

Curso 2005/06
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/8
I.S.B.N.: 84-7756-695-X

JAVIER HERNÁNDEZ BORGES

**Nuevas metodologías de análisis
de pesticidas por electroforesis capilar**

Directores

**FRANCISCO GARCÍA MONTELONGO
MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ DELGADO
ALEJANDRO CIFUENTES GALLEGO**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Agradecimientos

Resulta curioso comprobar que ni siquiera el lejano horizonte es tan inalcanzable como parece y que, algún día, con perseverancia, paciencia y ánimo, se consigue llegar a toda meta que uno se proponga. Esta Tesis ha sido el caso. Pero el camino recorrido no se podría haber hecho sin aquellos a los que uno aprecia, admira y quiere. Por eso, estas páginas que hoy escribo, en el laboratorio en el que he trabajado estos cuatro años, son para expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de una forma u otra, han hecho posible que este trabajo haya llegado a su fin.

Quisiera agradecer, en primer lugar, -aunque suene a tópico y no lo sea- a mis directores todo lo que he aprendido durante estos cuatro años ¡que ha sido mucho! A Montelongo, por haber comenzado esta aventura juntos; a Alejandro, por haberme acogido en su "laboratorio de electroforesis" como si hubiera formado parte de él desde el principio; a Miguel Ángel, por todos los momentos compartidos juntos en esta andadura en el laboratorio, en los cafés, en los pasillos, y también fuera de la facultad.

Agradecer también al Ministerio de Educación y Ciencia la beca FPU que ha supuesto el soporte económico personal, tan importante en estos casos.

A todos los miembros del Departamento de Química Analítica, en especial a los profesores Tere Borges, M^a Jesús Sánchez, Luis Galindo y Guillermo González por su inestimable ayuda y por hacerme partícipe de su "día a día".

Al profesor Josef Havel, de la Universidad de Masaryk, República Checa, el haberme aceptado en su laboratorio.

A la Dra. Elena Ibañez, del Instituto de Fermentaciones Industriales, Madrid, por toda la ayuda prestada.

A Gastón, M^a Lourdes, Ondrej, Sabina y Vlasta, de la Universidad de Masaryk, y a Carol, Miguel y Virginia, del Instituto de Fermentaciones, que han aguantado con paciencia la avalancha de "peticiones".

A Bea, Marisa, Yoli y Paco, por ser esa agradable brisa, tan necesaria, cuando uno se encuentra en la distancia.

A Coty, una de las principales "culpables" de que yo haya estudiado química.

A Pepe, por su apoyo constante, por todos los chistes, por los buenos consejos y por toda su ayuda.

A Guaci, Nicanor y Nisa, por su amistad incondicional que los ha hecho partícipes de todos los éxitos y de todas las derrotas de estos cuatro años.

A mi familia, mi hermana y mis padres, por su amor, cariño y apoyo constante y, sobre todo, por creer en algo que en muchos momentos resulta difícil de creer.

A Tere, porque esta aventura, al igual que la nuestra propia, la comenzamos casi a la vez. Gracias por estar siempre ahí dándolo todo.

A una persona que ha sido muy importante en mi vida y que sé, que esté donde esté, ha formado también parte importante de esto.

A todos, gracias.

Javier Hernández Borges, Septiembre 2005

A mi hermana

A mis padres

A Tere

Índice

ACRÓNIMOS	vii
CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1.-Pesticidas	3
I.1.1.- Génesis histórica	5
I.1.2.- Clasificación de los pesticidas	7
I.1.3.- Contaminación por pesticidas	9
I.1.4.- Límite máximo de residuos	12
I.1.5.- Legislación europea, estatal y autonómica en materia de pesticidas	13
I.1.6.- Métodos de análisis de pesticidas	18
I.2.- Preparación de la muestra para la determinación de analitos orgánicos	19
I.2.1.- Extracción líquido-líquido	20
I.2.2.- Extracción en fase sólida	21
I.2.3.- Extracción en punto de nube o <i>cloud point</i>	26
I.2.4.- Microextracción en fase sólida	28
I.3.- Electroforesis capilar	37
I.3.1.- Principios e instrumentación	39
I.3.2.- Modos de separación	42
I.3.3.- Sistemas de detección	45
I.3.4.- Técnicas de preconcentración en línea o de “ <i>stacking</i> ”	62
I.4.- Optimización y diseño experimental	67
I.5.- Estado actual de análisis de pesticidas por electroforesis capilar	74
I.5.1.- Técnicas de preconcentración fuera de línea	74
I.5.2.- Técnicas de preconcentración en línea	76
I.5.3.- Sistemas de detección	77

CAPÍTULO II.- OBJETIVOS	83
CAPÍTULO III.- MATERIAL Y MÉTODOS	87
III.1.- Reactivos y disoluciones	89
III.2.- Aparatos	90
III.3.- Programas informáticos	93
III.4.- Muestras reales	93
III.5.- Métodos	94
III.5.1.- Procedimiento SPME	94
III.5.2.- Procedimiento SPE	94
III.5.3.- Tratamiento de las muestras	95
III.5.4.- Activación de los capilares	95
III.5.5.- Protocolo de lavado de los capilares	96
CAPÍTULO IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
IV.1.- Análisis de un grupo de pesticidas mediante el uso combinado de microextracción en fase sólida con electroforesis capilar-espectrometría de masas. Optimización quimiométrica	101
IV.1.1.- Antecedentes	101
IV.1.2.- Separación por CE-UV	102
IV.1.3.- Optimización por CE-MS: Diseño experimental	110
IV.1.4.- Optimización del procedimiento de SPME	118
IV.1.5.- Aplicación del procedimiento de SPME-CE-MS a muestras reales	121
IV.1.6.- Conclusiones	123
IV.2.- Análisis de un grupo de pesticidas por electroforesis capilar con detección UV, combinada con microextracción en fase sólida y técnicas de preconcentración en línea	125

IV.2.1.- Antecedentes	125
IV.2.2.- Aplicación de técnicas de preconcentración en línea	126
IV.2.3.- Aplicación del método SPME-RP-SWMMR-CE-UV al análisis de muestras reales	136
IV.2.4.- Conclusiones	140
IV.3.- Determinación de herbicidas en aguas por electroforesis capilar con detección UV, combinando extracción en fase sólida y técnicas de preconcentración en línea	142
IV.3.1.- Antecedentes	142
IV.3.2.- Separación por CE-UV	144
IV.3.3.- Técnicas de preconcentración en línea	145
IV.3.4.- Validación del método	149
IV.3.5.- Procedimiento de SPE de aguas	149
IV.3.6.- Conclusiones	155
IV.4.- Análisis de herbicidas en bebidas de soja combinando extracción en fase sólida con electroforesis capilar-espectrometría de masas	157
IV.4.1.- Antecedentes	157
IV.4.2.- SPE-CE-UV de bebida de soja	157
IV.4.3.- Optimización por CE-MS	159
IV.4.4.- SPE-NSM-CE-UV de bebidas de soja	166
IV.4.5.- Conclusiones	168
IV.5.- Análisis de herbicidas en suelos por electroforesis capilar con detección UV, combinada con extracción en fase sólida e inyección electrocinética	170
IV.5.1.- Antecedentes	170
IV.5.2.- Separación por CE-UV	171
IV.5.3.- SPE-FESI-CE-UV de suelos	177
IV.5.4.- Conclusiones	179

CAPÍTULO V.- CONCLUSIONES GENERALES	181
ENGLISH SUMMARY (Resumen en Inglés)	185
ANEXOS	215
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	225

Acrónimos

ANDSA	Ácido 7-aminonaftalen-1,3-disulfónico
ANSA	Ácido 5-aminonaftalen-1-sulfónico
ANTS	Ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico
APCI	Ionización química a presión atmosférica
BGE	Electrolito de separación
CCR	Comisión conjunta de residuos
CCRP	Comité del Codex sobre residuos de pesticidas
CE	Electroforesis capilar
CEC	Electrocromatografía
CGE	Electroforesis capilar en gel
CIEF	Isoelectroenfoque
CMC	Concentración micelar crítica
CPE	Extracción en punto de nube o <i>cloud point</i>
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (o de cetiltrimetilamonio)
CTAC	Cloruro de hexadeciltrimetilamonio (o de cetiltrimetilamonio)
CW	Carbowax
CZE	Electroforesis capilar en zona libre
DAD	Detección por haz de diodos
DBB	Diseño de Box Behnken
DC	Corriente continua
DI-SPME	Microextracción en fase sólida con inmersión directa
DL ₅₀	Dosis letal para matar al 50% de los organismos
DVB	Divinilbenceno
EBE	Sector magnético
ECD	Detector de captura electrónica
EOF	Flujo electroosmótico
EPA	Agencia de protección medioambiental de los Estados Unidos
ESI	Interfase <i>electrospray</i>
FAB	Bombardeo con átomos rápidos
FAO	<i>Food and agricultural organization</i>
FASS	Inyección electrocinética o amplificación del campo

FASI	Inyección electrocinética o amplificación del campo
FESI	Inyección electrocinética o amplificación del campo
FID	Detector de ionización de llama
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMOOC	Cloroformiato de 9-fluorometilo
GC	Cromatografía de gases
HDB	Bromuro de hexadimetrino
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en espacio en cabeza
ICP	Plasma acoplado por inducción
ISP	Ionspray
IT	Trampa de iones
ITP	Isotacoforesis
LC	Cromatografía de líquidos
LIF	Fluorescencia inducida por láser
LMR	Límite máximo de residuos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MEKC	Cromatografía electrocinética micelar
MIP	Polímeros impresos molecularmente
MS	Espectrometría de masas
Mw	Peso molecular
NPD	Detector de nitrógeno-fósforo
NSM	<i>Stacking</i> en modo normal
OPA	o-ftaldialdehído
OMS	Organización mundial de la salud
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PMS	Polimetilsiloxano
PPMS	Polifenilmetilsiloxano

PPY	Polímeros de polipirrol
PS	Poliestireno
PONPE	Polioxietilen-7,5-nonilfeniléter
Q	Cuadrupolo
RP-NSM	<i>Stacking</i> en modo normal en polaridad inversa
RP-SWMR	<i>Stacking</i> con eliminación de matriz en polaridad inversa
SBSE	Extracción sobre barra agitadora
SDB-SA	Dodecilbencenosulfonato sódico
SDS	Docecilsulfatosódico (lauril sulfato sódico)
SDSA	Dodecanosulfonato sódico
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
SWMR	<i>Stacking</i> con eliminación de matriz
TEA	Trietilamina
TOF	Tiempo de vuelo
TPR	Resina templada
Triton X-100	Polioxietilen-9,5-octilfeniléter
Triton X-114	Polioxietilen-7,5-octilfeniléter
UV	Ultravioleta
VIS	Visible

Capítulo I

Introducción

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- Pesticidas

Desde 1950 la producción agrícola ha ido aumentando continuamente a un ritmo que ha superado con creces el tan importante aumento de la población. Este incremento se ha conseguido, principalmente, sin poner nuevas tierras en cultivo, sino aumentando el rendimiento por superficie, es decir, consiguiendo una mayor producción por cada hectárea cultivada. Dicho aumento de la productividad se ha desarrollado con la difusión de nuevas variedades de cultivo de alto rendimiento, unido a nuevas prácticas agrícolas que utilizan grandes cantidades de fertilizantes y pesticidas, así como tractores y otra maquinaria pesada. Los beneficios alcanzados por esta mejora agrícola son indiscutibles, pero han surgido diversos problemas entre los que destacan los daños medioambientales generados, incluyendo la erosión del suelo, la salinización y el anegamiento de suelos muy irrigados, el agotamiento de acuíferos, deforestación, etc. y la contaminación del medioambiente por el uso excesivo de pesticidas.

La denominación de *pesticidas* o *plaguicidas*, incluye una amplia variedad de productos muy diferentes en su composición y propiedades a pesar de su utilización común. Para los fines del *Codex Alimentarius* (Comisión creada en 1963 por la *Food and Agricultural Organization*, FAO, y la Organización Mundial de la Salud, OMS o WHO, *World Health Organization*, pertenecientes a la ONU), se entiende por *plaguicida* o *pesticida*, “cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción y/o almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos”. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el

producto contra su deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales.

Actualmente, se utilizan cada año en Europa cerca de 300000 toneladas de pesticidas. Muchos de ellos presentan una alta toxicidad así como una gran persistencia y movilidad medioambiental, lo que los convierte en uno de los grupos de contaminantes más importantes. Se han detectado residuos de pesticidas en alimentos, aguas, suelos, fluidos biológicos, etc. (Dean y col., 1996; Ahmed, 2001; Barr y Needham, 2002; Berrada y col., 2003) y en lugares tan remotos como la Antártida o el Ártico. Se han barajado cifras tan impactantes, como que en algunos casos se calcula que anualmente se consume más de medio kilo de pesticida por persona (Coscolla, 1993). La Comunidad Autónoma de Canarias es, de toda España, la que más pesticidas utiliza en su agricultura (Zumbado y col., 2004), hasta tal punto que existen evidencias de la existencia de restos de pesticidas en aves de Canarias (Mateo y col., 2000), hojas de pino canario (Villa y col., 2003) y también en humanos (Zumbado y col., 2004), en este último caso en cantidades superiores a la media europea.

La peligrosidad de estos compuestos presenta varios aspectos: peligrosidad en su fabricación y formulación, peligrosidad para el agricultor que entra en contacto con ellos, peligrosidad ecológica asociada a desequilibrios en el medio ambiente y peligrosidad para el consumidor. A pesar de todos los inconvenientes que plantean, difícilmente se puede prescindir de su uso en el estado actual de desarrollo de nuestra agricultura. El riesgo que plantea su aplicación puede verse reducido considerablemente si se aplican correctamente a los cultivos para los que han sido elaborados, siguiendo las correspondientes medidas de seguridad, aplicando las dosis adecuadas y, además, respetando los correspondientes *días de descanso*. Pero estas premisas muchas veces no se cumplen y, si no hay control alguno que lo impida, el alimento llega al consumidor con unos niveles de pesticidas superiores a los que debería contener.

I.1.1.- Génesis histórica

Los pesticidas han sido utilizados en cierta manera desde tiempos muy remotos (Costa y col., 1987). El *papiro de Ebers*, escrito sobre el año 1550 a. de C., recoge la utilización de ciertos preparados “médicos o farmacéuticos” que se utilizaban para repeler insectos de las casas. Incluso Homero (1000 a. de C.) menciona en la Odisea la quema de azufre para “*purgar las casas, las habitaciones, etc.*” (*La Odisea*, Capítulo XXII). Dioscórides, médico griego (40-90 a. de C.), ya conocía las propiedades tóxicas del azufre y del arsénico. Hay evidencias de que incluso alrededor del año 900 a. de C. los chinos utilizaban arsenicales para eliminar insectos de los jardines. Los romanos, por su parte, utilizaban dos especies de plantas (*Veratrum album L.* y *V. nigrum L.*, pertenecientes a la familia de las *liliáceas*) como raticidas (Shepard, 1939).

La evidencia más antigua que se tiene en occidente del uso de pesticidas, data de 1669, cuando se utilizaron arsenicales como insecticidas para eliminar plagas de hormigas en mieles. Por otro lado, el uso de compuestos de cobre como fungicidas se conoce desde 1807, mientras que el ácido cianhídrico, por ejemplo, ya conocido por los egipcios y romanos como un potente veneno, fue utilizado a partir de 1877 para fumigar los museos que guardaban colecciones de insectos (Shepard, 1939).

Hasta mediados de los años treinta, los pesticidas utilizados eran de origen natural o bien compuestos inorgánicos. El tabaco (nicotina) fue y todavía es utilizado en muchos países como insecticida. El azufre, por ejemplo, se empezó a utilizar con bastante frecuencia a principios del siglo XIX, época en la que ya se conocían sus propiedades como pesticida y, a pesar de la aparición de pesticidas organosulfurados como el *captan*, *maneb* u otros a finales de la década de los 50, todavía hoy es utilizado con frecuencia dada su baja toxicidad comparada con otro tipo de compuestos. El cloruro de mercurio fue ampliamente utilizado como fungicida a partir de 1891 y fue poco a poco reemplazado por formas mercuriales orgánicas como el fenilmercurio (1915), alquiloalquimercurio (década de los 20) y alquimercurio (década de los 40). Los graves envenenamientos acaecidos en lugares como Irak (1971-1972) por el consumo de

cereales que contenían estos productos de mercurio hicieron que se prohibiera su uso.

Los primeros pesticidas de síntesis orgánica aparecieron a principios de la década de los 30 y contenían grupos nitrogenados y tiocianatos. Entre 1935 y 1950 aparecieron los pesticidas organoclorados, entre los que se encuentra el DDT que, aunque fue sintetizado por Zeidler en 1874, no fue hasta 1939 cuando el Dr. Paul Muller descubrió su uso como insecticida, por el que le dieron el Premio Nobel de medicina en 1948. Desde entonces el DDT fue ampliamente utilizado para la eliminación de plagas y fue de gran utilidad para erradicar enfermedades como el tifus o la malaria en muchos países. Con la aparición de la cromatografía de gases en 1962, se pudo comprobar la presencia de residuos de plaguicidas clorados en toda la superficie terrestre, sobre todo de DDT, de ahí que a partir de 1970 fuera prohibido su uso por su alta persistencia, su capacidad de acumulación en tejidos grasos y su alta toxicidad, aunque todavía hoy se encuentran restos de DDT en muestras de diversa índole. En España existen algunos organoclorados que todavía se comercializan como el *metoxiclor* o el *lindano*.

Por otro lado, entre 1940 y 1970 aparecieron los compuestos organofosforados y los carbamatos, que presentan menor persistencia medioambiental que los anteriores, y que han sido utilizados hasta nuestros días. Quizás, el grupo de pesticidas más importante de reciente introducción sean los piretroides o piretrinas sintéticos, muchos de los cuales se encuentran, de forma natural, presentes en las flores de los crisantemos y otros.

Aunque hasta el momento son muchas las familias de pesticidas existentes, se están desarrollando los denominados *biopesticidas* o pesticidas bioquímicos que son sustancias naturales (de origen animal o vegetal, bacterias, minerales, etc.) capaces de controlar plagas por mecanismos que no implican una vía tóxica como los anteriores. En este grupo de compuestos se incluyen las feromonas que son utilizadas para atraer insectos hacia trampas adecuadas. Debido a la dificultad existente para poder asegurar que un determinado producto es efectivamente un *biopesticida*, la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA, <http://www.epa.gov>), entre otros organismos,

ha designado comités especiales con este fin. Por otro lado, la *ingeniería genética* también ha generado especies vegetales resistentes a ciertas plagas, de forma que estos vegetales sean capaces de sintetizar sustancias capaces de combatirlas.

I.1.2.- Clasificación de los pesticidas

Antes de hablar de la clasificación de los pesticidas, es importante resaltar que con objeto de proceder a su registro, así como de legislar acerca de sus contenidos en alimentos y del comercio de las diferentes fórmulas comerciales, los pesticidas reciben nombres generalmente cortos, distintivos, que no los vincule a ninguna compañía que los manufacture y que sean ampliamente aceptados por la comunidad científica, ya que la nomenclatura sistemática pocas veces es corta y no resulta nada práctico su uso. Actualmente, ya han sido asignados más de mil nombres oficiales por la *International Organization of Standardization* (ISO, <http://www.hdrss.demon.co.uk>; <http://www.iso.org>) con este fin.

Actualmente, la clasificación de los pesticidas se puede hacer en función de diferentes criterios como su campo de acción, grado de penetración, estabilidad, toxicidad, semejanza química, etc. Una clasificación bastante extendida en su uso diario es la generada atendiendo al objetivo o campo de acción al que están destinados. Siguiendo este criterio, la EPA, entre otros, clasifica a los pesticidas tal como se describe en la Tabla I.1.1.

La OMS, por su parte, recomienda clasificar a los pesticidas en función de su toxicidad (*The WHO recommended classification of pesticides by hazard*, 2004), atendiendo a dos posibles vías de contacto (oral y tópica) y a la formulación del producto (sólido o líquido), tal como muestra la Tabla I.1.2. Un indicador de la toxicidad de un compuesto puede ser la DL_{50} , *dosis letal*, que es la cantidad susceptible de provocar la muerte de un 50% de los animales de experimentación (generalmente ratas). Extrapolando los valores obtenidos en animales a las personas, pueden estimarse unas DL_{50} aproximadas para los seres humanos. Aunque lógicamente existe un margen de

error en esta extrapolación, los valores obtenidos dan una orientación sobre la toxicidad del producto en su utilización práctica. En lo que a las DL_{50} como indicadores de toxicidad se refiere, la EPA también plantea una clasificación parecida a la de la OMS.

Tabla I.1.1.- Clasificación de los pesticidas en función de su campo de acción (EPA).

Tipo de plaguicida	Organismo objeto
Acaricidas	Ácaros
Antibióticos	Microorganismos
Alguicidas	Algas
Avicidas	Pájaros
Bactericidas	Bacterias
Defoliantes	Hojas de plantas
Desinfectantes	Microorganismos
Fumigantes	Plagas en edificios, suelos, etc.
Fungicidas	Hongos
Herbicidas	Plantas
Insecticidas	Insectos
Larvicidas	Larvas de insectos
Molusquicidas	Caracoles, babosas
Nematocidas	Nematodos
Ovicidas	Huevos de insectos
Pisticidas	Peces
Repelentes	Insectos, pájaros
Raticidas	Roedores

Es importante destacar, que las DL_{50} representan una medida de la *toxicidad aguda*, pero el peligro de ingerir una dosis superior a las DL_{50} sólo ocurre normalmente por error, accidente, ignorancia o suicidio. Desde el punto de vista de los residuos de estos compuestos, interesa mucho más su toxicidad a corto y medio plazo (*toxicidad subcrónica*) y sobre todo a largo plazo (*toxicidad crónica*, como es el caso del desarrollo de un cáncer, por ejemplo), que se averigua también con otros ensayos en diferentes animales.

Otra clasificación bastante extendida es la que se realiza en base a la estructura química de los compuestos, sin embargo, esta clasificación es relativamente compleja ya que existen multitud de clases de pesticidas como puede apreciarse en diversos manuales de pesticidas, como por ejemplo, *The e-pesticide manual* del British Crop Protection Council que es editado cada año.

Tabla I.1.2.- Clasificación recomendada por la OMS
(*The WHO recommended classification of pesticides by hazard*, 2004).

Clasificación	DL ₅₀ en ratas (mg/kg de peso del animal)			
	Vía Oral		Vía tópica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Extremadamente tóxicos	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Altamente tóxicos	5-50	20-200	10-100	40-400
Moderadamente tóxicos	50-500	200-2 000	100-1 000	400-4 000
Ligeramente tóxicos	>500	>2 000	>1 000	>4 000

I.1.3.- Contaminación por pesticidas

Desde la Segunda Guerra Mundial, debido al desarrollo tecnológico, grandes cantidades de compuestos químicos de síntesis, probablemente desconocidos por los organismos vivos (xenobióticos), han sido introducidos en el medio ambiente. Algunos de estos compuestos se degradan fácilmente o son transformados en sustancias naturales o inertes, mientras que otros son altamente persistentes y, además, son fácilmente transportados hacia lugares muy alejados de sus focos de emisión. Sobre los años sesenta, la comunidad científica empezó a darse cuenta del peligro potencial que presentaban muchos de estos compuestos para el medio ambiente, de forma que las publicaciones científicas al respecto comenzaron a crecer exponencialmente, incluidas aquellas relacionadas con el análisis de pesticidas.

Generalmente, los pesticidas son aplicados en estado líquido en forma de *spray* sobre el cultivo y/o suelo, aunque algunas veces se incorporan directamente como sólidos (polvo o gránulos) o a través del tratamiento de las semillas. En la industria

química, la formulación de estos productos suele tener entre un 75 y un 99% de pureza. Hay que tener en cuenta que no todo el pesticida que se aplica alcanza su objetivo, pues una parte va a parar al suelo, otra sufre los efectos de la deriva, otra se evapora en el momento de la aplicación, etc., es decir, sólo una parte más o menos importante de la depositada es absorbida. Este porcentaje depende de la naturaleza del pesticida, de la formulación del producto (concentración, dosis y presencia de coadyuvantes que aumenten la retención por la planta), de las características de la aplicación (pulverización, espolvoreo, etc.), condiciones climáticas, y morfología y naturaleza de la superficie vegetal.

Una vez que se encuentra el pesticida sobre el vegetal, a lo largo del tiempo, los residuos van disminuyendo progresivamente por acción de diversas causas, como el crecimiento del órgano vegetal tratado, eliminación por agentes mecánicos como el viento y la lluvia, o por causas físicas como la volatilización y solubilización, degradación química, etc. Dicha disminución depende, por un lado, de la naturaleza de la especie vegetal así como de la velocidad del desarrollo de la misma y, por otro, de las características del pesticida y de la formulación aplicada, así como de todo un conjunto de factores climáticos.

La contaminación del medioambiente por pesticidas se produce por aplicaciones directas en los cultivos agrícolas, derrames accidentales, lavado inadecuado de tanques o contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamiento y residuos descargados o depositados en el suelo. Una vez en el suelo, los pesticidas pueden pasar a aguas superficiales y subterráneas por lixiviación, dependiendo de sus características químicas tales como solubilidad en agua, capacidad de adsorción sobre el suelo, capacidad de ionización, etc., del tipo de suelo (contenido en arcillas, en materia orgánica, porosidad, etc.), así como de las características topográficas o climáticas (temperatura o grado de precipitación acuosa, etc.). De forma genérica, la ausencia de luz, entre otros, hace que la degradación de los pesticidas en aguas subterráneas sea lenta. Por otro lado, existe una fracción del producto de aplicación que se volatiliza y pasa a la atmósfera, de forma que son transportados por el viento y, a su vez, pueden volver a la superficie terrestre

con las lluvias o por deposición sólida.

Para evaluar la distribución ambiental de un pesticida se utilizan parámetros como la constante de Henry, solubilidad en agua, coeficiente de adsorción en suelos, su coeficiente de partición octanol/agua, etc. El valor numérico de estos parámetros determina el grado de afinidad del pesticida por los sistemas bióticos (animales y plantas) y por los abióticos (suelo, aire y agua).

A pesar de que los pesticidas actuales no son altamente persistentes en el medio, el principal problema que se plantea es que muchos de ellos son empleados en concentraciones muy por encima de las recomendadas o bien, a pesar de estar prohibido el uso de ciertos grupos de ellos, se utilizan ilegalmente o erróneamente en muchos lugares (por ejemplo, pesticidas de aplicación floral no permitidos en frutas o vegetales). Además, hay que tener en cuenta que los que están permitidos en ciertos países, pueden no estarlo en otros.

El ser humano puede ingerir residuos de pesticidas al consumir productos vegetales que hayan sido tratados con los mismos y, también, al consumir alimentos de origen animal que hayan podido acumular esos residuos. Cuando el pesticida presenta cierta resistencia y, además, es soluble en las grasas (tejidos adiposos), dado que las cadenas alimentarias comienzan en los vegetales y terminan en los animales superiores, en esos últimos casos pueden encontrarse cantidades mayores de pesticidas persistentes debido a su sucesiva acumulación en la cadena alimentaria. Actualmente, con la prohibición del uso de pesticidas clorados de alta persistencia, este problema se ha reducido considerablemente. Los productos actuales, aunque tienen una velocidad de degradación más rápida, pueden causar cierta contaminación, aunque el problema sea mucho menor que antes.

En lo que a la exposición del ser humano a residuos de pesticidas se refiere, el grado de exposición depende de dos factores claramente diferenciados: por un lado, de los tratamientos efectuados por los agricultores y, por otro, de la composición de la dieta

alimentaria media en la zona geográfica considerada. Conocer este grado de exposición es importante, pero ello exige realizar estudios rigurosos a nivel estatal, regional y local, considerando tanto alimentos vegetales como animales.

I.1.4.- Límite máximo de residuos (LMR)

El problema de la presencia de residuos de pesticidas en los alimentos está tomando una importancia cada vez mayor, hasta tal punto que, actualmente, se ha convertido en una constante preocupación para los consumidores. Donde ha tenido mayor importancia es en el comercio internacional, dado que ciertos países son especialmente severos con los contenidos en residuos de determinados pesticidas y disponen de medios para realizar los análisis pertinentes.

Está claro que la presencia de residuos de estos productos en cantidades demasiado elevadas en los alimentos (superior a la legislación señalada por cada país en este sentido) puede presentar un riesgo importante para la salud humana, de ahí que sea necesario realizar multitud de controles para asegurar que los productos agroalimentarios están exentos de pesticidas o bien que éstos se encuentran en concentraciones inferiores a los valores permitidos. Quizás, donde más peligro existe, es en el consumo interno de cada país, ya que la gran mayoría de los vegetales, frutas, hortalizas, etc. van directamente desde la zona de cultivo hasta los puntos de venta, sin control alguno. En este sentido también, se hace necesario el desarrollo de técnicas analíticas rápidas, fiables y, cada vez más, compatibles con el medio ambiente que permitan la determinación de pesticidas en un amplio espectro de muestras.

El *Codex Alimentarius* (FAO/OMS) entiende por *residuo de pesticida o plaguicida* a “*toda/s sustancia/s presente/s en un producto alimenticio destinado al hombre o a los animales como consecuencia de la utilización de un plaguicida*”. Engloba por tanto, no sólo los restos del plaguicida en su forma molecular original, sino también todos sus metabolitos, productos de reacción e impurezas con significación toxicológica. También define el *límite máximo de residuos* (LMR) como “*la concentración máxima de residuos*

de un plaguicida (expresada en mg/kg) para que se permita legalmente su uso, en la superficie o en la parte interna de los productos alimenticios para consumo humano y de piensos". Los LMR se basan en datos de *buenas prácticas agrícolas* y tienen por objeto lograr que los alimentos derivados de productos básicos que se ajustan a los respectivos LMR sean, desde un punto de vista toxicológico, aceptables. De esta forma, los objetivos fundamentales del establecimiento de los LMR son tres: por un lado, controlar el uso de productos fitosanitarios y, por otro, proteger al consumidor y facilitar el comercio. Son establecidos en base a una compleja documentación que implica un estudio de las propiedades de los compuestos, análisis toxicológicos, estudios de metabolismo, métodos de análisis químico, riesgo al consumidor, etc. que es exhaustivamente evaluada antes de fijar el resultado final.

En lo que al análisis de pesticidas se refiere, los LMR son, sin duda alguna, un dato imprescindible a la hora de desarrollar una metodología analítica apropiada para este tipo de compuestos.

I.1.5.- Legislación europea, estatal y autonómica en materia de pesticidas

Aún antes de existir normativas respecto a la fijación de los LMR, ya habían empezado los muestreos y análisis de productos vegetales. Ya en 1926, antes incluso de descubrirse los pesticidas de síntesis orgánica, la división de química del Departamento de Agricultura del estado de California, analizaba diversos cargamentos de peras que habían sido tratadas con arsenicales. La razón la encontramos en las exigencias al respecto de los países europeos importadores, sobre todo de Gran Bretaña (Okumura, 1991). Incluso con anterioridad (1916), un decreto francés limitaba la aplicación de arsenicales en estados fenológicos precoces: envero en la viña y dos meses antes de la recolección en manzanos (Casanova, 1983). Pero el concepto actual de tolerancia arranca en 1954 en Estados Unidos, con la aprobación de la *Ley Miller* o "*Pesticide Chemicals Amendment to the Federal Food, Drug and Cosmetic Act*" (Rivero, 1960). En 1961, este concepto adquirió dimensiones internacionales cuando el "*Joint FAO/WHO Committee on Food Additives*" inició el procedimiento para establecer las tolerancias de

los pesticidas, de forma que en 1966, la comisión del *Codex Alimentarius* de dicho organismo (creada en 1963), creó el Comité del Codex sobre Residuos de Pesticidas (CCRP) que supone definitivamente el punto de partida a nivel mundial a la hora de fijar los LMR en productos de origen animal y vegetal. Así, en la mayor parte de los países europeos, esta normativa se inició en los años 60 y 70.

Los antecedentes de la fijación de los LMR en España los encontramos en 1973, año en el que se crea en nuestro país la “Comisión de Expertos para el Estudio y la Clasificación de Productos Fitosanitarios” que, entre otros, establece las condiciones de autorización de los productos fitosanitarios, de forma que no superen los indicados por el CCRP. En 1979, concretamente el 20 de febrero, se publica en España la primera orden que establece los LMR para productos de origen vegetal. Posteriormente, el R.D. 3349/1983 de 30 de noviembre, aprueba una reglamentación técnico-sanitaria en la que, entre otras cosas, se establecía la fijación de LMR toxicológicamente aceptables para aquellas sustancias que constituyeran los compuestos activos de los preparados. El 18 de junio de 1985 se crea la “Comisión Conjunta de Residuos de Productos Fitosanitarios” (CCR) en cumplimiento del artículo 4.3.2 del R.D. 3349/1983 cuya principal función radicaba en fijar los LMR en productos vegetales. Como consecuencia, y por la necesidad de fijar directivas comunitarias sobre estos residuos, tras la incorporación de España a la CEE, se publicaron dos órdenes en las que se fijaban los LMR en productos vegetales, la del 11 de marzo de 1987 y la del 27 de octubre de 1989. Pero hasta el año 1994, R.D. 280/1994 de 18 de febrero, no se llega al marco actual de la fijación de LMR en España, que incorpora directivas comunitarias, entre otras, la Directiva 90/642/CEE del Consejo, de 27 de noviembre.

La primera referencia comunitaria sobre residuos de pesticidas fue la 76/895/CEE de 9 de diciembre, siendo su ámbito de actuación el de frutas y hortalizas (excluyendo las patatas). En esta primera directiva, en la que se ponía de manifiesto la necesidad de ejercer un control oficial de los residuos de pesticidas, fueron establecidos LMR de grupo, no individuales, y se dejaba abierta la posibilidad de que los estados miembros establecieran, si así lo consideraban, LMR superiores a los establecidos en

esta normativa.

La posterior publicación de la directiva 86/361/CEE de 7 de agosto, amplió el marco de actuación de la anterior a los cereales. En esta directiva, los LMR en el caso de los cereales eran de obligado cumplimiento por todos los estados miembros, salvo cuando el grano no era destinado al consumo inmediato. Además, la directiva no era aplicable a cereales de exportación, ni a los productos que no se destinarían a alimentación, ni a granos utilizados en la siembra.

La directiva 90/642/CEE de 14 de diciembre, pretende solucionar problemas inherentes a las anteriores, como el hecho de que hubiera LMR mínimos y no máximos y de que se incluyera un número reducido de productos comercializados. En esta directiva, los LMR son de obligado cumplimiento incluso para productos para exportación, de forma que cobra gran importancia, por parte de la administración, la necesidad de llevar a cabo un control oficial en este aspecto.

Pero unos años después de la implantación de la directiva de 1990, se comprobó que la misma presentaba algunas deficiencias que fueron enmendadas con la 97/41/CE en la que, entre otros, se aprueba por primera vez la necesidad de evaluar el riesgo al consumidor antes de aprobar un LMR, con un número de datos suficientemente fiables.

El marco actual de la legislación nacional sobre residuos de plaguicidas se localiza en el R.D. 280/1994 que traspone las tres directivas comunitarias. Dicho decreto fue modificado por el R.D. 198/2000 para incluir los cambios de la Directiva 97/41/CE, incorporando todos los aspectos de las mismas. Cabe resaltar el hecho de que este decreto permite autorizar el uso de un determinado producto fitosanitario, sin que se haya publicado previamente el correspondiente LMR. Es importante también resaltar, que el R.D. 2163/1994 de 4 de noviembre, por el que se implanta el sistema armonizado comunitario de autorización para la comercialización y autorización de productos fitosanitarios, establece también que ningún país perteneciente a la CE puede obstaculizar ni prohibir la introducción en territorio nacional de productos vegetales que

contengan residuos de plaguicidas por debajo de los LMR establecidos como provisionales por otros estados miembros, lo que supone una aceptación por parte de España de dichos LMR aunque no estén publicados en la normativa española. Hay que señalar también que el R.D. 198/2000 ha sido modificado hasta estas fechas en unas 31 ocasiones para actualizar su contenido como aparece indicado en la Orden PRE/1041/2005, de 22 de abril, y que supone la última incorporación al ordenamiento jurídico interno del R.D. 280/1994 de dos directivas comunitarias del 2004 (2004/95/CE de 24 de septiembre y 2004/115/CE de 15 de febrero) que, entre otras, modificaron por última vez la directiva 90/642/CEE.

En la Comunidad Autónoma de Canarias, actualmente está vigente el Primer Plan Canario de I+D+I (PIC) 2003-2006 aprobado en marzo de 2003, que supone la primera actuación del Gobierno Autónomo de Canarias en este sentido. En dicho plan, quedan establecidas en el punto 2.4.3, las *áreas científico-tecnológicas focalizadas* que ha identificado el Gobierno de Canarias como áreas prioritarias de actuación en materia de I+D+I. En dicho punto, entre las ocho áreas prioritarias, se incluyen tanto la *Biomedicina y salud* como la *Agroalimentación*. En la primera de ellas, una de las áreas de actividad fundamentales de aplicación del plan se encuentra “*el combatir la contaminación medioambiental en alimentos, aguas naturales, aguas del mar, suelos y atmósfera*”, mientras que en la segunda, se encuentra “*la seguridad y calidad de los alimentos*”. Tanto en un caso como en otro, se hace necesario el desarrollo de políticas de actuación en materia de concienciación de la población, mejora de infraestructuras, personal, etc. para la determinación de pesticidas en un amplio espectro de matrices, con objeto de asegurar la calidad alimentaria y prevenir riesgos para la salud humana.

Recientemente, el Gobierno Autónomo de Canarias ha creado mediante la ley 1/2005 de 22 de abril (BOC del 28 de abril de 2005) el Instituto Canario de Calidad Agroalimentaria. En dicha ley, se subraya el hecho de que: “*En el plano social de Canarias, tenemos una sociedad muy exigente con la calidad de los productos agroalimentarios a través de su identificación, encontrándonos, incluso, con un amplio sector de la población que demanda productos sometidos a procesos de producción,*

transformación, en su caso, y comercialización, distintos de los tradicionales, como lo son la agricultura ecológica y la integrada. Se hace imprescindible, por tanto, un sistema de certificación y acreditación que funcione correctamente. La importancia de las funciones públicas relacionadas con la calidad de los productos agroalimentarios hace necesaria la puesta a disposición de los ciudadanos de un servicio de calidad agroalimentaria acorde, por un lado, con la rapidez con que acontecen los hechos y se dictan normas en este sector y, por otro, con la necesidad de especialización requerida, debida al contenido altamente técnico de la materia.”

En el Artículo 2, apartado 2 de dicha ley, referido al objeto y funciones del citado instituto, se encomienda al Instituto el ejercicio de la promoción, fomento, protección y control de la calidad agroalimentaria, incluida la potestad sancionadora inherente a las mismas y, especialmente, las siguientes:

- a) Llevar a cabo propuestas de disposiciones de carácter general en materia de calidad agroalimentaria.
- b) Aplicar la normativa europea, estatal y autonómica, en materia de calidad agroalimentaria y velar por su cumplimiento.
- c) Promocionar los productos agrarios y agroalimentarios originarios de Canarias.
- d) Promover la investigación aplicada a la calidad agroalimentaria.
- e) Efectuar el control de residuos de plaguicidas en productos agroalimentarios, adoptando medidas de intervención y sanción, en su caso.

A la vista de la legislación vigente, así como de las directrices tanto europeas como estatales y autonómicas existentes en lo que a materia de seguridad alimentaria se refiere, se hace necesario el desarrollo de metodologías analíticas que permitan determinar residuos de pesticidas en un amplio espectro de matrices, a nivel de sus LMR. Es más, las nuevas metodologías desarrolladas deben estar de acuerdo con otras directrices europeas que señalan que dichas metodologías deben ser rápidas, fiables y compatibles con el medio ambiente.

I.1.6.- Métodos de análisis de pesticidas

Los más recientes artículos de revisión (Sabik y col., 2000; Ahmed, 2001; Andreu y Picó, 2004) muestran los diferentes procedimientos de extracción a los que se suelen someter las muestras (principalmente aguas, suelos y frutas) para su posterior análisis y cuantificación, en lo que a contenido en pesticidas se refiere. En este sentido, las técnicas de pretratamiento de muestra más utilizadas son la extracción en fase sólida (SPE), la microextracción en fase sólida (SPME) y la extracción líquido-líquido (LLE) -esta última cada vez menos- aunque actualmente se están utilizando en mayor número técnicas como la extracción asistida por microondas o la extracción con fluidos supercríticos. En todas ellas se están aplicando, cada vez más, técnicas quimiométricas para la rápida optimización de los parámetros experimentales (Sun y Lee, 2003; Prado Rosales y col., 2004).

En lo que a las técnicas de separación se refiere, hoy en día la cromatografía de gases (GC) es la técnica más ampliamente empleada para el análisis multiresidual de plaguicidas, siendo, en general, capaz de conseguir los límites de detección más bajos (en el rango de los $\mu\text{g/l}$ incluso en algunos casos ng/l). Muchos métodos oficiales de análisis están basados en esta técnica en los que se utilizan diferentes detectores, como el de nitrógeno y fósforo (NPD), de captura electrónica (ECD), de ionización de llama (FID) o de espectrometría de masas (MS). En este último caso, dada las ventajas actuales que presenta la detección por MS, ésta es cada vez más utilizada, siendo el impacto electrónico la técnica de ionización más utilizada en casi todos los casos (Andreu y Picó, 2004).

Sin embargo, el análisis de compuestos de alto peso molecular, altamente polares o térmicamente lábiles presenta grandes dificultades o es prácticamente imposible de realizar mediante GC. Este hecho ha provocado que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) haya ido ganando terreno en el análisis de este tipo de compuestos y, más aún, con su acoplamiento a un espectrómetro de masas. La técnica HPLC presenta también la ventaja adicional de permitir derivatizaciones pre- y post-

columna de los analitos con objeto de mejorar su detección. El reciente desarrollo de columnas de cromatografía líquida que contienen polímeros impresos molecularmente (MIP) ha sido bastante popular en el análisis de pesticidas dada su gran estabilidad, bajo coste y sencillez de preparación (Ahmed, 2001).

Aunque la GC y el HPLC son las dos técnicas fundamentales en el análisis de pesticidas, en los últimos años se ha desarrollado ampliamente una técnica alternativa, la electroforesis capilar (CE), en la que se basa la parte experimental de esta Tesis Doctoral y que se presentará detalladamente en el punto I.3 de esta introducción.

I.2.- Preparación de la muestra para la determinación de analitos orgánicos

El *proceso analítico* se define como “*el conjunto de operaciones comprendidas entre la muestra –sin tomar, sin medir, sin tratar- y los resultados expresados según los requerimientos*”. Dentro del mismo, se distinguen tres grandes etapas: las operaciones previas, que preparan a la muestra para la medición analítica en sí, la medición y la transducción de la señal analítica, y la toma y el tratamiento de los datos. En la mayoría de los procesos analíticos actuales, más del 80% del tiempo de análisis se invierte prácticamente en la toma y pretratamiento de la muestra. Pretratamiento que, por otro lado, es imprescindible en la actualidad dado que en una determinada muestra existen multitud de compuestos que pueden interferir en la medida analítica, siendo muy pocas las muestras que actualmente pueden ser analizadas directamente.

Durante la etapa de pretratamiento de la muestra se persigue, por un lado, el aislamiento del analito de la propia matriz de la muestra o, lo que es lo mismo, disponer del analito en el estado más puro posible para posteriormente cuantificarlo con fiabilidad y, por otro lado, la preconcentración del mismo, sobre todo si se encuentra a concentraciones muy bajas. Todo ello evitando la pérdida del mismo durante todo el proceso, así como su posible degradación y la contaminación de la muestra. El pretratamiento se podría subdividir a su vez en tres etapas que, en la práctica, pueden

llevarse a cabo simultáneamente: extracción, preconcentración y limpieza (*clean-up*).

Entre las principales técnicas de pretratamiento de muestra actuales para analitos orgánicos, destacan la LLE, SPE, SPME y la extracción en punto de nube o *cloud point* (CPE). A continuación se da una breve descripción de las mismas, prestando especial atención a la SPE y SPME, que han sido las técnicas utilizadas en la presente Tesis Doctoral.

I.2.1.- Extracción líquido-líquido (LLE)

La LLE ha sido, y quizás todavía sigue siendo, la técnica de extracción, preconcentración y limpieza más utilizada hasta el momento. Se basa en la distribución de la muestra entre dos fases inmiscibles en las que el analito y la matriz tienen solubilidades diferentes. Casi siempre una de las fases es acuosa y la otra orgánica, de forma que tanto la eficacia como la selectividad del proceso dependen de la naturaleza de ambos disolventes. La selectividad depende, además, de todas aquellas variables que puedan afectar al proceso de equilibrio, como el pH, la temperatura, la adición de sales (como cloruro sódico, sulfato sódico, sales de aluminio y de hierro, etc. que originan el efecto *salting out*), presencia de agentes complejantes, uso de reactivos formadores de pares iónicos o de mezclas de disolventes, etc.

Los disolventes a utilizar deben seleccionarse de acuerdo con la inmiscibilidad de ambas fases y la polaridad del analito. En principio debería elegirse como extractante un disolvente puro o mezclas de disolventes con ciertas características. Por un lado, su solubilidad en agua debe ser inferior al 10%, deben ser volátiles para facilitar su posterior evaporación y, además, deben ser compatibles con las técnicas analíticas utilizadas posteriormente. Por otro lado, deben permitir obtener un valor de la constante de distribución elevado para los analitos de interés aumentando la concentración de los analitos en la fase orgánica.

La LLE puede llevarse a cabo de cuatro formas diferentes: extracción discontinua

(en una o varias etapas), continua, en contracorriente y en línea (Cela y col., 2002). La elección de una u otra dependerá de las características de la muestra, de los analitos, así como de las constantes de distribución. El principal inconveniente que presenta la técnica en casi todas sus formas de aplicación, es la gran cantidad de disolventes orgánicos que se utilizan (en la extracción en línea se utilizan menores cantidades), así como la necesidad de introducir etapas de evaporación de los mismos.

I.2.2.- Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE es una técnica de preparación y tratamiento de muestras, basada en la retención selectiva de los analitos y su posterior elución. En ella, los solutos son extraídos de una fase líquida o gaseosa mediante una fase estacionaria sólida apropiada, que generalmente se encuentra en el interior de los denominados *cartuchos*, formada por pequeñas partículas que presentan una gran afinidad por los analitos que, una vez extraídos, pueden ser eluidos de la fase estacionaria con un disolvente adecuado.

Los comienzos de la SPE como tal, pueden situarse en la década de los años sesenta, de forma que sus primeras aplicaciones se desarrollaron en la extracción de compuestos orgánicos de muestras acuosas. Por esta época, la compañía Rohm y Hass introduce una resina de poliestireno (PS, Amberlite XAD-1) que fue utilizada por Riley y Tailor (1969) para la preconcentración de compuestos orgánicos (contaminantes, carbohidratos, aminoácidos y ácidos húmicos) de muestras de aguas. A principios de los años setenta, aparecen en el mercado nuevas resinas como las de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB, Amberlite XAD-2, XAD-4) o las de poliacrilato (PA, Amberlite XAD-7 y XAD-8), que comenzaron a utilizarse cada vez más. Uno de estos primeros trabajos fue desarrollado por Burnham y col. (1972), para la preconcentración de fenoles y cresoles en muestras de aguas. El desarrollo de este novedoso sistema de extracción, conjuntamente con el hecho de que estos investigadores contaran con uno de los primeros sistemas GC-MS disponibles, permitió avanzar mucho en el análisis de contaminantes orgánicos de aguas. En principio la técnica fue denominada *extracción*

con *columnas de acumulación*. Tras las columnas de Amberlite, aparecieron otros copolímeros producidos por diferentes fabricantes, como las de Porapak (Krejčí y col., 1974) o Chromosorb (Butler y Burke, 1976). También se empezaron a utilizar pequeñas columnas de sílice con fases ligadas fruto del rápido desarrollo que tuvo el HPLC en la década de los setenta. En este sentido, May y col. (1975) y Littel y Fallick (1975) fueron los primeros que las utilizaron, también, para la extracción de compuestos orgánicos de aguas. La existencia en el mercado de una amplia gama de fases ligadas con una buena estabilidad (siempre y cuando se evitara el uso de pHs altos), extendió rápidamente la aplicación de la técnica al análisis de fluidos biológicos. Conjuntamente con el desarrollo de fases estacionarias poliméricas y fases ligadas, apareció también, entre los años setenta y ochenta, una nueva generación de adsorbentes de carbón que mejoró algunos de los problemas previos de este tipo de materiales.

Durante la década de los 80 y 90, el desarrollo de la SPE experimentó un gran crecimiento y, si bien inicialmente los esfuerzos se centraban en encontrar una fase estacionaria óptima y universal, poco a poco cambiaron y se centraron en resolver problemas concretos en función de las necesidades analíticas.

Como es bien sabido, las fases estacionarias se encuentran en el interior de pequeñas *columnas*, *cartuchos* cerrados o *discos*. En el caso de los discos, el adsorbente está inmovilizado en una membrana de microfibras de 0,5 mm de espesor, que permite flujos más altos que los utilizados en los cartuchos. Los discos se emplean, sobre todo, cuando el volumen de la muestra es muy grande y la concentración de los analitos es baja, como en el análisis de contaminantes orgánicos de aguas. En este caso, la rapidez de la extracción es mayor, el flujo es más uniforme y la eficiencia de la extracción es mayor al ser menor el tamaño de partícula.

En principio, todas las fases estacionarias desarrolladas desde los comienzos de la SPE son utilizadas actualmente y su modificación ha permitido mejorar las aplicaciones de la técnica, al igual que las mejoras introducidas en el proceso de fabricación de las mismas. Estas fases sólidas son similares a las empleadas en

cromatografía de líquidos, siendo las más utilizadas las de carbón activo, alúmina, gel de sílice, silicato de magnesio (Florisil), sílices enlazadas (Tabla I.2.1) y polímeros como el estireno-divinilbenceno. El uso de una u otra fase estacionaria dependerá de la estructura y propiedades del analito así como de la composición de la matriz de la muestra.

Tabla I.2.1.- Fases estacionarias ligadas a la sílice utilizadas en SPE (Fritz, 1999).

Tipo de fase estacionaria	Representación	Polaridad
Octadecil (<i>endcapped</i>)	C ₁₈ ec	Muy apolar
Octadecil	C ₁₈	Muy apolar
Octil	C ₈	Apolar
Etil	C ₂	Poco polar
Ciclohexil	CH	Poco polar
Fenil	PH	Poco polar
Cianopropil	CN	Polar
Diol	2OH	Polar
Sílice	SiOH	Polar
Carboximetil	CBA	Intercambiador catiónico débil
Aminopropil	NH ₂	Intercambiador aniónico débil
Acido Propilbencenosulfónico	SCX	Intercambiador catiónico fuerte
Trimetilaminopropil	SAX	Intercambiador aniónico fuerte

Existen dos conceptos básicos que se deben tener en cuenta en el desarrollo de un método de SPE. Por un lado, la denominada *capacidad del cartucho* y, por otro, el denominado *volumen de ruptura*. La capacidad del cartucho es la máxima cantidad de analito (incluidos los compuestos interferentes) que puede ser retenida en una determinada cantidad de fase estacionaria. Una vez que todos los centros activos de la fase estacionaria están ocupados, el resto del analito pasa a través de la misma sin quedar retenido. Por lo general, cuando se trata de compuestos a niveles traza, este factor no acarrea problema alguno con los cartuchos ordinarios. El volumen de ruptura, por su parte, es el volumen máximo de muestra que se puede hacer pasar a través del cartucho sin que se produzcan pérdidas de analito. En este caso habría que tener en

cuenta el grado de interacción analito-fase estacionaria. Si las interacciones entre los analitos y el relleno son débiles, a partir de un determinado volumen de muestra éstos empezarán a eluirse a la vez que otra especie es retenida. Cuando los volúmenes utilizados son superiores al volumen de ruptura, la cantidad de analito retenida se mantendrá constante y, por lo tanto, las recuperaciones obtenidas empezarán a disminuir.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, las fases estacionarias de SPE se pueden utilizar con diferentes fines. Por un lado pueden utilizarse como un *filtro químico* para la purificación de una muestra, reteniendo los analitos y dejando pasar el resto de los componentes de la matriz, o bien, reteniendo dichos componentes y dejando pasar a los analitos. Por otro lado pueden utilizarse como *técnica de preconcentración o de enriquecimiento de trazas*, lo que la convierte en una poderosa herramienta sobre todo cuando la concentración de los analitos en la muestra está por debajo del límite de detección de la técnica, tal como ya se ha comentado. También se utilizan para el *fraccionamiento de la muestra* en diferentes compuestos o grupos de compuestos (eluyendo cada fracción con una fase líquida distinta), así como *intercambiadores de disolvente* de la muestra (el analito es retenido y el disolvente de elución puede ser distinto al disolvente de la muestra) lo que puede resultar de gran utilidad como paso previo a muchas técnicas de separación. También permite el *almacenamiento de analitos* que sean inestables en medio líquido o que tengan una elevada volatilidad, así como llevar a cabo *reacciones de derivatización* entre grupos reactivos del analito y los grupos de la superficie del adsorbente.

A pesar de las ventajas inherentes de la SPE sobre la LLE, es necesario destacar que aunque la cantidad de disolventes orgánicos utilizados en SPE es mucho menor, todavía se utilizan volúmenes relativamente grandes. Es importante pues buscar técnicas alternativas en las que el uso de disolventes orgánicos sea todavía menor, como es el caso de la SPME.

La tecnología de *impresión molecular*, desarrollada recientemente, permite

obtener polímeros sintéticos (MIP) muy estables, que poseen propiedades de reconocimiento molecular selectivo. Son fáciles de preparar, el coste y tiempo de preparación es relativamente bajo, presentan una buena reproducibilidad en la preparación, así como una buena capacidad de muestra y estabilidad del material. Se trata de una técnica prometedora que ya ha demostrado ser de gran utilidad en la separación de analitos presentes en muestras biológicas, farmacéuticas y medioambientales (Sellergren y Lanza, 2000).

I.2.2.1.- Acoplamiento de la SPE con otras técnicas de separación/determinación

De forma general, el procedimiento de SPE se suele llevar a cabo en el modo fuera de línea, aunque se han descrito diversos acoplamientos con técnicas cromatográficas y no cromatográficas. La idea de acoplar este sistema de extracción en línea con otra técnica de separación/determinación da lugar a una buena herramienta en la automatización del proceso analítico.

El acoplamiento SPE-HPLC se lleva a cabo a través de una precolumna rellena con el adsorbente adecuado, insertada en el bucle de una válvula de inyección de seis vías, de forma que las etapas de activación, paso de la muestra y lavado pueden hacerse de forma automatizada y, a la vez, independiente del sistema cromatográfico. Cuando se eluyen los analitos, el inyector se coloca en una posición que permita su inyección en la columna cromatográfica. El procedimiento permite la introducción de los analitos con bajas pérdidas así como con una baja contaminación de la muestra.

También el acoplamiento SPE-GC tiene gran utilidad, sin embargo, el principal inconveniente que se planteaba era evitar que el agua existente en la muestra entrara en la columna del cromatógrafo. El primer acoplamiento descrito fue propuesto por Noroozian y col. (1987), quienes modificaron una válvula de seis vías, como las utilizadas actualmente en el acoplamiento con HPLC, para incorporar en ella una microcolumna de C₁₈ que permitiera extraer PCBs y pesticidas clorados de muestras acuosas. Después de la adsorción, la precolumna se secaba con helio y vacío, y los

analitos eran eluidos con n-hexano directamente al interior de la columna. Actualmente, en la SPE-GC se utilizan las mismas precolumnas que en SPE-HPLC, no existiendo riesgo de pérdida de analitos dado que se usan volúmenes de muestra más pequeños (1-10 ml).

El acoplamiento SPE-CE se ha descrito también en diversas ocasiones para la extracción de diferentes tipos de compuestos (Tomlinson y Naylor, 1995; Figeys y col., 1997; Petersson, y col., 1999; Yang y col., 1999; Guzmán, 2003). En este caso, el acoplamiento es quizás más complicado, dado que el volumen de muestra introducido en el interior del capilar debe ser muy pequeño, de ahí que la gran mayoría de las aplicaciones se lleve a cabo en el modo fuera de línea.

I.2.3.- Extracción en punto de nube o *cloud point* (CPE)

Los tensioactivos son moléculas que poseen una parte polar hidrofílica (cabeza) y una parte apolar hidrofóbica (cola) que generalmente es una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, que puede incluso contener anillos aromáticos. En disolución acuosa y a muy bajas concentraciones, los tensioactivos se encuentran en su forma monomérica, aunque también aparecen dímeros y trímeros. Cuando la concentración de tensioactivo sobrepasa un determinado valor, conocido como *concentración micelar crítica* (CMC), estas moléculas se asocian formando micelas que contienen entre 60 y 100 monómeros. Dependiendo de la naturaleza y de la concentración del tensioactivo y del disolvente utilizado, se forman diferentes estructuras como microemulsiones, monocapas, bicapas, etc. (Moroi, 1992). Desde un punto de vista analítico, una de las propiedades más importantes que presentan estos agregados moleculares es su capacidad para disolver solutos de diferente naturaleza.

Cuando una disolución micelar de un tensioactivo no iónico se calienta por encima de un valor de temperatura determinado, conocido como *temperatura de punto de nube*, se forman dos fases. Una de ellas es rica en el tensioactivo y, la otra, acuosa, lo contiene a una concentración cercana a la CMC. Cuando la disolución se enfría,

vuelve a aparecer una sola fase, ya que el proceso es reversible. Actualmente, poco se sabe sobre el mecanismo del proceso que tiene lugar a dicha temperatura; algunos autores sugieren que la causa se encuentra en que el tamaño de la micela aumenta al aumentar la temperatura (Lindman y Wennerstrom, 1991), otros proponen, sin embargo, que se produce un cambio en el tipo de interacción entre las micelas, que es de tipo repulsivo a bajas temperaturas y atractivo a altas temperaturas (DeGiorgio y col., 1984).

La temperatura de punto de nube (ver Tabla I.2.2) depende del tipo de tensioactivo, de su concentración (Fernández-Laespada y col., 1993) y de la presencia de sales, ácidos, bases, polímeros, urea u otros tensioactivos (Hinze y Pramauro, 1993). Asimismo, el fenómeno no es sólo exclusivo de tensioactivos no iónicos, sino que los tensioactivos zwitteriónicos también lo experimentan (Hinze y Pramauro, 1993), aunque recientemente se ha visto también que los tensioactivos aniónicos como el SDS, SDB-SA, o SDSA forman dos fases al incrementar la temperatura en presencia de altas cantidades de ácido clorhídrico (Casero y col., 1991). Sin embargo, no se ha descrito dicho efecto para tensioactivos de tipo catiónico.

Tabla I.2.2.- Temperatura de punto de nube de algunos tensioactivos a una concentración del 1% (Carabias Martínez y col., 2000a).

Tensioactivo no iónico	Temperatura (°C)	Tensioactivo zwitteriónico	Temperatura (°C)
Brij-30	2	C ₈ APSO ₄	32
PONPE 7.5	1	C ₁₂ APSO ₄	120
Triton X-100	64	C ₁₂ APS	-0,5
Triton X-114	25	C ₁₆ APS	20
Tween 80	93		

Estas propiedades se han utilizado en lo que se conoce como “extracción en punto de nube” o *cloud point extraction*, CPE (Quina y Hinze, 1999; Carabias Martínez y col., 2000b) cuyas primeras aplicaciones se localizaron en la extracción de iones metálicos (Miura y col., 1976; Watanabe y Tanaka, 1978) pero, sobre todo, en el campo de la purificación y aislamiento de especies de interés biológico como las proteínas

(Saitoh y col., 1995; Heegaard y col., 1997). Sin embargo, su uso para otro tipo de analitos que no sean biomoléculas es relativamente reciente (Saitoh y Hinze, 1991; Boeckelen y Niessner, 1993; Hinze y Pramauro, 1993). En este sentido, la CPE se ha utilizado para la extracción de diversos tipos de contaminantes, entre ellos PAHs (Saitoh y Hinze, 1991; Ferrer y col., 1996; Sicilia y col., 1999), pesticidas (Evdokimov y von Wandruszka, 1998; Carabias Martínez y col., 2003a), PCBs (Eiguren-Fernández y col., 1999), clorofenoles (Calvo-Seronero y col., 2000), aminas aromáticas (Chao y Shang-Da, 1998), etc. de diferentes tipos de matrices (aguas, suelos, suero sanguíneo, etc.) con gran éxito.

La metodología se ha descrito como método de extracción previo a HPLC, GC y CE, aunque en el campo de la GC y CE se han desarrollado muy pocos trabajos al respecto. El problema que se plantea previo a la determinación de los analitos es que, en algunos casos, es necesario eliminar el tensioactivo antes de la determinación cromatográfica o electroforética (aunque hay que tener en cuenta que las fases ricas en tensioactivos son compatibles con la gran mayoría de fases móviles y tampones utilizados en HPLC o CE). La técnica ha permitido obtener altos factores de preconcentración que pueden modificarse cambiando el tipo de tensioactivo utilizado. Además, los tensioactivos son menos tóxicos que muchos disolventes orgánicos utilizados en LLE, no es necesario introducir una etapa de evaporación y existe una amplia gama de tensioactivos disponible comercialmente y a muy bajo costo.

I.2.4.- Microextracción en fase sólida (SPME)

La SPME constituye una técnica de pretratamiento de muestras bastante utilizada en la actualidad. Desarrollada en 1990 por Pawliszyn (Arthur y Pawliszyn, 1990; Pawliszyn, 1997) para el análisis de compuestos orgánicos volátiles, se ha convertido en una técnica rutinaria en muchos laboratorios. Desde su aparición, la SPME ha jugado un papel importante en el análisis medioambiental y, dentro de éste, en el análisis de pesticidas. Las primeras aplicaciones de la SPME al análisis de estos compuestos fueron llevadas a cabo en 1994 (Eisert y col., 1994; Popp y col., 1994). Desde entonces su uso

se ha extendido a una gran variedad de matrices; prueba de ello es la gran cantidad de bibliografía existente (Beltrán y col., 2000; Krutz y col., 2003; Vas y Vekey, 2004). La aplicación de la SPME al análisis de cualquier compuesto requiere conocer bien la técnica: los tipos de fibras, los distintos factores que afectan a la misma, así como su posible acoplamiento a los diferentes instrumentos de análisis existentes y/o automatización. Se ha utilizado en análisis clínico, forense, alimentario, medioambiental, biomédico, etc. con gran éxito, aunque su área de aplicación por excelencia sigue siendo el análisis medioambiental.

La SPME utiliza una fibra de sílice fundida recubierta de un material adsorbente, que es, en general, un recubrimiento polimérico, que se utiliza para la extracción de compuestos orgánicos y/o inorgánicos volátiles derivados, por ejemplo, del mercurio, arsénico, etc. La fibra se encuentra en el interior de un tubo hueco, de tal forma que ésta se puede retraer y sacar de su interior, quedando así expuesta a la muestra. Su uso implica dos etapas: por un lado la etapa de extracción, que se puede llevar a cabo sumergiendo directamente la fibra en el interior de la disolución problema (*direct immersion*, DI-SPME), o bien, manteniéndola en el espacio en cabeza que está en equilibrio con la disolución (*headspace*, HS-SPME) y, por otro lado, la etapa de desorción que se puede hacer térmicamente, por ejemplo, en el inyector de un cromatógrafo de gases, o bien, utilizando disolventes orgánicos, bien sea acoplado en línea con un cromatógrafo de líquidos, bien se trate de una desorción manual con disolventes orgánicos, fuera de línea. Los analitos pueden, por lo tanto, extraerse tanto de líquidos (Gonçalves y Alpendurada, 2002; Zambonin y col., 2004) como de gases (Kozziel y col., 2000). Además, también se ha descrito la extracción de compuestos volátiles de sólidos, mediante el modo HS-SPME (Liu y col., 2001).

La SPME presenta diversas ventajas frente a técnicas más rutinarias como la LLE o la SPE. En primer lugar, puede utilizarse como técnica de muestreo in situ, integrando extracción y preconcentración en un único paso. Su aplicación es bastante sencilla, relativamente barata y permite utilizar menores cantidades de disolventes orgánicos que las utilizadas en técnicas como la LLE o la SPE convencionales,

simplificando así la etapa de preparación de muestra. Dado que la muestra es preconcentrada en la propia fibra, los límites de detección pueden ser bastante bajos, aunque, en general, la SPE proporciona factores de preconcentración mayores.

Las primeras fibras comercializadas, creadas para trabajar con GC, fueron las de polidimetilsiloxano (PDMS) -adecuadas para analitos apolares- y las de poliacrilato (PA) -apropiadas para analitos polares-. Posteriormente surgieron las fibras que combinan divinilbenceno (DVB), carboxen (CAR, carbono activo), carbowax (CW, polietilenglicol) y resina templada (TPR) como son las de PDMS/DVB, CW/TPR, CW/DVB, CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS. La elección del tipo de fibra depende de la naturaleza físico-química del compuesto a extraer. En la Tabla I.2.3, pueden verse los distintos tipos de fibras actualmente comercializadas, así como algunas de las familias de pesticidas a las que se han aplicado. En las fibras de PDMS y de PA, dado que el recubrimiento es un líquido muy viscoso, la extracción de los analitos se debe principalmente a un proceso de absorción, mientras que en las otras, en las que la fase estacionaria es un sólido poroso, la extracción se debe, principalmente, a un proceso de adsorción (Mullett y Pawliszyn, 2003), si bien en la práctica compiten ambos efectos.

En general, en GC, los compuestos volátiles requieren fibras con un recubrimiento de mayor espesor, mientras que para compuestos semivolátiles resulta efectivo el uso de fibras con un recubrimiento más delgado. Hay que tener en cuenta que cuanto mayor es el espesor de la fibra, mayor es el tiempo de extracción, aunque también es cierto que mayor es la cantidad de analito extraído, pero también es mayor el riesgo de retención irreversible de otros compuestos presentes en la matriz. La Figura I.2.1 muestra las propiedades de algunas de las fibras actualmente comercializadas.

Antes de utilizar estas fibras, es preciso acondicionarlas tal como indican los suministradores. Si la desorción es térmica, la activación se realiza introduciendo la fibra en el inyector de un cromatógrafo de gases, siguiendo un programa de temperaturas adecuado que viene especificado para cada fibra por el propio fabricante. Si, por el contrario, se utilizan disolventes orgánicos (LC o desorción manual), el

acondicionamiento puede hacerse sumergiendo la fibra en un disolvente orgánico apropiado (que suele ser el mismo disolvente de desorción) durante un cierto tiempo (entre 20-30 minutos).

Tabla I.2.3.- Tipos de fibras de SPME comercializadas actualmente.

<i>Tipo de fibra</i>	<i>Espesor (μm)</i>	<i>Compatibles con</i>	<i>Utilizadas para el análisis de pesticidas</i>
PDMS	7, 30, 100	GC HPLC	Amidas, Carbamatos, Cloroacetamidas, Piridazinona, Tiocarbamatos, Triazinas, Uracilos
PDMS/DVB	60, 65	GC HPLC (60 μm)	Amidas, Cloroacetamidas, Fenilureas, Piridazinona, Tiocarbamatos, Triazinas
DVB/CAR/PDMS	50/30	GC	Triazinas
CAR/PDMS	75, 85	GC	Tiocarbamatos, Triazinas, Uracilos
PA	85	GC HPLC	Amidas, Carbamatos, Cloroacetamidas, Dinitroanilinas, Fenilureas, Organofosforados, Tiocarbamatos, Triazinas, Uracilos
CW/DVB	65, 70	GC	Amidas, Cloroacetamidas, Piridazinonas, Tiocarbamatos, Triazinas
CW/TPR	50	HPLC	Triazinas

Un factor de gran importancia en las aplicaciones futuras de la SPME radica en el desarrollo de nuevos recubrimientos. Cuando se intentan desarrollar nuevos tipos de recubrimientos en SPME hay que tener en cuenta diversos aspectos. En primer lugar, la polaridad de los analitos que se quiere extraer y la del recubrimiento debe ser similar. Dicho recubrimiento debe ser, además, resistente a condiciones físicas y químicas extremas, como altas temperaturas, alto contenido en sales, presencia de disolventes orgánicos, pHs extremos, etc. para asegurar que es suficientemente estable y que la reproducibilidad es suficientemente buena. Recientemente, Mullett y Pawliszyn (2003) han recopilado los avances llevados a cabo hasta el momento en relación con el desarrollo

de recubrimientos selectivos y biocompatibles para SPME. Estos nuevos recubrimientos incluyen fases del tipo alquil-diol-sílice (ADS) (Mullett y Pawliszyn, 2002), polisilicona fulereno (C_{60}) (Xiao y col., 2001), fibras de sílice porosa (C_{18}) (Liu y col., 1997), poli(3-metiltiofeno) (Gbatu y col., 1999), fibras combinación de grupos hexafluorobisfenol con oligo-PDMS, BSP3 (Harvey y col., 2002), MIP (Wu y col., 2000a; Koster y col., 2001), inmunoabsorbentes (Yuan y col., 2001), polímeros de polipirrol (PPY) (Wu y Pawliszyn, 1999), etc. aún no comercializados, que contribuyen a ampliar aún más las posibles aplicaciones de la técnica (Mullett y col., 2002). Hay que tener en cuenta, que la variedad de fibras actualmente existente, junto con estos nuevos recubrimientos, pueden, en un determinado momento, dificultar la elección de la fibra, aunque una vez seleccionada la extracción puede ser más selectiva.

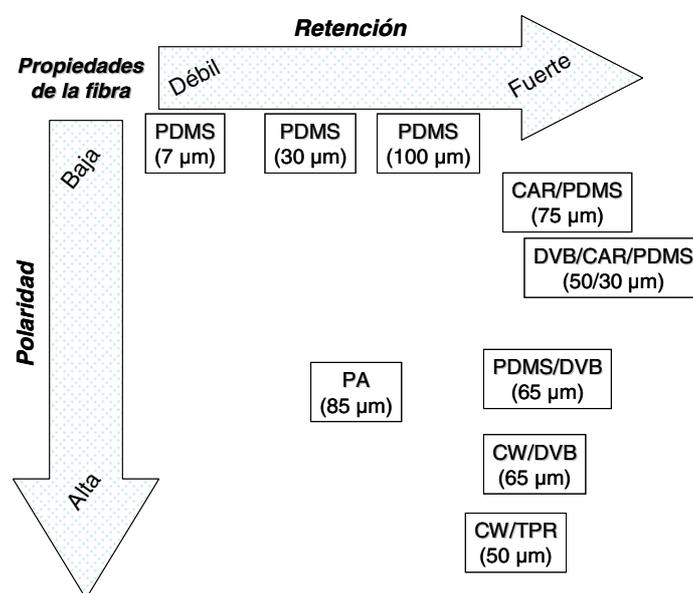


Figura I.2.1.- Propiedades de algunas de las fibras actualmente comercializadas.

Adaptado de Kataoka y col. (2000).

Inmovilizar nuevos recubrimientos poliméricos sobre la fibra de sílice fundida a través de procedimientos convencionales es una tarea bastante complicada. Con este

tipo de procedimientos, la estabilidad térmica de estos recubrimientos es menor, lo que hace que la recuperación sea baja y que no sea factible su acoplamiento con GC o HPLC. Una de las deficiencias de las fibras comercializadas inicialmente, así como las de estos nuevos recubrimientos, era la baja reproducibilidad entre lotes que presentaban. Esta baja reproducibilidad estaba asociada al hecho de que las fibras estaban hechas a partir de polímeros lineales que presentaban un amplio rango de distribución de pesos moleculares, responsable de la variación de sus propiedades físicas (Stevens, 1999). La tecnología *sol-gel* ha permitido solventar ambos problemas, permitiendo una adecuada y duradera incorporación de compuestos orgánicos a estructuras inorgánicas poliméricas. Se ha utilizado para obtener recubrimientos de polifenilmetilsiloxano (PPMS) y polimetilsiloxano (PMS) (Cai y col., 2003), polietilenglicol (Wang y col., 2000), PDMS (Chong y col., 1997), éteres corona (Zeng y col., 2001) etc. Además, diversas publicaciones recientes han sustituido estos polímeros lineales por dendrímeros utilizando la tecnología *sol-gel* (Kabir y col., 2004; Kim y col., 2004). Los dendrímeros habían sido utilizados anteriormente como fases pseudo-estacionarias en cromatografía electrocinética (Palmer y Tanaka, 1997), como fases estacionarias ancladas en CEC (Chao y Hanson, 2003), como fases estacionarias en GC (Newkome y col., 2001), etc. y, actualmente, su uso como recubrimientos de las fibras está empezando a dar resultados satisfactorios.

Muchos son los factores que influyen en el proceso de extracción y desorción en la técnica SPME, tanto en el modo de *inmersión directa* como en el modo de *espacio en cabeza*. Su conocimiento es fundamental para hacer un uso adecuado de la misma.

Los tiempos de extracción y de desorción son dos variables importantes que deben ser controladas de forma rigurosa para alcanzar una buena reproducibilidad. En lo que a la extracción se refiere, llega un momento en que ésta es máxima (tiempo de equilibrio) y no se extrae más analito (Figura 1.2.2). Estos tiempos de equilibrio pueden llegar a ser largos, sin embargo, no es necesario trabajar con tiempos tan largos ya que es posible trabajar en condiciones de no equilibrio, en cuyo caso se debe controlar rigurosamente el tiempo de extracción. En la bibliografía se comprueba que,

normalmente, los tiempos de extracción varían desde unos pocos minutos hasta varias horas (Rodríguez y col., 2003; Frías-García y col., 2004b). Por otro lado, los tiempos de desorción son más cortos, en general, inferiores a 30 minutos, siendo una variable crítica que debe seleccionarse de manera que se asegure que no quede analito alguno en la fibra y que la desorción sea total. Una descripción extensa de los equilibrios cinético y termodinámico en SPME se puede encontrar en el trabajo de Pawliszyn (1997).

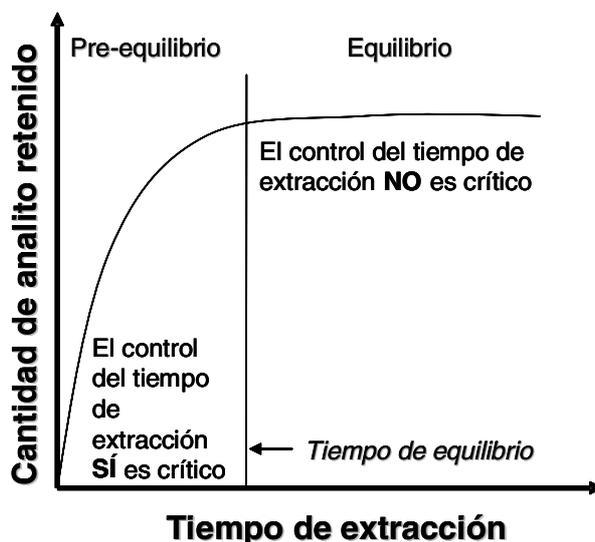


Figura I.2.2.- Variación con el tiempo de la cantidad de analito retenida por la fibra en SPME.

Adaptado a partir de Vas y Vekey (2004).

De manera general, la cantidad de analito retenido por la fibra aumenta al hacerlo el volumen de muestra, con el consiguiente aumento de sensibilidad. Ahora bien, la cantidad de analito extraída es solamente una fracción del total y depende del coeficiente de reparto del analito entre la muestra y la fibra que se debe tener en consideración a la hora de fijar el volumen de la muestra a extraer. Además, hay que tener en cuenta que el efecto matriz puede ser importante, sobre todo en el modo DI-SPME.

Cuando se opera en el modo HS-SPME, cuanto menor es el espacio en cabeza

mayor es la sensibilidad. En general se recomienda que esté comprendido entre un 30 y un 50% del volumen del vial, aunque dicho volumen puede ser mayor cuando se trate de muestras más concentradas. Es importante, también, mantener constante tanto el volumen de la muestra como el del espacio en cabeza para garantizar una buena reproducibilidad. Además, y también con este fin, la fibra debe mantenerse siempre a la misma altura dentro del vial.

El pH puede ser también una variable importante en SPME, influyendo tanto en la eficacia como en la selectividad de la extracción. Aunque para pesticidas neutros el pH no es una variable importante (Guan y col., 1998), para pesticidas ionizables, sobre todo para los ácidos (Lee y col., 1998a; Lee y col., 1998b), el pH debe ser ajustado antes de la extracción. Así, con fibras en las que la extracción de los analitos se debe principalmente a un proceso de absorción (PDMS y PA) sólo la forma neutra será extraída.

Normalmente se añade a la muestra una sal con objeto de disminuir la solubilidad de los analitos en la misma y favorecer su paso hacia la fibra. Este efecto de *salting-out*, afecta a cada compuesto de forma específica. Las sales más utilizadas en SPME con este fin son: el cloruro sódico, bicarbonato sódico, carbonato potásico y sulfato amónico. Sin embargo, el uso de altos contenidos salinos es más recomendable para el modo HS-SPME, dado que en DI-SPME una alta concentración de sales puede provocar la deposición de éstas sobre la fibra, dañándola y disminuyendo, así, la eficacia de la extracción con el tiempo.

En general, la agitación acelera la transferencia de los analitos hacia la fibra, sobre todo en HS-SPME. Cuando se trata de matrices líquidas, compensa los bajos coeficientes de difusión propios de las mismas. El tiempo de equilibrio disminuye al aumentar la velocidad de agitación, pero una agitación muy rápida puede provocar falta de reproducibilidad y de precisión, e incluso no permitir que los compuestos queden retenidos. Algunos autores han empleado la agitación por ultrasonidos (Rodríguez y col., 2003) y los movimientos de la propia fibra, sobre todo automatizada en GC (Eisert y

Levsen, 1996), o del vial (Kataoka y col., 2000).

La temperatura tiene efectos contrapuestos sobre la extracción. Por un lado, un aumento de la misma provoca un incremento de los coeficientes de difusión de los analitos en la muestra, aumentando así la cantidad de analito extraído y disminuyendo el tiempo de extracción. Este efecto puede ser mayor cuando se opera en el modo HS-SPME, dado que al aumentar la temperatura aumenta la cantidad de analito (volátil) presente en el espacio en cabeza. Hay que tener en cuenta, además, que si la muestra es acuosa, un incremento de la temperatura aumenta la cantidad de agua presente en el espacio en cabeza, interfiriendo ésta en la extracción. Se ha podido comprobar que una humedad relativa del 90% puede reducir la extracción en torno a un 10% (Martos y Pawliszyn, 1997). Por otro lado, un aumento de la temperatura favorece la desorción de los analitos, con lo que es preciso mantener una situación de compromiso y buscar un valor óptimo que minimice este último. En principio, es recomendable calentar ligeramente la muestra y estudiar la influencia de la temperatura (Sakamoto y Tsutsumi, 2004).

Cuando se lleva a cabo la desorción utilizando un disolvente orgánico es preciso seleccionar el disolvente adecuado y la cantidad del mismo, que puede ser muy pequeña (100-200 μ l). Dado que no todas las fibras son compatibles con los disolventes orgánicos (ver Tabla I.2.3), este modo de operación no es aplicable en todos los casos.

Hasta ahora, la extracción por SPME de una muestra acuosa a la que se le ha añadido un disolvente orgánico no ha sido muy estudiada pero, en general, se puede deducir que la cantidad de analito extraído disminuye con la cantidad de disolvente añadida (Arthur y col., 1992; Eisert y Levsen, 1995). Sin embargo, en ciertos casos se ha podido también apreciar el efecto contrario (Krough y col., 1997; Doong y Liao, 2001), sobre todo, cuando se trata de muestras sólidas, como lodos o suelos, dado que el disolvente mejora la difusión de los analitos hacia la fibra o bien porque se producen cambios en la interacción fibra-analito. En estos últimos casos, en los que la extracción se ve incrementada, el porcentaje de disolvente añadido suele ser pequeño (inferior a un

5%). Recientemente, se ha estudiado también la influencia de la adición de medios micelares a muestras acuosas sobre la extracción (Doong y col., 2000), y se ha comprobado que estos medios provocan descensos exponenciales de los rendimientos de las extracciones.

El hecho, por ejemplo, de que muchos factores influyan sobre la extracción y desorción de los analitos en SPME hace necesaria una adecuada y cuidadosa estrategia de optimización. En la bibliografía se observa que, de manera general, la optimización se lleva a cabo “paso a paso”, variando un solo factor a la vez y tomando como *función respuesta* las áreas de cada analito (aunque es preferible calcular los porcentajes de extracción). A pesar de esta tendencia mayoritaria, también se han utilizado con bastante éxito técnicas quimiométricas, como el *diseño experimental* (González-Barreiro y col., 2000; Salafranca y col., 2003) o las *redes neuronales artificiales* (*Artificial Neural Networks*, ANNs) (Frías y col., 2004b) que permiten que el número de experiencias necesarias para la optimización sea menor.

I.3.- Electroforesis capilar

La CE es una técnica de separación basada en la migración diferencial de especies cargadas bajo la acción de un campo eléctrico o gradiente de potencial que se establece con ese fin. La electroforesis convencional fue introducida como herramienta analítica por Tiselius (Premio Nóbel 1948) en su tesis doctoral (1930), aunque no fue hasta 1937 cuando desarrolló su célebre *celda electroforética*, el primer instrumento para llevarla a cabo. A partir de entonces, la electroforesis se consideró como una alternativa importante a otras técnicas de separación de la época. En 1967 Hjertén empleó por primera vez capilares de 3 mm de diámetro interno, aunque no fue hasta 1974 con Virtanen, y más tarde con Mikkers y col. (1979c), cuando se demostraron las ventajas de emplear capilares con diámetros internos de 200 μm para la electroforesis en zona libre, que evitaban los fenómenos de convección del medio electroforético y permitían trabajar con campos eléctricos mayores obteniendo así mejores eficacias. A pesar de las mejoras

introducidas, estos trabajos no parecían despertar interés alguno en la comunidad científica. Sólo con la aparición en 1981 de los trabajos de Jorgenson y Lukacs (1981a, 1981b) quedó demostrada su elevada capacidad analítica. En estos trabajos se describió de forma sencilla la teoría de la dispersión en electroforesis y se demostró, por primera vez, el gran potencial de separación de esta técnica utilizando voltajes elevados en capilares de 75 μm de diámetro interno. En 1989 apareció el primer instrumento comercial y a partir de ese momento tuvo lugar un incremento espectacular del número de publicaciones, congresos científicos, aparatos comerciales y metodologías relacionadas con esta técnica.

Actualmente, la CE utiliza capilares de sílice fundida (de entre 25-100 μm de diámetro interno y 20-80 cm de longitud) junto con altos campos eléctricos (normalmente hasta 1000 V/cm). La CE proporciona elevada rapidez de análisis, altas eficacias, facilidad de automatización, es aplicable a una amplia gama de compuestos, requiere volúmenes de muestra pequeños y un mínimo consumo de reactivos lo que hace que cada análisis tenga un bajo coste y afecte mínimamente al medio ambiente.

Recientes artículos de revisión muestran que la CE ha sido aplicada en muchas ocasiones al análisis, por ejemplo, de biomoléculas (García-Campaña y col., 2003), fármacos (Pang y col., 2004), flavonoides (Molnár-Pert y Füzfai, 2004), pesticidas (Picó y col., 2003), microorganismos (Rodríguez y Armstrong, 2004), ADN y proteínas (Lin y col., 2003), en diferentes tipos de muestras como aguas, fluidos biológicos (Hernández y col., 2003), alimentos (Cortacero-Ramírez y col., 2003), etc.

Aunque las primeras y principales aplicaciones de la CE se encuentran en la separación de proteínas, péptidos y secuencias de ADN, cada vez se ha ido ampliando su aplicación a otros campos, especialmente al del análisis medioambiental. En este sentido, se ha demostrado que la CE, en sus diferentes modalidades, es una técnica complementaria de las técnicas habituales de análisis para la separación y determinación de especies químicas nocivas para el medio ambiente -contaminantes orgánicos e inorgánicos- (St. Claire, 1996).

I.3.1.- Principios e instrumentación en CE

El esquema general de este tipo de dispositivos es bastante sencillo (Figura I.3.1). Consta de un tubo capilar, dos depósitos que contienen el electrolito de separación, un detector y una fuente de alto voltaje que suministra potenciales eléctricos entre 0 y 50 kV y que permite invertir la polaridad. Los extremos de los capilares de sílice fundida se suelen colocar en el interior de los depósitos que contienen el electrolito de separación, al igual que los electrodos. La muestra es colocada en el interior del capilar reemplazando uno de los depósitos, por otro que la contenga, aplicando bien sea un campo eléctrico (inyección electrocinética) o presión externa (inyección hidrodinámica).

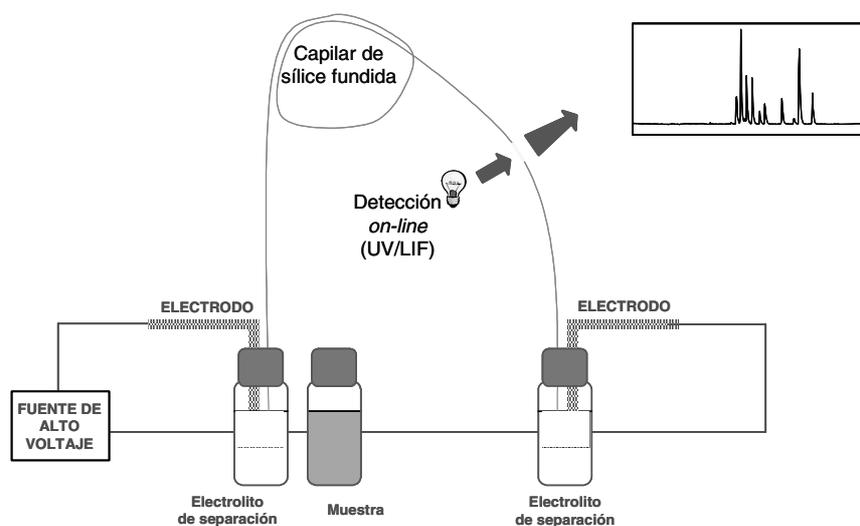


Figura I.3.1.- Esquema general de un equipo de CE.

En CE, la separación de los analitos se lleva a cabo en el interior de capilares de sílice fundida de entre 25 y 100 μm de diámetro interno, recubiertos exteriormente de un polímero (poliimida) que aporta la flexibilidad y la resistencia de la que carecen, dado que son extremadamente frágiles. Su baja absorción de la radiación en la zona del UV-VIS, hace que este tipo de detección sea factible y, además, su elevada relación superficie externa/volumen interno favorece la disipación del calor generado por *efecto*

Joule durante la aplicación de voltaje, aunque, en este sentido, los capilares se encuentran dentro de un sistema de termostatación que permite mantener la temperatura constante de un análisis a otro, dentro de unos límites conocidos. Los capilares pueden utilizarse directamente o bien recubiertos en su interior de un polímero, normalmente de naturaleza neutra o hidrofóbica como poliacrilamida, alcohol polivinílico, polietilenglicol, etc.

La pared interna del capilar tiene grupos silanoles que en contacto con el tampón de separación se ionizan. El grado de ionización se controla principalmente mediante la activación previa del capilar con una disolución de hidróxido sódico y con el pH del tampón de separación (aparecen cargas negativas con disoluciones acuosas de pH superior a 2,5-3). De este modo, la pared cargada negativamente atrae a los iones con carga positiva del tampón creando una *doble capa eléctrica*. Esta doble capa tiene dos zonas: una *compacta* próxima a la pared del capilar, y en la cual las interacciones que se dan entre los grupos cargados negativamente de la sílice y los contraiones del tampón son tan grandes que compensan la agitación térmica, y otra zona más alejada de la pared, denominada *difusa*, con interacciones más débiles con los silanoles cargados, pudiéndose producir agitación térmica. Bajo la acción del campo eléctrico, las cargas positivas de la zona difusa se desplazan hacia el cátodo y arrastran con ellas el agua de solvatación que llevan asociada. Es lo que se conoce como *flujo electroosmótico* (EOF) que influirá de igual forma en todas aquellas sustancias que se encuentren en el interior del capilar. El resultado de este fenómeno viene determinado por la *movilidad electroosmótica*:

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon \xi}{4\pi \eta}$$

donde ϵ es la constante dieléctrica del tampón, η su viscosidad y ξ (potencial zeta) el potencial que se genera en la zona difusa de la doble capa eléctrica. Este último factor va a determinar la magnitud del EOF. Al emplear tampones con concentraciones muy elevadas, el espesor de la capa difusa de la doble capa eléctrica disminuye y el de la zona compacta aumenta, el potencial zeta entonces disminuye y, en la misma proporción, disminuye μ_{eo} .

Un factor característico del EOF es el perfil plano que presenta el flujo y que origina elevadas eficacias (en algunos casos hasta un millón de platos teóricos por metros, NTP), fruto de la uniformidad a lo largo del capilar de dicha fuerza impulsora.

Bajo la acción del campo eléctrico (E)

$$E = \frac{V}{l}$$

donde V es el voltaje aplicado y l la longitud total del capilar, las sustancias cargadas en el interior del capilar experimentan un proceso de electromigración al verse sometidas a una fuerza originada por el campo eléctrico y una fuerza de rozamiento que se opone a la eléctrica. Si se utiliza la *aproximación de Stokes* en la que se considera la partícula como una esfera rígida, la expresión de la fuerza de rozamiento sobre esta sustancia (F_r) viene dada por la ecuación

$$F_r = 6\pi\eta r_p v_e$$

donde r_p es el radio de la partícula y v_e la velocidad a la cual se desplaza. Por otro lado, la partícula con carga al estar sometida a un campo eléctrico, se ve sometida a una fuerza eléctrica:

$$F_e = q \cdot E$$

donde q es la carga de la partícula sometida al campo eléctrico (E). Cuando ambas fuerzas se igualan,

$$F_r = F_e$$

la partícula adopta un movimiento rectilíneo uniforme, cuya velocidad viene dada por la expresión:

$$v_e = \frac{q}{6\pi\eta r_p} E$$

en la que la denominada *movilidad electroforética*, μ_e , viene expresada como:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r_p}$$

que es el parámetro que gobierna la selectividad del sistema de separación a través de

la relación q/r_p en el modo de CE en zona libre.

En capilares sin un recubrimiento interno, se dan simultáneamente la migración electroforética y la migración electroosmótica de los componentes de la muestra, de forma que la velocidad que van a adoptar las sustancias dentro del capilar será la suma de ambos factores:

$$v = (\mu_{eo} + \mu_e)E$$

De esta forma, el EOF afecta por igual a todas las especies, independientemente de que sean especies catiónicas, aniónicas o neutras, empujándolas hacia el cátodo. Sólo si se modifica la carga de la pared del capilar el EOF puede invertirse.

El tiempo de migración de la sustancia cargada vendrá dado por la expresión:

$$t_m = \frac{l}{(\mu_{eo} \pm \mu_e)E}$$

donde l es la longitud del capilar hasta el punto de detección.

Muchas veces el EOF necesita ser controlado. A valores de pH altos, por ejemplo, puede ser demasiado grande, dando lugar a la elución de los solutos antes de que ocurra la separación. La velocidad del EOF se puede variar, por ejemplo, variando el campo eléctrico aplicado, el pH del tampón, la fuerza iónica, utilizando recubrimientos de la pared interna del capilar o utilizando modificadores orgánicos, tensioactivos, etc.

I.3.2.- Modos de separación en CE

Existen diversos modos de separación en CE entre los que se encuentran la electroforesis capilar de zona libre (CZE), la electrocromatografía capilar (CEC), la cromatografía electrocinética micelar (MEKC), la electroforesis capilar en geles o redes

poliméricas (CGE), el isoelectroenfoque capilar (CIEF) y la isotacoforesis capilar (CITP). Estas modalidades se diferencian principalmente en la naturaleza del medio de separación que se encuentra dentro del capilar y en las características de los analitos que se quiere separar.

Electroforesis capilar en zona libre (CZE). Además de ser la primera modalidad de electroforesis desarrollada (Jorgenson y Lukacs, 1981b; Jorgenson y Lukacs, 1983; Green y Jorgenson, 1984) es, hoy en día, la más utilizada. En el interior del capilar se encuentra únicamente el tampón de separación. De este modo, al aplicar el voltaje, las sustancias con carga, se separarán en el interior del capilar en función de su movilidad electroforética, que está directamente relacionada con su relación carga/masa. Existe un valor óptimo de campo eléctrico a partir del cual se obtendrán los tiempos de análisis más cortos con una eficacia adecuada. A partir de este valor comienzan a aparecer fenómenos relacionados con la generación de calor por *efecto Joule* disminuyendo la eficacia de la separación. La CZE posee una serie de limitaciones que, en algunos casos, se consiguen superar con el empleo de otras modalidades de CE. Entre estas limitaciones hay que destacar que no se van a poder separar compuestos que no presenten carga al pH del tampón de separación. Por otro lado, se pueden producir adsorciones sobre la superficie del capilar de algunas especies generalmente con una densidad de carga positiva elevada (dichas adsorciones van a influir negativamente en el proceso de separación).

Isotacoforesis capilar (CITP). En este caso, la muestra se inyecta entre un tampón que se denomina *frontal* con una movilidad superior a la del componente de la muestra más rápido, y un tampón *terminal* cuya movilidad es inferior a la del compuesto más lento de esta muestra. Con la aplicación de la diferencia de potencial, los analitos se distribuyen en bandas que migran entre el tampón frontal y el terminal dentro del capilar (Pospichal y col., 1989), todos ellos con igual velocidad. La movilidad efectiva de cada sustancia es el parámetro que va a determinar el comportamiento de las sustancias en el interior del capilar y de las propiedades de las bandas electroforéticas dentro de éste. Este modo de electroforesis es el menos utilizado y tiene su principal campo de

aplicación en la preconcentración de muestras dentro del capilar.

Isoelectroenfoque capilar (CIEF). Se trata de una herramienta de gran utilidad en el área de la bioquímica analítica, al ser su principal aplicación la separación de péptidos y proteínas (Hjertén y Zhu, 1985). Los capilares normalmente empleados en esta modalidad tienen un recubrimiento interno que disminuye o, en el mejor de los casos, elimina el EOF. En el capilar se introduce una mezcla de anfólitos de diferentes valores de pH. A este tampón se le añade la muestra. Al aplicar un campo eléctrico se establece un gradiente de pH por parte de los anfólitos dentro del capilar. Los péptidos y proteínas con carga positiva o negativa se desplazan bajo la influencia del campo hacia el cátodo o ánodo, respectivamente, hasta llegar a aquella zona del capilar en la cual el pH del tampón es igual al punto isoeléctrico del analito. Es en este punto del capilar en el cual el analito, al no tener carga, deja de migrar. Cuando todos los componentes han alcanzado su punto isoeléctrico, se aplica normalmente presión para empujar a los analitos hacia el detector y proceder a su detección.

Cromatografía electrocinética micelar (MEKC). Esta modalidad de CE, introducida por Terabe y col. (1984), surge como solución a la separación de compuestos sin carga, aunque se emplea también en determinadas separaciones de sustancias cargadas. Constituye, junto con la CZE, una de las modalidades más utilizadas. En MEKC se emplean disoluciones tamponadoras con un tensioactivo a una concentración superior a la CMC, de modo que éste estará formando micelas. Aunque la naturaleza del tensioactivo empleado en MEKC puede ser muy variada (aniónica, neutra, catiónica o zwitteriónica, en función de la cual las micelas migrarán hacia el cátodo o el ánodo), el más utilizado en la actualidad es el SDS (Holland y Sepaniak, 1993; García y col., 1996). La popularidad del SDS se debe a su elevada solubilidad en agua, baja CMC, pequeña absorción molar en el ultravioleta, incluso a bajas longitudes de onda, disponibilidad y bajo coste. Este tensioactivo forma micelas de relativa hidrofobicidad que proporcionan una selectividad adecuada para muchas mezclas de solutos. Las micelas se comportan, en términos cromatográficos, como fases pseudoestacionarias que se desplazan a lo largo de la columna (Terabe y col., 1984, 1985). Los analitos sin carga

eléctrica van a interactuar hidrofóbicamente con las micelas en función de su coeficiente de partición específico, que dependerá de sus características químicas. En el caso de sustancias cargadas, las interacciones serán tanto de tipo hidrófobo como iónico entre analito y micelas.

Electrocromatografía capilar (CEC). Este tipo de CE recibe este nombre debido a su similitud con la cromatografía de líquidos. Al igual que ocurre en MEKC, su desarrollo se debe fundamentalmente a la necesidad de separar por CE compuestos sin carga eléctrica (Knox y Grant, 1987). El capilar se rellena de una fase estacionaria adecuada, que puede ser sílice recubierta o no de fase estacionaria. El tampón, que actúa de fase móvil, se mueve al aplicar un campo eléctrico, siendo su velocidad proporcional al EOF. Las sustancias neutras se separan (como en HPLC) por su distinta interacción con la fase estacionaria.

Electroforesis capilar en gel (CGE). En este tipo de CE, el relleno del capilar consiste en un polímero disuelto en el tampón de separación que actúa como tamiz molecular. La aplicación fundamental de esta técnica es la separación de compuestos que posean una relación carga/masa igual, pero con masas moleculares diferentes (Cohen y Karger, 1987; Guttman y col., 1990) como pueden ser fragmentos de ADN, polisacáridos, o complejos SDS-proteína. De este modo, las moléculas con menor tamaño atraviesan con mayor facilidad los poros formados por el polímero en disolución y, por lo tanto, migran en un tiempo menor que las de mayor tamaño. Los polímeros más empleados para este fin son, fundamentalmente, poliacrilamida lineal, polietilenglicol, alcohol polivinílico y derivados de la celulosa.

I.3.3.- Sistemas de detección en CE

Uno de los primeros problemas que hubo que resolver en CE fue la compatibilidad de diferentes sistemas de detección con los pequeños diámetros de capilar utilizados y, por tanto, con los pequeños volúmenes de muestra usados (desde algunos nanolitros hasta pocos microlitros), lo que, lógicamente, limita la sensibilidad que

esta técnica puede proporcionar.

En CE los detectores pueden localizarse en distintos lugares del capilar: *on-column*, *end-column* (Cheng y Dovichi, 1988), *post-column* (Tracht y col., 1994) o a lo largo de toda la columna (Beale y Sudmeier, 1995). La detección en CE se lleva a cabo, en la mayoría de los instrumentos comerciales, mediante absorción de luz UV-VIS en el modo *on-column*, es decir, una zona del propio capilar de separación actúa como célula de detección. Otros sistemas de detección utilizados son los basados en la fluorescencia inducida por láser (LIF), espectrometría de masas (MS) y, en menor medida, los detectores amperométricos, conductimétricos, radiométricos, termoópticos, de índice de refracción, los basados en la espectrometría Raman, en fosforescencia y en quimioluminiscencia. La señal del detector se envía a un convertidor analógico/digital y se almacena y procesa en un ordenador obteniendo el electroferograma de la separación.

De los detectores anteriormente señalados, la detección más utilizada es la absorción de luz ultravioleta seguida de la LIF, siendo ésta última una de las que mayor sensibilidad proporciona (Tabla I.3.1). Sin embargo, el mayor inconveniente que presenta la detección LIF es su especificidad, dado que su empleo está limitado a aquellos compuestos que contengan grupos fluoróforos o que posean grupos susceptibles de derivatización (si bien es posible su uso también en modo indirecto).

En los últimos años, la espectrometría de masas está cobrando una importancia cada vez mayor como método de detección en CE (Niessen y col., 1993; Smith y col., 1993; Cai y Henion, 1995; Banks, 1997; Ross, 2001) dado que aporta una adecuada sensibilidad, así como información estructural de las sustancias analizadas a partir de su masa molecular y/o patrones de fragmentación obtenidos.

A continuación se describirán algunos aspectos de los tres detectores más utilizados en CE (UV-VIS, LIF y MS), con especial atención en el MS, dado que, conjuntamente con el UV-VIS, se ha utilizado en la presente Tesis Doctoral.

Tabla I.3.1.- Sistemas de detección utilizados en CE y límites de detección alcanzados (Khaledi, 1998).

Sistema de detección	Límites de detección alcanzados
Absorción UV-VIS directa	10^{-5} - 10^{-7} M
Absorción UV-VIS indirecta	10^{-4} - 10^{-6} M
Fluorescencia directa	10^{-7} - 10^{-9} M
Fluorescencia indirecta	10^{-6} - 10^{-8} M
Fluorescencia inducida por láser	10^{-9} - 10^{-12} M
Espectrometría de masas	10^{-8} - 10^{-10} M
Quimioluminiscencia	10^{-7} - 10^{-9} M
Índice de refracción	10^{-5} - 10^{-7} M
Amperométrico	10^{-8} - 10^{-9} M
Conductimétrico	10^{-5} - 10^{-7} M
Radioquímico	10^{-9} - 10^{-11} M
Radioactividad	10^{-6} - 10^{-10} M
Raman	10^{-3} - 10^{-5} M

I.3.3.1.- Detector ultravioleta-visible (UV-VIS)

La absorción UV-VIS es el método de detección más ampliamente utilizado en CE, debido a su naturaleza casi universal para la detección de compuestos orgánicos y a la baja absorción de radiación en la zona del UV-VIS de los capilares de sílice fundida. Es más, el uso de bajas longitudes de onda en CE-UV supone una ventaja inherente sobre la detección UV en HPLC: bajas longitudes de onda de luz UV son difíciles de utilizar en LC tanto en régimen isocrático como en gradiente, debido a las impurezas de la fase móvil, al ruido inducido por el flujo y a los efectos relacionados con el índice de refracción de la fase móvil (Taylor y Yeung, 1991). Sin embargo, los capilares de sílice fundida solamente absorben a longitudes de onda inferiores a 200 nm y el trabajar a dichas longitudes de onda (Kakehi y col., 1994) puede ser tolerable en CE debido a que los capilares tienen espesores muy pequeños.

Aunque los detectores UV-VIS son baratos, fiables y su manejo y mantenimiento es sencillo, poseen una sensibilidad relativamente baja debida al pequeño paso óptico de la zona de detección (el propio diámetro interno del capilar). Para aumentar el camino óptico se han desarrollado capilares con células *burbuja* o *bubble-cells*, (Horstkotter y col., 2002) o células en forma de Z, *Z-shaped cells*, (Morin y col., 1993). En las células *burbuja* se crea una región expandida en el interior del capilar, de manera que es el diámetro interno el que se modifica localmente pero no el externo. Dado que la burbuja se localiza solamente en la región de detección, no se produce incremento alguno de la corriente. Sin embargo, en dicha zona se produce una disminución local de la velocidad de flujo y de la resistencia eléctrica y, por tanto, del campo eléctrico, disminuyendo así la velocidad de migración de los analitos. En las células en forma de Z, por su parte, lo que se hace es cambiar el sentido de la radiación sobre el capilar, deformándolo en la región de detección formando una zeta y haciendo incidir la luz longitudinalmente, el volumen interno del capilar no se modifica. El uso de ambos tipos de células no se ha generalizado, dado que su manejo a veces no es sencillo y, aunque el incremento de sensibilidad obtenido es apreciable, la resolución y la eficacia de los picos pueden verse afectadas de manera importante.

En este tipo de detectores, la detección se puede llevar a cabo directa o indirectamente. En este último caso, menos frecuente que el primero, el electrolito de fondo posee una sustancia que presenta una alta absorción a la longitud de onda seleccionada, de forma que cuando los analitos pasan por el detector, dado que presentan una baja o nula absorción a dicha longitud de onda, aparecen en el electroferograma como picos invertidos o picos negativos.

I.3.3.2.- Detector de fluorescencia inducida por láser (LIF)

Los detectores de fluorescencia presentan como principal ventaja su elevada sensibilidad frente a los detectores UV-VIS, pudiéndose alcanzar los menores límites de detección sobre todo cuando se emplea LIF. Este tipo de detector LIF fue por primera vez acoplado en línea a un instrumento de CE por Gassman y col. (1985). En LIF el haz

procedente del láser se enfoca sobre el capilar de forma que la fluorescencia emitida es recogida sobre un detector fotosensible. Se trata de un detector muy sensible, sin embargo, su uso está restringido a moléculas que posean fluorescencia propia, como porfirinas (Wu y col., 1994a), algunos fármacos (Roach y col., 1988, Reinhold y col., 1992, Soini y Novotny, 1992), bilirrubinas (Wu y col., 1994b), etc. o bien, dado que la fluorescencia nativa no es una propiedad muy extendida entre los analitos, éstos pueden ser adecuadamente derivatizadas con agentes fluorescentes apropiados que los haga detectables por esta vía. La utilización de un láser como técnica de excitación en CE presenta una serie de ventajas tales como el que puede ser enfocado cerca del límite de difracción de la luz y que, frecuentemente, su poder de excitación puede ser variado en un amplio intervalo y optimizado para los analitos en estudio. Aunque la mayoría de los láseres tienen una sola o muy pocas líneas de emisión, están disponibles una variedad de ellos con líneas de emisión comprendidas entre las regiones del UV y del infrarrojo. Los láseres más comunes son: Ar (λ_{exc} =457, 488, 514 nm), He-Cd (λ_{exc} =325, 354, 442 nm), He-Ne (λ_{exc} =543,5 nm) aunque también están disponibles comercialmente láseres de diodos que trabajan en el infrarrojo (Higashijima y col., 1991, Williams y Soper, 1995).

En la mayoría de los casos, la derivatización se lleva a cabo en el modo pre-columna o fuera de línea aunque en la bibliografía también se han descrito casos en los que la derivatización se lleva a cabo en el propio capilar (Wu y col., 2000b). Entre los agentes derivatizantes más utilizados se encuentran FITC, OPA, ANSA, ANDSA y ANTS.

Al igual que en la detección UV-VIS, una alternativa para la detección de analitos que no presentan grupos fluoróforos es la detección indirecta, añadiendo al electrolito de separación un fluoróforo adecuado; aunque en este caso la sensibilidad obtenida es también menor que con la detección directa.

I.3.3.3.- Detector de masas: Acoplamiento CE-MS

La MS es una técnica altamente selectiva, con una adecuada sensibilidad, que proporciona información sobre la masa molecular de los compuestos en estudio y que

permite, en algunos casos, la determinación estructural de dichos compuestos. Una de las ventajas de su acoplamiento a cualquier técnica de separación es que proporciona una segunda dimensión de separación, en concreto, acoplada a la CE, además de la separación de los analitos según su relación carga/tamaño (en el modo CZE), se produce la separación en función de su relación masa/carga en MS. Los modos de CE más adecuados para su acoplamiento en línea con un espectrómetro de masas son los de zona libre y la electrocromatografía ya que son los que pueden utilizar un tampón de separación más compatible con la posterior detección por espectrometría de masas (Brocke y col., 2001). En la Figura I.3.2 se muestra una visión global del acoplamiento CE-MS.

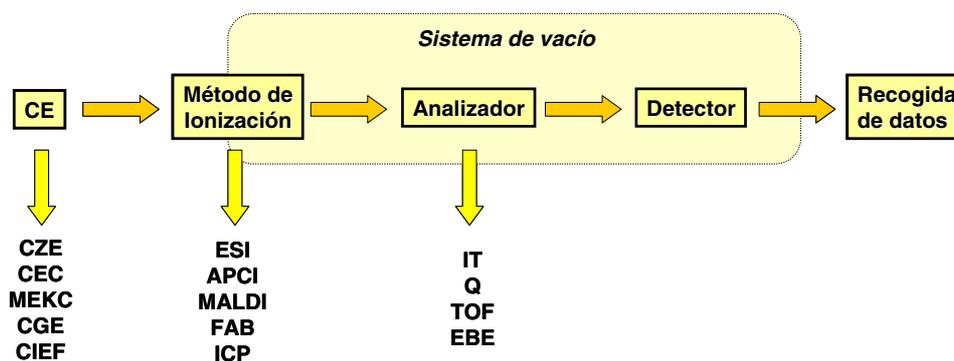


Figura I.3.2.- Esquema global del acoplamiento CE-MS.

I.3.3.3.1.- Interfases CE-MS

Después de la publicación de Jorgenson y Lukacs (1981a) que puso de manifiesto la alta capacidad de separación de la CE, pasaron seis años hasta que fue acoplada por primera vez a un espectrómetro de masas (Olivares y col., 1987). Este retraso fue debido, por un lado, a la complejidad del acoplamiento y, por otro, a los profundos cambios que estaba experimentando la espectrometría de masas en ese tiempo. El acoplamiento entre CE y MS debe solucionar una primera dificultad asociada con la compatibilidad entre una técnica que trabaja con muestras en fase líquida, como la CE, con otra técnica que trabaja con muestras en estado gaseoso, como la MS.

Además, dicho acoplamiento debe solucionar una segunda dificultad como es el cierre del circuito eléctrico en el que trabaja todo equipo de CE.

Se han utilizado, de forma satisfactoria, diversas interfases para el acoplamiento CE-MS: plasma de acoplamiento inductivo (Kannamkumarath y col., 2002; Álvarez-Llamas y col., 2005), bombardeo de átomos rápidos de flujo continuo, ionización por *electrospray* o electronebulización (Hernández-Borges y col., 2004), ionización química a presión atmosférica (Muijselaar y col., 1998; Nilsson, y col., 2003; Tanaka y col., 2003) y *electrospray* asistido neumáticamente o *ionspray* (Tomer, 2001). Otros sistemas de ionización como la desorción-ionización láser asistida por matriz (MALDI) son utilizados fundamentalmente en los acoplamientos CE-MS fuera de línea recogiendo las fracciones procedentes de la columna capilar, aunque en los últimos años, se han desarrollado diversos mecanismos para llevar a cabo el acoplamiento CE-MALDI-MS en línea. En la Figura I.3.3 se muestra de forma gráfica una comparativa entre los sistemas de ionización que han sido más utilizados en el acoplamiento CE-MS, en términos de polaridad y peso molecular de los analitos en estudio.

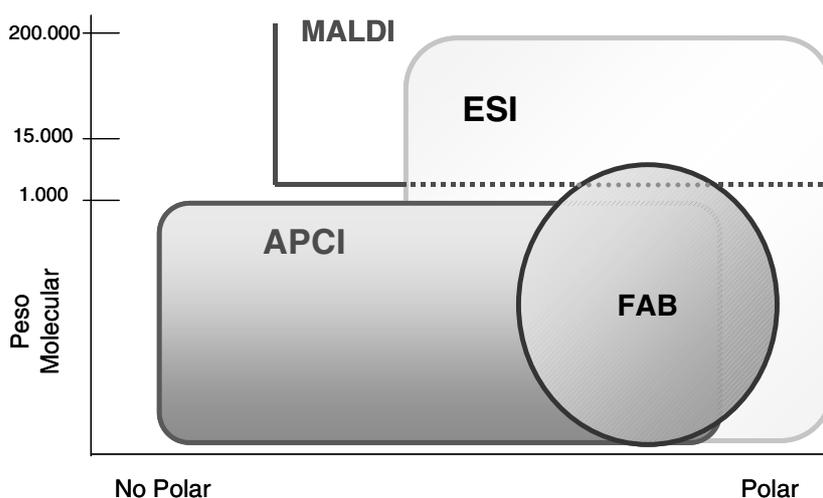


Figura I.3.3.- Gráfico comparativo de los sistemas de ionización más utilizados en el acoplamiento CE-MS.

MALDI, permite trabajar con compuestos de alto peso molecular, al igual que la interfase ESI, aunque presenta dificultades para la ionización de moléculas pequeñas a diferencia del ESI. Por otro lado la polaridad de los analitos debe ser superior cuando se trabaja con las interfases ESI y FAB. Tanto MALDI como APCI permiten la ionización de compuestos más apolares que FAB y ESI. La interfase ESI abarca una de las zonas más amplias en términos de pesos moleculares y polaridades, además de poder trabajar con sustancias termolábiles, al ser una técnica de ionización de las denominadas “blandas”.

La interfase ESI, en sus distintas modalidades es, sin duda alguna, la más utilizada en la actualidad en el acoplamiento CE-MS, ya que permite que las moléculas sean transferidas directamente desde la fase líquida propia de la CE hacia la fase gaseosa necesaria en MS. Además, ha demostrado suministrar una sensibilidad suficiente, una gran versatilidad y ser de fácil manejo. Por este motivo se realiza, a continuación, una descripción más detallada de este tipo de ionización.

Ionización por *electrospray*

El *electrospray* es una técnica de ionización suave, en la que los iones de la muestra, procedentes de la disolución a la salida del capilar de separación, son transferidos desde una fase condensada a una fase gas (Dole y col., 1968; Gaskell, 1997; Niessen, 1997; Smyth, 1999). El uso del *electrospray* en MS fue principalmente desarrollado por Yamashira y Fenn (1984) lo que les supuso la obtención del Premio Nobel de Química en el año 2002. En ocasiones, no se considera una técnica de ionización en sí, ya que no produce iones, sino la transferencia de éstos desde una fase líquida a una fase gaseosa, sin embargo, el *electrospray* tiene el potencial suficiente, principalmente a través de colisiones ion-molécula, para producir cambios en la naturaleza y cargas de los iones en fase gaseosa.

La generación del *electrospray* se realiza de una forma simple (Figura I.3.4). Inicialmente se establece una diferencia de potencial entre el final del capilar de separación y la entrada al espectrómetro de masas. El valor de este potencial varía entre

3 y 6 kV. Si este potencial es positivo, entrarán al equipo MS los iones negativos presentes en la disolución que sale del capilar de separación. Del mismo modo, si se aplica un potencial negativo, entrarán al sistema de masas los iones positivos. A medida que la disolución sale del capilar se genera una nube de gotas altamente cargadas que son sometidas a un gradiente de potencial antes de llegar al espectrómetro de masas. Durante su recorrido hasta el orificio de entrada al espectrómetro de masas, las gotas reducen su tamaño, por un lado, debido a la evaporación del disolvente, que se favorece mediante un flujo de gas “de secado” en la cámara de ionización y, por otro lado, por una subdivisión (lo que se denomina “explosiones de Coulomb”) debido a la alta densidad de carga existente en la superficie de las gotas provocada por el potencial aplicado y el tamaño cada vez menor de las gotas debido a la evaporación del disolvente (Figura I.3.4). Al final del proceso se obtienen iones (monocargados o multicargados) que son transferidos al “sistema óptico” del espectrómetro de masas, zona en la que los iones son transportados y dirigidos hacia el analizador de masas y, posteriormente, al detector.

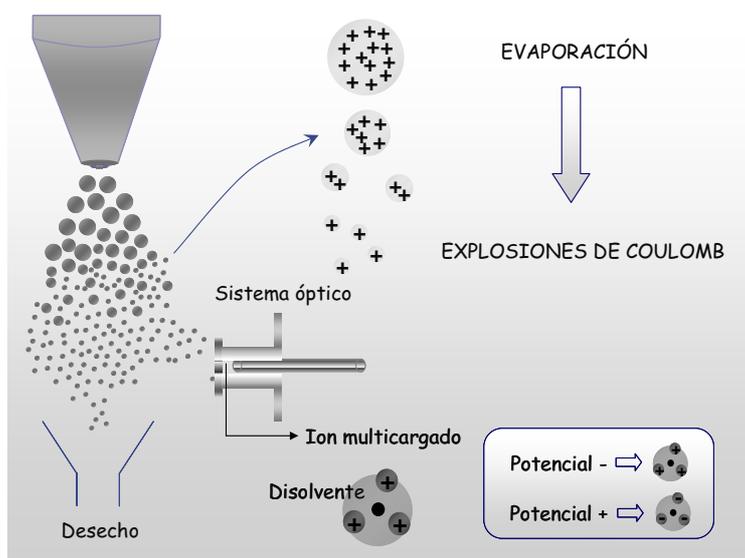


Figura I.3.4.- Esquema de la generación del *electrospray*.

Como ya se ha señalado anteriormente, un aspecto muy importante a tener en cuenta en cualquier acoplamiento CE-MS es el método utilizado para establecer el cierre

del circuito eléctrico a la salida del capilar. Para ello es necesario modificar el modelo convencional de CE en el cual los extremos del capilar y los electrodos se encuentran sumergidos en una disolución conductora, normalmente la misma que se encuentra en el interior del capilar.

Como ya se ha comentado arriba, el primer acoplamiento CE-MS a través de una interfase ESI fue llevado a cabo por Olivares y col. (1987). En este acoplamiento, la conexión eléctrica se realizó mediante un recubrimiento de la punta del capilar con un metal conductor, siendo necesaria la presencia de flujo electroosmótico para completar el circuito eléctrico. Era necesario por un lado, un alto porcentaje de medio acuoso, y por otro, una fuerza iónica adecuada en el tampón de separación. Aunque esta interfase es compatible con el pequeño volumen de líquido que fluye del capilar (0,1-1 $\mu\text{l}/\text{min}$), el mantenimiento de un *electrospray* estable con un flujo inferior a 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ es muy difícil. Por otro lado el *electrospray* generado es muy sensible a pequeñas diferencias del campo eléctrico, a variaciones en el flujo y otras perturbaciones. El final del capilar metalizado se empleó, además, para generar la diferencia de voltaje que requiere el *electrospray*, generándose una diferencia de potencial de 3-6 kV entre el final del capilar y la entrada al espectrómetro de masas. La vida media de este capilar metalizado era limitada (pocas decenas de inyecciones), siendo, además, muy laborioso el proceso de fabricación de estos capilares con el metal depositado.

En los años sucesivos, el desarrollo de esta interfase CE-ESI-MS se fue mejorando, introduciendo diversas variaciones que han dado lugar en la actualidad a tres modelos de interfase ESI para CE-MS: la denominada coaxial con flujo adicional (*coaxial liquid sheath-flow interface*), la que no emplea flujo adicional (*sheathless interface*) y la de unión líquida (*liquid-junction interface*).

Interfase coaxial con flujo adicional (*coaxial liquid sheath-flow*)

El diseño de esta interfase fue desarrollado inicialmente por Smith y col. (Smith y col. 1988; Edmonds y col., 1989) como mejora al primer diseño CE-ESI-MS de Olivares y

col. (1987). En este nuevo diseño, el cierre del circuito eléctrico se lleva a cabo a través de una disolución conductora (líquido adicional o *sheath liquid*). Esta interfase permite una mejor adaptación de la misma a un mayor número de modos de CE, ya que el contacto eléctrico es independiente del flujo procedente del capilar, por lo que se van a poder emplear tampones de separación de naturaleza orgánica o acuosa, y fuerzas iónicas más altas, que no eran compatibles con la primera interfase ESI.

Esta interfase está formada por tres tubos concéntricos (ver Figura I.3.5). El primero de ellos, situado en el interior, es el propio capilar de separación que se encuentra rodeado de un tubo de acero inoxidable por el que fluye el flujo adicional. Por el tercer tubo fluye un gas, normalmente nitrógeno, que favorece la nebulización de la muestra. Estos tres tubos concéntricos están situados en la cámara de nebulización, que se encuentra a una temperatura generalmente comprendida entre 100 y 350 °C. La situación del capilar de separación en el interior de estos tubos es importante. No debe sobresalir más de 0,1-0,2 mm con respecto a los tubos del flujo adicional y del gas de nebulización para que, de esta manera, se genere el *spray* de forma adecuada.

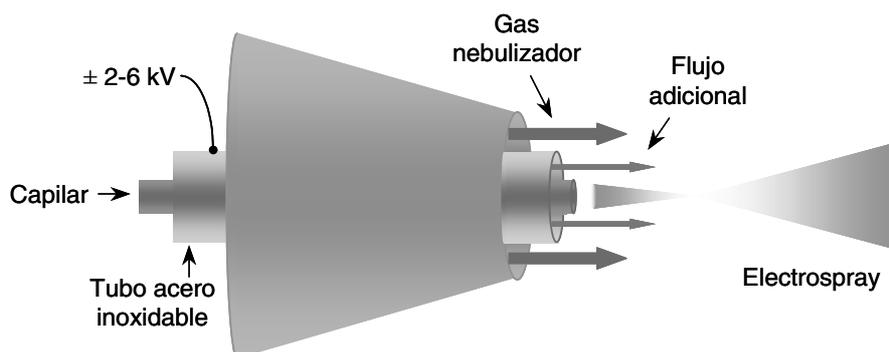


Figura I.3.5.- Diseño de la interfase coaxial con flujo adicional (*coaxial liquid sheath-flow*).

El flujo adicional que se hace pasar por el tubo metálico que rodea el capilar, cierra el circuito eléctrico necesario durante la separación por CE al establecer el contacto eléctrico entre el electrodo situado en el vial de entrada, el capilar y el tubo de

acero inoxidable que hace de electrodo de salida. Este tubo metálico sirve también para definir la diferencia de potencial entre la salida del capilar y la entrada del espectrómetro de masas.

El flujo adicional debe tener una conductividad eléctrica suficiente como para completar el circuito eléctrico, si bien se puede trabajar con una disolución de conductividad baja siempre y cuando esté compensada por la conductividad del tampón de separación. Si se trabaja con fuerzas iónicas muy altas en el flujo adicional o en el tampón de separación, se pueden producir descargas eléctricas en la interfase. Se ha de tener en cuenta que concentraciones de tampón o de flujo adicional relativamente altas, pueden perjudicar la detección por MS ya que se produciría fundamentalmente la ionización en fase gaseosa de estas especies, desplazando a los analitos en estudio, aumentando el ruido de fondo o, incluso, originando la obstrucción de la interfase o del tubo de entrada al espectrómetro de masas.

La naturaleza del flujo adicional y del tampón de separación va a afectar a la transferencia de los analitos desde la fase líquida a la gaseosa. Normalmente el flujo adicional suele estar compuesto de un porcentaje mayor o igual a un 50% de disolvente orgánico, con la adición de algún ácido o base en función de la naturaleza de los analitos y el modo (positivo o negativo) en que se quieran ionizar. La optimización de este flujo adicional supone la elección de la cantidad y tipo de disolvente orgánico a utilizar, pH y también la velocidad de salida del flujo, afectando todo ello a la relación señal/ruido de la detección por MS.

La mayor parte de las interfases CE-MS que se comercializan en la actualidad son de este tipo y se caracterizan por ser equipos con una robustez adecuada, si bien el flujo adicional origina la dilución de los compuestos a analizar y, por tanto, la sensibilidad que se obtiene es inferior a la que proporciona la interfase sin flujo adicional que se describe a continuación.

Interfase sin flujo adicional (*sheathless*)

La mayoría de los dispositivos de este tipo se basan en la primera interfase descrita por Olivares y col. (1987), empleando para el cierre del circuito eléctrico el recubrimiento con un metal conductor del extremo del capilar próximo al equipo MS (Wahl y col., 1994; Krieger y col., 1995; Bateman y col., 1997), siendo el oro y la plata los metales más utilizados (Figura I.3.6). El diámetro del extremo final del capilar se suele reducir (usando, por ejemplo, ácido fluorhídrico) para aumentar el rendimiento y la estabilidad del *electrospray*. Los avances en las técnicas de recubrimiento han mejorado la estabilidad de dicho *spray*, al ser ésta la mayor limitación en los inicios del acoplamiento CE-ESI-MS. Otros dispositivos permiten el cierre del circuito eléctrico introduciendo un electrodo a la salida del capilar (Fan y col., 1994; Cao and Moini, 1997). En otros acoplamientos sin flujo adicional la fuente de alto voltaje proporciona el campo eléctrico tanto para la separación en CE como para el *electrospray*, de modo que la posición del extremo final del capilar se ajusta cerca del electrodo de entrada al espectrómetro de masas (≈ 1 mm) y el contacto eléctrico entre ambos se establece a través del aire y del *spray* formado (Mazereeuw y col., 1997).

En principio, esta modalidad de interfase sin flujo adicional parece ser la más adecuada para el acoplamiento CE-MS debido a la compatibilidad entre el flujo de muestra procedente de la columna capilar y la cantidad necesaria para llevar a cabo la detección por espectrometría de masas. A diferencia de la interfase que emplea flujo adicional, en ésta no hay dilución de los analitos ni hay, durante la nebulización, sustancias distintas a las del flujo procedente del capilar de separación, lo que supone mayores eficacias en los procesos de ionización y desorción en el *electrospray*, lo que, a su vez, se traduce en una mejora considerable de la sensibilidad (Isaac y col., 2004).

El mayor problema de este tipo de diseños sin flujo adicional es su dependencia del EOF que se genera dentro del capilar y la menor estabilidad y, por tanto, robustez con respecto a las interfases comerciales (del tipo *coaxial liquid sheath-flow*) que son hasta la fecha las más empleadas en los laboratorios.

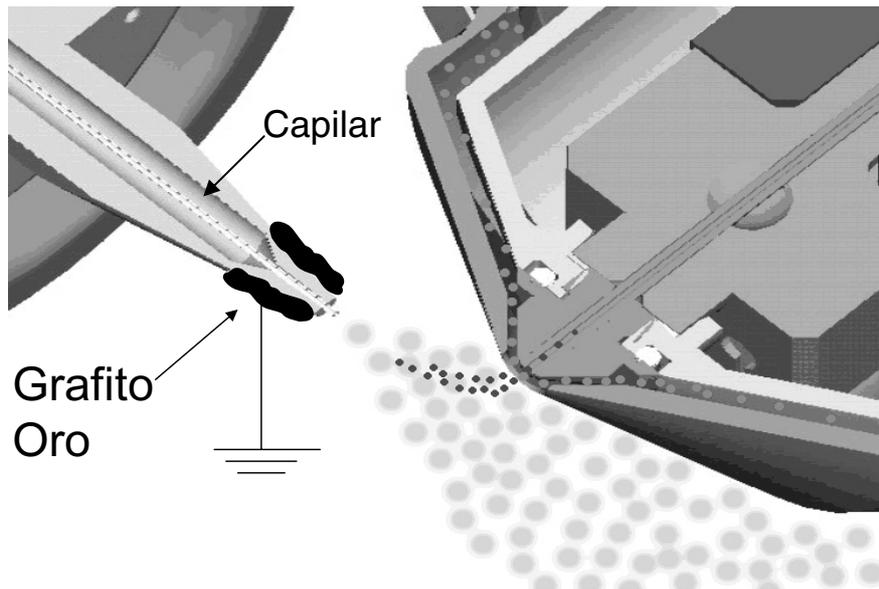


Figura I.3.6.- Esquema de la conexión eléctrica mediante la interfase sin flujo adicional (*sheathless*) utilizando un capilar recubierto con un metal conductor.

Interfase de unión líquida (*liquid-junction*)

Esta interfase fue diseñada por Lee y col. (1988, 1989). El contacto eléctrico se lleva a cabo a través de una unión líquida (Figura I.3.7) que se establece en una abertura situada en la parte final del capilar y anterior al *electrospray*. Esta cavidad está conectada a un vial con tampón de separación, que a su vez está en contacto con el electrodo que cierra el circuito eléctrico.

En los últimos años el desarrollo de este tipo de dispositivos ha sido menor. En los experimentos llevados a cabo por Pleasance y col. (1992) se demostró la menor eficacia de estos dispositivos, aunque en la actualidad siguen siendo otra alternativa para el acoplamiento CE-MS sobre todo cuando se emplea ICP-MS.

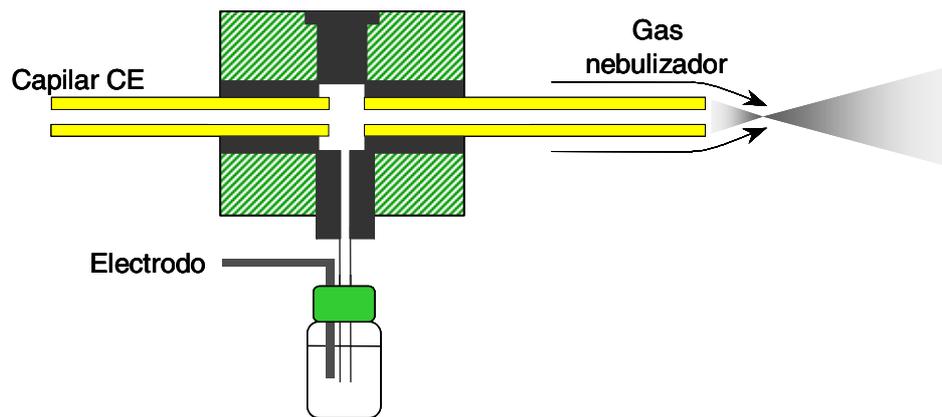


Figura I.3.7.- Esquema de la conexión eléctrica mediante la interfase de unión líquida (*liquid-junction*).

I.3.3.3.2.- Disolventes y tampones compatibles

Como ya se ha mencionado anteriormente, las disoluciones empleadas tanto en el tampón de separación como en el líquido adicional van a afectar de manera significativa a la señal obtenida en CE-ESI-MS (Wahl y Smith, 1994; Huber y col., 1999; lavarone y col., 2001; Ross, 2001). Generalmente las mejores señales se obtienen con tampones volátiles con la mínima concentración y fuerza iónica posible. Una alta cantidad de sales afectará negativamente a la formación del *electrospray* y reducirá el rendimiento de ionización-desorción de las moléculas de interés. Por otro lado, la adición de aditivos al tampón de separación (tensioactivos, selectores quirales, etc.) va a afectar también de manera negativa a la formación del *spray* y, por lo tanto, a la eficacia de ionización de los analitos para su posterior detección por espectrometría de masas. Asimismo, un empleo continuado de estas sustancias poco volátiles puede llegar a originar la obstrucción de la interfase y/o del tubo de entrada al espectrómetro.

En lo que se refiere al tampón de separación es necesario llegar a una situación de compromiso entre una alta concentración de tampón que degradará la señal obtenida

por MS, y una baja concentración que producirá ensanchamientos de las bandas electroforéticas debido a diferencias en la conductividad entre la muestra y el electrolito de separación. Son compatibles todas aquellas especies volátiles como el ácido acético ($pK_a=4,76$), ácido fórmico ($pK_a=3,75$), hidróxido amónico ($pK_a=9,30$), etc., en disolución acuosa o mezclas hidro-orgánicas, principalmente con acetonitrilo, propanol, etanol y/o metanol (Tabla I.3.2).

Tabla I.3.2.- Algunos tampones y disolventes compatibles con CE-ESI-MS.

Ácidos	Bases
Ácido acético	Hidróxido amónico
Ácido fórmico	TEA
Bicarbonato sódico	Carbonato sódico
Ácido ϵ -aminocaproico	TRIS
Ácido caproico	Dietilamina
Disolventes orgánicos	
Etanol	1-propanol
Metanol	2-propanol
Acetonitrilo	

Una técnica utilizada en algunas ocasiones con objeto de poder utilizar compuestos no compatibles con ESI-MS (por ejemplo, tensioactivos) en el tampón de separación, es la denominada técnica de *llenado parcial del capilar* o *partial filling* (Nelson y col., 1996; Molina y col., 2001). En esta técnica parte del capilar se rellena con un electrolito que contiene el tensioactivo, de forma que éste interacciona con los analitos en cuestión, provocando su separación, sin que el tensioactivo se introduzca en el espectrómetro de masas. Es importante en este caso optimizar bien la cantidad de tampón con tensioactivo introducida en el capilar así como controlar que durante el tiempo de análisis este último no se introduce en el sistema óptico del instrumento. El uso de esta técnica permite utilizar otros tipos de tampones pero, en algunos casos, su aplicación es algo tediosa y no siempre se obtienen los resultados esperados.

Como líquido adicional se suelen utilizar mezclas hidro-orgánicas (en general 1:1) con acetonitrilo, etanol, propanol, metanol y una pequeña cantidad de ácido o base (normalmente en porcentajes inferiores al 1%) en función del analito y de si la ionización se realiza en el modo positivo o negativo.

Todas ellas constituyen las sustancias más comúnmente utilizadas en CE-MS ya que proporcionan adecuadas separaciones en CE, además de una buena señal en MS. En ocasiones se emplean sustancias no volátiles que aunque interfieran en la nebulización son necesarias para llevar a cabo una correcta separación electroforética. Los tampones más tradicionales en CE (TRIS, fosfato, etc.) pueden ser utilizados en concentraciones más bajas que las utilizadas tradicionalmente, normalmente inferiores a 20 mM.

I.3.3.3.- Analizadores

Existe una variada gama de equipos de MS que pueden ser utilizados en los acoplamientos CE-MS: los cuadrupolos (Q), las trampas de iones (IT), los sectores magnéticos (EBE), los analizadores de tiempo de vuelo (TOF), así como sistemas más complejos formados por combinación de los anteriores (por ejemplo, Q-TOF). En el acoplamiento CE-MS se han utilizado fundamentalmente los analizadores de IT, Q o TOF. En la Tabla I.3.3 se presentan de forma resumida algunas ventajas e inconvenientes de estos analizadores.

Tabla I.3.3.- Clasificación de los analizadores en función de las cualidades que se indican.

	Resolución	Sensibilidad	Rango de masas	Velocidad de barrido	MS/MS
Mejor	EBE	TOF	TOF	TOF	
↑	TOF	EBE	EBE	IT	IT
	IT	IT	Q	Q	
Peor	Q	Q	IT	EBE	

I.3.4.- Técnicas de preconcentración en línea o de “*stacking*” en CE

Actualmente, existen diversos métodos de preconcentración en línea, también denominados métodos de *stacking*, utilizados para mejorar la baja sensibilidad de la CE asociada tanto al pequeño volumen de muestra introducido en el capilar como, en el caso de la detección espectroscópica, al pequeño paso de luz que se corresponde con el pequeño diámetro del capilar. La mejora de la sensibilidad que se obtiene con estos métodos depende, en general, de la naturaleza de los analitos y de la matriz en la que se encuentran disueltos, así como de las condiciones de separación empleadas.

El término *stacking* fue propuesto por primera vez por Ornstein (1964). Actualmente, este término hace referencia al estrechamiento de las bandas electroforéticas -de forma que se produce una concentración de la muestra- como consecuencia del propio proceso electroforético. El fenómeno de *stacking* se conoce casi desde el nacimiento de la electroforesis clásica. Haglund y Tiselius (1950) fueron los primeros en utilizar muestras disueltas en una matriz con una conductividad inferior a la del electrolito de separación. En dicho trabajo, concluyeron que el método de *stacking* era bastante eficaz, nada complicado y que podría ser ampliamente aplicado en otros casos. Ornstein (1964) y Davis (1964) crearon en una separación por electroforesis clásica en gel de poliacrilamida una zona con una conductividad distinta a la del gel. La denominaron electroforesis discontinua (*disc electroforesis*) que proporcionó buenos resultados en este sentido. Otra mejora importante en la preconcentración en línea fue la isotacoforesis (ITP), ya descrita anteriormente, y desarrollada por Everaerts y col. en los años 70 (Everaerts y col., 1976; Mikkers y col., 1979a, 1979b). Sin embargo, debido a la complejidad que plantea la elección de electrolitos adecuados no ha sido ampliamente utilizada en este sentido.

Después de que naciera la CE, los primeros en utilizar técnicas de *stacking* parecidas a las anteriores en CZE para analitos con carga, fueron Mikkers y col., (1979c). Posteriormente, Chien y Burgi (1991, 1992) introdujeron lo que se denominaría como *field-amplified sample stacking* (FASS) también conocida como *field-enhancement*

sample injection (FESI). Desde entonces, se han desarrollado otras técnicas que han sido ampliamente utilizadas, tanto para analitos con carga como neutros, sobre todo recientemente, tal como muestran los últimos artículos de revisión (Osborn y col., 2000; Shihabi 2000; Chien, 2003; Kim y Terabe, 2003).

Los métodos de preconcentración en línea pueden clasificarse en dos grandes grupos. En primer lugar, los que hacen uso de mecanismos de preconcentración cromatográficos como la SPE en línea y, en segundo lugar, lo que están basados en fenómenos electroforéticos. En el primero de ellos, se trata en general de capilares de pequeñas dimensiones o bien membranas que contienen una fase estacionaria (desde C₁₈ hasta inmunoabsorbentes) que retiene, más o menos selectivamente, los analitos (Tomlinson y col., 1996; Heegaard y col., 1998; Martínez y col., 2000; Schweitz y col., 2000). Posteriormente, se eluyen con un disolvente adecuado al mismo tiempo que se introducen en el capilar. En este sentido se han desarrollado diferentes diseños que intentan superar, cada vez más, los problemas que van surgiendo, dado que no es fácil aplicar esta técnica. Los métodos basados en fenómenos electroforéticos, por su parte, focalizan y preconcentran los analitos aprovechando diferentes propiedades tales como diferencias de conductividad, pH, fuerza iónica, viscosidad, etc. entre el tampón de separación y la matriz de la muestra (Britz-McKibbin y Chen, 2000). Dado que este tipo de procedimientos ha sido utilizado en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, a continuación se describirán algunos de los métodos más utilizados.

1.3.4.1.- “Stacking” en modo normal (NSM)

El NSM es la técnica de preconcentración en línea más simple (Quirino y Terabe, 1997). El fenómeno de *stacking* se produce cuando la muestra, inyectada hidrodinámicamente, tiene una conductividad menor que la del BGE. En la zona de inyección, al ser menor la conductividad de la muestra, el campo eléctrico creado al aplicar la diferencia de potencial es mayor y, por lo tanto, la velocidad electroforética de los analitos es también mayor. Esto hace que los analitos se muevan rápidamente hacia la frontera entre ambas zonas y que se produzca la preconcentración (Figura 1.3.8).

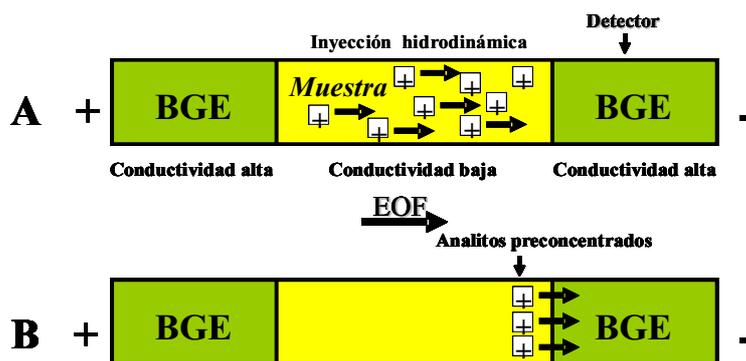


Figura I.3.8.- *Stacking* en modo normal (NSM).

La técnica puede aplicarse indistintamente para cationes y para aniones, trabajando tanto en polaridad normal como en polaridad inversa. Permite, además, que el volumen de muestra introducido en el sistema electroforético pueda aumentarse hasta un 10-20% del volumen total del capilar sin pérdida alguna de eficacia, siempre que se trabaje con los analitos disueltos en la matriz adecuada y se optimicen algunos parámetros como, por ejemplo, el tiempo de inyección. Como disolvente de la muestra puede utilizarse agua o un tampón de concentración menor que el tampón de separación. También el uso de disolventes orgánicos solos o mezclados en diferente proporción con el tampón de separación puede dar buenos resultados. En este sentido, se ha utilizado con bastante frecuencia el acetonitrilo, dado que tiene una resistividad adecuada para favorecer el *stacking*. Tanto es así, que cuando en el NSM se utiliza este disolvente la técnica se conoce como *stacking con acetonitrilo* (Friedberg y col., 1997; Shihabi, 1998; Chang y Wang, 2004).

I.3.4.2.- “*Stacking*” con eliminación de matriz (SWMR)

Esta técnica es realmente una variación del NSM. En este caso, la matriz de la muestra debe tener una conductividad inferior a la del tampón y los analitos deben estar cargados o, si no poseen carga alguna, estar ligados a micelas, por ejemplo, que tengan

carga. Los aniones se pueden preconcentrar si la separación tiene lugar con polaridad normal, mientras que para preconcentrar cationes, hay que invertir el EOF y trabajar en polaridad inversa. La Figura I.3.9, muestra un esquema de este procedimiento para cationes (separación en polaridad inversa). En primer lugar, el capilar se llena prácticamente con la muestra disuelta en un tampón de baja conductividad (Figura I.3.9A), lo que, al igual que en el caso anterior, puede conseguirse también con disolven-

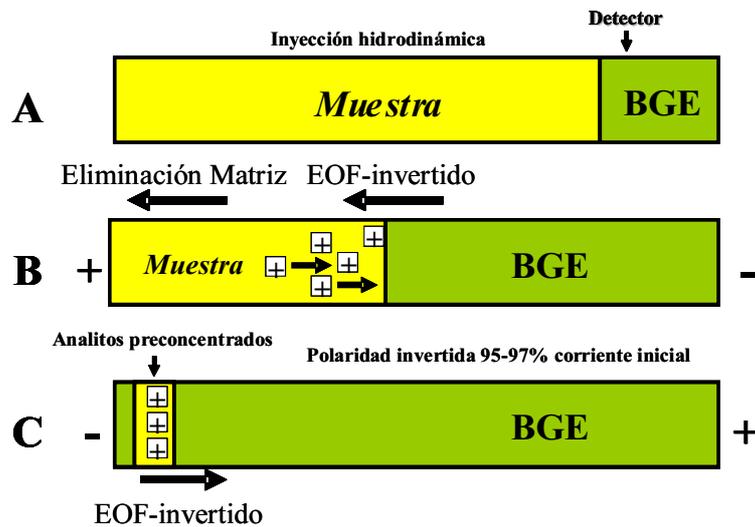


Figura I.3.9.- *Stacking* con eliminación de matriz (SWMR).

tes orgánicos, disolviendo la muestra en agua o bien en un tampón de concentración menor que la del tampón de separación. Una vez introducida la muestra, se aplica una diferencia de potencial positiva (polaridad normal) de forma que mientras los cationes se mueven hacia el cátodo, concentrándose en la frontera entre el electrolito y la muestra, el EOF, en sentido anódico, empuja la matriz de la muestra eliminándola por el extremo de inyección (Figura I.3.9B). Cuando la mayor parte de la muestra ha sido eliminada (especies cargadas negativamente y algunas neutras) la intensidad de corriente, que ha ido variando con el tiempo de separación a medida que se elimina la matriz, es de aproximadamente un 95-97% la del electrolito. En ese momento, se invierte de nuevo la polaridad y se lleva a cabo la separación (Figura I.3.9C).

I.3.4.3.- Inyección electrocinética o amplificación del campo (FASI, FASS o FESI)

En este modo de *stacking* la introducción de los analitos en el capilar se realiza en modo electrocinético, de forma que dependerá del EOF de la muestra, de la carga y movilidad del analito. Así, los analitos iónicos se introducirán en el capilar, mientras que aquellos que no posean carga quedarán en el vial que contiene la muestra. Cuando la conductividad de la muestra es inferior a la del electrolito de separación, este fenómeno de *stacking* es conocido como FASI, FASS o FESI. Al aplicar una diferencia de potencial, la baja conductividad de la muestra implica que el campo eléctrico creado es mayor que en el electrolito de separación y, como consecuencia, la velocidad de los analitos iónicos en la muestra es mayor. De esta forma, aumenta la cantidad de analito inyectada, preconcentrándose en la zona de separación entre muestra y el electrolito dando lugar a una banda más estrecha. Muchas veces, antes de la inyección de la muestra, se introduce en el capilar una pequeña cantidad de un disolvente de alta resistividad, que suele ser agua (Chien y Burgi, 1991; Vinther y Soeberg, 1991), con objeto de asegurar una adecuada amplificación del campo eléctrico y así aumentar más aún la sensibilidad.

En condiciones de separación utilizando polaridad normal, solamente se pueden inyectar electrocinéticamente cationes mientras que cuando se trabaja en polaridad inversa, con un modificador adecuado del EOF como CTAC, HDB, etc. se pueden inyectar aniones. Los analitos sin carga también pueden ser inyectados, siempre y cuando se unan a una micela con carga, tal como muestran los trabajos de Quirino y Terabe (1998a, 1998b).

I.3.4.4.- “Sweeping” MEKC

Este modelo de *stacking* fue introducido por Quirino y Terabe (1998c). En él, a diferencia del *stacking* convencional, es necesario que las conductividades de la muestra y del BGE sean lo más parecidas posible, aunque una conductividad mayor también permite la preconcentración de los analitos, sin afectarla de manera importante (Lin y col., 2001).

Tabla I.3.3.- Resumen de los métodos de preconcentración comentados (Núñez y Sentellas, 2002)

Método	Analito	Aumento de sensibilidad	Muestra
NSM	Cargado Neutro*	10	Conductividad < tampón
SWMR	Cargado Neutro**	100	Conductividad < tampón
FA SI o FESI	Cargado Neutro**	1000	Conductividad < tampón
<i>Sweeping</i> - MEKC	Con afinidad a la micela	1000	Conductividad = tampón
Isotacoforesis	Cargado	100	Movilidad intermedia a la de los tampones
<i>pH-focusing</i>	Ionizable	50- 1000***	pH diferente al del tampón

* en CEC; **unidos a micelas; ***combinando *pH-focusing* con *sweeping*.

En este caso, el capilar se acondiciona con un tampón electroforético micelar, SDS, por ejemplo, que da lugar a micelas cargadas negativamente. Seguidamente, se introduce hidrodinámicamente en el capilar un gran volumen de muestra preparada en una matriz con una conductividad similar a la del tampón electroforético micelar pero libre de micelas. Finalmente, se colocan viales que contienen el tampón micelar en los extremos del capilar y se aplica una diferencia de potencial con polaridad negativa a lo largo del mismo. Las micelas entran así en el capilar y, al ir penetrando en la zona de muestra, van interaccionando con los analitos (que se mueven en sentido contrario) y los van acumulando en una banda estrecha. La separación se realiza entonces por MEKC. El uso de esta técnica con tensioactivos catiónicos para formar micelas (Kim y col., 2001) ha conducido a incrementos de sensibilidad del orden de 10 a 1000 veces.

I.4.- Optimización y diseño experimental

Sir Ronald A. Fisher fue el primero en utilizar los métodos estadísticos conjuntamente con el diseño de experimentos (Box, 1978). Durante algunos años estuvo

a cargo de la estadística y el análisis de datos en la Estación Agrícola Experimental de Rothamsted en Londres, Inglaterra. Fue quien primero desarrolló y utilizó el análisis de varianza como herramienta primaria para el análisis estadístico del diseño experimental. A pesar de los extensos trabajos de Fisher, otros investigadores han contribuido al desarrollo de los estudios y aplicaciones sobre diseño experimental, como son Yates (1934, 1937), Box (Box y col., 1978), Kempthorne (1952) y Cochran (Cochran, 1947; Cochran y Cox, 1957).

Muchas de las primeras aplicaciones de los métodos de diseño experimental se llevaron a cabo en áreas relacionadas con la agricultura y la biología, de ahí que gran parte de la terminología utilizada provenga de estos antecedentes agrícolas. Pero no fue hasta 1930 cuando se aplicó por primera vez en la industria. Terminada la Segunda Guerra Mundial, los métodos de diseño experimental se introdujeron en las industrias químicas y de transformación de Europa y Estados Unidos.

Recientemente ha surgido un renovado interés por el diseño experimental que actualmente se aplica en multitud de áreas que emplean de forma extensiva la experimentación.

En muchas técnicas analíticas la respuesta del sistema de medida depende de una variedad de factores experimentales bajo el control del operador. Para una aplicación concreta será importante establecer qué valores de estos factores aseguran que la respuesta del sistema sea óptima. De esta forma, el proceso de búsqueda y localización del conjunto de valores de los factores que producen el mejor resultado posible en una medición o determinación analítica se conoce como *optimización* (Cela, 1994). Los factores se pueden clasificar en *controlados* (si pueden ser alterados a voluntad del experimentador) o *incontrolados* y pueden ser, tanto *cualitativos* (si sus posibles "valores" no se pueden ordenar numéricamente), como *cuantitativos*. Los diferentes valores que toma un factor cuando se realiza un experimento se denominan *niveles* o *tratamientos*. La elección de estos niveles viene dada principalmente por la experiencia y conocimiento del experimentador, así como por las limitaciones o

restricciones del sistema físico o instrumento de trabajo.

El término *diseño experimental* se utiliza habitualmente para describir las etapas de identificación de los factores que pueden influir en el resultado de un experimento, de modo que se minimicen los efectos de los factores incontrolados, así como las etapas de utilización del análisis estadístico para separar y evaluar los efectos de los diversos factores implicados. Haciendo uso de tests de significancia se puede determinar qué factores son influyentes en el resultado y cuáles no. Dado que son muchos los factores que afectan a los resultados experimentales se pueden necesitar diseños experimentales muy complejos. Son muchos los tipos de diseño experimental existentes de los cuales se describen, a continuación, los más utilizados (Kellner, 1998).

Diseños de “screening”

Así se denominan a aquellos diseños en los que existen dos niveles para cada factor, de entre los cuales el más utilizado es el *diseño factorial completo* (*full factorial design*) a dos niveles (Figura I.4.1), también denominado *diseño 2^k* , siendo k el número de factores. Si el número de factores de un experimento es pequeño, los *diseños factoriales completos* pueden llevarse a cabo de forma sencilla y rápida. Sin embargo, si el número de factores es grande, el número de experimentos aumenta de forma drástica, de forma que cuando éstos son muchos es necesario intentar discernir cuáles de ellos son realmente importantes o influyentes en el experimento. Ello puede llevarse a cabo determinando los denominados *efectos de los factores*. Muchos programas estadísticos permiten calcular numéricamente la influencia de cada factor o de la combinación de varios de ellos sobre el experimento en sí, permitiendo eliminar aquellos que realmente ejercen poca o ninguna influencia.

Cuando el número de factores es grande, el número de experimentos puede reducirse utilizando un *diseño factorial fraccionado*. En estos casos, el número de experimentos es reducido por un valor p de acuerdo con un diseño de tipo 2^{k-p} . Cuando p toma el valor de 1, se tiene el denominado *diseño semifraccionado*.

Aparte de los diseños *saturados*, se utilizan muchos otros *diseños factoriales fraccionados* para estudiar el efecto de los factores. Estos diseños aparecen y pueden ser generados con la mayoría de los programas estadísticos.

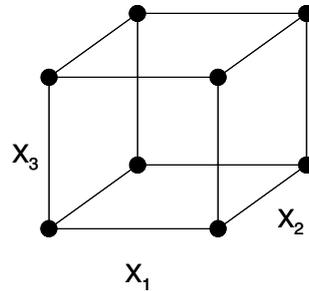


Figura I.4.1.- Diseño factorial completo a dos niveles. x_1 , x_2 y x_3 representan los factores.

Diseños de superficie de respuesta

Cuando la respuesta de un sistema analítico depende de dos factores que son variables continuas, la relación entre la respuesta y los niveles de los dos factores se puede representar por una superficie tridimensional denominada *superficie de respuesta*. Una representación más conveniente es el *diagrama de curvas de nivel*, muy parecido a los mapas topográficos, siendo su forma *a priori* desconocida para el investigador.

Para describir la relación cuantitativa existente entre las respuestas y los factores, se utilizan modelos matemáticos que deben ser capaces de describir tanto superficies de respuesta lineales como no lineales. Las dependencias no lineales pueden ser modeladas si los niveles de los factores que se investigan son al menos tres.

Los *diseños factoriales* de tres niveles se conocen como *diseños de superficie de respuesta*. En este sentido también existen *diseños factoriales completos de tres niveles* análogos a los existentes con dos niveles. Este tipo de diseños se utilizan frecuentemente para estudiar los efectos producidos por dos o tres factores. Si se trata de un número superior, surge el mismo problema que en los *diseños de screening*: el número de experimentos se hace demasiado grande. Estas desventajas han hecho que

se desarrollen los denominados *diseños óptimos*, de los que el *diseño compuesto centrado* o *central composite design* y el *diseño de Box-Behnken* (DBB) son los más importantes.

El *diseño compuesto centrado* consiste en una combinación de un *diseño factorial completo* o *fraccionado* y de un diseño adicional, que es frecuentemente un *diseño en estrella*, en los que el punto central de ambos coincide. Si se considera un diseño formado por un *diseño factorial completo* a dos niveles unido con un *diseño en estrella*, se obtiene que el número de experimentos viene dado por:

$$N^{\circ} \text{ exp.} = 2^{k-p} + 2k + n_0$$

donde k es el número de factores, p el valor de reducción del *diseño completo* y n_0 es el número de experimentos en el centro del diseño.

La Figura I.4.2A muestra un *diseño compuesto centrado* de tres factores. La distancia α de los puntos del diseño estrella puede ser diferente para cada punto. En un diseño uniforme en el que la distancia es la misma para todos los puntos, suele tomarse

$$\alpha = 2^{k-p/4}$$

con objeto de estimar el error experimental cometido se suelen realizar réplicas de experimentos. En este sentido, normalmente suelen hacerse al menos tres réplicas del punto central.

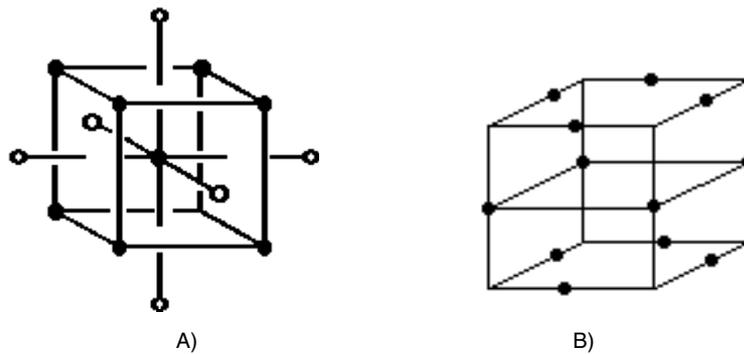


Figura I.4.2.- Ejemplos de diseño experimental. A) *Diseño compuesto centrado* para tres factores. B) *Diseño de Box-Behnken* para tres factores.

Sin embargo, el *diseño compuesto centrado* a pesar de presentar buenas propiedades estadísticas, presenta una gran desventaja de tipo experimental: *el diseño en estrella* fuera del cubo hace que aumenten los niveles de cada factor. En muchas ocasiones el ajuste de estos niveles es difícil de llevar a cabo desde un punto de vista experimental. Cuando esto ocurre, suele utilizarse el diseño de DBB, Figura I.4.2B.

En el DBB (Box y Wilson, 1951; Box y Behnken, 1960; Box y col., 1978) los puntos experimentales se encuentran en una hipersfera equidistante del punto central, tal como muestra la Figura I.4.2B para un diseño de tres factores. A diferencia del *diseño compuesto centrado* los factores sólo deben ajustarse entre dos niveles. Es más, si se llevan a cabo dos réplicas del punto central, el número de experimentos para un DBB de tres factores es 15 y no 17 como el caso del *diseño compuesto centrado* de tres factores, y los factores presentan tres niveles, no cinco.

A la hora de llevar a la práctica un diseño experimental, es preciso tener en cuenta un aspecto importante. Existen una serie de factores incontrolados durante el transcurso de un experimento, pero los errores en un método debido a esa variación incontrolada no son aleatorios durante mucho tiempo, ya que los errores en medidas sucesivas están *correlacionados*. Esto puede conducir a que se produzcan errores de tipo sistemático en los resultados. Con objeto de superar este problema de forma efectiva se utiliza la técnica de *aleatorización* que consiste en llevar a cabo los experimentos de forma aleatoria, asegurando así que los errores en cada nivel de los factores debidos a factores incontrolados no estén correlacionados.

Etapas de un proceso de optimización

Básicamente, un proceso de optimización consta de tres pasos:

1.- *Selección de una función objeto*. Se trata de seleccionar aquel criterio o variable que se pretende optimizar (maximizar o minimizar). Frecuentemente, dicha variable suele ser la señal analítica o el tiempo de análisis. En casos más complicados, sin embargo, se idean una serie de funciones objeto obtenidas combinando varios criterios, como pueden ser la selectividad, sensibilidad, precisión... Esta función también

se denomina *función respuesta* sólo que se trata de una respuesta obtenida a partir de otras.

2.- *Selección de los factores más importantes.* Como ya se ha señalado, se puede hacer llevando a cabo un diseño experimental de *screening* que permite, mediante la determinación de los efectos de los factores, así como de su influencia en la respuesta medida, determinar qué factores son los que realmente influyen en el resultado.

3.- *Optimización.* Se trata de encontrar la combinación de factores que maximice o minimice dicha función objeto. En términos matemáticos encontrar los máximos y los mínimos son procesos virtualmente idénticos. Para ello puede distinguirse entre optimización simultánea y secuencial. En la primera la relación entre respuesta y factores se obtiene llevando a cabo un diseño experimental, construyendo un modelo matemático e investigando a través de este modelo la relación entre las variables. Por otro lado, la optimización secuencial se basa en un diseño de experimentos inicial, seguido de otros experimentos llevados a cabo en una cierta dirección que será función de esos experimentos iniciales. No se trata de buscar la relación existente entre la respuesta y los factores, sino que la superficie de respuesta se busca realizando experimentos en una cierta dirección.

Un buen método de optimización tiene dos cualidades importantes: produce un conjunto de condiciones experimentales que proporcionan la respuesta máxima o, al menos, una respuesta que sea próxima al óptimo, y lo hace así con el número más pequeño posible de etapas experimentales de ensayo. En la práctica, la velocidad y conveniencia del procedimiento de optimización resulta extremadamente importante, pudiendo ser suficiente en algunos casos utilizar un método que alcance de manera razonable un valor próximo al óptimo verdadero en un número pequeño de pasos.

I.5.- Estado actual del análisis de pesticidas por electroforesis capilar

Sin duda alguna, la GC ha sido y es la técnica utilizada más frecuentemente en el análisis de pesticidas dada su gran robustez, su alta sensibilidad y su buena reproducibilidad (Barr y Needham, 2002). Sin embargo, existen ciertos pesticidas que se descomponen a altas temperaturas, así como otros que presentan volatilidades tan bajas, que se hace necesaria una etapa previa de derivatización de los mismos, por lo que, sobre todo en estos casos, son más adecuadas otras técnicas de análisis como HPLC o CE. Aunque, en este sentido, la cromatografía de líquidos se presenta como una alternativa muy atractiva, la CE ha ido haciéndose un hueco cada vez mayor en la determinación de este tipo de compuestos, fundamentalmente, debido a los bajos requerimientos de muestra y de disolventes orgánicos, como puede apreciarse en diferentes artículos de revisión existentes al respecto (Karcher y El Rassi, 1999; Sovocool y col., 1999; Menzinger y col., 2000; Eash y Bushway, 2000; Tegeler y El Rassi, 2001; Berrada y col., 2003; Picó y col., 2003).

Con objeto de mejorar los bajos límites de detección normalmente alcanzados en CE, se han desarrollado técnicas de preconcentración tanto fuera de línea como en línea (Hempel, 2000; Valcárcel y col., 2001; Dabek-Zlotorzunska y col., 2001; Simonet y col., 2003). El primer caso comprende técnicas como la LLE, SPE, SPME o CPE, fundamentalmente. Entre ellas, las menos utilizadas hasta el momento son la SPME y la CPE. Dentro de las técnicas de preconcentración en línea se incluyen las denominadas técnicas de *stacking* o *sweeping* (Osbourn y col., 2000; Shihabi, 2000; Chien, 2003; Kim y Terabe, 2003) entre las que existen distintas variantes, como las ya comentadas anteriormente (Núñez y Sentellas, 2002).

I.5.1.- Técnicas de preconcentración fuera de línea

La LLE ha sido, hasta ahora, el método de separación clásico utilizado para la extracción de pesticidas de un amplio espectro de matrices líquidas y, aún hoy día, sigue utilizándose con frecuencia. Asimismo, la extracción sólido-líquido, asistida por

microondas o por ultrasonidos, también es bastante utilizada, sobre todo como paso previo a su extracción posterior con SPE o SPME (Rodríguez y col., 2001a, 2001b, 2003). Sin embargo, ambos procedimientos de extracción implican el uso de grandes cantidades de disolventes, así como la introducción de diversas etapas de limpieza de los extractos, etapas de evaporación, etc.

En lo que a la SPME se refiere, hasta el momento, son pocas las publicaciones que la combinan con CE para el análisis de pesticidas (Rodríguez y col., 2003; Frías-García y col., 2004b). Es de esperar que la combinación de estas dos técnicas (CE y SPME) al análisis de pesticidas vaya en aumento a medida que se consigan límites de detección del mismo orden que los obtenidos por GC o HPLC, lo que se podría llegar a conseguir al combinarlas con técnicas de preconcentración en el interior del capilar. La extracción sobre barras magnéticas agitadoras (SBSE), como variante de la SPME, se ha aplicado hasta la fecha al análisis de pesticidas previa a CE en una ocasión (Juan-García y col., 2005b), en el análisis de nueve pesticidas en verduras y frutas, y es de esperar que siga utilizándose, en cuanto se amplíe el tipo de fases estacionarias comercialmente disponibles.

Sin duda alguna, la SPE ha sido una estrategia ampliamente utilizada previa a CE en la extracción y/o preconcentración de contaminantes (Martínez y col., 2000). Se ha utilizado bastante en la extracción de pesticidas de extractos de matrices o directamente de la propia matriz, como aguas de ríos (Loos y Niessner, 1999; Carabias Martínez y col., 2000a, 2002; Hinsmann y col., 2000), aguas subterráneas (Frías-García y col., 2004b), aguas de consumo humano (Loos y Niessner, 1999; Carneiro y col., 2000; Quirino y col., 2000; Carabias Martínez y col., 2002; García-Ruiz y col., 2005), frutas y verduras (Rodríguez y col., 2001b, 2002; Juan-García y col., 2005a, 2005b), etc. Aunque en la mayoría de los casos se utilizan cartuchos empaquetados con fases estacionarias derivadas de la sílice, como C₈, C₁₈, etc. en general se ha utilizado una amplia gama de fases estacionarias (Martínez y col., 2000) en función de la naturaleza química de los analitos. Normalmente los límites de detección a los que se llega con SPE-CE-UV de pesticidas son del orden de pocos µg/l y en muy pocas ocasiones se ha llegado a los ng/l

(Loos y Niessner, 1999; Carabias Martínez y col., 2000a, 2002; Hinsmann y col., 2000; Frías-García y col., 2004b). Sin embargo, su combinación con técnicas de preconcentración en línea (Carabias Martínez y col., 2003b; Quirino y col., 2000; Núñez y col., 2002b, 2002c) ha permitido alcanzar niveles de ng/l, fundamentalmente cuando se aplica a matrices acuosas.

Además de las anteriores, la extracción en punto de nube ha sido utilizada previa a CE para el análisis de pesticidas en contadas ocasiones (Carabias Martínez y col., 1999, 2003a, 2003b). Lo mismo ocurre con la extracción con fluidos supercríticos y la extracción con líquidos presurizada (Penmetsa y col., 1997b; Nemoto y Lehotay, 1998; Lancas y col., 1999) así como con la *supported liquid membrane extraction* (SLME) -que combina tanto la LLE como los clásicos procesos de extracción por membranas- para el análisis de atrazina en zumos de frutas (Khrolenko y col., 2002) o de glifosato (Dzygiel y Wieczorek, 2000).

I.5.2.- Técnicas de preconcentración en línea

Las técnicas de preconcentración en línea constituyen una importante herramienta para mejorar la sensibilidad que normalmente se alcanza en CE (Osborn y col., 2000; Shihabi 2000; Chien, 2003; Kim y Terabe, 2003) y han sido también utilizadas para el análisis de pesticidas aunque no con demasiada frecuencia.

La SPE ha sido aplicada en línea para el análisis de pesticidas, aunque existen muy pocos trabajos al respecto, como los desarrollados para el análisis de triazinas utilizando C₁₈ como fase estacionaria por Cai y El Rassi (1992), Arce y col. (1997) y Hinsmann y col. (2000). En estos dos últimos trabajos se ha acoplado un sistema automatizado de flujo continuo (*continuous flow system*, CFS) a un instrumento de CE comercial, con objeto de mejorar no sólo los límites de detección sino, también, la reproducibilidad de la determinación.

El *sweeping* ha sido utilizado recientemente en diversas ocasiones para el

análisis de estereoisómeros del triadimenol (Otsuka y col., 2003), de sales de amonio cuaternario (Núñez y col., 2002c), de triazinas (Lin y col., 2001), fenilureas (Quirino y col., 2000) y de herbicidas fenoxiácidos (Quirino y col., 1999), al igual que el SWMR para sales de amonio cuaternario (Núñez y col., 2002b) y para pesticidas como el tiabendazol o la procimidona (Rodríguez y col., 2002). Otros autores han aplicado técnicas de *stacking* en las que las micelas juegan un importante papel, como los trabajos publicados sobre la determinación de metilcarbamatos (Molina y col., 2001), triazinas (da Silva y col., 2003), fenilureas (Quirino y col., 2000; da Silva y col., 2003) o fenoxiácidos (Quirino y col., 1999). También se ha utilizado en algunas ocasiones el FESI (Quirino y col., 1999; Turiel y col., 2000). Los límites de detección alcanzados en todos estos casos están en torno a pocos $\mu\text{g/l}$, aunque en algunos casos sólo se consigue llegar hasta niveles de mg/l dependiendo, fundamentalmente, del tipo de matriz (Molina y col., 2001; Otsuka y col., 2003).

I.5.3.- Sistemas de detección

La determinación de pesticidas en diferentes tipos de matrices se ha llevado a cabo utilizando también diferentes sistemas de detección. Los más utilizados en este sentido, son los que a continuación se detallan.

I.5.3.1.- Detección ultravioleta-visible (UV-VIS)

Dado que la mayoría de los instrumentos comerciales de electroforesis poseen un detector UV o de diodos en línea, éste sistema de detección ha sido el más utilizado hasta el momento en CE, incluido el análisis de un gran número de familias de pesticidas, sobre todo triazinas, fenoxiácidos y sales de amonio cuaternario como muestran diferentes artículos de revisión (Karcher y El Rassi, 1999; Sovocool, y col., 1999; Tegeler y El Rassi, 2001; Berrada y col., 2003; Picó y col., 2003). Generalmente, la detección de estos compuestos se ha llevado a cabo a bajas longitudes de onda, entre 200 y 254 nm, ya que casi todos los pesticidas presentan un máximo de absorción en esta gama de longitudes de onda a las que también pueden absorber multitud de

compuestos presentes en matrices reales. Es por ello que este tipo de detección debe utilizarse sólo cuando la muestra es muy limpia, como el caso de aguas, o bien cuando la muestra se ha sometido a un adecuado pretratamiento que incluye diversas etapas de limpieza, para así asegurar la correcta identificación y cuantificación de los analitos.

La baja sensibilidad asociada al pequeño paso óptico que se corresponde con el diámetro interno del capilar, ha hecho que se desarrollen diversas estrategias de preconcentración en línea, tal como se ha venido comentando. Además de éstas, también se ha desarrollado el uso de *células burbuja* o en forma de Z, que han permitido mejorar la sensibilidad hasta 500 veces, como es el caso del análisis de fenilureas por MEKC llevado a cabo por Quirino y col. (2000), aunque su uso no se ha generalizado y, en algunos casos, requiere una instrumentación adecuada, no versátil para todos los instrumentos que actualmente se comercializan.

I.5.3.2.- Detección por fluorescencia inducida por láser (LIF)

La primera aplicación CE-LIF al análisis de pesticidas, fue realizada en 1995 por Jung y Bumley para el análisis de pesticidas fenoxiácidos. Desde entonces, han ido surgiendo diferentes métodos de análisis de pesticidas y de algunos de sus metabolitos. A pesar de que la detección por LIF posee una sensibilidad bastante alta, desafortunadamente, los pesticidas no suelen presentar fluorescencia nativa y, por lo tanto, para su determinación por esta vía, es necesario desarrollar un método de derivatización de los mismos, previo a su inyección en CE o bien en el mismo capilar, siempre y cuando éstos presenten grupos funcionales susceptibles de derivatización con un agente apropiado. Además, el producto de la derivatización debe presentar fluorescencia a la longitud de onda de excitación del láser del detector que, como se ha señalado anteriormente, es una longitud de onda puntual que dependerá del tipo de láser utilizado. Con este fin se han utilizado derivatizantes como el FITC (Wall y El Rassi, 2001), FMOG (Wall y col., 2001), ácido carbazol-9-N-acético (Wall y col., 2002), OPA (Wu y col., 2000b), ANDSA (Karcher y El Rassi, 1997; Mechref y El Rassi, 1996), etc., para diferentes grupos de pesticidas.

Los trabajos publicados hasta el momento de análisis de pesticidas o sus metabolitos por CE-LIF, son bastante inferiores en número a los publicados utilizando CE-UV, debido a la limitación anteriormente mencionada. Sin embargo, esta técnica ha sido aplicada al análisis de metilcarbamatos (Wu y col., 2000b), fenoxiácidos (Juang and Brumley, 1995; Mechref y El Rassi, 1996; Penmetsa y col., 1996; Karcher y El Rassi, 2000), piretroides (Karcher y El Rassi, 1997, 2000) y pesticidas de tipo fenólico (Wall y col., 2002) así como metabolitos de pesticidas con grupos aminobencénicos (Wall y El Rassi, 2001; Wall y col., 2001). En lo que a sensibilidad se refiere, se han conseguido límites de detección realmente bajos, del orden de 10 ng/l (Penmetsa y col., 1996), 0,2 µg/l (Mechref y El Rassi, 1996) o 10^{-10} M (Wall y El Rassi, 2001), utilizando como agentes derivatizantes cloruro de dansilo, ANDSA y FITC, respectivamente. De los trabajos anteriormente mencionados, sólo el de Wu y col. (2000b) propone una derivatización de los pesticidas en el interior del capilar utilizando OPA como agente derivatizante, aunque en este caso los límites de detección alcanzados no son muy bajos, del orden de los mg/l.

También se han determinado pesticidas por CE con detección por fluorescencia indirecta, como es el caso del trabajo de Chang y Liao (2002), en el que determinaron glufosinato, glifosato y ácido aminometilfosfónico (el principal metabolito del glifosato) en aguas subterráneas enriquecidas y en preparados de pesticidas comerciales, utilizando un tampón 1 mM de fluoresceína a pH 9,5 y un láser de argón ionizado. Los límites de detección alcanzados se encontraban entre 2,5 y 15,9 µM.

I.5.3.3.- Detección por espectrometría de masas (MS)

Las características mencionadas del acoplamiento CE-MS constituyen un gran atractivo para su uso en el análisis de pesticidas. Es interesante indicar que, además de la mejora en sensibilidad e información estructural que puede aportar el empleo de CE-ESI-MS, la interfase ESI evita en muchos casos tanto la necesidad de derivatizar los pesticidas para aumentar su volatilidad, como la degradación térmica de los mismos que se podría producir, por ejemplo, en GC. Sin embargo, es evidente que es necesario

mejorar aún más la sensibilidad del acoplamiento CE-MS (en la actualidad está en torno a los mg/l- μ g/l) debido, principalmente, a los pequeños volúmenes de muestra que normalmente se inyectan (1-10 nl) y a la dilución que la ionización por ESI en el modo con flujo adicional (el más utilizado) origina. Algunos procedimientos para superar esta limitación utilizan, por ejemplo, técnicas de preconcentración durante la purificación o separación de las muestras (Núñez y Sentellas, 2002; Wu, 2003).

La primera aplicación de CE-MS al análisis de pesticidas fue descrita por Lee y col. en 1989 para la determinación de sulfonilureas. Desde entonces ha sido aplicada a otros grupos de pesticidas como metilcarbamatos (Molina y col., 2001), triazinas (Nelson y col., 1996; Nelson y Lee, 1996; Tsai y col., 1998; Menzinger y col., 2001), clorotriazinas (Yang y col., 1997), fenoxiácidos (Nielen, 1995; Otsuka y col., 1998; Menzinger y col., 2001), sales de amonio cuaternario (Moyano y col., 1996; Wycherley y col., 1996; Lazar y Lee, 1999; Núñez y col., 2002a) y mezclas de diferentes pesticidas (Rodríguez y col., 2002, 2003; Goodwin y col., 2003). Sin embargo, pocos de estos trabajos han sido aplicados a muestras reales y tan solo encontramos aplicaciones al análisis de aguas (Moyano y col., 1996; Song y Budde, 1998; Núñez y col., 2002a; Rodríguez y col., 2003), frutas y vegetales (Rodríguez y col., 2002, 2003) o trigo (Goodwin y col., 2003), de ahí que su aplicación al análisis de pesticidas en muestras reales esté aún desarrollándose.

De todos los trabajos anteriormente citados, solamente el de Goodwin y col. (2003) ha utilizado una interfase sin flujo adicional; el resto ha utilizado la interfase con flujo adicional, única comercializada hasta el momento. Asimismo, en muy pocas ocasiones se ha utilizado la técnica de *llenado parcial* en el análisis de pesticidas por CE-MS (Nelson y Lee, 1996; Menzinger y col., 2001; Molina y col., 2001), con objeto de poder utilizar tensioactivos en el tampón de separación sin que éstos entren en el espectrómetro de masas y provoquen una pérdida importante de sensibilidad.

En la gran mayoría de los trabajos anteriormente citados se señala la clara influencia que tienen muchos de los parámetros mencionados en la formación del *electrospray*. Entre ellos, se señalan como fundamentales tanto la composición del

tampón de separación como la del líquido adicional (en el caso que se use este tipo de interfase). Por tanto, para que la señal sea lo más intensa posible y origine límites de detección adecuados, es necesaria una optimización rigurosa de cada uno de estos parámetros.

1.5.3.4.- Detección electroquímica

La detección electroquímica, basada en medidas conductimétricas, amperométricas y potenciométricas, no ha sido tan ampliamente utilizada en CE como las anteriores. A pesar de que este tipo de detección puede proporcionar límites de detección uno o dos órdenes de magnitud mejores que los obtenidos con detección UV (en algunos casos incluso más, dependiendo de las propiedades redox del analito), ha sido utilizada en pocas ocasiones dado que no se trata de un detector universal. Por ejemplo, la detección amperométrica es compleja al requerir el desarrollo de sistemas de desacoplamiento del instrumento de CE del electrodo de medida. También se hace necesario que el electrodo esté perfectamente alineado con el capilar para asegurar que las medidas sean fiables y reproducibles. A pesar de estas desventajas, el hecho de que proporciona límites de detección bajos y de que se trate de un detector alternativo, ha hecho que se haya utilizado en algunas ocasiones en la determinación de pesticidas como el asulam (Chicharro y col., 2002) o de metabolitos de pesticidas, como es el caso de ciertos compuestos aminobencénicos o de algunos clorofenoles (Luong y col., 1999; Asthana y col., 2000). En el trabajo de Chicharro y col. (2002), por ejemplo, se determinó el pesticida asulam en presencia de otros herbicidas como la simazina, el diuron o el amitrol, en aguas potables mediante una extracción previa con cartuchos C₁₈. Si bien los límites de detección eran de 0,4 mg/l, el procedimiento de SPE permitió reducir dicho límite a 0,8-1 µg/l.

Capítulo II

Objetivos

II.- OBJETIVOS

Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de una de las líneas de investigación del grupo investigador denominado “*Análisis químico aplicado a la industria, medioambiente y productos agroalimentarios*” adscrito al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de La Laguna. Dicha línea de investigación está relacionada con el desarrollo de metodologías analíticas rápidas y no contaminantes, que permitan la determinación de pesticidas en productos de interés agroalimentario y medioambiental. Dentro de esta línea de investigación, el objetivo principal que se ha planteado a la hora de desarrollar la presente Tesis ha sido el establecer nuevos métodos de análisis de pesticidas por electroforesis capilar. Además de este objetivo principal, se pueden destacar otros específicos:

- Tratar de incrementar la sensibilidad y selectividad de las determinaciones analíticas por electroforesis capilar, mediante el uso de métodos de preconcentración que sean más económicos y limpios, tales como la microextracción en fase sólida (SPME) o la extracción en fase sólida (SPE), para la determinación de pesticidas en diferentes tipos de muestras, tanto de interés medioambiental como alimentario.
- Hacer uso de diferentes técnicas de preconcentración en línea con objeto de mejorar la sensibilidad obtenida por electroforesis capilar.
- Estudiar el uso de diferentes detectores (UV-VIS y MS) para la determinación electroforética de diferentes grupos de pesticidas.
- Investigar el uso de herramientas matemáticas, como el diseño experimental, para la optimización de la etapa de preparación de muestra y de las condiciones de detección.
- Validar las metodologías analíticas desarrolladas, llevando a cabo los correspondientes estudios de repetibilidad y reproducibilidad en las condiciones óptimas, así como obtener las correspondientes rectas de calibrado.
- Aplicar las metodologías desarrolladas al análisis de distintos tipos de muestras reales (campos alimentario y medioambiental), con objeto de determinar la aplicabilidad de las mismas a diferentes matrices.

Capítulo III

Material y métodos

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- Reactivos y disoluciones

- Pirimetanil, pirifeno, ciprodinil, ciromazina y pirimicarb, Riedel-de Haën, calidad Pestanal® (pureza >97%). Las disoluciones de cada pesticida fueron preparadas en metanol (1 mg/ml) y conservadas en el frigorífico hasta su utilización. Las disoluciones de trabajo fueron preparadas diariamente por diluciones apropiadas.
- Flumetsulam y metosulam, Dr. Enhrenstorfer GMBH (pureza >98,5%). Las disoluciones de cada pesticida fueron preparadas en acetonitrilo (1 mg/ml) y conservadas en el frigorífico hasta su utilización. Las disoluciones de trabajo fueron preparadas diariamente por diluciones apropiadas.
- Metilcloransulam, diclosulam y florasulam, Dr. Enhrenstorfer GMBH. Las disoluciones de 10 mg/l en acetonitrilo fueron conservadas en el frigorífico hasta su utilización. Las disoluciones de trabajo fueron preparadas diariamente por diluciones apropiadas.
- Acetato amónico, carbonato amónico, hidróxido amónico, cloruro sódico, ácido acético y ácido fórmico, Merck, p.a.
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, o cetiltrimetilamonio, (CTAB), cloruro de hexadeciltrimetilamonio, o cetiltrimetilaminio, (CTAC), bromuro de hexadimetrina o poli(dibromuro de 1,5-dimetil-1,5-diazaundecametileno) (HDB), Sigma-Aldrich.
- Disoluciones de hidróxido sódico 0,1 M y 1 M preparadas a partir de hidróxido sódico, Merck, p.a.
- Disoluciones de ácido clorhídrico 1 M y 0,01 M preparadas a partir de ácido clorhídrico 35%, Panreac, p.a.
- Etanol absoluto, acetonitrilo, acetona, metanol, 1-propanol, 2-propanol y 1-butanol, Merck y Scharlau, p.a.
- Agua desionizada, Milli-Q® obtenida de un sistema Milli-Q Gradiente A10, Millipore.

III.2.- Aparatos

- Equipo de electroforesis capilar Beckman P/ACE-5510 equipado con un detector de diodos en línea y controlado por el programa GOLD.
- Equipo de electroforesis capilar Beckman P/ACE-2100 equipado con un detector UV con filtros de 200, 214, 254 y 280 nm.
- Equipo de electroforesis capilar Beckman P/ACE-5500 equipado con un detector UV y conectado a un espectrómetro de masas.
- Espectrómetro de masas de trampa de iones Bruker Daltonics modelo Esquire 2000 equipado con una interfase *electrospray* ortogonal Agilent Technologies modelo 61607A. El contacto eléctrico en la punta del *electrospray* se establece vía líquido adicional proporcionado por una jeringa con controlador de flujo Cole Palmer modelo 74.900-00-05. En las Figuras III.1, III.2 y III.3 se muestran los equipos utilizados para CE-ESI-MS y un esquema de este acoplamiento.
- Balanza de precisión Sartorius CP224S.
- pH-metro PHM 64 Radiometer con electrodo doble de calomelanos/vidrio.
- Agitador magnético Agimatic-E Selecta.
- Centrífuga para tubos de 50 ml Selecta modelo Centronics.
- Centrífuga modelo L-70 Beckman.
- Rotavapor con baño termostático Büchi R-200, con controlador de vacío V-800.
- Sistema de purificación de agua previamente destilada “Milli-Q[®] Standard System”, Millipore.
- Dispositivo de extracción manual para SPME, Supelco.
- Sistema de vacío Vac-Master IST para extracción con cartuchos de SPE.
- Cartuchos Sep-Pak Plus C₁₈ de 500 mg, Waters, para extracción en fase sólida.
- Fibras de SPME con recubrimiento de poliacrilato (PA) 85 µm (GC/HPLC), Supelco.
- Fibras de SPME con recubrimiento de polidimetilsiloxano (PDMS) 100 µm (GC/HPLC), Supelco.
- Fibras de SPME con recubrimiento de polidimetilsiloxano-divinilbenceno, (PDMS-DVB) 60 µm (HPLC), Supelco.

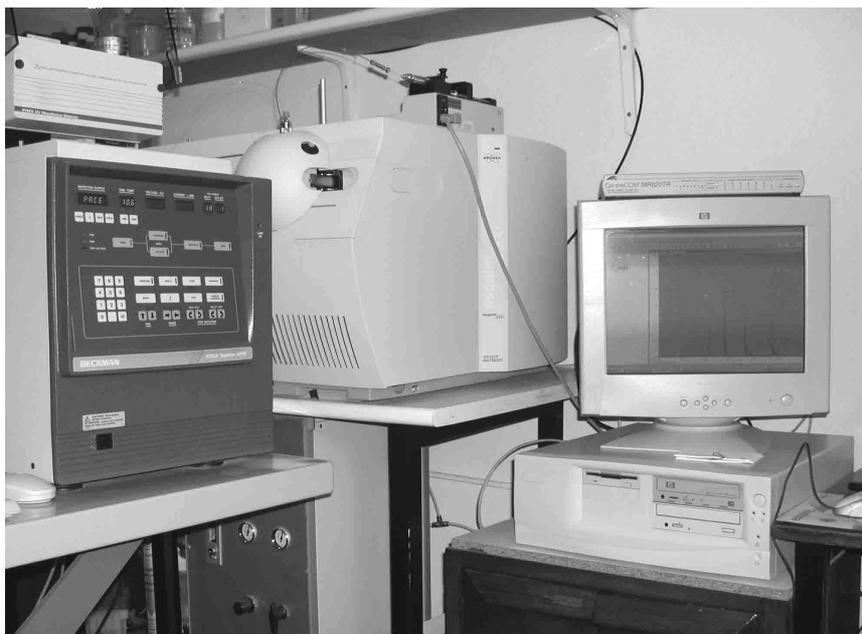


Figura III.1.- Imagen del equipo CE-ESI-MS utilizado en esta Tesis Doctoral.

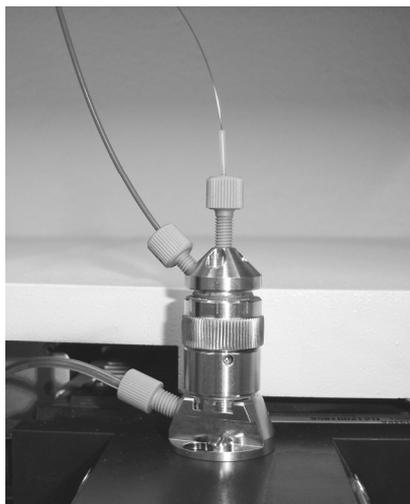


Figura III.2.- Imagen de la interfase ESI utilizada.

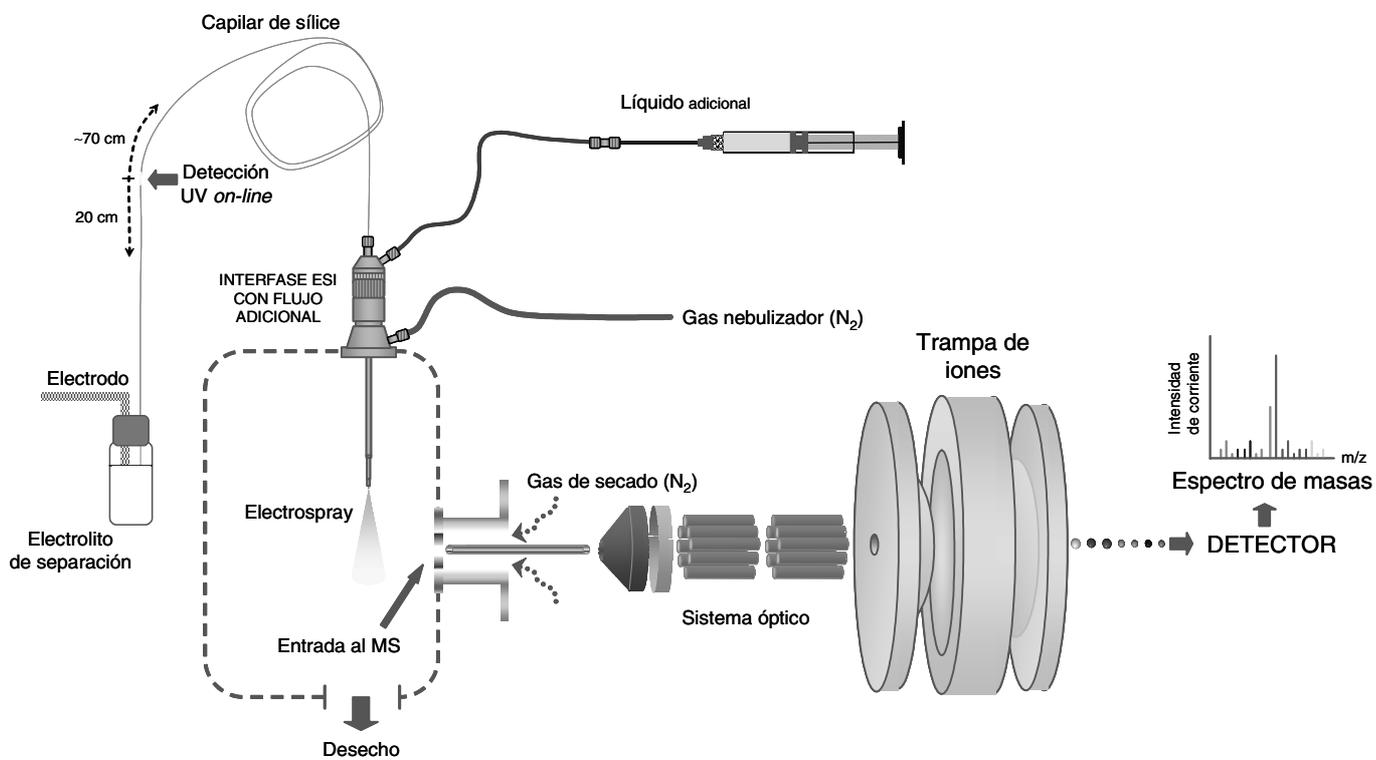


Figura III.3.- Representación esquemática del acoplamiento CE-ESI-MS utilizado en esta Tesis Doctoral.

- Fibras de SPME con recubrimiento de carbowax/resina templada (CW-TPR) 50 μm (HPLC), Supelco.
- Capilares de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno, Composite Metal Services.

III.3.- Programas informáticos

- Programa Microsoft EXCEL para la elaboración de hojas de cálculo, obtención de las rectas de calibrado, etc.
- Programa Microcal ORIGIN 6.0 y Microsoft POWER POINT para la representación de los electroferogramas y la preparación de las figuras.
- Programa STATGRAPHICS PLUS 4.0 para la elaboración y estudio del diseño experimental.
- Programa CE EXPERT Beckman, que proporciona todo un conjunto de datos relacionados con el llenado del capilar, inyección, etc.
- Programa de adquisición de datos GOLD que permite controlar el equipo P/ACE, visualizar en tiempo real los datos adquiridos, cálculo e integración automática y manual, identificación de picos en base a tiempos de migración, cálculo de eficacias (para lo que se utilizó la función *suitability*), etc.
- Programa de adquisición de datos ESQUIRE NT que permite controlar el espectrómetro de masas, visualizar en tiempo real los datos adquiridos, el cálculo y la integración automática y manual, la identificación de picos en base a tiempos de migración absolutos y relativos, calibrar a distintos niveles de concentración, etc.

III.4.- Muestras reales

- Las muestras reales que han sido analizadas en los diferentes apartados que se presentan en el Capítulo IV de esta Tesis Doctoral, son los siguientes:
 - Zumos de manzana, uva y naranja.
 - Agua mineral y de estanque.
 - Bebida de soja.
 - Suelos agrícolas.

III.5.- Métodos

III.5.1.- Procedimiento SPME

Antes de su uso, las fibras fueron acondicionadas en metanol durante 30 minutos, con agitación constante a 300 rpm. Entre extracciones, las fibras se lavaron con metanol durante 20 minutos a 300 rpm.

Después de la optimización descrita en la sección IV.1, las condiciones óptimas de extracción, que se utilizaron tanto en los trabajos descritos en la sección IV.1 como en la IV.2, fueron las que se señalan a continuación. Un volumen de 6 ml de muestra (agua o zumo) fue colocado en un vial de vidrio de 10 ml con tapa de rosca y septum, junto con 1,8 g de cloruro sódico (31%). A continuación, se ajustó el pH a 6,0 con una disolución 0,1 M de hidróxido sódico. La fibra de PDMS/DVB se introdujo directamente en la muestra, de forma que la extracción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 150 minutos y agitación constante a 800 rpm. A continuación, la etapa de desorción se llevó a cabo en 200 μ l de metanol durante 16 minutos a 1000 rpm.

III.5.2.- Procedimiento SPE

Después de la optimización descrita en la sección IV.3, las condiciones óptimas de extracción, que se utilizaron tanto en los trabajos descritos en la sección IV.3 como en la IV.4 y IV.5 para la extracción de las triazolopirimidinas (metosulam, metilcloransulam, diclosulam, flumetsulam, florasulam), fueron las que a continuación se señalan. El cartucho de C₁₈ fue activado con 5 ml de acetonitrilo y, a continuación, con 2 ml de ácido clorhídrico 0,01 M. Seguidamente, se pasó por el mismo la muestra (agua mineral, agua de estanque, bebida de soja o extracto de suelo) y se secó el cartucho a vacío durante 15 minutos. Los analitos se eluyeron con 10 ml de acetonitrilo que posteriormente fueron evaporados en un rotavapor (secciones IV.3 y IV.4, aguas y bebida de soja) o en corriente de nitrógeno (sección IV.5, extracto de suelo).

III.5.3.- Tratamiento de las muestras

Zumos de frutas.- Unos 6 ml de zumo de fruta (naranja, uva o manzana) se centrifugaron a 11 000 rpm a 0 °C durante 8 minutos y el sobrenadante fue filtrado con filtros de 0,45 µm (Millipore) y sometido al procedimiento SPME descrito en el apartado III.5.1.

Agua mineral y de estanque.- Ambos tipos de aguas no fueron sometidos a tratamiento alguno previo a su extracción con cartuchos C₁₈.

Bebida de soja.- Unos 5 ml de bebida de soja fueron diluidos con 20 ml de agua destilada y 4 ml de ácido clorhídrico 1 M. A continuación, la muestra fue centrifugada a 14000 rpm y 0 °C durante 30 minutos. El sobrenadante fue filtrado con filtros de 0,45 µm (Millipore) y fue extraído con cartuchos C₁₈ siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.5.2.

Suelo.- Unos 2 g de suelo agrícola procedente de los alrededores de La Laguna fueron extraídos con 75 ml de agua desionizada y 300 µl de hidróxido sódico 0,1 M en ultrasonidos durante 20 minutos. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 4 000 rpm y a temperatura ambiente durante 10 minutos. Al sobrenadante se le añadió 1 ml de ácido clorhídrico 0,1 M y se centrifugó a 4000 rpm durante 6 minutos. Este nuevo sobrenadante fue filtrado con filtros de 0,45 µm y 50 ml del mismo fueron extraídos con cartuchos C₁₈ siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.5.2.

III.5.4.- Activación de los capilares

Antes de su uso, los capilares de sílice fundida fueron activados haciendo pasar mediante presión de 20 psi, una disolución de NaOH 0,1 M durante 30 minutos y, a continuación, agua desionizada durante 15 minutos.

III.5.5.- Protocolo de lavado de los capilares

Los protocolos de lavado de los capilares al comienzo y al final del día, así como entre inyecciones, que permitieron obtener una buena reproducibilidad y repetibilidad de los diferentes métodos descritos en el Capítulo IV, fueron los que a continuación se detallan (todos los lavados se hicieron con una presión de 20 psi).

Sección IV.1.- Al comienzo del día el capilar era lavado con agua desionizada durante 5 minutos y tampón de separación durante otros 5 minutos. Entre inyecciones era lavado durante 2 minutos con agua desionizada y con tampón de separación durante 2 minutos más. Al final del día se hacía pasar agua desionizada durante 5 minutos.

Sección IV.2.- Para los experimentos llevados a cabo en polaridad normal, al comienzo del día el capilar era lavado con agua desionizada durante 5 minutos y, entre inyecciones, durante 3 minutos con agua desionizada y tampón de separación durante 3 minutos más; al final del día se hacía pasar nitrógeno durante 5 minutos con objeto de dejar el capilar vacío. Para los experimentos llevados a cabo en polaridad invertida, al comienzo del día el capilar era lavado con agua desionizada durante 5 minutos, NaOH 0,1 M durante 5 minutos y de nuevo agua desionizada durante 5 minutos más; entre inyecciones era lavado con agua desionizada durante 2 minutos, NaOH 0,1 M durante 3 minutos, agua desionizada durante 3 minutos y tampón de separación durante tres minutos más; al final del día se hacía pasar nitrógeno durante 5 minutos con objeto de dejar el capilar vacío.

Sección IV.3.- Al comienzo del día el capilar era lavado con tampón de separación durante 5 minutos. Entre inyecciones se hacía pasar tampón de separación durante 2 minutos, mientras que al final del día el capilar era lavado con agua desionizada durante 5 minutos y 2 minutos más con nitrógeno con objeto de dejar el capilar vacío.

Sección IV.4.- Al comienzo del día el capilar era lavado con tampón de separación durante 3 minutos. Entre inyecciones se hacía pasar tampón de separación durante 1 minuto, mientras que al final del día el capilar era lavado con agua desionizada durante 5 minutos y 2 minutos más con nitrógeno con objeto de dejar el capilar vacío.

Sección IV.5.- Al comienzo del día el capilar era lavado con tampón de separación durante 3 minutos. Entre inyecciones se hacía pasar tampón de separación durante 2 minutos, mientras que al final del día el capilar era lavado con agua desionizada durante 3 minutos.

Capítulo IV

Resultados y discusión

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1.- Análisis de un grupo de pesticidas mediante el uso combinado de microextracción en fase sólida con electroforesis capilar-espectrometría de masas. Optimización quimiométrica.

En esta sección se describe la determinación analítica de un grupo de pesticidas (ciromazina, ciprodinil, pirimicarb, pirifenox y pirimetanil) en zumos de frutas (uva y naranja), mediante extracción previa con fibras de SPME y posterior separación y detección por CE-UV y CE-MS. Los parámetros del *electrospray* (presión de nebulización, flujo y temperatura del gas de secado, composición del líquido adicional, etc.) así como los parámetros de extracción y desorción de las fibras (fuerza iónica, pH, tiempo de extracción y de desorción) han sido optimizados haciendo uso de un diseño experimental, con objeto de minimizar el número de experiencias necesarias para establecer las condiciones óptimas. Este trabajo constituye una de las primeras aplicaciones del diseño experimental a la optimización de los parámetros del *electrospray*, permitiendo la determinación de este grupo de pesticidas en zumos hasta unos pocos $\mu\text{g/l}$.

IV.1.1.- Antecedentes

Hasta la elaboración de este capítulo de la presente Tesis Doctoral, se habían desarrollado varios métodos de análisis de pesticidas por CE-MS, pero pocos de ellos habían sido aplicados a muestras reales (Núñez y col., 2002a; Rodríguez y col., 2002; Goodwin y col., 2003) y, como norma general, los autores habían utilizado la SPE como método de preconcentración fuera de línea (Rodríguez y col., 2002). En lo que a la SPME respecta, se había aplicado combinada con CE-MS en un solo trabajo para el análisis de pesticidas (Rodríguez y col. 2003) en el que, utilizando una interfase con flujo adicional, se determinaron por CE-ESI-MS los pesticidas ioxinil, o-fenilfenol, haloxifop, acifluorfen y picloram en extractos de uvas, manzanas, naranjas y tomates, utilizando una fibra de CW-TPR. Los porcentajes de recuperación obtenidos oscilaron entre el 7 y

94%, mientras que los límites de cuantificación alcanzados estuvieron comprendidos entre 0,02 y 5 mg/kg. El proceso de optimización seguido en este caso, tanto para la optimización de los parámetros del *electrospray* como del procedimiento de extracción por SPME, fue la estrategia conocida como “paso a paso”, que implica mantener todos los factores experimentales constantes y variar sólo uno de ellos.

Fruto de una revisión bibliográfica exhaustiva, se pudo comprobar que de los cinco pesticidas elegidos en este trabajo (Figura IV.1.1), que pertenecen a las familias de las anilino pirimidinas (pirimetanil y ciprodinil), piridinas (pirifenox), triazinas (ciromazina) y carbamatos (pirimicarb) (*The e-pesticide manual*, 2001), sólo el pirimicarb, había sido previamente analizado por CE-ESI-MS por Molina y col. (2001) conjuntamente con otros carbamatos, pero no había sido determinado en ninguna muestra real. El resto de los pesticidas, bastante utilizados como fungicidas (pirifenox, ciprodinil y pirimetanil) e insecticidas (ciromazina y pirimicarb) en frutas, vegetales, etc. en muchas zonas de nuestro país, incluida Canarias, no había sido determinado hasta el momento por CE y, como se ha indicado anteriormente, tampoco había sido extraído mediante SPME previa a su determinación por CE. Además, este grupo de compuestos tampoco había sido determinado simultáneamente en una misma matriz. Así, por ejemplo, el pirimetanil se ha determinado en uvas, fresas y tomates por HS-SPME-GC-MS (Navalón y col., 2002) y, también en el hollejo de uva y en la pulpa de la misma por LLE-HPLC-UV (Teixeira y col., 2004), el pirifenox en fresas y naranjas mediante dispersión de la matriz en fase sólida o extracción sólido-líquido previos a su determinación por HPLC-ESI-MS (Soler y col., 2004), el ciprodinil en vinos blancos por SPME-GC-MS (Rial Otero y col., 2002) y el pirimicarb en aguas por SPE-HPLC-ESI-MS (Nogueira y col., 2004).

IV.1.2.- Separación por CE-UV

Una de las principales dificultades a la hora de llevar a cabo una determinación analítica por CE-MS, es que es conveniente el uso de compuestos volátiles en el tampón de separación, no pudiendo utilizarse tensioactivos, ciclodextrinas, ni otras sustancias no volátiles que inhiban la señal del detector. El modo de CE más sencillo y compatible con

la detección por MS es el de CZE, aunque se han descrito separaciones por MEKC-MS de pesticidas, por ejemplo, utilizando la técnica del *partial-filling* para evitar que el tensioactivo llegue al detector (Nelson y col., 1996; Molina y col., 2001). Otro modo muy compatible es el de CEC, sin embargo, los problemas y limitaciones del uso de capilares empacutados han hecho que, hasta la fecha, el acoplamiento CEC-MS no sea de uso generalizado.

Los cinco pesticidas estudiados (ver Tabla IV.1.1) tienen valores de pK_a comprendidos entre 3,52 (pirimetanil) y 5,22 (ciromazina). Dado que a valores bajos de pH estos compuestos están cargados positivamente, su separación por CZE a estos pHs se plantea, en principio, viable. Además, es preciso destacar que uno de los pesticidas seleccionados, el pirifenox, puede presentar dos estereoisómeros, Z y E, como consecuencia del doble enlace C=N. Dado que los dos sustituyentes en ese carbono son estructuralmente diferentes, la movilidad de ambos estereoisómeros en el tampón de separación podría ser, en principio, ligeramente diferente permitiendo su separación.

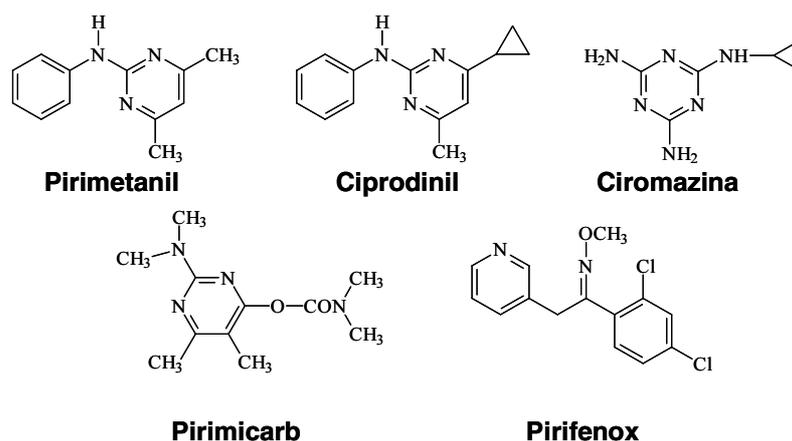


Figura IV.1.1.- Estructuras químicas de los cinco pesticidas estudiados.

En primer lugar se optimizó el tampón de separación por CE-UV, con un capilar de 50 cm de longitud efectiva (57 cm de longitud total) y 50 μm de diámetro interno.

Aunque los capilares en nuestro acoplamiento CE-MS deben tener una longitud mínima de 80-90 cm, la optimización de la separación por CE-UV se llevó a cabo con capilares de 57 cm, ya que esta longitud remeda adecuadamente la utilizada en CE-MS originando tiempos de análisis más cortos. Tal como se ha señalado anteriormente, los tampones utilizados en las separaciones electroforéticas que impliquen detección por espectrometría de masas, deben ser volátiles. Por esta razón, inicialmente, se intentó llevar a cabo la separación de los cinco pesticidas, utilizando un tampón acuoso con concentraciones de ácido acético o fórmico comprendidas entre 0,1 y 0,5 M a distintos pHs.

Tabla IV.1.1.- Características y aplicaciones de los pesticidas estudiados
(*The e-pesticide manual*, 2001).

Pesticida	Mw (g/mol)	pK_a	LMR (mg/kg)	Tipo	Uso
Ciromazina	166,2	5,22	0,05-15	Insecticida	Frutas, vegetales y flores.
Pirifenox	295,2	4,61	0,05	Fungicida	Frutas, vegetales y flores.
Pirimicarb	238,3	4,44	0,1-1	Insecticida	Frutas, vegetales, cereales y flores.
Ciprodinil	225,3	4,44	0,1-2	Fungicida	Frutas, vegetales, cereales y flores.
Pirimetanil	199,3	3,52	1-5	Fungicida	Vinos, vegetales, frutas y flores.

Puesto que el pH tiene una importancia vital en la ionización de este tipo de pesticidas, se llevaron a cabo diversos ensayos a distintos valores de pH manteniendo la concentración de ácido constante. Inicialmente se utilizó el ácido acético a una concentración de 0,5 M, ajustando el pH con hidróxido amónico al 32%. En la Figura IV.1.2 se muestra la influencia del pH sobre la separación, pudiéndose observar que a valores de pH 2 y 3 la separación no se produce, sin embargo, a pH 4 la separación tiene lugar. Los diferentes ensayos a valores de pH ligeramente por encima y por debajo de 4, mostraron que éste es efectivamente el pH que proporciona una mejor separación de los analitos. En la figura se muestra, además, que a pH 4,2 el ciprodinil empieza a perder eficacia hasta tal punto que a pH 4,5 la pérdida es considerable. No deja de ser interesante el hecho de que a pH 4 el pirifenox presente dos picos que podrían

corresponderse con sus dos estereoisómeros. Ambos isómeros no se comercializan por separado dado que en medio ácido un isómero se convierte fácilmente en el otro.

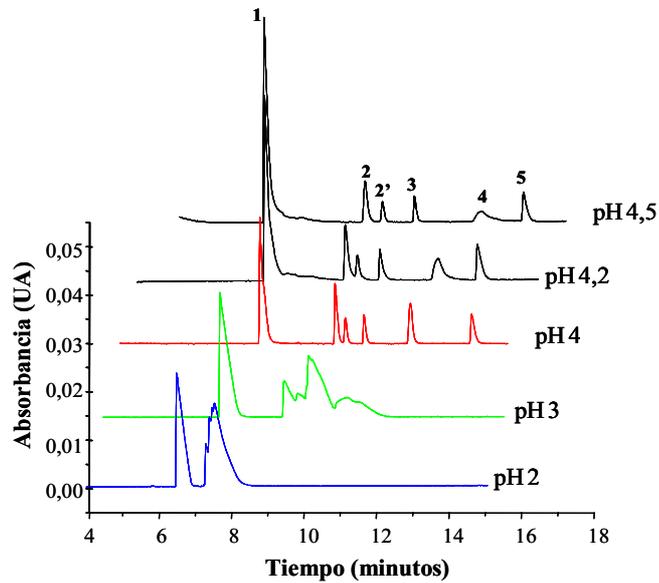


Figura IV.1.2.- Influencia del pH en la separación de los cinco pesticidas estudiados utilizando como tampón ácido acético 0,5 M. Temperatura: 25 °C. Voltaje aplicado: +25 kV. Inyección hidrodinámica durante 8 segundos a 0,5 psi. Muestra: 25 mg/l de cada pesticida en metanol. (1) Ciromazina. (2, 2') Pirifenox, posibles isómeros Z y E. (3) Pirimicarb. (4) Ciprodinil. (5) Pirimetanil.

Una vez seleccionado el pH adecuado, se procedió a variar la concentración de ácido acético con objeto de obtener la concentración óptima que proporcionara una mejor separación en términos de resolución y tiempo de análisis. La Figura IV.1.3 muestra la influencia de la concentración de ácido acético sobre la separación de los cinco pesticidas. Tal como puede observarse, a medida que aumenta la concentración de ácido mejora la resolución y eficacia, debido posiblemente a que el mayor contenido iónico disminuye la adsorción de los pesticidas sobre las paredes del capilar, aumenta el tiempo de análisis debido a una disminución del potencial *zeta* y disminuye cualquier fenómeno de dispersión por electromigración. Cuando la concentración de ácido es de 0,3 M la eficacia del pico correspondiente al ciprodinil (pico 4) mejora considerablemente

con respecto a concentraciones menores, sin embargo, la ciromazina (pico 1) todavía presenta cola, a lo que hay que añadir que la resolución de los posibles isómeros Z y E del pirifenox no es total. Sin embargo, a concentraciones de 0,4 y 0,5 M de ácido la resolución de dichos isómeros es mucho mayor y ya no se observa la cola tan pronunciada del pico 1. Debido a esto, y a que la eficacia de los picos mejora con respecto a 0,3 M y se mantiene prácticamente igual a 0,5 M, se decidió considerar como concentración de ácido óptima la de 0,4 M.

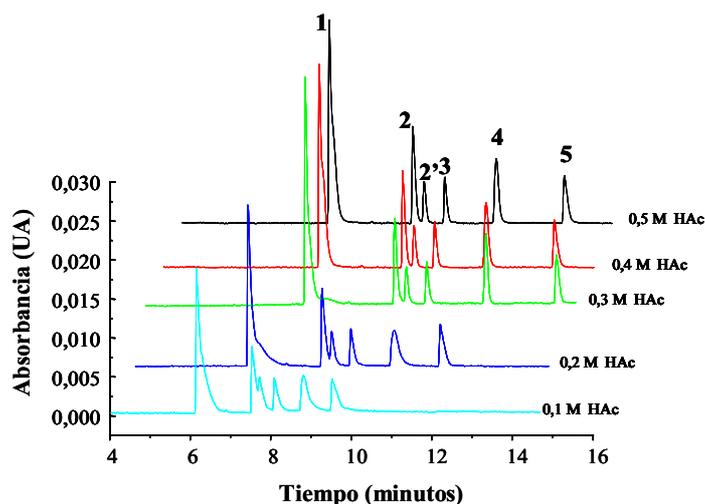


Figura IV.1.3.- Influencia de la concentración de ácido acético (pH 4) en la separación de los cinco pesticidas. Temperatura: 25 °C. Voltaje aplicado: +25 kV. Inyección hidrodinámica durante 8 segundos a 0,5 psi. Muestra: 25 mg/l de cada pesticida en metanol. (1) Ciromazina. (2, 2') Pirifenox, posibles isómeros Z y E. (3) Pirimicarb. (4) Ciprodinil. (5) Pirimetanil.

Un aspecto importante que también se debe tomar en consideración en CE-MS a la hora de seleccionar el tampón, es la corriente eléctrica generada. Si la corriente es muy alta, se produce un mayor calentamiento del capilar por *efecto Joule*. A pesar de la buena disipación de calor que se puede obtener con el líquido refrigerante, propio de la instrumentación utilizada, dicho calentamiento puede hacer que los picos se deformen y que disminuya la eficacia y la resolución, dado que se generan gradientes de temperatura y, por tanto, variaciones de la viscosidad en el interior del capilar. Además,

en CE-MS el valor de la corriente no debe ser muy alto, debido a que mantener el voltaje aplicado resulta aún más difícil, de ahí que, en este sentido, sean preferibles tampones con un bajo contenido iónico. Con el tampón de ácido acético 0,4 M la corriente que se genera al aplicar un voltaje de +25 kV es del orden de 70 μA , valor que, *a priori*, puede considerarse límite a la hora de llevar a cabo una separación por CE-MS. Por otro lado, considerar el tampón de ácido acético 0,5 M supone que la corriente sea del orden de 100 μA , valor que es difícilmente compatible con este modo de separación. El valor de dicha corriente se podría disminuir si se disminuye el voltaje aplicado, pero ello haría que el tiempo de análisis fuera aún mayor. No hay que olvidar que los capilares son todavía más largos en CE-MS y que los tiempos de análisis son también mayores, así que hay que intentar, además, que el tiempo de análisis en este tipo de estudios previos sea el menor posible. En este sentido, observados los tiempos de análisis, se consideró que el voltaje aplicado no se debería disminuir y debería mantenerse en torno a +25 kV.

Aunque utilizando ácido acético 0,4 M a pH 4, la separación se consideró aceptable en cuanto a resolución y tiempo de análisis, se decidió estudiar el efecto de otro tampón, a base de ácido fórmico, sobre la separación. La Figura IV.1.4 muestra la influencia del pH sobre la separación utilizando una concentración 0,1 M de ácido fórmico. Se puede apreciar que, en este caso, a pH 4, la separación que se produce es peor comparada con la obtenida con ácido acético al mismo pH y a la misma concentración 0,1 M (Figura IV.1.3).

El hecho de que los experimentos con ácido fórmico se llevaran a cabo a una concentración de 0,1 M radica en que no se pudieron utilizar concentraciones de fórmico iguales a las de acético, dado que las corrientes generadas con el fórmico eran mucho más altas. Esta diferencia se explica considerando que el ácido fórmico (pK_a 3,8) es un ácido más fuerte que el acético (pK_a 4,8), de modo que es necesario añadir una mayor cantidad de amoníaco para alcanzar los mismos valores de pH, aumentando la fuerza iónica y, por tanto, la conductividad eléctrica del tampón. En la Figura IV.1.4 se muestran, además, los valores de la corriente para los experimentos llevados a cabo con dicho ácido. Como puede verse, para una concentración de ácido fórmico 0,1 M y un

valor de pH de 4, la corriente es de 75 μA , mientras que a pH 5 es de 100 μA . Mantener constante el voltaje aplicado con este último valor de corriente resulta muy difícil en CE-UV siendo prácticamente imposible de mantener en CE-MS. Un aumento de la concentración de ácido fórmico por encima de 0,1 M a pH 4, en teoría proporcionaría una mayor eficacia de la separación, dado que, como ya se ha visto en la Figura IV.1.3, al aumentar la fuerza iónica mejora la separación de estos compuestos. Sin embargo, los valores de corriente alcanzados serían muy altos y el calentamiento originado empeoraría la eficiencia de la separación. Teniendo en cuenta esta limitación experimental y, dado que la separación proporcionada por el tampón de ácido acético 0,4 M a pH 4 fue bastante buena, se seleccionó este último como el más adecuado.

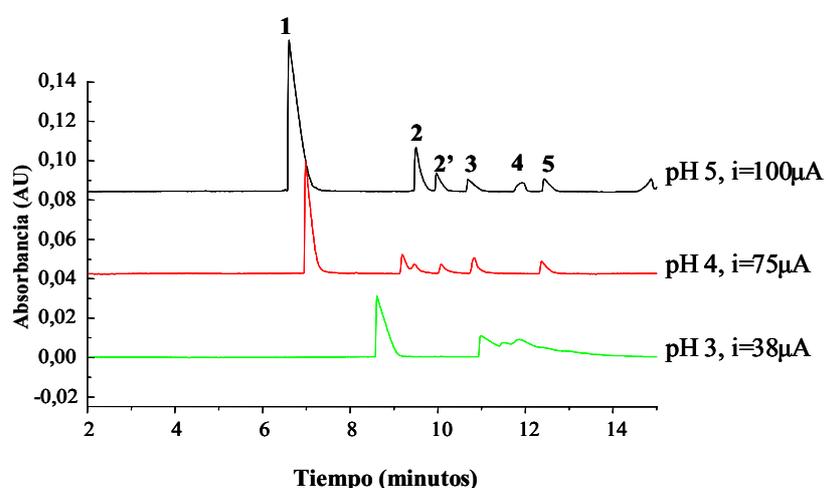


Figura IV.1.4.- Influencia del pH en la separación de los cinco pesticidas estudiados utilizando un tampón de ácido fórmico 0,1 M. Temperatura: 25 °C. Voltaje aplicado: +25 kV. Inyección hidrodinámica durante 8 segundos a 0,5 psi. Muestra: 25 mg/l de cada pesticida en metanol. (1) Ciromazina. (2, 2') Pirifenox, posibles isómeros Z y E. (3) Pirimicarb. (4) Ciprodinil. (5) Pirimetanil.

Con el tampón anteriormente mencionado, los pesticidas disueltos en metanol pudieron ser inyectados hasta 8 segundos a 0,5 psi. La Figura IV.1.5 muestra la separación conseguida en las condiciones de separación y de inyección óptimas. Se puede apreciar que el tiempo de análisis es inferior a 11 minutos y que las eficacias de pico son bastante buenas (hasta 223000 platos teóricos por metro, NTP/m).

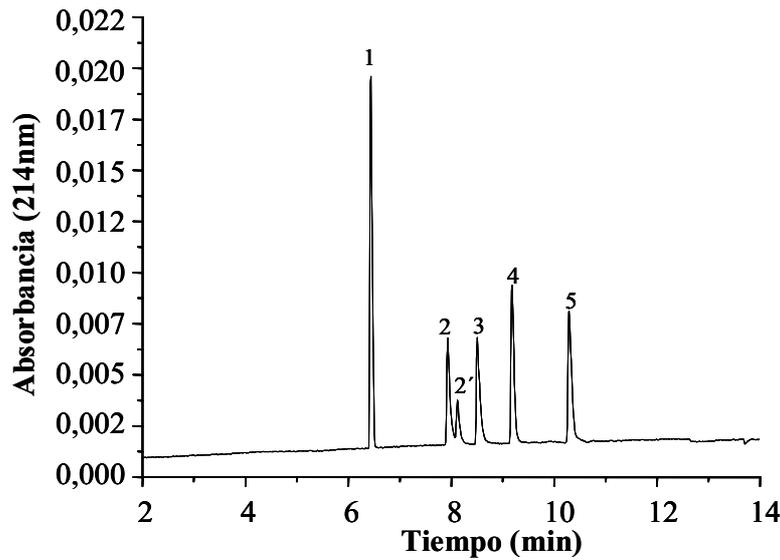


Figura IV.1.5.- Electroferograma de la separación de los cinco pesticidas bajo las condiciones de separación óptimas en CE-UV. Tampón: ácido acético 0,4 M, pH 4. Longitud total del capilar: 57 cm (50 cm de longitud efectiva). Voltaje: +25 kV. Temperatura: 25 °C. Detección: 214 nm. Inyección hidrodinámica durante 12 segundos a 0,5 psi. Muestra: 25 mg/l de cada pesticida en metanol. (1) Ciromazina. (2, 2') Pirifenox, posibles isómeros Z y E. (3) Pirimicarb. (4) Ciprodinil. (5) Pirimetanil.

Una vez que se determinaron las condiciones óptimas de separación, se llevaron a cabo los correspondientes estudios de reproducibilidad y repetibilidad del método. Para ello se efectuaron 5 inyecciones consecutivas a tres niveles de concentración distintos (5, 25 y 50 mg/l) en tres días diferentes. La Tabla IV.1.2 muestra los parámetros de validación del método para una concentración de 25 mg/l, obteniéndose resultados similares para los otros dos niveles de concentración. Los valores de la desviación estándar relativa (RSD) de los tiempos de migración fueron menores del 1,7% para la repetibilidad y del 3,8% para la reproducibilidad. Asimismo, los valores de RSD para las áreas de pico fueron inferiores al 5,8% y 8,7% para la repetibilidad y reproducibilidad, respectivamente. Los límites de detección obtenidos, calculados como tres veces la relación señal/ruido, oscilaron entre 0,60 mg/l para la ciromazina y 1,40 mg/l para el pirifenox.

Tabla IV.1.2.- Datos de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad del método de separación de los cinco pesticidas por CE-UV (datos mostrados para una concentración de 25 mg/l).

Pesticida	Repetibilidad (n=5)		Reproducibilidad (n=15)		Eficacia NTP/m	LOD ^{a)} (mg/l)
	t _m (RSD %)	Área (RSD %)	t _m (RSD %)	Área (RSD %)		
Ciromazina	1,4	5,8	1,8	8,7	105000	0,60
Pirifenox	1,5	4,1	2,1	5,0	141000	1,40
Pirimicarb	1,6	3,7	2,2	5,9	223000	1,20
Ciprodinil	1,7	4,8	3,8	6,2	26000	0,90
Pirimetanil	1,7	4,8	3,1	6,3	219000	1,10

a) LOD: Límite de detección calculado como tres veces la relación señal/ruido.

IV.1.3.- Optimización por CE-MS: Diseño experimental

Cuando el tampón anteriormente optimizado se utilizó en CE-ESI-MS, la estabilidad del ESI fue baja, dado que la corriente en el interior del capilar era alta para este tipo de dispositivos, provocando, frecuentemente, caídas de corriente. Sin embargo, este problema se pudo solucionar fácilmente utilizando un tampón de menor concentración (ácido acético 0,3 M, pH 4) a expensas de que las eficacias proporcionadas fueran ligeramente inferiores a las del tampón anterior, si bien los tiempos de análisis también se acortaron con este nuevo tampón.

Diferentes autores (Ross 2001; Huikko y col., 2002; Mohín, 2002) han señalado la importancia de una adecuada optimización de los parámetros del *electrospray* (presión de nebulización, temperatura y flujo del gas de secado, composición del líquido adicional, etc.) para obtener una señal suficientemente intensa en el espectrómetro de masas. Normalmente esta optimización se suele llevar a cabo “paso a paso”, variando un solo factor cada vez. Es por ello que en este trabajo, previo a la optimización de los parámetros del ESI mediante un diseño experimental apropiado, se ha llevado a cabo un estudio preliminar que permita, no sólo elegir el líquido adicional más adecuado, sino, además, evaluar los niveles de cada factor que se deben tener en cuenta en el diseño experimental.

En primer lugar se probaron como líquidos adicionales mezclas 1:1 metanol-agua, isopropanol-agua y acetonitrilo-agua, que contenían diferentes porcentajes de ácido acético. Para ello, se llenó el capilar con una mezcla de pesticidas de 2 mg/l, se aplicó una presión de 0,5 psi y se monitorizó la intensidad del espectro de masas generado. Esto es lo que se conoce como *infusión directa*. Estos primeros experimentos mostraron las relaciones m/z más intensas para estos pesticidas (ciromazina: 167,1; pirifenox: 295,1; pirimicarb: 239,1; ciprodinil: 226,1; pirimetanil: 200,1) y permitieron, a su vez, trabajar en el modo ion extraído. Como puede apreciarse en las Figuras IV.1.6 A, B y C, en las que se representa la señal obtenida para los iones de mayor intensidad de cada pesticida frente al porcentaje de ácido en cada uno de los líquidos adicionales ensayados, las señales del espectrómetro de masas más intensas fueron obtenidas utilizando una mezcla isopropanol-agua. Por consiguiente, esta mezcla fue elegida como líquido adicional, cuya composición estaba aún por optimizar.

Seguidamente, se llevó a cabo un diseño experimental de *screening* del tipo *diseño semifraccionado* con 2^{k-1} experimentos (k=número de factores) más dos réplicas del punto central, que fue generado por el programa *Statgraphics Plus*, con objeto de evaluar qué factores del ESI son realmente importantes. En este diseño, los niveles de cada factor fueron los siguientes: presión de nebulización, 1-10 psi, flujo del gas de secado, 2-10 l/min, temperatura del gas de secado, 50-300 °C, flujo del líquido adicional, 0,1-0,5 ml/h, porcentaje de isopropanol en el líquido adicional, 20-80%, y porcentaje de estabilidad en el *skimmer*, 20-100%. Los niveles de estos factores fueron seleccionados en base a los estudios preliminares desarrollados, así como a las limitaciones de tipo experimental del propio instrumento. Estos 34 experimentos fueron llevados a cabo por infusión directa de una mezcla de los cinco pesticidas, tomando como respuesta la suma de las intensidades de los iones mayoritarios de cada pesticida. Es preciso señalar que, dado que este *screening* se hizo por infusión directa, no se tuvo en cuenta el porcentaje de ácido en el líquido adicional; así, cuando se lleve a cabo la optimización propiamente dicha con separaciones *completas* y no por *infusión directa*, el porcentaje de ácido en el tampón determinará también el porcentaje de ácido a utilizar en el líquido adicional. La respuesta seleccionada fue evaluada con el programa *Statgraphics Plus* pudiéndose

comprobar que tanto la velocidad del flujo adicional, como el porcentaje de estabilidad en el *skimmer* tenían una influencia muy baja sobre la respuesta del sistema y que, por lo tanto, podían mantenerse constantes en sucesivos experimentos, de ahí que se mantuvieran a 0,22 ml/h y 100%, respectivamente.

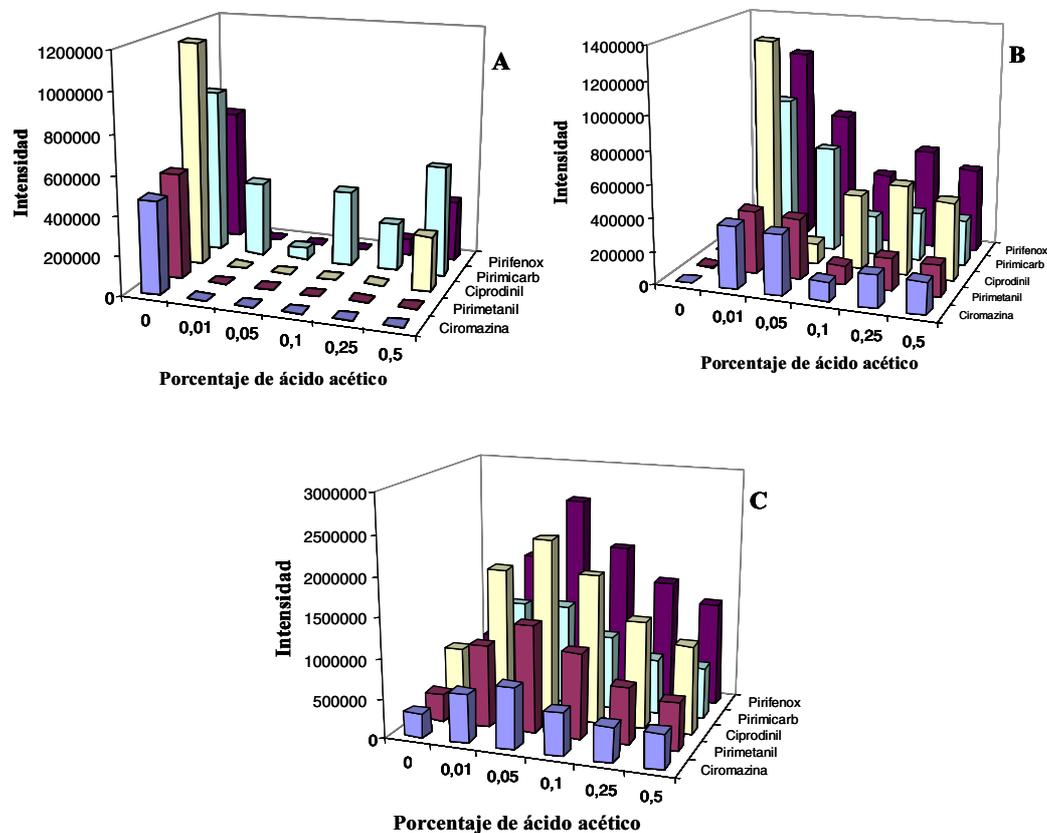


Figura IV.1.6.- Influencia de la naturaleza del líquido adicional sobre la señal del espectrómetro de masas.

A) Acetonitrilo-agua 1:1. B) Metanol-agua 1:1. C) Isopropanol-agua 1:1.

A continuación, se llevó a cabo un diseño experimental de superficie de respuesta del tipo *diseño compuesto centrado* con cinco factores cuyos niveles se muestran en la Tabla IV.1.3. En este caso se llevaron a cabo separaciones completas de los cinco pesticidas y se tomó como función respuesta la suma de las áreas de pico de los cinco pesticidas. Los 45 experimentos se desarrollaron aleatoriamente y su resultado

fue evaluado de nuevo con el programa *Statgraphics Plus*. Tal como puede apreciarse en la Figura IV.1.7, las mayores áreas de pico fueron obtenidas con una presión de nebulización baja, así como con un flujo del gas de secado bajo y altas temperaturas. Un porcentaje relativamente alto de isopropanol en el líquido adicional, así como porcentajes

Tabla IV.1.3.- Factores y niveles de los factores del *diseño compuesto centrado* utilizado para optimizar los parámetros del *electrospray*.

Factor	Diseño compuesto centrado			
	Diseño factorial completo		Diseño en estrella	
	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto
Isopropanol en el líquido adicional (%)	20	80	0	100
Acido en el líquido adicional (%)	0,001	0,09	0	0,1
Presión de nebulización (psi)	3	9	1	11
Flujo del gas de secado (l/min)	3	9	1	11
Temperatura del gas de secado (°C)	100	250	50	300

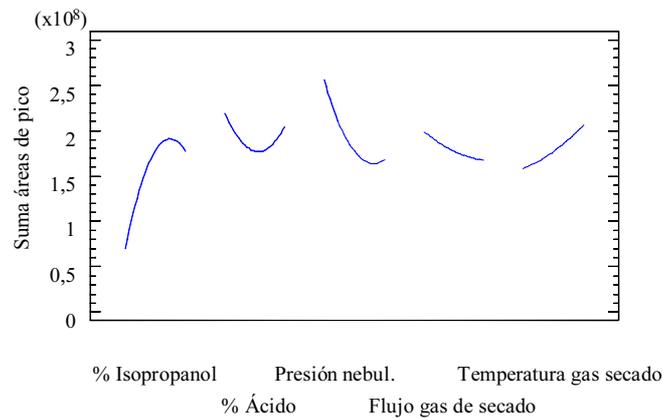


Figura IV.1.7.- Efecto individual de cada factor sobre la señal del espectrómetro de masas, calculada como suma de las áreas de pico de los cinco pesticidas.

de ácido acético bajos o altos proporcionaban resultados similares. La combinación de factores que, según el programa, maximiza la respuesta seleccionada fue la siguiente: presión de nebulización de 2 psi, flujo del gas de secado de 2 l/min, temperatura del gas

de secado de 300 °C y un líquido adicional formado por una mezcla isopropanol-agua (65:35 v/v) sin ácido acético. Cuando dicho experimento se llevó a cabo, se pudo comprobar que la combinación óptima de factores mencionada, proporcionaba las mayores áreas de pico para los cinco pesticidas. A pesar de ello, se llevaron a cabo diversos experimentos variando tanto el flujo del líquido adicional, como el porcentaje de estabilidad en el *skimmer*, que se habían mantenido constantes durante todo el proceso de optimización (0,22 ml/h y 100%, respectivamente), y en los que se pudo comprobar que la variación de dichos valores no mejoraba la señal del MS. La Figura IV.1.8, muestra el electroferograma de ion extraído obtenido en las condiciones de separación y de nebulización óptimas, mientras que la Figura IV.1.9, muestra los espectros de masas de los seis compuestos, incluyendo el de los picos 2 y 2'. Tal como puede verse en el electroferograma, aparecen dos picos parcialmente resueltos que se corresponden con el pirifenox (picos 2 y 2', ion extraído 295,1 m/z), lo que corrobora la anterior suposición de que son estereoisómeros del pirifenox y no impurezas del mismo.

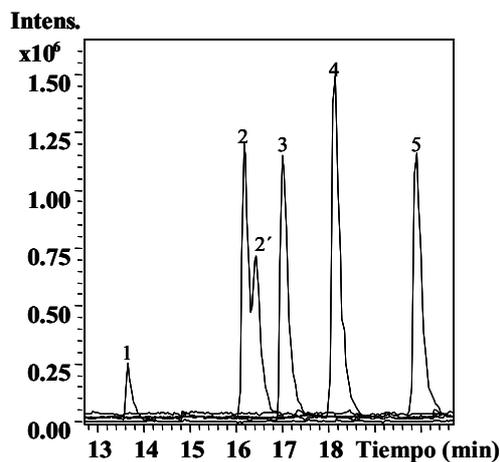


Figura IV.1.8.- Electroferograma de iones extraídos correspondiente a la separación por CE-ESI-MS de los cinco pesticidas. Tampón: ácido acético 0,3 M, pH 4. Longitud total del capilar: 87 cm. Voltaje: +25 kV. Temperatura: 25 °C. Presión del gas nebulizador de 2 psi, flujo del gas de secado de 2 l/min, temperatura del gas de secado de 300 °C, líquido adicional de 65% isopropanol-agua con un flujo de 0,22 ml/h. Inyección hidrodinámica durante 18 segundos, 0,5 psi. Muestra: 5 mg/l de (1) ciromazina, (2, 2') pirifenox, (3) pirimicarb, (4) ciprodinil, (5) pirimetanil en metanol. Iones extraídos: 167,1, 295,1, 239,1, 226,1 y 200,1, respectivamente (todos ellos $\pm 0,2$ m/z).

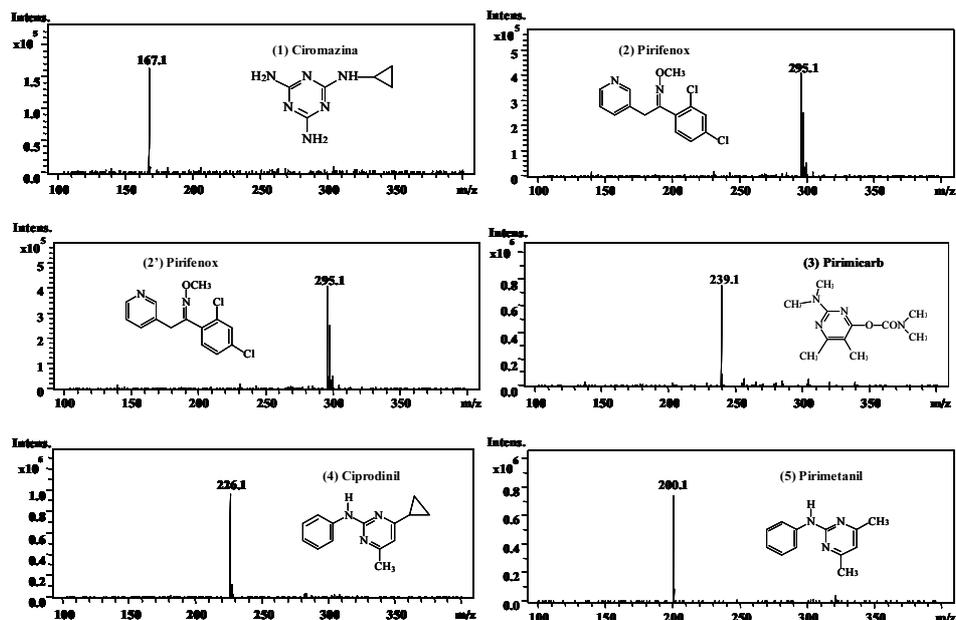


Figura IV.1.9.- Espectros de masas de los cinco pesticidas obtenidos directamente a partir del electroferograma de la Figura IV.1.8. Mw experimentales (g/mol): (1) 166,1; (2) 295,1; (3) 238,1; (4) 225,3; (5) 199,1.

Una vez que se optimizaron los parámetros del ESI, se desarrollaron los correspondientes estudios de reproducibilidad y repetibilidad. Para ello se efectuaron cinco inyecciones consecutivas a tres niveles de concentración distintos (5, 25 y 50 mg/l) en tres días diferentes. La Tabla IV.1.4 muestra los parámetros de validación del método para una concentración de 25 mg/l, obteniéndose resultados similares para los otros dos niveles de concentración. Los valores de RSD de los tiempos de migración fueron menores del 1,9% para la repetibilidad y del 3,4% para la reproducibilidad. Asimismo, los valores de RSD para las áreas de pico fueron inferiores a 8,8% y 11,0% para la repetibilidad y reproducibilidad, respectivamente. Estos valores son ligeramente superiores a los obtenidos en CE-UV, lo que indica que el método CE-MS no es tan reproducible como el de CE-UV. Además, las eficacias de pico en CE-MS fueron también inferiores a las obtenidas en CE-UV, hecho que ha sido repetidamente mencionado en la bibliografía y que está relacionado con el efecto sifón que tiene lugar en el interior del capilar como consecuencia del diseño del flujo adicional utilizado en la interfase ESI.

Además, a este hecho hay que añadir que en CE-MS se utilizó un tampón algo más diluido que en CE-UV debido a los problemas ya mencionados de caída de corriente. Los límites de detección, calculados como tres veces la relación señal/ruido, se encontraron entre 90,0 µg/l (pirimicarb y ciprodinil) y 300 µg/l (ciromazina), siendo 10 veces inferiores a los obtenidos en CE-UV, lo que permite determinar este grupo de pesticidas a concentraciones muy bajas, en el rango de los µg/l.

Una vez estudiadas la reproducibilidad y repetibilidad del método, se obtuvieron las correspondientes rectas de calibrado para los cinco pesticidas a concentraciones comprendidas entre 0,5 y 50 mg/l, mostrando buenos coeficientes de correlación (R) superiores a 0,9950 (Tabla IV.1.4).

Tal como se ha indicado anteriormente, la determinación de residuos de pesticidas en muestras reales plantea serias dificultades: la baja concentración de los mismos en este tipo de muestras, así como la gran cantidad de interferencias de la propia matriz de la muestra (Simplicio y Boas, 1999). En este caso particular, con objeto de aplicar la anterior metodología al análisis de pesticidas en muestras reales, se inyectaron en el capilar, sin pretratamiento alguno, zumos de naranja y de uva enriquecidos con 15 y 500 µg/l de cada pesticida. En estas inyecciones no se pudo apreciar pesticida alguno, debido, en primer lugar, a la falta de sensibilidad del método para detectar niveles tan bajos y, en segundo lugar, a las interferencias presentes en la propia muestra. Sólo a concentraciones relativamente altas, superiores a 500 µg/l, el pirifeno, el pirimicarb y el ciprodinil pudieron ser detectados, siendo las áreas de los picos muy pequeñas, lo que, unido a una elevada falta de reproducibilidad y a un elevado ruido de fondo, hizo imposible una cuantificación fiable. Por ello fue necesario el desarrollo de un método de extracción y preconcentración previo a la inyección de la muestra.

Tabla IV.1.4.- Datos de validación del método de determinación de los cinco pesticidas por CE-MS.

Pico	Pesticida	Repetibilidad ^{a)}		Reproducibilidad ^{a)}		Eficacia ^{a)}	Recta de calibrado ^{b)}	R	S _{y/x}	LOD ^{c)}	LOQ ^{d)}
		(RSD %, n=5)		(RSD %, n=15)							
		t _m	Área	t _m	Área	NTP/m				(µg/l)	(µg/l)
1	Ciromazina	1,9	8,8	2,8	9,7	26500	y = (533 ± 51)x + (984 ± 1429)	0,9960	2,0	300	1000
2,2'	Pirifenox	1,6	6,1	2,7	9,6	26600	y = (6232 ± 197)x - (2314 ± 5540)	0,9990	7,7	120	400
3	Pirimicarb	1,7	7,4	2,5	7,7	22900	y = (3879 ± 275)x + (2374 ± 7724)	0,9950	11	90,0	300
4	Ciprodinil	1,1	6,8	3,4	11,0	23900	y = (5598 ± 104)x - (4436 ± 2938)	0,9993	4,1	90,0	300
5	Pirimetamil	1,6	7,9	2,7	10,8	44800	y = (3969 ± 70)x - (1922 ± 6285)	0,9994	2,7	120	400

a) Datos mostrados para una concentración de 25 mg/l.

b) Pendiente y ordenada en el origen x10⁻³. Intervalos de confianza calculados al 95% de nivel de confianza.

c) Calculado como tres veces la relación señal/ruido.

b) Calculado como diez veces la relación señal/ruido.

R: Coeficiente de correlación (n=5). S_{y/x}: Error estándar de la estimación x10⁻³.

IV.1.4.- Optimización del procedimiento de SPME

Con objeto de optimizar un procedimiento de SPME para este grupo de pesticidas, se llevó a cabo un estudio preliminar con cuatro fibras diferentes: polidimetilsiloxano, PDMS, polidimetilsiloxano-divinilbenceno, PDMS/DVB, poliacrilato, PA, y carbowax-resina templada, CW/TPR, que son, actualmente, las únicas fibras comercializadas compatibles con disolventes orgánicos (denominadas “fibras para HPLC”). Con cada una de estas fibras se llevó a cabo la extracción de 6 ml de una disolución acuosa a diferentes pHs que contenía 50 µg/l de cada pesticida y un 10% de cloruro sódico (el cloruro sódico se añadió para favorecer el efecto de *salting-out*). Durante la extracción, la agitación se mantuvo constante (800 rpm), al igual que durante la desorción (1 000 rpm). Como disolventes de desorción se probaron tanto el metanol como el acetonitrilo (dado que son los disolventes en los que los analitos presentan una mayor solubilidad), siendo el primero de ellos el que proporcionó los mejores resultados. La fibra que demostró una mayor capacidad de extracción fue la PDMS/DVB, aunque uno de los pesticidas, la ciromazina, no pudo ser extraída por ninguna de ellas.

Una vez seleccionada la fibra, se llevó a cabo la optimización de los parámetros que afectan a la extracción (tiempo de extracción y de desorción, pH y porcentaje de NaCl) con disoluciones acuosas de 50 µg/l de cada pesticida, haciendo uso de un diseño experimental del tipo *diseño compuesto centrado*. En dicho diseño, el pH se modificó entre 4 y 9, el porcentaje de NaCl entre 0 y 31%, el tiempo de extracción entre 0 y 200 minutos y el tiempo de desorción entre 0 y 40 minutos. Una vez realizados estos experimentos, los porcentajes de recuperación de cada pesticida fueron calculados e introducidos -primero de forma individual y luego conjuntamente- en el programa *Statgraphics Plus* con objeto de obtener la correspondiente superficie de respuesta, así como de localizar el óptimo de la extracción. La Figura IV.1.10 muestra el efecto de los factores individuales sobre la recuperación de cada uno de los cuatro pesticidas extraídos por la fibra. Tal como puede apreciarse, existe una estrecha relación entre el tiempo de extracción y el porcentaje de recuperación para los pesticidas pirifenox, pirimetanil y ciprodinil, lo que sugiere que a altos tiempos de extracción (200 minutos)

aún no se ha alcanzado el equilibrio. En lo que respecta al pH, un aumento del mismo mejora la extracción del pirifeno, pirimicarb y pirimetanil, mientras que para el ciprodinil existe un valor óptimo a pH 6. En general se puede asumir, además, que para todos los pesticidas, excepto el ciprodinil, un incremento de la concentración de NaCl aumenta la extracción de estos compuestos y, por lo tanto, el tiempo de extracción se ve reducido a altas concentraciones de la sal. En el caso del tiempo de desorción, valores próximos a 16 minutos son suficientes para asegurar la desorción de todos los analitos.

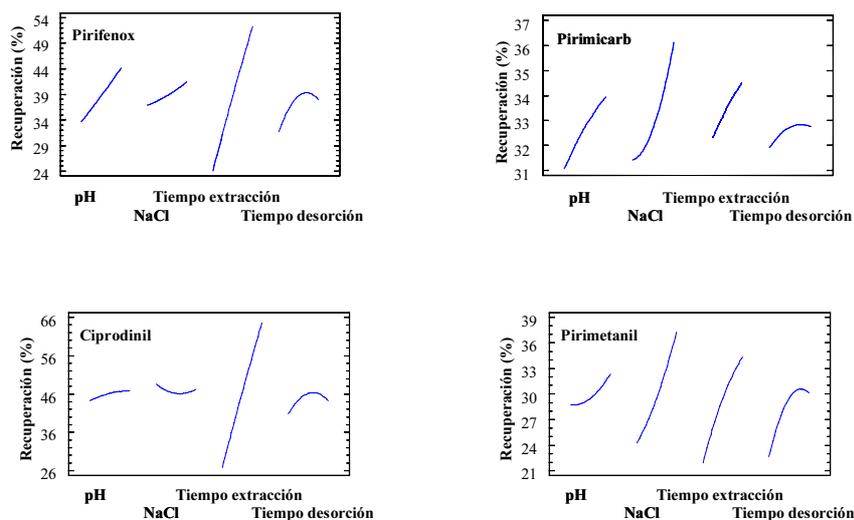


Figura IV.1.10.- Efectos individuales de los factores que influyen en el procedimiento de SPME sobre el porcentaje de recuperación de cada pesticida.

La Figura IV.1.11 muestra las superficies de respuesta del proceso de extracción, tomando como respuesta el porcentaje de recuperación global de todos los pesticidas. Las condiciones óptimas predichas por el programa fueron las siguientes: extracción a pH 6 con un 31% en NaCl durante 200 minutos y desorción en metanol durante 16 minutos. A pesar de que las condiciones óptimas calculadas por el programa sugerían una extracción de 200 minutos, dado que durante dicho tiempo no se alcanza el equilibrio, se decidió llevar a cabo la extracción a tiempos inferiores (150 minutos)

aunque el porcentaje de recuperación fuera ligeramente menor, lo que exigiría un riguroso control del tiempo de extracción con objeto de que la reproducibilidad del proceso fuera adecuada. Cuando se llevó a cabo la extracción bajo estas condiciones óptimas, las recuperaciones obtenidas fueron del 56% para el pirifeno, 50% para el pirimicarb, 59% para el ciprodinil y 58% para el pirimetanil. En lo que a porcentajes de recuperación proporcionados por la SPME se refiere, comparando con los datos existentes en la bibliografía (Rodríguez y col., 2003; Frías y col., 2004a; Zambonin y col., 2004) puede apreciarse que estos porcentajes son bastante buenos, dado que cuando se trabaja por *inmersión directa*, los porcentajes de recuperación suelen ser más bajos.

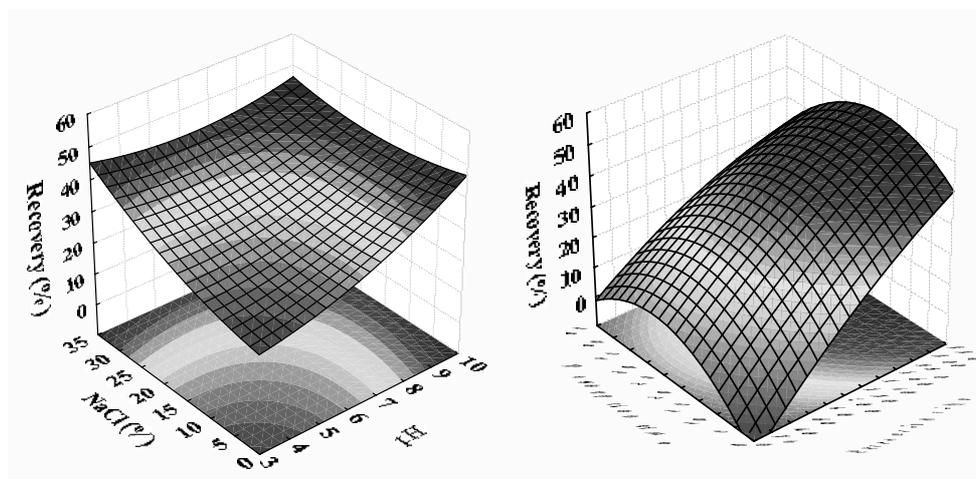


Figura IV.1.11.- Superficie de respuesta estimada para el *diseño compuesto centrado* utilizado en la optimización del procedimiento de SPME. Izquierda: Porcentaje de recuperación frente al porcentaje de NaCl y al pH. Derecha: Porcentaje de recuperación frente al tiempo de desorción (minutos) y de extracción (minutos).

Con objeto de validar el procedimiento de SPME, diversas muestras de agua desionizada de diferente concentración (15, 50, 150, 250 y 1000 $\mu\text{g/l}$) de cada pesticida, fueron extraídas tres veces. La Tabla IV.1.5 muestra los porcentajes de recuperación medios, así como la RSD y los límites de detección obtenidos para cada pesticida. Como puede apreciarse, el rango de linealidad del procedimiento de SPME se encuentra entre 15 y 1000 $\mu\text{g/l}$ para el pirifeno, ciprodinil y pirimetanil, y entre 15 y 150 $\mu\text{g/l}$ para el pirimicarb, con límites de detección comprendidos entre 5,41 y 7,75 $\mu\text{g/l}$.

Tabla IV.1.5.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3), RSD (entre paréntesis) y límite de detección (LOD) para el procedimiento SPME aplicado a muestras de agua desionizada enriquecida a diferentes niveles de concentración.

Pesticida	15 µg/l	50 µg/l	150 µg/l	250 µg/l	1000 µg/l	LOD (µg/l)
Pirifenox	50 (14)	55 (19)	50 (9)	47 (6)	56 (12)	7,75
Pirimicarb	51 (11)	57 (13)	44 (13)	31 (12)	12 (37)	5,92
Ciprodinil	64 (13)	66 (15)	45 (10)	50 (7)	52 (13)	5,41
Pirimetanil	56 (7)	48 (8)	48 (8)	53 (5)	55 (4)	7,69

IV.1.5.- Aplicación del procedimiento de SPME-CE-MS a muestras reales

La inyección directa de diferentes tipos de zumos (por ejemplo, uva y naranja) enriquecidos con los cinco pesticidas (desde 15 hasta 250 µg/l) mediante CE-MS, como era de esperar, no permitió su detección (Figuras IV.1.12A y IV.1.13A). Sin embargo, cuando se aplicó el procedimiento SPME optimizado a un zumo de naranja enriquecido con 150 µg/l de cada pesticida, se pudo comprobar que dicho procedimiento permitía la extracción y posterior cuantificación de los cuatro pesticidas, tal como puede apreciarse en la Figura IV.1.12B. El procedimiento SPME-CE-MS fue también probado en zumos de uva enriquecidos a concentraciones de 40 µg/l, inferiores a los LMR establecidos. Como puede apreciarse en la Figura IV.1.13, el pirifenox, pirimicarb, pirimetanil pudieron ser determinados a estas concentraciones, mientras que para el ciprodinil pudo apreciarse un efecto matriz alto que sólo permitió su determinación a concentraciones superiores a 150 µg/l. Este hecho se puede explicar si se tiene en cuenta que a altos tiempos de extracción, como es este caso (150 minutos) existe una competencia importante entre los distintos analitos y las interferencias existentes en la muestra por adsorberse sobre la fibra. Además, cuanto mayor es el tiempo de extracción, en mayor medida tienen lugar estas adsorciones y, por lo tanto, los límites de detección alcanzados no son tan bajos. Para tratar de evitar este hecho, se aplicó un pretratamiento de la muestra previo al proceso de SPME, utilizando una extracción asistida por ultrasonidos con diferentes disolventes orgánicos, como la acetona (Rodríguez y col., 2003), sin éxito alguno.

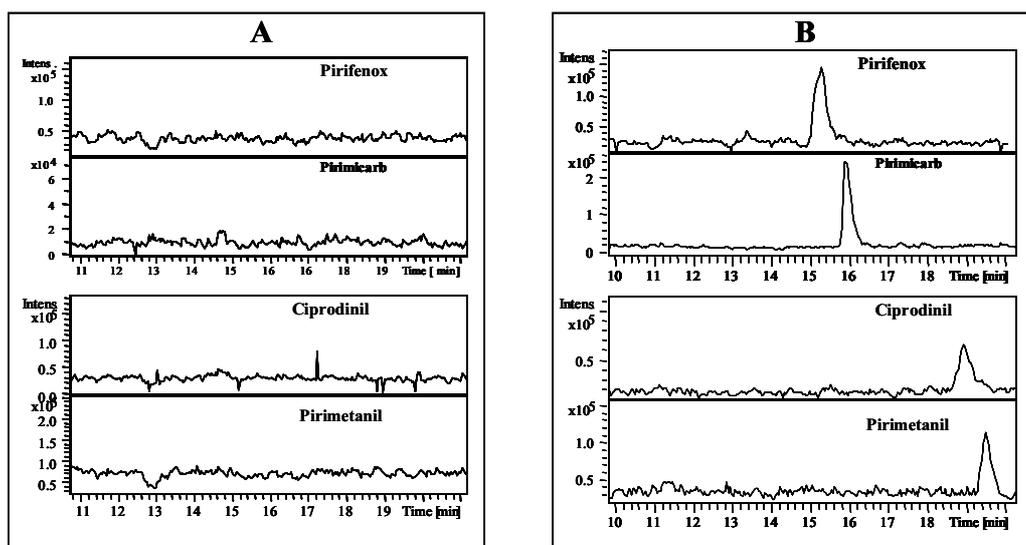


Figura IV.1.12.- A) Electroferogramas de iones extraídos obtenidos tras la inyección directa en CE-MS de un zumo de naranja que contenía 150 $\mu\text{g/l}$ de cada pesticida. B) Electroferogramas de iones extraídos obtenidos tras la inyección en CE-MS de la misma muestra de zumo, previamente extraída con SPME. Otras condiciones similares a la Figura IV.1.8.

Es necesario destacar, que la reproducibilidad de la extracción de los pesticidas de los diferentes zumos fue la misma que la previamente obtenida en muestras acuosas. Además, la detección del pirifenox, pirimicarb y pirimetanil a concentraciones tan bajas (40 $\mu\text{g/l}$), representa la concentración de pesticida más baja alcanzada hasta la fecha en muestras reales por SPME-CE-MS.

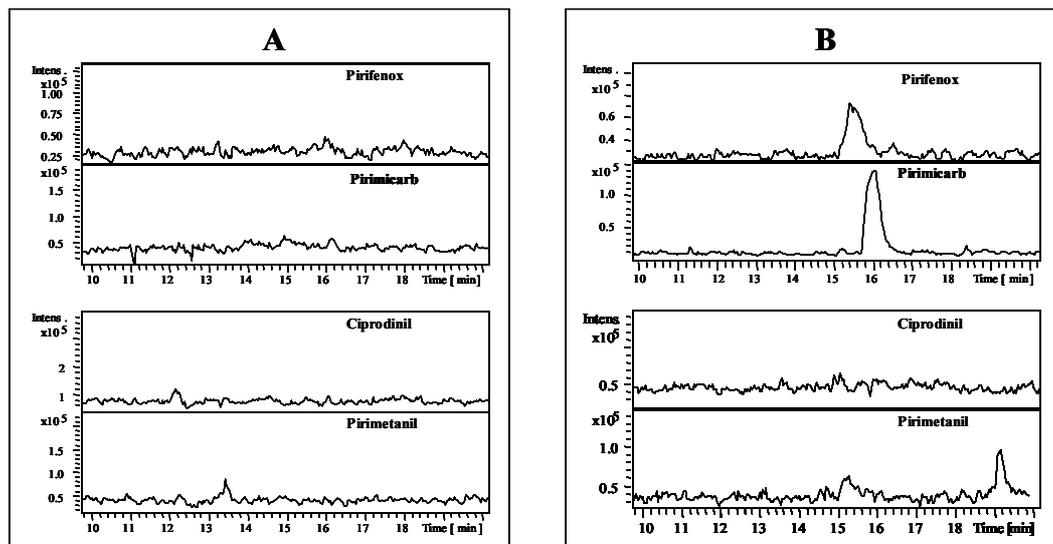


Figura IV.1.13.- A) Electroferogramas de iones extraídos obtenidos tras la inyección directa en CE-MS de un zumo de uva que contenía 40 $\mu\text{g/l}$ de cada pesticida. B) Electroferogramas de iones extraídos obtenidos tras la inyección en CE-MS de la misma muestra de zumo, previamente extraída por SPME. Otras condiciones similares a la Figura IV.1.8.

IV.1.6.- Conclusiones

1. Se ha puesto a punto una nueva metodología para la determinación de un grupo de pesticidas en zumos de frutas (uva y naranja) mediante SPME-CE-MS, lo que supone la primera separación de este grupo de pesticidas por CE-MS, y el segundo trabajo existente en la bibliografía referido a SPME-CE de pesticidas.
2. La separación óptima estudiada por CE-UV, como paso previo a la determinación por CE-MS, fue conseguida con un tampón de ácido acético 0,4 M (pH 4), lo que ha permitido obtener límites de detección comprendidos entre 0,6 y 1,4 mg/l.
3. Por primera vez se ha llevado a cabo la optimización de los parámetros del *electrospray* utilizado en CE-ESI-MS mediante un diseño experimental. Las condiciones

óptimas obtenidas han sido las siguientes: presión del gas nebulizador de 2 psi, flujo del gas de secado de 2 l/min, temperatura del gas de secado de 300 °C, líquido adicional de una mezcla 65% isopropanol-agua con un flujo de 0,22 ml/h. Estas condiciones conjuntamente con el uso del tampón ácido acético 0,3 M a pH 4 han permitido obtener límites de detección comprendidos entre 0,09 y 0,30 mg/l, lo que supone una mejora de 10 veces con respecto a los valores obtenidos por CE-UV.

4. La optimización de los parámetros que influyen en el procedimiento SPME se llevó a cabo haciendo uso de un diseño experimental. Las condiciones óptimas obtenidas fueron las siguientes: fibra de PDMS/DVB, 6 ml de muestra al 31% NaCl, pH 6, 150 minutos de extracción a 25 °C y 16 minutos de desorción en 200 µl de metanol, extrayéndose cuatro de los cinco pesticidas seleccionados, con niveles de recuperación comprendidos entre 50 y 59%. El procedimiento de SPME optimizado para los pesticidas seleccionados resultó ser preciso y reproducible, proporcionando límites de detección comprendidos entre 5,41 y 7,75 µg/l.

5. El nuevo método SPME-CE-MS se ha aplicado a la determinación de pesticidas en zumos de uva y naranja. Los pesticidas pirifenox, pirimicarb y pirimetanil se pudieron determinar en los mismos a niveles de hasta 40 µg/l, excepto el ciprodinil que sólo pudo ser determinado a niveles del orden de 150 µg/l.

IV.2.- Análisis de un grupo de pesticidas por electroforesis capilar con detección UV, combinada con microextracción en fase sólida y técnicas de preconcentración en línea.

En esta sección se presenta un estudio comparativo de diferentes métodos de preconcentración en línea (NSM, SWMR y FESI) para la determinación por CE con detección UV del grupo de cinco pesticidas seleccionado en la sección anterior (ciromazina, ciprodinil, pirifeno, pirimicarb y pirimetanil). La mejor de estas técnicas de preconcentración es utilizada, junto con el procedimiento SPME optimizado en la sección IV.1, para la determinación de este grupo de pesticidas en zumos de manzana y de naranja. Se demuestra que la combinación de ambos procedimientos de preconcentración permite determinar estos pesticidas a niveles de 2,50 µg/l en aguas y 3,10 µg/l en zumos.

IV.2.1.- Antecedentes

En la sección IV.1 se presentó la determinación de este grupo de cinco pesticidas por SPME-CE-MS en zumos de frutas. Un espectrómetro de masas es, sin duda alguna, una poderosa herramienta para el análisis de todo tipo de compuestos en matrices complejas, sobre todo desde el punto de vista de la selectividad y sensibilidad de la técnica. Sin embargo, se trata de un instrumento caro que no todos los laboratorios analíticos pueden costear.

Los detectores UV, bien sea de filtros o de diodos, son mucho más económicos que los anteriores, siendo los más utilizados en los laboratorios analíticos. Sin embargo, uno de sus principales inconvenientes cuando se usan en CE es su baja sensibilidad debida tanto a los pequeños volúmenes de muestra introducidos en el capilar, como al pequeño paso óptico del mismo, que se corresponde con su diámetro interno. El uso combinado de este tipo de detectores de bajo coste con técnicas de preconcentración en línea puede solucionar esta limitación, como ya ha sido demostrado mediante el análisis de otros pesticidas (Núñez y col., 2001, 2002; Carabias Martínez y col., 2003b; Da Silva

y col., 2003; Molina y col., 2001), proporcionando límites de detección en el rango de los $\mu\text{g/l}$.

IV.2.2.- Aplicación de técnicas de preconcentración en línea

En el capítulo I se indicó brevemente que la aplicación y la mejora de sensibilidad obtenida con unos u otros métodos de preconcentración en línea dependen, en general, de las características instrumentales del equipo, así como de la naturaleza de los analitos y de la matriz en la que se encuentran disueltos. Asimismo, se señaló que para poder aplicar estas técnicas al análisis de cationes o de aniones, en unos casos sería necesario utilizar polaridad normal y, en otros, polaridad inversa. Dado que en este caso los cinco pesticidas seleccionados tienen valores de pK_a entre 3,52 (pirimetanil) y 5,22 (ciromazina) al pH del tampón utilizado en la sección IV.1, y que era una disolución de ácido acético 0,4 M a pH 4, estos compuestos se encontrarán protonados. Si se utiliza polaridad normal, se podrán utilizar tanto el NSM como el FESI, mientras que si se invierte el EOF, en polaridad inversa se podrán utilizar tanto el NSM como el SWMR.

“Normal stacking mode” en polaridad normal (NP-NSM)

En el NSM, la preconcentración de los analitos se produce cuando se inyecta una muestra con una conductividad menor a la del BGE, debido al cambio tan abrupto que se genera en el campo eléctrico local. En el modo más sencillo se utiliza como disolvente de la muestra agua o un tampón de concentración menor que la del tampón de separación, aunque hay que señalar que el uso de disolventes orgánicos puede mejorar considerablemente la sensibilidad. Para obtener una muestra con una conductividad adecuada se prepararon mezclas de los pesticidas en disoluciones 1:3, 1:1, 3:1 metanol-ácido acético 0,4 M, en metanol puro y en ácido acético 0,4 M. La combinación que proporcionó las mayores relaciones señal/ruido y, por lo tanto, los menores límites de detección fue la 1:1 (metanol-ácido acético 0,4 M). El uso de tampón de separación en lugar de la disolución de ácido acético no proporcionó resultados satisfactorios. Utilizando la mezcla 1:1, ésta se pudo introducir en el capilar hasta 35

segundos a 0,5 psi, lo que representa aproximadamente un 3% del volumen total del capilar. Tiempos de inyección mayores provocaban caídas de corriente. En estas condiciones de NSM óptimas se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad a tres niveles de concentración distintos (0,5, 1 y 2,5 mg/l) con cinco inyecciones consecutivas en tres días diferentes. La Tabla IV.2.1 muestra los resultados obtenidos para una concentración de 0,5 mg/l (resultados similares fueron obtenidos para los otros dos niveles de concentración). Las RSD para áreas de pico fueron menores del 9,7% para la reproducibilidad y del 7,2% para la repetibilidad. Los límites de detección obtenidos oscilaron entre 60,2 µg/l (ciromazina) y 280 µg/l (pirimicarb) y representan un incremento de sensibilidad entre 4 y 14 veces con respecto a los límites de detección obtenidos sin *stacking*, ya descritos en el apartado IV.1. Este incremento de sensibilidad obtenido (en torno a 10) fue similar a los descritos en la bibliografía utilizando esta técnica (Quirino y Terabe, 2000). Los valores de RSD para los tiempos de migración fueron inferiores al 1,8% para la repetibilidad y al 3% para la reproducibilidad. Las eficacias de pico fueron superiores a 200000 NTP/m (desde 208000 hasta 550000 NTP/m) para todos los pesticidas.

“Field-enhancement sample injection” en polaridad normal (NP-FESI)

En este modo de *stacking* la introducción de los analitos en el capilar se realiza en el modo electrocinético, de forma que dependerá del EOF, de la muestra y de la carga y movilidad del analito. Así, los analitos iónicos se introducirán en el capilar, mientras que aquellos que no posean carga permanecerán en el vial de inyección. Teniendo en cuenta los valores de pK_a de los pesticidas, es necesario que éstos se encuentren protonados en el momento de aplicar la inyección electrocinética, al mismo tiempo la conductividad de la muestra debe ser baja con respecto al tampón de separación. Para ello, diversas mezclas de los pesticidas disueltos en metanol y una disolución de ácido acético 0,4 M han sido probadas como en el apartado anterior. Los pesticidas disueltos en esta disolución de ácido acético e inyectados a diferentes tiempos, no proporcionaron un incremento de sensibilidad adecuado. Los mejores resultados fueron obtenidos también con la mezcla 1:1 (metanol-ácido acético 0,4 M). Es

preciso destacar que cuando se trabaja con FESI, es necesario optimizar tanto el tiempo de inyección como el voltaje al que se inyecta la muestra. El equipo de CE utilizado P/ACE 5510 sólo permite realizar inyecciones electrocinéticas hasta voltajes de 10 kV. Tras una adecuada optimización tanto del tiempo de inyección como del voltaje, se pudo comprobar que los mejores resultados se obtenían con una inyección de 35 segundos a +10 kV. Voltajes inferiores proporcionaron sensibilidades menores.

En las condiciones óptimas de NP-FESI se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad a tres niveles de concentración distintos (0,5, 1 y 2,5 mg/l) con cinco inyecciones consecutivas en tres días diferentes. La Tabla IV.2.1 muestra los resultados obtenidos para una concentración de 0,5 mg/l (se obtuvieron resultados similares para los otros dos niveles de concentración). Las RSD para áreas de pico fueron menores del 9,9% para la reproducibilidad y del 5,8% para la repetibilidad. Los límites de detección obtenidos se encontraron entre 20,4 µg/l (ciprodinil) y 83,0 µg/l (pirimicarb), representando un incremento de sensibilidad entre 14 y 44 veces con respecto a los límites de detección obtenidos sin *stacking* (apartado IV.1). Esto supone también una mejora de sensibilidad respecto al NP-NSM. Los valores de RSD para los tiempos de migración fueron menores del 2% para la repetibilidad y del 4% para la reproducibilidad, demostrando así que la técnica era reproducible. Las eficacias de pico fueron superiores a 69000 NTP/m (desde 69000 hasta 160000 NTP/m) para todos los pesticidas.

Las Figuras IV.2.1B y IV.2.1C muestran los electroferogramas obtenidos tras inyectar una muestra que contenía 0,5 mg/l de cada pesticida, utilizando el NP-NSM y el NP-FESI, respectivamente. La Figura IV.2.1A, por su parte, muestra el electroferograma obtenido tras inyectar la misma muestra sin aplicar ninguna de las dos técnicas de *stacking* (condiciones idénticas a las del apartado IV.1 por CE-UV). Como puede apreciarse en la figura, el incremento de sensibilidad obtenido mediante FESI, entre 14 y 44 veces, dependiendo del pesticida, fue superior a las de las otras dos técnicas.

Tabla IV.2.1.- Datos de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad del método de separación de los cinco pesticidas utilizando el NSM y el FESI como técnicas de preconcentración en línea (datos mostrados para una concentración de 0,5 mg/l).

Pesticida	NP-NSM					NP-FESI				
	Repetibilidad	Reproducibilidad		LOD ^{a)} (µg/l)	Incr. ^{b)}	Repetibilidad	Reproducibilidad		LOD ^{a)} (µg/l)	Incr. ^{b)}
	(n=5) Área (RSD %)	(n=15) Área (RSD %)	NTP/m			(n=5) Área (RSD %)	(n=15) Área (RSD %)	NTP/m		
Ciromazina	7,2	9,6	550000	60,2	10	5,8	9,9	87000	21,7	28
Pirifeno	3,4	8,7	460000	192	7	2,0	5,9	160000	59,5	24
Pirimicarb	6,6	7,4	490000	277	4	3,7	4,1	136000	83,0	14
Ciprodinil	2,3	6,5	208000	66,4	14	3,6	5,0	69000	20,4	44
Pirimetanil	5,4	9,7	365000	203	5	2,4	5,5	158000	59,8	18

a) Calculado como 3 veces la relación señal/ruido.

b) Incremento de sensibilidad (número de veces) comparado con condiciones sin *stacking* (ver texto).

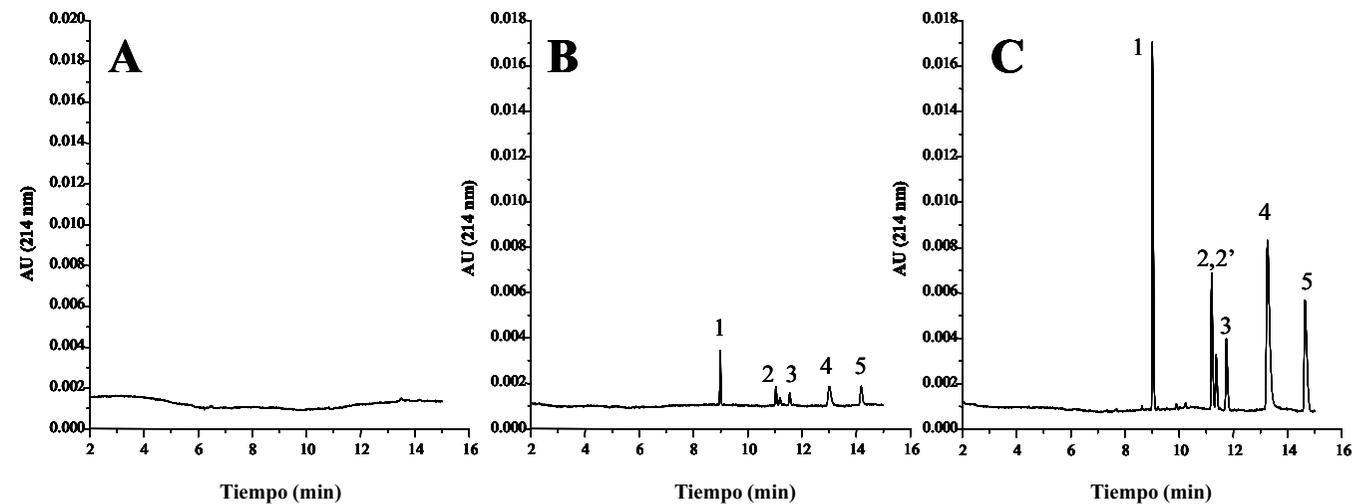


Figura IV.2.1.- Electroferograma de la separación de los pesticidas en estudio. A) Sin *stacking*. Muestra disuelta en metanol. Inyección hidrodinámica en el ánodo durante 12 segundos a 0,5 psi. B) NSM. Muestra en metanol-ácido acético 0,4 M 1:1. Inyección hidrodinámica en el ánodo durante 35 segundos a 0,5 psi. C) FESI. Muestra en metanol-ácido acético 0,4 M 1:1. Inyección electrocinética en el ánodo durante 35 segundos a +10 kV. Tampón: ácido acético 0,4 M, pH 4. Longitud total del capilar: 57 cm (50 cm efectivos). Voltaje: +22 kV. Temperatura: 25 °C. Detección a 214 nm. Muestra: 0,5 mg/l de (1) Ciromazina. (2,2') Pirifenox, isómeros Z y E. (3) Pirimicarb. (4) Ciprodinil. (5) Pirimetanil.

“Normal stacking mode” en polaridad inversa (RP-NSM)

Para poder aplicar otras técnicas de preconcentración como el SWMR para cationes, fue necesario invertir el EOF utilizando un modificador apropiado como CTAC, CTAB, HDB, etc., pero aunque se invierta el EOF, el NSM se puede seguir utilizando. Con este fin, se añadieron al tampón de separación (ácido acético 0,4 M, pH 4) dos tensioactivos catiónicos, el CTAC y CTAB, y un polication, el HDB, a diferentes concentraciones (0,2-1,2 mM CTAC y CTAB, 0,005-0,05% HDB) siempre inferiores a su concentración micelar crítica para no trabajar en el modo MEKC y evitar, además, que el tiempo de análisis fuera demasiado alto. Los mejores resultados en términos de eficacia, resolución y tiempo de análisis fueron obtenidos utilizando CTAB y CTAC a una concentración de 0,4 mM. Sin embargo, en estas condiciones no todos los picos estaban resueltos. Fue por ello que se adicionaron al tampón de separación diferentes modificadores orgánicos (metanol, etanol, acetonitrilo, 1-propanol y 2-propanol) a diferentes concentraciones (0-10%). El uso del 2-propanol proporcionó una separación adecuada de los pesticidas, con tiempos de análisis cortos y buenas eficacias. Hay que señalar que tanto el uso de CTAC como del CTAB proporcionaron perfiles electroforéticos similares. Sin embargo, el CTAB presentaba un mayor ruido de fondo, de ahí que se eligiera el CTAC. En la Figura IV.2.2A, se presenta el electroferograma obtenido en las condiciones de separación óptimas en el que se observa que los pesticidas se separan en menos de 11 minutos. Comparado con la separación obtenida en polaridad normal (Figuras IV.2.1B y IV.2.1C) prácticamente se invirtió el orden de migración de los pesticidas, salvo para el ciprodinil (pico 4); además, en estas condiciones experimentales también fue posible separar los dos isómeros del pirifenox.

Una vez optimizado el tampón con CTAC, se aplicó también el NSM como técnica de preconcentración. Tras probar diversas mezclas metanol-ácido acético 0,4 M, de nuevo la relación 1:1 proporcionó las mayores relaciones señal/ruido. En este caso, la muestra -que contenía 0,5 mg/l de cada pesticida- pudo ser inyectada hasta 200 segundos, lo que supone, aproximadamente, un 16% del volumen total del capilar, con límites de detección comprendidos entre 32,1 µg/l (ciromazina) y 106 µg/l (ciprodinil).

Tiempos de inyección superiores provocaron una pérdida de resolución importante, así como un aumento del tiempo de análisis. Cuando la muestra tenía una concentración mayor (2 mg/l) el tiempo de inyección no pudo ser tan alto (ver Figura IV.2.2), de forma que sólo se pudo inyectar durante unos 40 segundos, de ahí la importancia de la concentración escogida y del establecimiento del rango de aplicación de la técnica.

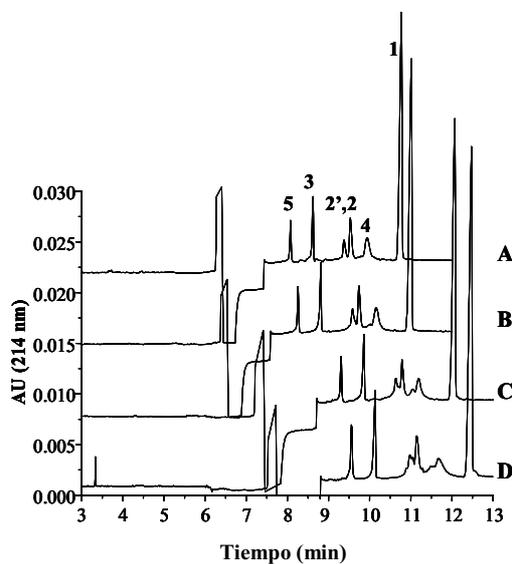


Figura IV.2.2.- Electroferogramas de la separación de los pesticidas en estudio a diferentes tiempos de inyección (0,5 psi) utilizando RP-NSM. A) 40 segundos. B) 45 segundos. C) 50 segundos. D) 60 segundos. Tampón: CTAC 0,4 mM, ácido acético 0,4 M, pH 4, 5% (v/v) 2-propanol. Longitud total del capilar: 57 cm (50 cm efectivos). Voltaje: -22 kV. Temperatura: 25 °C. Detección a 214 nm. Muestra: 2 mg/l de cada pesticida en metanol- ácido acético 0,4 M (1:1). (1) Ciromazina. (2,2') Pirifenox, isómeros Z y E. (3) Pirimicarb. (4) Ciprodinil. (5) Pirimetanil.

De nuevo, bajo las condiciones de RP-NSM, se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad a tres concentraciones diferentes (0,2, 0,35 y 0,5 mg/l) inyectadas cinco veces consecutivas en tres días diferentes. La Tabla IV.2.2 muestra los resultados de este estudio para la concentración de 0,5 mg/l (para las otras dos concentraciones los resultados fueron similares, siendo las RSD incluso ligeramente inferiores). Los valores de RSD para los tiempos de migración fueron inferiores al 2,2% para la reproducibilidad

y al 1,6% para la repetibilidad. Comparando los resultados de esta tabla con los de la Tabla IV.2.1, puede verse que el RP-NSM proporcionó mejores resultados que el NP-NSM, en términos de límites de detección y eficacia, y mejores eficacias que el NP-FESI (con RP-NSM se alcanzaron 900000 NTP/m). Sin embargo, los límites de detección para la ciromazina, pirifenox y ciprodinil (32,1, 81,0 y 106 µg/l, respectivamente) fueron ligeramente superiores a los obtenidos utilizando el FESI (21,7, 59,5 y 20,4 µg/l, respectivamente).

“Stacking” con eliminación de matriz en polaridad inversa (RP-SWMR)

Antes de aplicar el SWMR se llenó el capilar con el tampón de separación (0,4 mM CTAC, ácido acético 0,4 M, pH 4, 5% v/v 2-propanol) y se midió la corriente a -20 kV. A continuación, se introdujo la muestra en el interior del capilar, cuya conductividad fue modificada de la misma forma que en el apartado anterior (mezclas 1:1, 1:3 y 3:1, etc.). Tras aplicar voltaje con la disposición normal de los electrodos, polaridad normal, la corriente era inicialmente muy baja e iba aumentando poco a poco. Cuando el valor adquirido era de un 95-97% el valor de corriente inicial, se interrumpió la separación, se invirtió la polaridad, polaridad inversa, y se llevó a cabo la separación. El tiempo necesario para alcanzar el 95-97% del valor de corriente inicial es conocido como “tiempo de inversión” (*reversal time*) y va a depender del tiempo que se ha introducido la muestra en el capilar que, además, debe ser optimizado. En este caso, el disolvente de la muestra que proporcionó las mayores relaciones señal/ruido fue, nuevamente, la mezcla 1:1, lo que permitió inyectar una muestra de 0,5 mg/l hasta 6 segundos a 20 psi (tiempo de inversión de 1,9 minutos; ver Figura IV.2.3A). Cuando se aplicó el RP-SWMR a concentraciones superiores (1 ó 2 mg/l, por ejemplo) varios picos se solapaban. Por lo tanto, la aplicación de esta técnica sólo fue posible a concentraciones inferiores a 0,5 mg/l. Además, se pudo observar que tiempos de inyección superiores a 6 segundos (Figuras IV.2.3B y IV.2.3C), provocaban una pérdida de resolución entre la ciromazina y el ciprodinil (picos 1 y 4, respectivamente), así como entre los isómeros del pirifenox (picos 2 y 2'). Asimismo, los tiempos de inyección del orden de 9-15 segundos requerían tiempos de inversión de 5-30 minutos, como consecuencia del gran volumen inyectado.

Tabla IV.2.2.- Datos de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad del método de separación de los cinco pesticidas utilizando el RP-NSM y el RP-SWMR como técnicas de preconcentración en línea (datos mostrados para una concentración de 0,5 mg/l).

Pesticida	RP-NSM					RP-SWMR				
	Repetibilidad	Reproducibilidad		LOD ^{a)}	Incr. ^{b)}	Repetibilidad	Reproducibilidad		LOD ^{a)} (µg/l)	Incr. ^{b)}
	(n=5)	(n=15)	NTP/m	(µg/l)		(n=5)	(n=15)	NTP/m	(µg/l)	
Área (RSD %)	Área (RSD %)				Área (RSD %)	Área (RSD %)				
Ciromazina	2,0	5,9	610000	32,1	19	4,2	4,4	700000	2,20	272
Pirifenox	7,1	8,9	760000	81,0	17	2,2	3,1	660000	42,5	33
Pirimicarb	7,5	8,4	800000	41,0	29	3,4	3,4	950000	15,8	76
Ciprodinil	5,8	9,4	220000	106	9	4,7	5,9	220000	25,7	35
Pirimetanil	8,8	9,4	900000	48,5	23	3,9	4,0	1000000	17,4	63

a) Calculado como 3 veces la relación señal/ruido.

b) Incremento de sensibilidad (número de veces) comparado con condiciones sin *stacking* (ver texto).

Inyectando la muestra 6 segundos a 20 psi, se consiguieron límites de detección (Tabla IV.2.2) de hasta 2,20 $\mu\text{g/l}$ (ciromazina), lo que supuso, por un lado, un incremento de sensibilidad de hasta 272 veces con respecto a una inyección sin *stacking* y, por otro, un incremento importante con respecto a los límites de detección alcanzados normalmente en CE (mg/l).

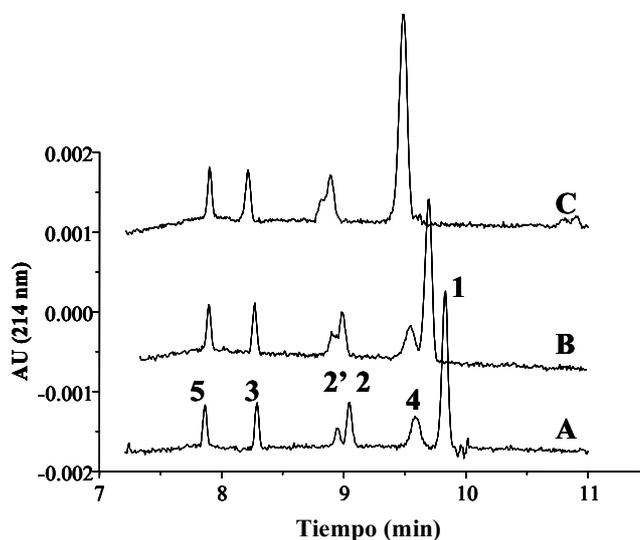


Figura IV.2.3.- Influencia del tiempo de inyección en RP-SWMMR empleando una presión de inyección de 20 psi. A) 6 segundos. B) 7,5 segundos. C) 8,5 segundos. Eliminación de matriz a +20 kV. Separación a -20 kV. Tampón: 0,4 mM CTAC, ácido acético 0,4 M, pH 4, 5% (v/v) 2-propanol. Longitud total del capilar: 57 cm (50 cm efectivos). Temperatura: 25 °C. Detección a 214 nm. Muestra 50 $\mu\text{g/l}$ de cada pesticida en metanol-ácido acético 0,4 M (1:1). (1) Ciromazina. (2,2') Pirifenox, isómeros Z y E. (3) Pirimicarb. (4) Ciprodinil. (5) Pirimetanil.

Los estudios de repetibilidad y reproducibilidad llevados a cabo también a tres niveles de concentración distintos (0,05, 0,25 y 0,5 $\mu\text{g/l}$) con cinco inyecciones consecutivas en tres días diferentes, mostraron que el método RP-SWMMR era reproducible (ver Tabla IV.2.2). En este caso y, por motivos de comparación con las otras técnicas, los datos mostrados por la Tabla IV.2.2 se corresponden con los obtenidos para una concentración de 0,5 mg/l (los resultados fueron similares para los otros dos niveles de concentración). Los valores de RSD para los tiempos de migración

fueron inferiores al 0,7% para la repetibilidad y al 1,6% para la reproducibilidad. Estas RSD, así como las correspondientes a las áreas mostradas en la Tabla IV.2.2, fueron menores que en el resto de las técnicas de preconcentración. En general, el RP-SWMMR aportaba los menores límites de detección así como las mayores eficacias (hasta 1000000 NTP/m) y las menores RSD. Por lo tanto, se seleccionó este método de preconcentración para aplicarlo al análisis de muestras reales.

A continuación, se obtuvieron las rectas de calibrado de los cinco pesticidas, a concentraciones comprendidas entre 20 y 500 µg/l, con tres inyecciones consecutivas de cinco concentraciones diferentes, siendo los coeficientes de correlación (R) obtenidos superiores a 0,996 para todos los pesticidas, como se muestra en la Tabla IV.2.3.

Tabla IV.2.3.- Datos de calibración del método RP-SWMMR-CE-UV.

Pesticida	Recta de calibrado	R	$S_{y/x}$	LOD ^{a)} (µg/l)	LOQ ^{b)} (µg/l)
Ciromazina	$y = (1,921 \pm 0,012)x + (0,032 \pm 0,004)$	0,9998	0,005	2,20	7,33
Pirifenox	$y = (0,618 \pm 0,021)x + (0,007 \pm 0,006)$	0,9988	0,003	42,5	142
Pirimicarb	$y = (0,378 \pm 0,009)x + (0,003 \pm 0,003)$	0,9994	0,008	15,8	52,7
Ciprodinil	$y = (0,569 \pm 0,033)x - (0,000 \pm 0,010)$	0,9965	0,012	25,7	85,7
Pirimetanil	$y = (0,275 \pm 0,013)x + (0,003 \pm 0,004)$	0,9978	0,004	17,4	58,0

a) Calculado como tres veces la relación señal/ruido. b) Calculado como diez veces la relación señal/ruido. R: Coeficiente de correlación (n=5). $S_{y/x}$: Error estándar de la estimación. Intervalos de confianza de la pendiente y ordenada en el origen calculados al 95% de nivel de confianza.

IV.2.3.- Aplicación del método SPME-RP-SWMMR-CE-UV al análisis de muestras reales

El procedimiento de preconcentración en línea RP-SWMMR que aportaba una sensibilidad tan alta, fue combinado con el procedimiento SPME optimizado en el apartado IV.1. Siguiendo dicho procedimiento de SPME, se llevaron a cabo tres extracciones consecutivas con fibras PDMS/DVB de agua Milli-Q y de zumos de

manzana y naranja comerciales enriquecidos a diferentes niveles de concentración. La Tabla IV.2.4, muestra los porcentajes de recuperación medios, así como las RSD y los límites de detección obtenidos tras el procedimiento SPME y la inyección de la muestra con RP-SWMMR. La ciromazina no se extrajo en ninguna de las matrices analizadas tal como se comprobó en la sección IV.1. Como puede apreciarse en la tabla, los porcentajes de recuperación en agua Milli-Q fueron ligeramente inferiores a los obtenidos por SPME-CE-MS para la misma muestra (sección IV.1). Esto pudo ser debido a que las fibras pertenecían a un lote diferente al anterior. Por otro lado, los porcentajes de recuperación en los zumos fueron inferiores a los obtenidos en aguas, con lo que pudo apreciarse un fuerte efecto de la matriz de la muestra, que fue todavía más acentuado en el caso del zumo de naranja. A pesar de ello, los límites de detección obtenidos para los cinco pesticidas tras aplicar la metodología SPME-RP-SWMMR-CE-UV en los zumos oscilaron entre 3,10 y 12,4 $\mu\text{g/l}$ para el zumo de manzana y entre 8,10 y 47,0 $\mu\text{g/l}$ para el zumo de naranja. Se trata de límites de detección inferiores a los alcanzados por SPME-CE-MS en la anterior sección.

En el caso del zumo de naranja, que fue el que presentó las menores recuperaciones y los mayores límites de detección, es importante destacar que el procedimiento SPME implica la introducción directa de la fibra en el zumo, tras un pretratamiento de muestra muy corto que sólo requiere un ajuste de pH, centrifugación y adición de cloruro sódico. Se trata de un procedimiento simple y rápido que permite llegar a límites de detección muy bajos (LMR comprendidos entre 0,05 y 15 mg/kg). Por otro lado, las bajas recuperaciones obtenidas pueden ser debidas a la presencia de partículas en suspensión así como de ciertos compuestos, por ejemplo, pectinas que forman micelas que se unen a los pesticidas dificultando su extracción por la fibra (Simplicio y col.1999).

La Figura IV.2.4 muestra el electroferograma obtenido tras analizar mediante el procedimiento SPME-RP-SWMMR-CE-UV una muestra de agua enriquecida con, aproximadamente, 7 $\mu\text{g/l}$ de cada uno de los pesticidas (ver pie de figura).

Tabla IV.2.4.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3), RSD (entre paréntesis) y límites de detección (LOD) del procedimiento SPME-RP-SWMR-CE-UV aplicado a muestras de aguas y zumos de frutas enriquecidos*.

Pico	Pesticida	Agua desionizada		Zumo de manzana		Zumo de naranja	
		Recuperación (%)	LOD (µg/l)	Recuperación (%)	LOD (µg/l)	Recuperación (%)	LOD (µg/l)
2	Pirifenox	44 (9)	6,00	33 (11)	8,70	6 (13)	47,0
3	Pirimicarb	38 (6)	2,80	24 (9)	4,40	11 (6)	9,70
4	Ciprodinil	40 (8)	3,90	14 (7)	12,4	5 (12)	34,6
5	Pirimetaniil	46 (7)	2,50	36 (9)	3,10	14 (7)	8,10

*Resultados obtenidos para 15 µg/l de cada pesticida en agua y zumo de manzana y 50 µg/l en zumo de naranja.

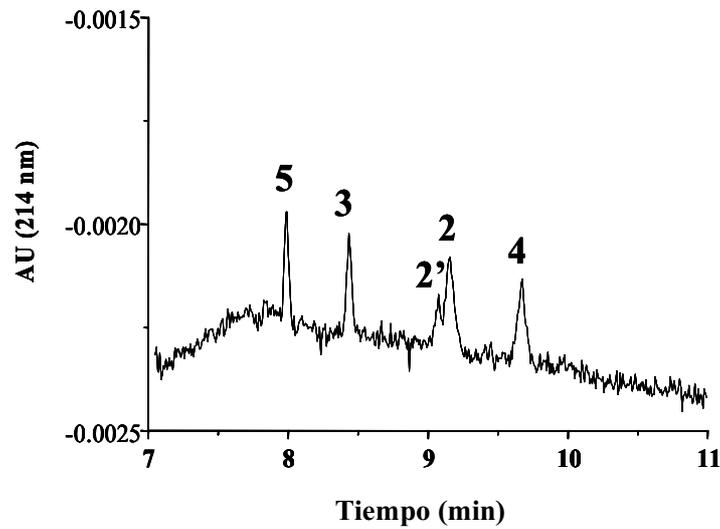


Figura IV.2.4.- Electroferograma de una muestra de agua sometida al procedimiento SPME-RP-SWMR-CE-UV. Muestra: (1) Círomazina 6,0 µg/l (no extraído). (2,2') Pirifenox, isómeros Z y E, 10,2 µg/l. (3) Pirimicarb 6,0 µg/l. (4) Ciprodinil 7,2 µg/l. (5) Pirimetanil 6,6 µg/l.

La Figura IV.2.5, por su parte, muestra el electroferograma obtenido tras analizar mediante el procedimiento SPME-RP-SWMR-CE-UV una muestra de zumo de manzana enriquecido con, aproximadamente, 15 µg/l de cada pesticida (ver Figura IV.2.5A), así como la misma muestra sin enriquecer (Figura IV.2.5B). Como puede apreciarse, en la propia muestra no existe interferencia alguna con los pesticidas de estudio (esto también se observó en el caso de los zumos de naranja). Asimismo, se puede apreciar que el método permitió la determinación de estos pesticidas a niveles muy bajos. A pesar de que para el caso del zumo de naranja, los porcentajes de recuperación fueron todavía menores, el método se pudo utilizar para la extracción de este tipo de pesticidas de dicha matriz, dado que los límites de detección finales fueron inferiores a los LMR establecidos para los mismos.

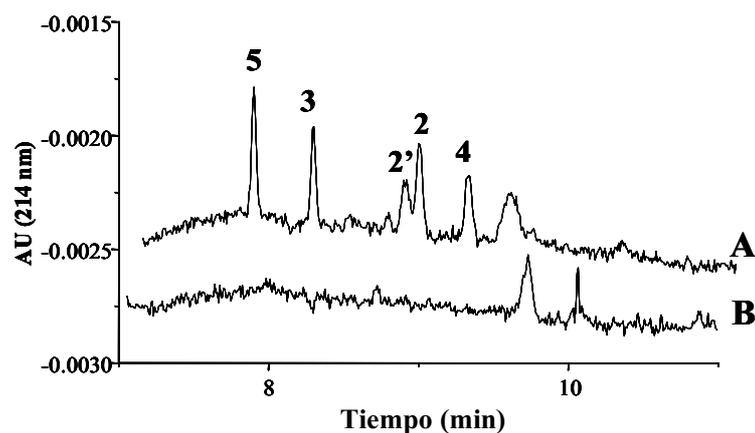


Figura IV.2.5.- Electroferograma SPME-RP-SWMR-CE-UV de muestras de: A) zumo de manzana enriquecido. Muestra: (1) Ciromazina 15,0 $\mu\text{g/l}$ (no extraído). (2,2') Pirifenox, isómeros Z y E, 25,5 $\mu\text{g/l}$. (3) Pirimicarb 15,0 $\mu\text{g/l}$. (4) Ciprodinil 18,0 $\mu\text{g/l}$. (5) Pirimetanil 16,5 $\mu\text{g/l}$. B) zumo de manzana sin enriquecer.

IV.2.4.- Conclusiones

1. Se ha puesto a punto una nueva metodología para la determinación de un grupo de pesticidas en zumos de frutas (manzana y naranja) mediante SPME-RP-SWMR-CE-UV, que supone la primera aplicación de la SPME combinada con CE y técnicas de *stacking* al análisis de pesticidas.

2. Se han estudiado diversas técnicas de preconcentración en línea, como el NSM y el FESI en polaridad normal con el tampón descrito en el apartado IV.1 (ácido acético 0,4 M, pH 4) y, el NSM y el SWMR en polaridad inversa con un tampón de CTAC 0,4 mM, ácido acético 0,4 M, pH 4, 5% v/v 2-propanol. De todas ellas, el RP-SWMR proporcionó las mayores relaciones señal/ruido, así como las mayores eficacias, permitiendo la introducción de la muestra en el interior del capilar durante 6 segundos a 20 psi. Esto ha permitido alcanzar límites de detección comprendidos entre 2,20 y 42,5 $\mu\text{g/l}$, lo que supone una mejora de sensibilidad de hasta 272 veces con respecto a condiciones de inyección ordinarias sin *stacking*.

3. El método RP-SWMMR-CE-UV se ha combinado con el procedimiento SPME (sección IV.1) y se ha aplicado a la determinación de estos pesticidas en zumos de manzana y naranja. Los límites de detección alcanzados oscilaron entre 3,10 y 12,4 µg/l para el zumo de manzana y entre 8,10 y 47,0 µg/l para el zumo de naranja. Esto supone una mejora de los límites de detección conseguidos anteriormente por SPME-CE-ESI-MS.

IV.3.- Determinación de herbicidas en aguas por electroforesis capilar con detección UV, combinando extracción en fase sólida y técnicas de preconcentración en línea.

En esta sección se presenta la determinación de cinco herbicidas pertenecientes a la familia de las triazolopirimidinas (metilcloransulam, metosulam, flumetsulam, florasulam y diclosulam) en aguas minerales y de estanque. Para ello se utiliza CE-UV junto con SPE con cartuchos C₁₈, como técnica de preconcentración fuera de línea, y SWMR, como técnica de preconcentración en línea. Aunque se han evaluado tanto el NSM como el SWMR como métodos de *stacking*, el SWMR fue el que proporcionó los límites de detección más bajos, en el rango 6,54-11,9 µg/l. Se demuestra que el método SPE-CE-UV, combinado con el SWMR, permite determinar este grupo de pesticidas en aguas a niveles de ng/l.

IV.3.1.- Antecedentes

La familia de pesticidas de las triazolopirimidinas incluye compuestos como el metilcloransulam, metosulam, diclosulam, flumetsulam y diclosulam, cuyas estructuras, conjuntamente con otros datos de interés, se recogen en la Tabla IV.3.1. Todos ellos son utilizados en distintas partes del mundo como herbicidas para prevenir o combatir la aparición de malas hierbas en los campos de cultivo. Tres de estos pesticidas, concretamente metilcloransulam, diclosulam y flumetsulam están registrados por la EPA (<http://www.epa.gov>) como contaminantes y han sido detectados en aguas de ríos en zonas del oeste de los Estados Unidos (Battaglin y col., 2000; Furlong y col., 2000). El metilcloransulam, por ejemplo, es persistente en la superficie terrestre (suelos, ríos, etc.), pero todavía más en aguas subterráneas, de ahí que haya que prestar especial atención en las zonas en las que se utilice. El florasulam, por su parte, está registrado por la Unión Europea (Directiva 2003/60/EC), que recomienda la monitorización de este pesticida en aguas subterráneas dada su fácil y rápida lixiviación en ciertos tipos de suelos. En lo que respecta al metosulam, aunque no está registrado por la EPA ni por la Unión Europea, es utilizado con frecuencia en muchos otros países como Reino Unido o

Alemania. Además, dado que son pesticidas desarrollados a mediados de la década de los 90, ya se están empezando a utilizar en toda Europa y, por lo tanto, su determinación en un amplio espectro de matrices podría ser de gran interés.

Tabla IV.3.1.- Características y aplicación de los pesticidas estudiados (*The e-pesticide manual*, 2001).

Pesticida	Estructura química	pK_a	Mw (g/mol)	LMR (mg/kg)	Aplicación	Registrado por
Metilcloransulam		4,81	429,8	0,02-0,1	Soja, heno	EPA
Diclosulam		4,00	406,2	0,02	Soja, nueces	EPA
Florasulam		4,54	359,3	0,01-0,1	Cereales, frutas.	UE
Flumetsulam		4,60	325,3	0,05	Maíz, soja	EPA
Metosulam		4,80	418,3	-	Cereales	Diversos países

Hasta el momento, no se ha desarrollado ningún método que permita la determinación simultánea de los cinco pesticidas en ningún tipo de matriz, sin embargo, sí se han determinado individualmente por diversas técnicas. El metosulam, por ejemplo, mediante un método de inmunoensayo tipo ELISA (Parnell y col., 1998), metilcloransulam por HPLC (Krieger y col., 2000), florasulam por espectrometría de masas (Jackson y col. 2000), flumetsulam por GC-MS (Rouchaud y col., 2002) y HPLC (Battaglin y col., 2000), diclosulam mediante métodos radiométricos (Zabik y col., 2001) y

flumetsulam y metosulam por HPLC-MS (Laganá y col., 2000). Sin embargo, no se han determinado conjuntamente y tampoco haciendo uso de la CE.

En lo que a la extracción de estos pesticidas se refiere, la SPE se ha utilizado en diversas ocasiones, pero nunca para extraer los cinco pesticidas simultáneamente. La EPA propone un método no oficial para la determinación individual de metilcloransulam (EPA MRD Número 442315-03) y otro para el diclosulam (EPA MRD Número 445878-03) en aguas, utilizando cartuchos C₁₈ previo a su posterior análisis por GC-MS. De la misma forma, existen también dos métodos para el análisis de flumetsulam (EPA MRD Número 419521-07) y metilcloransulam (EPA MRD Número 442315-02), por separado, en suelos, y su posterior análisis por GC-MS, utilizando también cartuchos C₁₈. Por otro lado, Laganá y col. (2000) han utilizado cartuchos Carbograph-1 (37-150 µm de diámetro de partícula) para la limpieza de extractos de suelos que contenían metosulam y flumetsulam. Furlong y col. (2000) han utilizado dos cartuchos consecutivos, el primero de intercambio iónico y el segundo de un polímero estireno-divinilbenceno, para la extracción de flumetsulam, entre otros, de diferentes tipos de aguas.

IV.3.2.- Separación por CE-UV

Dado que tal como se ha mencionado en el apartado IV.3.1 no existe método alguno que permita la determinación de este grupo de compuestos por CE, fue necesario llevar a cabo un estudio preliminar. En este sentido y a partir de los espectros de absorción de los pesticidas seleccionados, se pudo comprobar que presentaban un máximo a 205 nm, longitud de onda que se escogió para su posterior determinación. A continuación, se intentó buscar un tampón apropiado para la separación de estos herbicidas por CZE, teniendo en cuenta que poseen valores de pK_a comprendidos entre 4,00 (diclosulam) y 4,81 (metilcloransulam), ver Tabla IV.3.1. En este sentido, dos de los herbicidas (metilcloransulam y metosulam) tienen valores de pK_a muy similares al igual que sus pesos moleculares, lo que, *a priori*, podría complicar su separación. Teniendo en cuenta este aspecto, se probaron varios tampones con valores de pH superiores a 5, inyectando durante 12 segundos a 0,5 psi una mezcla de 2 mg/l de los cinco pesticidas

disueltos en acetonitrilo, dado que es el disolvente en el que presentan mayor solubilidad. Como BGEs se probaron disoluciones de amoníaco, acetato amónico, ácido acético, carbonato amónico y ácido fórmico (concentraciones comprendidas entre 5 y 80 mM), así como mezclas de ellas, para obtener tampones con diferentes valores de pH (5-11). No se escogieron sales poco volátiles como el fosfato, borato, etc. ni modificadores del EOF como CTAC, CTAB, HDB, etc. dado que se buscaba un tampón que en principio pudiera ser compatible con la detección por espectrometría de masas, permitiendo así el análisis de muestras más complejas. Ninguna de las disoluciones probadas anteriormente permitió una adecuada separación de los cinco herbicidas. En general, con tampones con pH superior a 6,5 ciertos compuestos se solapaban, especialmente el metosulam y el metilcloransulam como ya se adelantó. Al mismo tiempo, BGEs con un alto contenido iónico proporcionaron un EOF bastante bajo y, por tanto, un tiempo de análisis elevado. Tras probar diferentes combinaciones de las anteriores disoluciones se pudo comprobar que el BGE que permitió separar los cinco herbicidas consistía en un tampón ácido fórmico 24 mM, carbonato amónico 16 mM a pH 6,4 (pH de la disolución). Con este tampón el tiempo de análisis fue de 9 minutos a un voltaje de +23 kV. Concentraciones de ácido fórmico y de carbonato amónico por encima de las anteriormente señaladas proporcionaron tiempos de análisis mayores, aunque la resolución de los picos era mayor. El uso de ácido acético en lugar de ácido fórmico, proporcionó valores similares de corriente, eficacia de pico y resolución, pero un tiempo de análisis mayor.

IV.3.3.- Técnicas de preconcentración en línea

Una vez optimizado el electrolito de separación, se probaron dos procedimientos de preconcentración en línea, el NSM y el SWMR, para intentar mejorar la sensibilidad de la determinación.

“Normal stacking mode” (NSM)

En el NSM, la concentración de los analitos se produce cuando se inyecta una

muestra con una conductividad inferior a la del BGE, debido al cambio tan abrupto que se genera en el campo eléctrico local, como se ha comentado anteriormente. En este caso, para obtener una muestra con una conductividad inferior a la del BGE se prepararon mezclas de 0,5 mg/l de los pesticidas en disoluciones 1:1, 1:3, 3:1 acetonitrilo-tampón de separación, acetonitrilo puro y tampón de separación. Estas mezclas fueron inyectadas a diferentes tiempos y se calculó la relación señal/ruido en cada caso. Entre ellas, la mezcla de pesticidas disuelta en acetonitrilo, sin adición alguna del tampón de separación, proporcionó las mayores relaciones señal/ruido y, por lo tanto, los límites de detección más bajos. El acetonitrilo ha sido utilizado en diversas ocasiones con este fin (Friedberg y col., 1997; Shihabi, 1998; Chang y Wang, 2004) debido a que su resistividad eléctrica favorece el efecto de *stacking*. En nuestro caso, el uso de acetonitrilo como disolvente de la muestra permitió inyectarla hasta 60 segundos a 0,5 psi, lo que supone aproximadamente un 4% del volumen interno del capilar. Tiempos de inyección superiores a 60 segundos, provocaron una distorsión de los picos así como una pérdida de resolución. Estas condiciones de NSM óptimas permitieron alcanzar límites de detección que oscilaron entre 133 µg/l para el flumetsulam y 195 µg/l para el metilcloransulam, con eficacias comprendidas entre 230000 y 285000 platos teóricos por metro (Tabla IV.3.2), proporcionando una mejora de la sensibilidad entre 8 y 11 veces con respecto a condiciones de sin *stacking*, disolviendo la muestra en el BGE.

“Stacking” con eliminación de matriz (SWMR)

Además del NSM, también se aplicó el SWMR, dado que se trata de preconcentrar aniones en polaridad normal. En este caso, la conductividad de la muestra también influye de manera importante en la eficacia de la preconcentración, por lo que el SWMR se llevó a cabo con mezclas de 0,5 mg/l de los pesticidas en disoluciones 1:1, 1:3, 3:1 acetonitrilo-tampón de separación, así como acetonitrilo puro y tampón de separación. En este caso, la muestra fue introducida en el capilar aplicando una presión de 20 psi. A continuación, se invirtió la polaridad (-23 kV), y se monitorizó la corriente. En los primeros instantes, la corriente era muy baja, pero gradualmente comenzaba a aumentar. Cuando el valor alcanzado fue del 95-97% del valor inicial, se interrumpió la

separación y se invirtió la polaridad (+23 kV). De nuevo, el uso de acetonitrilo puro como disolvente de la muestra proporcionó las mayores relaciones señal/ruido. En estas condiciones, la muestra pudo ser inyectada hasta 18 segundos a 20 psi, proporcionando límites de detección comprendidos entre 6,54 µg/l para el flumetsulam y 11,9 µg/l para el florasulam (ver Tabla IV.3.2), lo que supone un incremento de sensibilidad importante, hasta 20 veces con respecto al NSM y hasta 214 veces con respecto a condiciones sin *stacking*, disolviendo la muestra en BGE. Además, el SWMR proporcionó eficacias entre 390000 y 500000 platos teóricos por metro, superiores a las proporcionadas por el NSM.

Tabla IV.3.2.- Comparación entre el NSM y el SWMR en términos de sensibilidad y eficacia.

Pico	Herbicida	NSM (60 s a 0,5 psi)			SWMR (18 s a 20 psi)		
		LOD ^{a)} (µg/l)	NTP/m	Incr. ^{b)}	LOD ^{a)} (µg/l)	NTP/m	Incr. ^{b)}
1	Metosulam	143	285000	8	10,1	480000	117
2	Metilcloransulam	195	250000	11	9,83	555000	214
3	Flumetsulam	133	245000	8	6,54	452000	174
4	Diclosulam	191	230000	8	10,6	390000	143
5	Florasulam	185	265000	10	11,9	440000	148

a) Calculado como tres veces la relación señal/ruido. b) Incremento de sensibilidad obtenido con respecto a condiciones sin *stacking* (muestra disuelta en BGE).

Los resultados obtenidos con ambas técnicas de preconcentración se pueden apreciar en la Figura IV.3.1, que muestra los electroferogramas obtenidos tras aplicar ambas técnicas de preconcentración a una mezcla de 200 µg/l de los cinco pesticidas disueltos en acetonitrilo. Como se puede observar, el incremento de sensibilidad proporcionado por el SWMR fue muy superior (entre 117 y 214 veces con respecto a condiciones sin *stacking*).

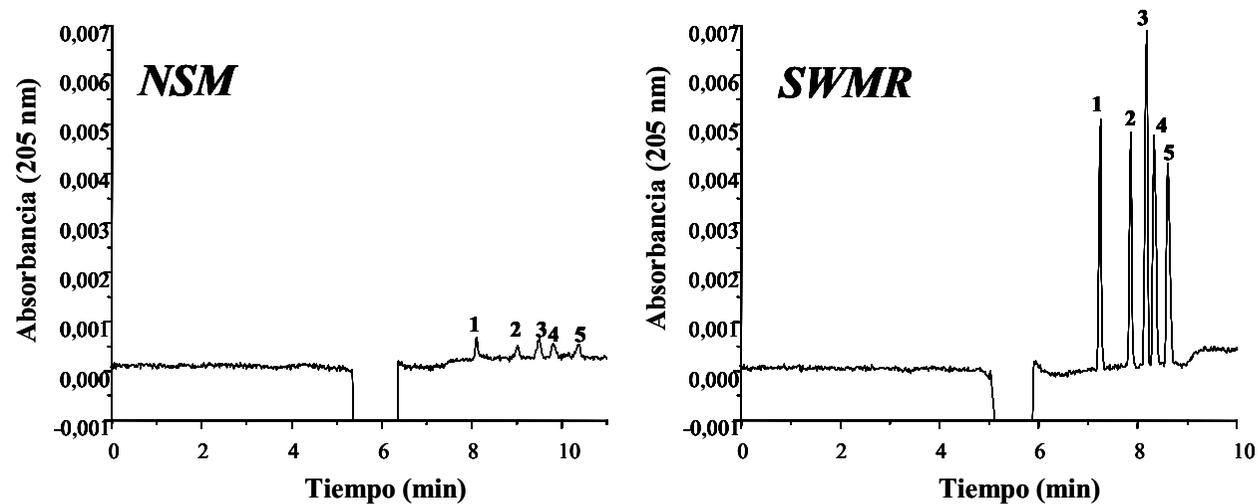


Figura IV.3.1.- Electroferograma de la separación de los cinco pesticidas con NSM (mezcla de pesticidas disuelta en acetonitrilo e inyectada 60 segundos a 0,5 psi) y SWMR (mezcla de pesticidas disuelta en acetonitrilo e inyectada 18 segundos a 20 psi, potencial aplicado de -23 kV para eliminar la matriz y separación a +23 kV). Tampón: ácido fórmico 24 mM, carbonato amónico 16 mM, pH 6,4. Longitud total: 57 cm (50 cm efectivos). Voltaje: +23 kV. Temperatura: 22 °C. Muestra: (1) Metosulam (0,22 mg/l). (2) Metilcloransulam (0,20 mg/l). (3) Diclosulam (0,24 mg/l). (4) Florasulam (0,20 mg/l). (5) Flumetsulam (0,18 mg/l).

IV.3.4.- Validación del método

Una vez optimizada la separación electroforética, así como el método de *stacking* (SWMR), se llevaron a cabo los correspondientes estudios de reproducibilidad y repetibilidad. Para ello se realizaron cinco inyecciones consecutivas a tres niveles de concentración distintos (50, 100 y 200 µg/l) en tres días diferentes. La Tabla IV.3.3 muestra los parámetros de validación del método para una concentración de 200 µg/l, aunque se obtuvieron también resultados similares para los otros dos niveles de concentración. Los valores de RSD de los tiempos de migración oscilaron entre 1,6 y 2,2% para la repetibilidad y entre 2,1 y 2,6% para la reproducibilidad. Asimismo, los valores de RSD para las áreas oscilaron entre 2,1 y 6,3% para la repetibilidad y entre 6,5 y 8,8% para la reproducibilidad. Los límites de detección obtenidos, calculados como tres veces la relación señal/ruido, se encontraron entre 6,54 µg/l (flumetsulam) y 11,9 µg/l (florasulam).

Una vez estudiadas la reproducibilidad y repetibilidad del método, se obtuvieron las correspondientes rectas de calibrado para los cinco pesticidas (Tabla IV.3.3) a concentraciones comprendidas entre 40 y 200 µg/l, mostrando coeficientes de correlación (R) aceptables, superiores a 0,9962.

IV.3.5.- Procedimiento de SPE de aguas

Dado que este grupo de pesticidas puede suponer una importante fuente de contaminación de aguas, la metodología previamente optimizada (SWMR-CE-UV) se aplicó al análisis de este tipo de muestras. Para ello fue necesario desarrollar previamente un método que permitiera la extracción de este grupo de pesticidas de las muestras acuosas. En este caso se seleccionó la SPE para extraer y preconcentrar los analitos. Para ello se seleccionaron cartuchos C₁₈ teniendo en cuenta que este tipo de cartuchos había sido previamente utilizado para el análisis de metilcloransulam y diclosulam en aguas (método EPA MRD Número 442315-03 y EPA MRD Número 445878-03).

Tabla IV.3.3.- Datos de validación del método de determinación de los cinco pesticidas por SWMR-CE-UV.

Pesticida	Repetibilidad ^{a)}		Reproducibilidad ^{a)}		Recta de calibrado	R	S _{y/x}	LOD ^{b)}	LOQ ^{c)}
	(RSD %, n=5)		(RSD %, n=15)					µg/l	µg/l
	t _m	Área	t _m	Área					
Metosulam	1,9	6,3	2,3	8,5	y = (1,593 ± 0,107)x + (0,004 ± 0,008)	0,9965	0,007	10,1	33,7
Metilcloransulam	1,7	5,0	2,1	8,8	y = (1,401 ± 0,063)x - (0,001 ± 0,004)	0,9969	0,004	9,83	32,8
Flumetsulam	1,6	6,2	2,4	8,3	y = (2,281 ± 0,099)x - (0,002 ± 0,006)	0,9972	0,005	6,54	21,8
Diclosulam	2,2	3,3	2,5	7,7	y = (2,858 ± 0,163)x - (0,006 ± 0,011)	0,9977	0,009	10,6	35,3
Florasulam	1,8	2,1	2,6	6,5	y = (2,066 ± 0,127)x - (0,003 ± 0,008)	0,9962	0,007	11,9	39,7

a) Datos obtenidos para una concentración de 100 µg/l.

b) Calculado como tres veces la relación señal/ruido.

c) Calculado como diez veces la relación señal/ruido.

R: coeficiente de correlación (n=5). S_{y/x}: Error estándar de la estimación. Intervalos de confianza de la pendiente y ordenada en el origen calculados al 95% de nivel de confianza.

La optimización del procedimiento SPE (acondicionamiento, lavado y elución) se llevó a cabo con disoluciones de los cinco pesticidas en agua Milli-Q, calculando los porcentajes de recuperación obtenidos para cada pesticida. Después de probar distintos tipos de disolventes para acondicionar el cartucho (metanol, acetonitrilo, etc.) así como distintos volúmenes de muestra y protocolos de elución, las condiciones óptimas de extracción, que proporcionaron los mayores porcentajes de recuperación (entre 55 y un 110%) fueron las que se detallan a continuación.

Los cartuchos se activaron con 5 ml acetonitrilo y 2 ml de ácido clorhídrico 0,01 M. A continuación, se pasaron 50 ml de agua enriquecida a la que se le habían añadido 2 ml de ácido clorhídrico 1 M y se pasó aire por el cartucho durante 15 minutos para secarlo totalmente. Seguidamente, los analitos se eluyeron con 10 ml de acetonitrilo que fueron evaporados hasta casi sequedad en un rotavapor a 40 °C. El residuo se redisolvió en 1 ml de acetonitrilo y fue inyectado en el sistema electroforético siguiendo los pasos del SWMR previamente optimizados. Este nuevo procedimiento de SPE es diferente de los propuestos para el metilcloransulam y diclosulam por la EPA, en lo que a etapas de activación, lavado y elución se refiere.

Una vez optimizado el procedimiento SPE y con objeto de evaluar la repetibilidad del mismo, se aplicó a la determinación de estos pesticidas en aguas minerales y de estanque enriquecidas a dos niveles de concentración diferentes (600 y 1000 ng/l). La eficacia del procedimiento SPE pudo comprobarse por comparación de los electroferogramas de los extractos obtenidos con los de un estándar. Se llevaron a cabo tres extracciones a cada nivel de concentración (n=3). La Tabla IV.3.4 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos para cada pesticida a ambos niveles de concentración, así como la RSD y los límites de detección alcanzados por el procedimiento SPE-SWMR-CE-UV. Tal como puede apreciarse en dicha tabla, los porcentajes de recuperación medios se encontraron en torno al 100% para todos los pesticidas, excepto para el metosulam que sólo se recuperó entre el 55 y 63% en aguas de estanque y entre el 59 y 64% en aguas minerales. Los límites de detección obtenidos para el procedimiento SPE-SWMR-CE-UV que, tal como se ha señalado, combina dos

técnicas de preconcentración diferentes, oscilaron entre 131 ng/l (flumetsulam) y 328 ng/l (metosulam) en aguas minerales, y entre 129 ng/l (flumetsulam) y 342 ng/l (metosulam) en aguas de estanque. Es interesante señalar que en pocas ocasiones se han alcanzado límites de detección mediante CE para pesticidas próximos a los obtenidos en el presente trabajo (Carabias Martínez y col., 2000a; Quirino y col., 2000; Núñez y col., 2002; Carabias Martínez y col., 2003b).

Hay que destacar también que los porcentajes de recuperación del metilcloransulam y del diclosulam obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos por los métodos no oficiales propuestos por la EPA (EPA MRD Número 442315-03; EPA MRD Número 445878-03). Por otro lado, aunque Furlong y col. (2000), determinaron flumetsulam en diferentes tipos de aguas (aguas subterráneas, de río, etc.) con porcentajes de recuperación comprendidos entre 50 y 110%, los valores de RSD fueron más altos que en nuestro caso (en torno al 20%).

Una vez comprobado que los límites de detección del procedimiento de SPE-SWMMR-CE-UV eran inferiores a 350 ng/l, este procedimiento se aplicó al análisis de muestras de aguas minerales y de estanque enriquecidas con pesticidas a una concentración de 350 ng/l, con objeto de demostrar la utilidad de la metodología desarrollada. La Figura IV.3.2A, muestra el electroferograma obtenido para una muestra de agua mineral tras ser analizada por el procedimiento SPE-SWMMR-CE-UV desarrollado. Como puede apreciarse en la figura, todos los pesticidas pudieron ser detectados a este nivel de concentración. Además, la inyección de la muestra utilizando las condiciones de NSM optimizadas (Figura IV.3.2B) no permitió llegar hasta límites de detección tan bajos, como se había comprobado anteriormente. Por otra parte, la inyección directa de la muestra sin SPE, no permitió detectar tampoco estos pesticidas (Figura IV.3.2C), de ahí la necesidad de un proceso de preconcentración fuera de línea.

Tabla IV.3.4.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3), RSD y límites de detección (LOD) del procedimiento SPE-SWMR-CE-UV aplicado a aguas minerales y de estanque enriquecidas.

Pesticida	Agua mineral					Agua de estanque				
	1000 ng/l		600 ng/l		LOD	1000 ng/l		600 ng/l		LOD
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	ng/l	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	ng/l
Metosulam	59	7	64	11	328	63	5	55	8	342
Metilcloransulam	110	10	92	7	195	104	14	92	16	201
Flumetsulam	102	15	98	5	131	104	7	99	10	129
Diclosulam	105	9	100	1	207	108	11	85	9	220
Florasulam	92	5	101	5	247	97	2	91	7	253

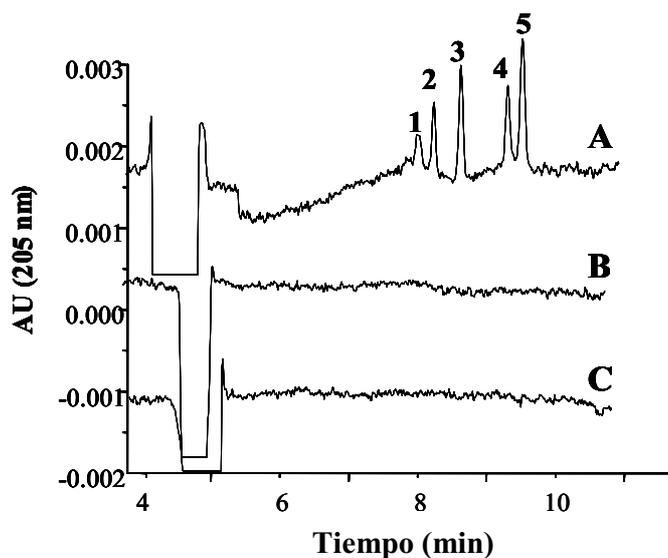


Figura IV.3.2.- (A) SPE-SWMR-CE-UV de una muestra de agua mineral que contiene 350 ng/l de cada pesticida. (B) SPE-NSM-CE-UV de una muestra de agua mineral que contiene 350 ng/l de cada pesticida. (C) Inyección directa mediante SWMR de una muestra de agua que contiene 350 ng/l de cada pesticida (en la inyección por NSM el electroferograma es idéntico). (1) Metosulam. (2) Metilcloransulam. (3) Diclosulam. (4) Florasulam. (5) Flumetsulam.

La Figura IV.3.3 muestra el electroferograma obtenido para una muestra de agua de estanque enriquecida con pesticidas a una concentración de 350 ng/l. En este caso, también se pudieron detectar los cinco pesticidas aunque tanto la línea base como el tiempo de análisis se desplazaron ligeramente, lo que podría ser debido a que este tipo de muestras posee una gran cantidad de materia orgánica que no es retenida por el cartucho durante la elución y que también es inyectada en el interior del capilar. A pesar de ello, dicho desplazamiento no supuso impedimento alguno a la hora de su identificación y cuantificación. Cuando una muestra de agua de estanque sin enriquecer fue sometida al procedimiento de SPE e inyectada en el sistema electroforético, se pudo observar dicho desplazamiento de la línea base, pero ninguna interferencia.

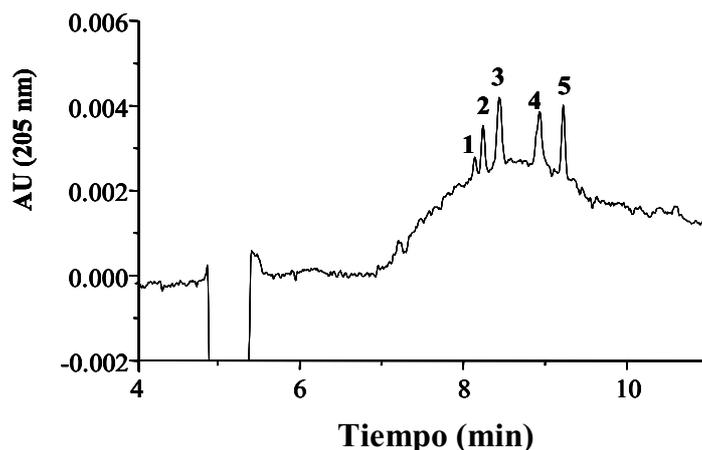


Figura IV.3.3.- Electroferograma de una muestra de agua de estanque enriquecida (350 ng/l) después de someterla al procedimiento SPE-SWMR-CE. (1) Metosulam. (2) Metilcloransulam. (3) Diclosulam. (4) Florasulam. (5) Flumetsulam.

IV.3.6.- Conclusiones

1. Se ha puesto a punto una nueva metodología para la determinación de un grupo de pesticidas (metosulam, metilcloransulam, diclosulam, florasulam y flumetsulam) pertenecientes a la familia de las triazolopirimidinas en aguas minerales y de estanque mediante SPE-CE-UV.
2. La separación óptima fue obtenida utilizando un tampón de ácido fórmico 24 mM y carbonato amónico 16 mM, a pH 6,4.
3. El NSM y el SWMR se han estudiado como técnicas de preconcentración en línea. De las dos, el SWMR proporcionó las mayores relaciones señal/ruido así como las mayores eficacias permitiendo la inyección de elevados volúmenes de muestra en el interior del capilar (inyecciones de hasta 18 segundos a 20 psi). Este hecho, ha permitido obtener límites de detección comprendidos entre 6,54 y 11,9 $\mu\text{g/l}$, lo que supone una mejora de sensibilidad de hasta 214 veces con respecto a condiciones de inyección ordinarias (sin *stacking*).

4. El nuevo método SPE-SWMMR-CE-UV desarrollado se ha aplicado a la determinación de pesticidas en aguas minerales y de estanque, obteniéndose porcentajes de recuperación comprendidos entre 85 y 110% para todos los pesticidas excepto para el metosulam que oscilaron entre el 55 y 64%. Este método permitió alcanzar límites de detección comprendidos entre 131 ng/l (flumetsulam) y 328 ng/l (metosulam) para aguas minerales, y entre 129 ng/l (flumetsulam) y 342 ng/l (metosulam) para aguas de estanque.

IV.4.- Análisis de herbicidas en bebidas de soja combinando extracción en fase sólida con electroforesis capilar-espectrometría de masas.

En esta sección se presenta la determinación de cinco herbicidas pertenecientes a la familia de las triazolopirimidinas (metilcloransulam, metosulam, flumetsulam, florasulam y diclosulam) en bebidas de soja por CE-MS utilizando la SPE como técnica de preconcentración fuera de línea y el NSM como técnica de preconcentración en línea. Al igual que se ha hecho en la sección IV.1, los parámetros del *electrospray* han sido optimizados mediante un *diseño compuesto centrado*. Se demuestra que el método SPE-CE-MS desarrollado permite la determinación de este grupo de pesticidas en bebidas de soja a niveles de $\mu\text{g/l}$.

IV.4.1.- Antecedentes

Dado que el grupo de pesticidas anteriormente seleccionado (metilcloransulam, metosulam, flumetsulam, florasulam y diclosulam) es frecuentemente utilizado en cultivos de soja, y que sus derivados están siendo cada vez más utilizado en nuestros días como alimentos (por ejemplo, en bebidas de soja, también llamadas “leche de soja”), es previsible que dichos pesticidas puedan aparecer en este tipo de productos. En lo relativo a los antecedentes, es interesante señalar que no existe ningún método descrito para la determinación de estos pesticidas en bebidas de soja.

IV.4.2.- SPE-CE-UV de bebida de soja

En la sección IV.3, se optimizó la separación electroforética de un grupo de cinco triazolopirimidinas así como los procedimientos de SWMR y el NSM como técnicas de preconcentración en línea y un procedimiento de SPE para su extracción de muestras de agua. La Figura IV.4.1A, muestra la separación por CE-UV de una mezcla patrón de los cinco pesticidas aplicando el NSM. En este caso, los pesticidas disueltos en acetonitrilo, pudieron ser inyectados hasta un máximo de 60 segundos a 0,5 psi (límites de detección entre 133 y 195 $\mu\text{g/l}$, ver Tabla IV.3.2).

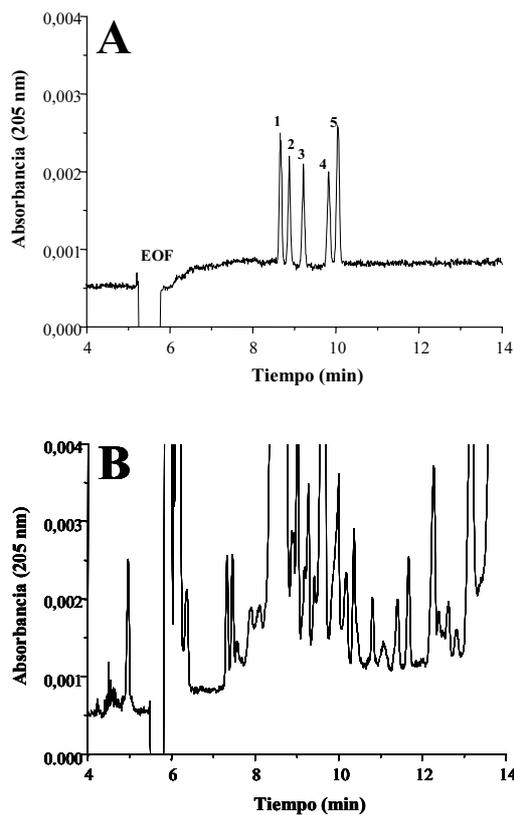


Figura IV.4.1.- Electroferograma NSM-CE-UV de: A) Una mezcla de 1000 $\mu\text{g/l}$ de cada pesticida en acetoni-trilo, y B) Una muestra de bebida de soja que contenía 200 $\mu\text{g/l}$ de cada pesticida, previamente tratada mediante SPE. Inyección: 60 segundos a 0,5 psi. Tampón de separación: ácido fórmico 24 mM, carbonato amónico 16 mM, pH 6,4. Longitud total: 57 cm (50 cm efectivos). Voltaje: +23 kV. Temperatura: 22 °C. (1) Metosulam. (2) Metilcloransulam. (3) Diclosulam. (4) Florasulam. (5) Flumetsulam.

El protocolo de SPE optimizado en la sección anterior para la extracción de estos herbicidas en aguas, se aplicó a una muestra de bebida de soja, matriz bastante más compleja que las anteriores. La Figura IV.4.1B muestra el electroferograma de una muestra de bebida de soja enriquecida con estos pesticidas y sometida previamente al procedimiento de SPE. Tal como puede apreciarse, la determinación de este tipo de pesticidas por NSM-CE-UV no fue viable, debido a la gran cantidad de compuestos

interferentes. Además, cuando se utilizó como modo de preconcentración el SWMR, que fue el que realmente proporcionó los límites de detección más bajos (ver sección IV.3), el electroferograma obtenido presentaba el mismo aspecto pero con picos mayores. Con objeto de evaluar si era posible o no eliminar dichas interferencias, el procedimiento SPE fue modificado de diversas formas. Se probaron volúmenes de muestra distintos, al igual que diferentes protocolos de elución y lavado del cartucho, sin éxito alguno, de ahí que se intentara desarrollar un método por CE-ESI-MS que permitiera determinar estos pesticidas en la bebida de soja, aprovechando que el MS es un detector mucho más selectivo que el UV.

Es preciso destacar que en la Figura IV.4.1 se ha mostrado, a efectos comparativos, sólo el electroferograma de la inyección con NSM y no con SWMR, a pesar de que las figuras son muy similares, puesto que en CE-MS no es posible utilizar esta última estrategia de preconcentración, ya que no existe un vial con tampón de separación a la salida del capilar, que es imprescindible para llevar a cabo el SWMR.

IV.4.3.- Optimización por CE-MS

Como hasta el momento no se había llevado a cabo la determinación de estos pesticidas por CE-MS, fue necesario realizar un estudio preliminar para ver qué factores tenían mayor influencia en el análisis. En lo que al tampón se refiere, el optimizado en la sección anterior y que consistía en una disolución de ácido fórmico 24 mM y carbonato amónico 16 mM (pH 6,4) era perfectamente compatible con la detección por MS como se pudo comprobar posteriormente.

Primeramente, se introdujo por infusión directa (0,5 psi) una mezcla de 2 mg/l de cada pesticida disuelta en acetonitrilo, utilizando como líquido adicional una mezcla acetonitrilo-agua 1:1. Dado que estos pesticidas son ácidos débiles, pudieron ser detectados en el modo negativo. Estos primeros experimentos mostraron las relaciones m/z más intensas para estos pesticidas (en concreto para metosulam, 416,1 y 418,1, metilcloransulam, 428,0 y 430,0, diclosulam, 404,0 y 406,0, florasulam, 358,1,

flumetsulam, 324,1). A continuación, y con objeto de realizar un estudio preliminar, se optimizaron manualmente, de forma rápida, las condiciones de nebulización para que permitieran detectar los pesticidas con una sensibilidad adecuada. Los parámetros fijados en esta etapa previa a la optimización fueron los siguientes: flujo del líquido adicional de 0,35 ml/h, 35% de estabilidad en el *skimmer*, presión de nebulización de 2 psi, flujo del gas de secado de 5 l/min y temperatura del gas de secado de 250 °C. Con estos valores fijos, se probaron diferentes flujos adicionales, con objeto de seleccionar los componentes del mismo. En primer lugar se probaron (por infusión directa de una mezcla de 2 mg/l de cada pesticida) como líquidos adicionales mezclas 1:1 metanol-agua, isopropanol-agua y acetonitrilo-agua, que contenían diferentes porcentajes de trietilamina (TEA), hidróxido amónico, acetato amónico o el propio tampón de separación. La señal más intensa fue obtenida en presencia de TEA, de ahí que, a continuación, se probaran diferentes mezclas (1:1, 4:1, 3:1, 1:3, 1:4, etc.) metanol-agua, isopropanol-agua y acetonitrilo-agua con TEA. Entre los diferentes líquidos adicionales utilizados, el que contenía acetonitrilo-agua proporcionó las mayores relaciones señal/ruido y, por lo tanto, la mayor sensibilidad. Sin embargo, la señal no era suficientemente estable y se optó por utilizar como líquido adicional la mezcla metanol-agua con TEA, que proporcionaba resultados similares pero con una mayor estabilidad.

Una vez que se seleccionaron los componentes del líquido adicional, se llevó a cabo un diseño experimental de superficie de respuesta del tipo *diseño compuesto centrado* con cinco factores (presión de nebulización, flujo y temperatura del gas de secado y porcentajes de metanol y de TEA en el líquido adicional) cuyos niveles se muestran en la Tabla IV.4.1. En este caso se llevaron a cabo separaciones completas de los cinco pesticidas con el tampón de ácido fórmico 24 mM, carbonato amónico 16 mM a pH 6,4, y se tomó como función respuesta la suma de las áreas de pico para los cinco pesticidas, al igual que se hizo en la sección IV.1. El flujo del líquido adicional, así como el porcentaje de estabilidad en el *skimmer* se mantuvieron constantes (0,35 ml/h y 35%, respectivamente), dado que la variación de ambos factores no mejoraba la intensidad de la señal del MS (este hecho también se observó en el apartado IV.1 con la separación del otro grupo de pesticidas estudiados). Los 45 experimentos se desarrollaron

aleatoriamente y los resultados fueron evaluados con el programa *Statgraphics Plus*.

Tabla IV.4.1.- Factores y niveles de los factores del *diseño compuesto centrado* utilizado para optimizar los parámetros del *electrospray*.

Factor	Diseño Compuesto Centrado			
	Diseño factorial completo		Diseño en estrella	
	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto
Metanol en el líquido adicional (%)	20	80	0	100
TEA en el líquido adicional (%)	1	2	0	3
Presión de nebulización (psi)	3	9	1	11
Flujo del gas de secado (l/min)	3	9	1	11
Temperatura del gas de secado (°C)	100	250	50	300

En la Figura IV.4.2 se puede apreciar que las mayores áreas de pico se obtenían con un flujo del gas de secado bajo, bajas temperaturas y altos porcentajes de metanol y de TEA en el líquido adicional, de tal forma que la combinación de factores que, según el programa, maximiza la respuesta seleccionada fue la siguiente: presión de nebulización de 3 psi, flujo del gas de secado de 3 l/min, temperatura del gas de secado de 50 °C, y un líquido adicional formado por una mezcla metanol-agua (82,5:17,5 v/v) con 2% de TEA. Cuando se llevó a cabo dicho experimento, se comprobó que, efectivamente, de todos los experimentos anteriormente citados, éste proporcionaba las mayores áreas para los cinco pesticidas. A pesar de ello, se llevaron a cabo diversos experimentos variando tanto el flujo del líquido adicional, como el porcentaje de estabilidad en el *skimmer*, que se habían mantenido constantes durante todo el proceso de optimización (0,35 ml/h y 35%, respectivamente). En ellos se pudo comprobar que la variación de dichos valores no mejoraba la señal del MS. Tampoco la ligera variación del resto de los parámetros ya optimizados como, por ejemplo, la variación de la temperatura (30-100 °C), proporcionaba mejora alguna de la señal.

CE-MS con “*stacking*” en modo normal

A pesar de que el uso de métodos de preconcentración en línea como el *stacking* (Quirino y col., 2000; Núñez y col., 2002; Carabias Martínez y col., 2003b) o el *sweeping*

(Lin y col., 2001; Núñez y col., 2002; Otsuka y col., 2003) han proporcionado importantes incrementos de sensibilidad en CE para el análisis de pesticidas, el uso de este tipo de estrategias en CE-MS está bastante limitado. Muchas de estas estrategias de preconcentración en línea utilizan tensioactivos, ciclodextrinas y otros compuestos no volátiles que no pueden ser utilizados en CE-MS. Además, como se ha señalado, el SWMR utilizado en la sección IV.3 y que proporcionaba incrementos de sensibilidad importantes, no pudo ser utilizado en CE-MS al no existir vial de salida. Por lo tanto, el único modo de *stacking* que pudo ser utilizado en este caso fue el NSM.

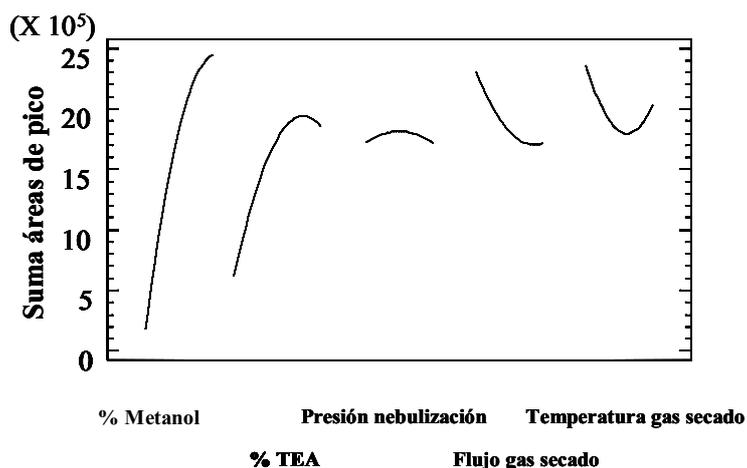


Figura IV.4.2.- Efecto individual de cada factor sobre la señal del espectrómetro de masas, calculada como suma de las áreas de pico de los cinco pesticidas.

Con objeto de obtener la conductividad de la muestra adecuada para que se produzca el fenómeno de *stacking* mediante NSM, se probaron diferentes mezclas de los pesticidas disueltos en disoluciones 1:3, 1:1, 3:1 acetonitrilo-tampón de separación, así como en acetonitrilo puro o tampón de separación. De todas ellas, el uso de acetonitrilo puro proporcionó las mayores relaciones señal/ruido y, por tanto, los límites de detección más bajos. En nuestro caso, los pesticidas disueltos en acetonitrilo pudieron ser introducidos en el capilar durante un máximo de 100 segundos a baja presión (0,5 psi), lo que representa aproximadamente un 3,7% del volumen total del capilar (87 cm de longitud total). Mayores tiempos de inyección provocaban caídas de corriente. En la

sección anterior, en la que igualmente se estudió el NSM, la muestra se pudo inyectar durante un máximo de 60 segundos a baja presión (0,5 psi), lo que representa un 5,2% del volumen del capilar que en el caso de CE-UV era de 57 cm).

La Figura IV.4.3, muestra los electroferogramas obtenidos en las condiciones de separación, de *stacking* y de nebulización óptimas, mientras que la Figura IV.4.4, muestra los espectros de masas de los cinco compuestos obtenidos a partir de los electroferogramas de la Figura IV.4.3.

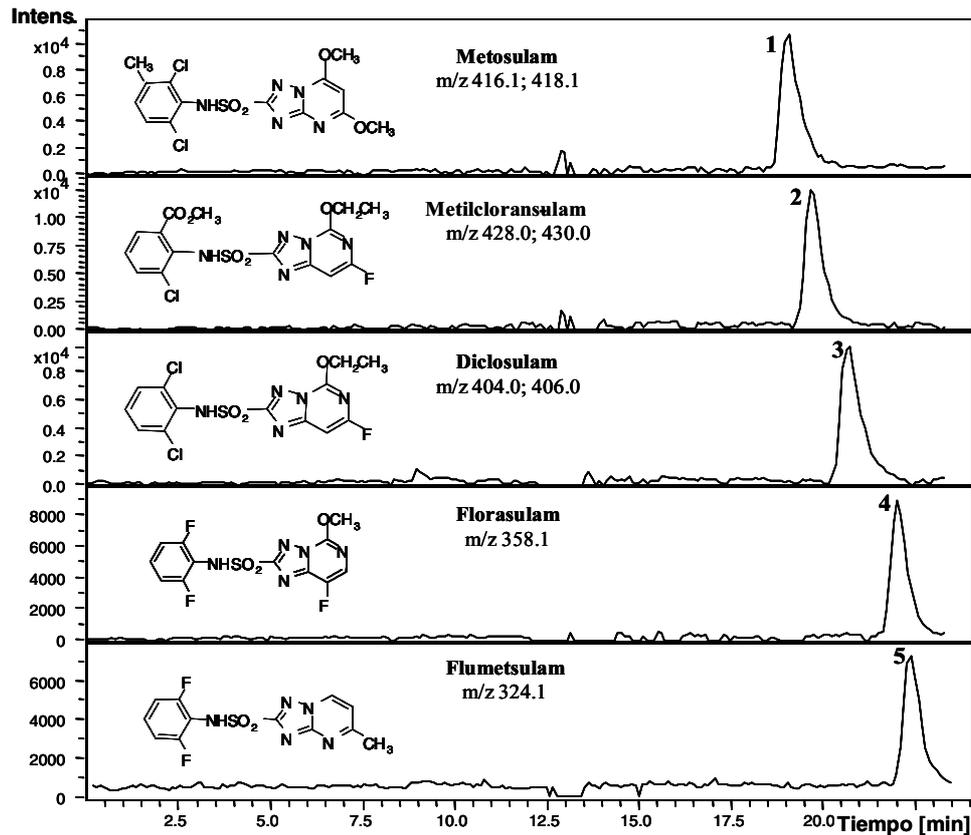


Figura IV.4.3.- Electroferogramas de iones extraídos de la separación de los cinco pesticidas. Tampón: ácido fórmico 24 mM, carbonato amónico 16 mM, pH 6,4. Longitud total del capilar: 87 cm (80 cm efectivos). Voltaje: +25 kV. Temperatura: 22 °C. Inyección hidrodinámica durante 100 segundos a 0,5 psi. Muestra: 1 mg/l de cada pesticida en acetonitrilo.

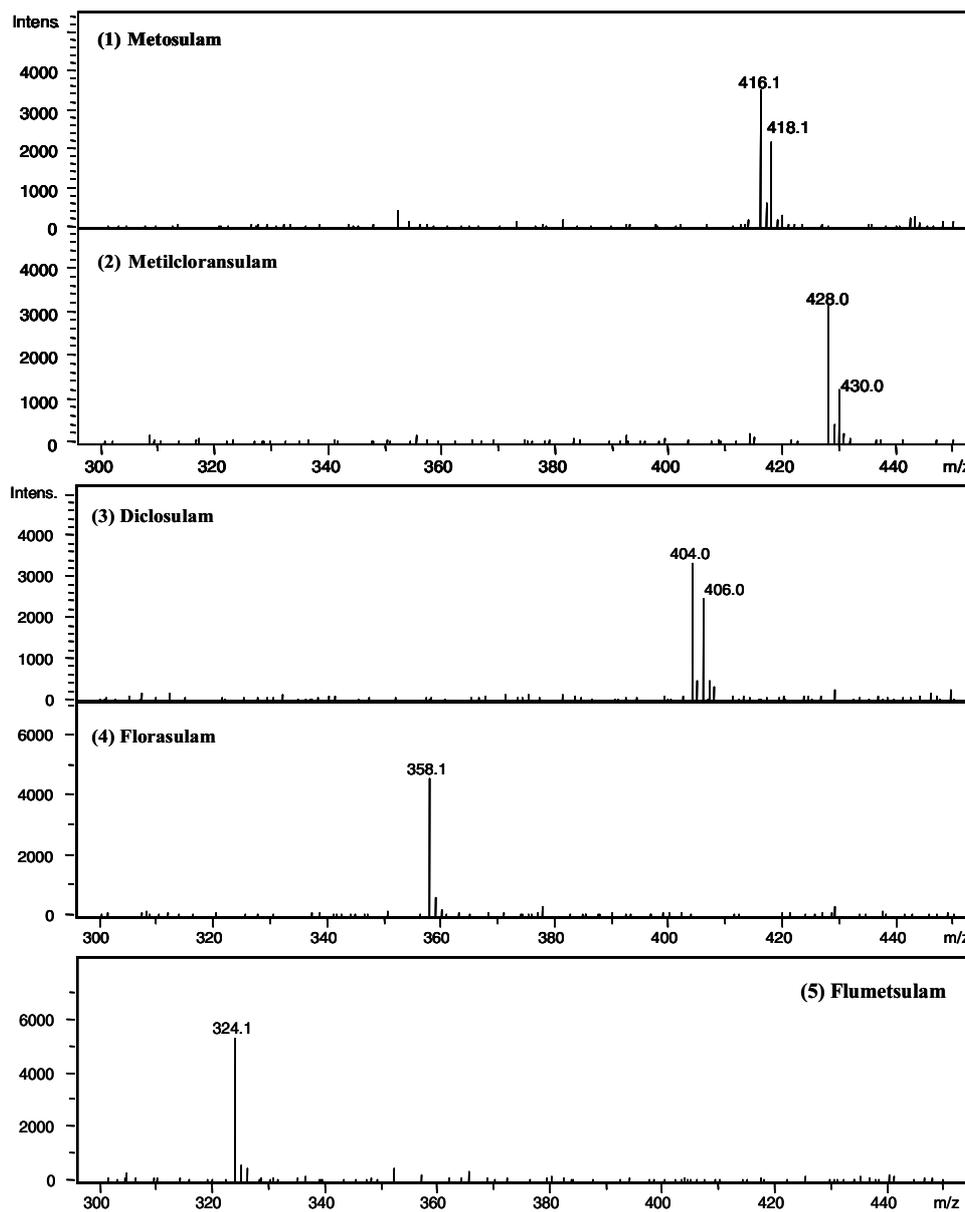


Figura IV.4.4.- Espectros de masas de los cinco pesticidas obtenidos directamente a partir del electroferograma de la Figura IV.4.3.

Estos espectros de masas eran los esperados teniendo en cuenta la distribución isotópica debida fundamentalmente a los átomos de cloro de cada molécula. Los pesos

moleculares determinados por CE-MS fueron consistentes con los esperados para estos compuestos (ver Tabla IV.4.2). Como puede apreciarse en la Tabla IV.4.2, los límites de detección obtenidos mediante NSM-CE-MS estuvieron comprendidos entre 74,0 µg/l para el metosulam y 150 µg/l para el flumetsulam. Estos valores fueron hasta 2,6 veces inferiores a los obtenidos en la sección IV.3 por NSM-CE-UV (Tabla IV.4.2), donde no se pudo inyectar una mayor cantidad de muestra (recordemos que con NSM-CE-UV la cantidad de muestra inyectada constituía aproximadamente un 5,2% del volumen total del capilar, mientras que la cantidad inyectada en NSM-CE-MS suponía sólo un 3,7% de dicho volumen) debido a que se producía un solapamiento de picos importante, hecho que no ocurre en CE-MS ya que el modo ion extraído permite la detección selectiva de los iones seleccionados.

Tabla IV.4.2.- Comparación de los procedimientos NSM-CE-UV y NSM-CE-MS.

Pesticida	Mw_{teórico}	Mw_{exp.}^{a)}	NSM-CE-UV	NSM-CE-MS
	(g/mol)	(g/mol)	LOD^{b)} (µg/l)	LOD^{b)} (µg/l)
Metosulam	418,3	418,1	143	74,0
Metilcloransulam	429,8	430,0	195	75,0
Diclosulam	406,2	406,0	191	80,0
Florasulam	359,3	359,1	185	105
Flumetsulam	325,3	325,1	133	150

a) Mw_{exp.} Peso molecular determinado por CE-ESI-MS.

b) Calculado como tres veces la relación señal/ruido.

Validación del método

Una vez que se optimizaron los parámetros del ESI así como los del método de *stacking* se llevaron a cabo los correspondientes estudios de reproducibilidad y de repetibilidad. Para ello se realizaron 3 inyecciones consecutivas a tres niveles de concentración distintos (0,5, 1 y 2 mg/l) en tres días diferentes. La Tabla IV.4.3 muestra los parámetros de validación del método para una concentración de 1 mg/l, aunque se obtuvieron resultados similares para los otros dos niveles de concentración. Los valores de RSD de los tiempos de migración oscilaron entre 0,8 y 1,4% para la repetibilidad y

entre 2,4 y 3,1% para la reproducibilidad, mientras que los valores de RSD para las áreas oscilaron entre 3,8 y 6,4% para la repetibilidad y entre 6,5 y 8,1% para la reproducibilidad. Los límites de detección obtenidos fueron calculados como tres veces la relación señal/ruido, y estaban comprendidos entre 74 µg/l para el metosulam y 150 µg/l para el flumetsulam, lo que permitió determinar este grupo de pesticidas a muy bajas concentraciones. Una vez estudiadas la reproducibilidad y repetibilidad del método, se obtuvieron las correspondientes rectas de calibrado para los cinco pesticidas (Tabla IV.4.3) a concentraciones comprendidas entre 500 y 5000 mg/l, mostrando coeficientes de correlación (R) superiores a 0,9960.

IV.4.4.- SPE-NSM-CE-MS de bebidas de soja

Una vez validado el procedimiento de CE-MS, la misma muestra de bebida de soja, que contenía 200 µg/l de cada pesticida y que no pudo ser analizada por CE-UV debido a la gran cantidad de interferencias que presentaba (Figura IV.4.1B), fue inyectada en CE-MS. En la Figura IV.4.5, se muestran los electroferogramas obtenidos pudiendo apreciarse que por CE-MS pueden determinarse correctamente los cinco pesticidas en la muestra. En estas condiciones pudo determinarse que el procedimiento de SPE propuesto proporcionaba recuperaciones comprendidas entre el 75 y 95% para todos los pesticidas excepto para el metosulam que fue sólo del 40%.

Como se señaló anteriormente, a pesar de que se probaron distintos protocolos de lavado del cartucho de C₁₈, así como diferentes volúmenes de muestra y de elución, para intentar mejorar los porcentajes de recuperación de los herbicidas, dichos porcentajes no pudieron ser mejorados. Además, es interesante señalar que no se detectó ninguno de los pesticidas en las muestras de bebidas de soja no enriquecidas.

Tabla IV.4.3.- Datos de validación del método de determinación de los cinco pesticidas por CE-MS.

Pesticida	Reproducibilidad ^{a)}		Repetibilidad ^{a)}		Recta de calibrado ^{b)}	R	S _{y/x}	LOD ^{c)}	LOQ ^{d)}
	(RSD %, n=3)		(RSD %, n=9)					µg/l	µg/l
	t _m	Área	t _m	Área					
Metosulam	0,8	5,7	2,4	7,2	y = (279 ± 11,1)x - (62,0 ± 16,1)	0,9985	13,2	74,0	247
Metilcloransulam	1,3	6,2	2,6	6,5	y = (398 ± 26,1)x - (110 ± 35,6)	0,9980	28,2	75,0	250
Diclosulam	1,1	5,2	2,8	8,1	y = (257 ± 24,2)x - (24,2 ± 32,1)	0,9960	26,2	80,0	267
Florasulam	1,4	6,4	2,9	7,2	y = (331 ± 10,8)x - (84,0 ± 14,4)	0,9985	11,7	105	350
Flumetsulam	1,3	3,8	3,1	7,6	y = (228 ± 12,6)x + (4,95 ± 15,1)	0,9985	12,3	150	500

a) Datos mostrados para una concentración de 1 mg/l.

b) Pendiente y ordenada en el origen x10⁻³. Intervalos de confianza de la pendiente y ordenada en el origen calculados al 95% de nivel de confianza.

c) Calculado como tres veces la relación señal/ruido.

d) Calculado como diez veces la relación señal/ruido.

R: coeficiente de correlación (n=5). S_{y/x}: error estándar de la estimación x10⁻³.

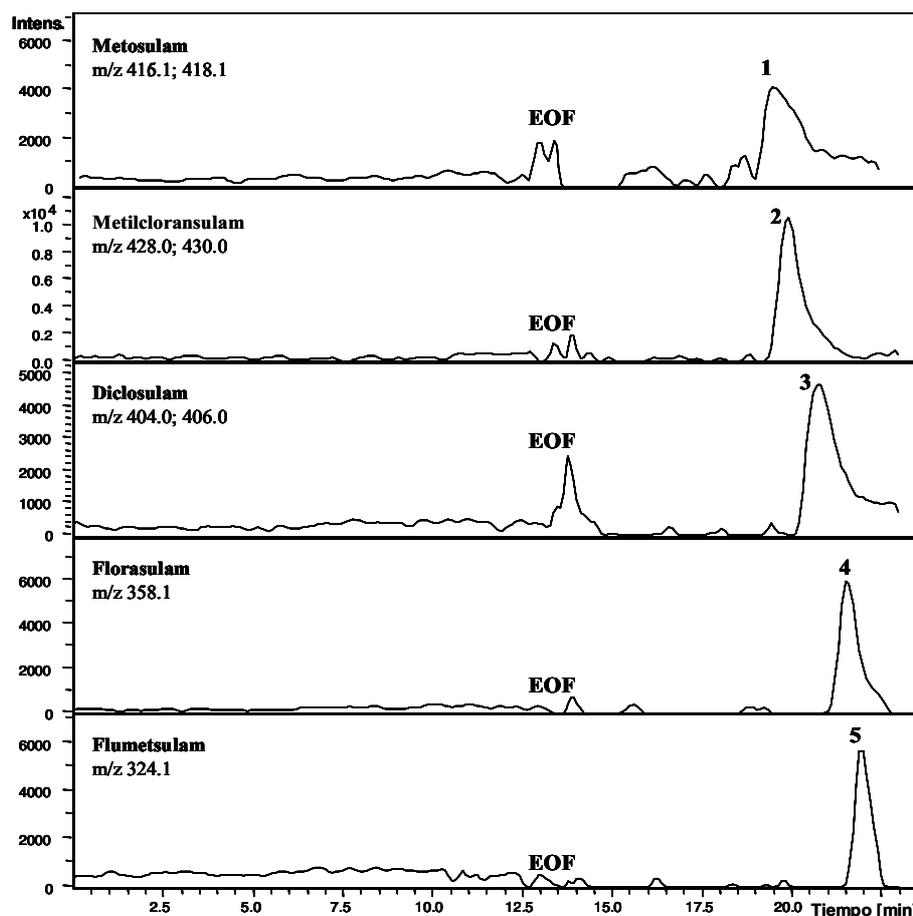


Figura IV.4.5.- Electroferogramas de iones extraídos obtenidos tras la inyección en CE-MS de una muestra de bebida de soja, que contenía 200 µg/l de cada pesticida, previamente sometida al procedimiento SPE. Otras condiciones similares a la Figura IV.4.3.

IV.4.5.- Conclusiones

1. Se ha puesto a punto una nueva metodología para la determinación de un grupo de pesticidas (metilcloransulam, metosulam, flumetsulam, florasulam y diclosulam) en bebida de soja mediante SPE-CE-NSM-MS. Este trabajo supone la primera separación

de este grupo de pesticidas por CE-MS y su primera determinación en este tipo de muestras.

2. La optimización de los parámetros del *electrospray* se llevó a cabo mediante un diseño experimental. Las condiciones óptimas obtenidas fueron las siguientes: 35% de estabilidad en el *skimmer*, presión del gas nebulizador de 3 psi, flujo del gas de secado de 3 l/min, temperatura del gas de secado de 50 °C, líquido adicional de 82,5% metanol-agua con un 2% en TEA y un flujo de 0,35 ml/h.

3. El NSM se ha aplicado como técnica de preconcentración en línea junto con CE-MS, obteniéndose límites de detección para los pesticidas estudiados entre 74,0 y 150 µg/l, lo que supone una mejora de hasta 2,6 veces los límites de detección obtenidos por NSM-CE-UV.

4. La extracción de los pesticidas de las bebidas de soja se ha llevado a cabo mediante el procedimiento SPE optimizado en la anterior sección, presentando porcentajes de recuperación comprendidos entre el 75 y 95% para todos los pesticidas excepto para el metosulam que fue sólo del 40%.

IV.5.- Análisis de herbicidas en suelos por electroforesis capilar con detección UV, combinada con extracción en fase sólida e inyección electrocinética.

En esta sección se presenta la determinación de los cinco herbicidas pertenecientes a la familia de las triazolopirimidinas (metilcloransulam, metosulam, flumetsulam, florasulam y diclosulam) en suelos por CE-UV utilizando la SPE como técnica de preconcentración fuera de línea, y el FESI como técnica de preconcentración en línea, para lo que ha sido necesario invertir el flujo electroosmótico utilizando HDB como modificador. Se demuestra que el método SPE-FESI-CE-UV permite determinar este grupo de pesticidas en suelos a niveles de ng/g.

IV.5.1.- Antecedentes

En apartados anteriores se ha descrito la determinación de los cinco herbicidas derivados de las triazolopirimidinas en aguas por SPE-SWMMR-CE-UV y en bebida de soja por SPE-NSM-CE-MS. Dado que este tipo de herbicidas se utiliza con bastante frecuencia para eliminar o prevenir la aparición de malas hierbas en campos de cultivo, pasan directamente al suelo y de ahí, con las lluvias, a aguas subterráneas. En el caso del florasulam, que es el único de los cinco registrado por la Unión Europea, ésta recomienda prestar especial atención a esta posibilidad en aquellas zonas en la que se utilice.

Los suelos constituyen, sin duda alguna, una de las matrices de mayor interés medioambiental. Sin embargo, el trabajar con este tipo de muestra no es una tarea fácil, dada la gran cantidad de ácidos húmicos y fúlvicos que poseen, y que pueden interferir de forma importante en su análisis. En lo que respecta al análisis de pesticidas en suelos, la CE se ha utilizado en pocos casos, como es la determinación de sulfonilureas (Dinelli y col., 1995; Penmetsa y col., 1997b; Menne y col., 1999), fenoxiácidos (Garrison y col., 1994; Desiderio y col., 1997) o sales de amonio cuaternario (Stransky, 1985). Un artículo de reciente revisión (Andreu y Picó, 2004) muestra que el análisis de pesticidas en suelos se ha llevado a cabo mayoritariamente por GC y HPLC, y que la CE está

empezando a ser utilizada con este propósito.

Tal como se ha señalado anteriormente, la EPA propone dos métodos para el análisis individualizado de flumetsulam (EPA MRD Número 419521-07) y metilcloransulam (EPA MRD Número 442315-02) en suelos y su posterior análisis por GC-MS, utilizando también cartuchos C_{18} para su extracción de los mismos. Por otro lado, Laganá y col. (2000) han utilizado cartuchos Carbograph-1 (37-150 μm de diámetro de partícula) para la limpieza de extractos de suelos que contenían metosulam y flumetsulam. Sin embargo, no se ha desarrollado ningún método que permita su determinación simultánea en este tipo de muestra y, menos aún, utilizando la CE como técnica de separación.

IV.5.2.- Separación por CE

En esta sección, además de desarrollar la metodología adecuada para el análisis de los pesticidas mencionados en suelos por CE, se lleva también a cabo el estudio de la técnica de preconcentración en línea FESI. En este caso, como este grupo de herbicidas posee valores de pK_a entre 4,00 y 4,81, a valores de pH altos, tendrán una carga negativa y su inyección electrocinética sólo será viable cuando se trabaje en polaridad inversa, ya que en condiciones de polaridad normal, el EOF expulsaría a los aniones introducidos electrocinéticamente en el capilar. Es por ello que se optimizó primeramente un tampón de separación con un modificador del EOF apropiado. Inicialmente se probó el mismo tampón de separación anterior (ácido fórmico 24 mM, carbonato amónico 16 mM, pH 6,4) adicionando tensioactivos como el CTAC o CTAB, o el policatió HDB, a concentraciones inferiores a su concentración micelar crítica. En este caso, el uso de CTAC o CTAB a concentraciones comprendidas entre 0,1 y 0,8 mM no proporcionó una separación adecuada de los pesticidas, ni siquiera introduciendo otros componentes en el tampón, como modificadores orgánicos. El uso de HDB a concentraciones comprendidas entre 0,001 y 0,300% conjuntamente con la variación de ciertos componentes del tampón y el pH, proporcionó mejores resultados. Como se puede ver en la Figura IV.5.1A, un tampón formado por 0,0042% HDB, ácido fórmico 11 mM y

carbonato amónico 16 mM a pH 7,6, permitió separar todos los pesticidas excepto el metilcloransulam y el diclosulam, picos 3 y 4, respectivamente.

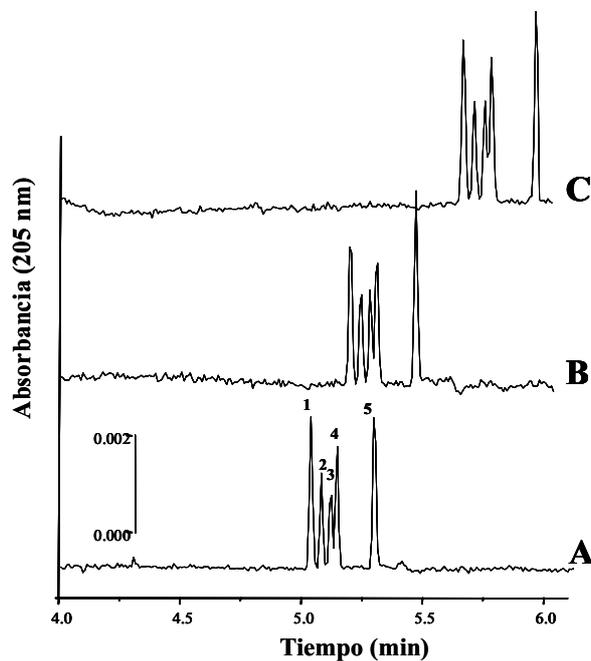


Figura IV.5.1.- Electroferograma obtenido mediante FESI-CE-UV de una mezcla de 420 $\mu\text{g/l}$ de cada pesticida en acetonitrilo con 17% de carbonato amónico 16 mM. Inyección: 5 segundos a -10 kV. Tampón de separación: 0,0042% HDB, ácido fórmico 11 mM, carbonato amónico 16 mM, pH 7,6, con: A) 0% (v/v) 2-propanol; B) 1% (v/v) 2-propanol; C) 2,5% (v/v) 2-propanol. Longitud total 67 cm (60 cm efectivos). Voltaje: -20 kV. Temperatura: 21 °C. (1) Flumetsulam. (2) Florasulam. (3) Metilcloransulam. (4) Diclosulam. (5) Metosulam.

Con objeto de separar todos los pesticidas, se añadieron diferentes modificadores orgánicos (1-propanol, 2-propanol, butanol, acetona, metanol y etanol) al tampón de separación (concentraciones comprendidas entre 1 y 10%), sin éxito alguno. A modo de ejemplo, las Figuras IV.5.1B y IV.5.1C, muestran el efecto que tiene la adición de 2-propanol al tampón de separación. Como se puede apreciar en la figura, la adición del modificador provoca una importante pérdida de resolución al mismo tiempo que un incremento en la duración del análisis. Además, porcentajes de modificador superiores a los mostrados en la figura, no sólo incrementaron el tiempo de análisis, sino

que provocaron una pérdida total de resolución, de ahí que se ensayaran también otros modificadores como las ciclodextrinas (α -CD y β -CD) a concentraciones comprendidas entre 1 y 8 mM. Aunque las ciclodextrinas son utilizadas en CE para separaciones quirales, también han demostrado ser efectivas en separaciones no quirales (Qui y col., 2004; Groom y col., 2005) al modificar la hidrofobicidad del medio. De las dos utilizadas, la que proporcionó los mejores resultados fue la α -CD a una concentración de 2,5 mM.

“Field-enhancement sample injection” (FESI)

Con objeto de conseguir que la conductividad de la muestra fuera inferior a la del tampón de separación y que, a su vez, tuviera lugar una adecuada ionización de los analitos, los pesticidas fueron disueltos en una mezcla de acetonitrilo y disolución de carbonato amónico 16 mM y, posteriormente, inyectados electrocinéticamente (6 segundos a -8 kV). En la Figura IV.5.2, se puede apreciar la influencia del porcentaje de disolución de carbonato amónico en la muestra sobre la eficacia del FESI. Tanto bajos porcentajes de disolución de carbonato, inferiores al 10%, como muy altos, cercanos al 100%, no mejoraban la sensibilidad y daban lugar a inyecciones muy poco reproducibles. Sin embargo, el uso de un 17% de dicha disolución, proporcionó las mayores relaciones señal/ruido y, por lo tanto, los menores límites de detección. El uso de tampón de separación en lugar de la disolución de carbonato amónico tampoco mejoró la sensibilidad. Por otra parte, la introducción de un pequeño volumen de agua en el capilar, previo a la inyección electrocinética de la muestra, tal como ha sido sugerida por diversos autores (Chen y Burgi, 1991; Vinther y Soeberg, 1991), no proporcionó mejora alguna.

Una vez determinada la conductividad más apropiada de la muestra, se procedió a optimizar el voltaje de inyección. Un voltaje superior a -8 kV no proporcionó mejora alguna de la sensibilidad, produciéndose, además, un empeoramiento de las eficacias. En estas condiciones (-8 kV), la muestra pudo ser inyectada hasta un máximo de 8 segundos, ya que a tiempos de inyección superiores la pérdida de eficacia era considerable. La Figura IV.5.3, muestra el electroferograma obtenido en las condiciones

de separación y preconcentración en línea óptimas. Como se puede apreciar, el tiempo de análisis fue inferior a 6,5 minutos, lo que supuso una mejora con respecto al tiempo de análisis conseguido en los apartados IV.3 y IV.4. Por otro lado, los límites de detección obtenidos, que fueron calculados como tres veces la relación señal/ruido, oscilaron entre 13,0 $\mu\text{g/l}$ para el metosulam y 31,5 $\mu\text{g/l}$ para el metilcloransulam. En este caso, la sensibilidad obtenida fue ligeramente inferior a la descrita en la sección IV.4 en la que se utilizó el SWMR (6,54-11,9 $\mu\text{g/l}$). Sin embargo, el FESI es un método de preconcentración en línea más selectivo que el SWMR, sobre todo para muestras con cierta complejidad y, además, es de más fácil aplicación.

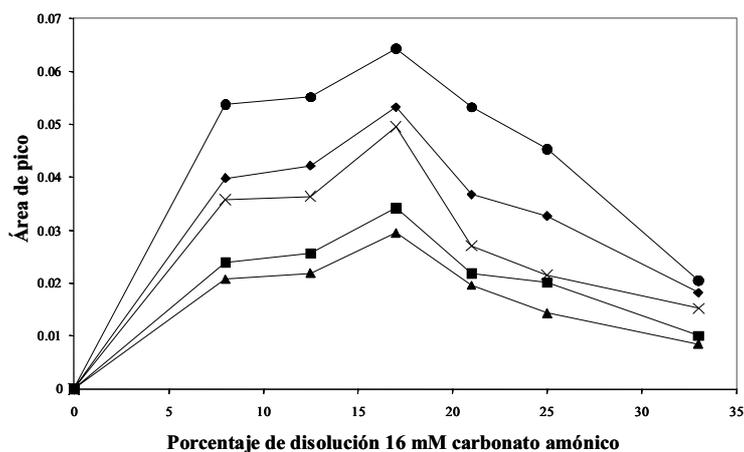


Figura IV.5.2.- Influencia del porcentaje de disolución de carbonato amónico 16 mM (pH 9,04) en la inyección electrocinética de una muestra de 330 $\mu\text{g/l}$ de cada pesticida en acetonitrilo. Inyección 6 segundos a -8 kV. -◇- Flumetsulam. -■- Florasulam. -▲- Metilcloransulam. -x- Diclosulam. -●- Metosulam. Cada muestra fue inyectada tres veces.

Validación del método

Una vez que se ha optimizado tanto el tampón de separación como el procedimiento de preconcentración FESI, se llevaron a cabo los correspondientes estudios de reproducibilidad y repetibilidad. Para ello se realizaron 3 inyecciones consecutivas a tres niveles de concentración distintos (125, 250 y 400 $\mu\text{g/l}$) en tres días

diferentes. La Tabla IV.5.1 muestra los parámetros de validación del método para una concentración de 125 µg/l, aunque se obtuvieron resultados similares para los otros dos niveles de concentración. Las RSD de los tiempos de migración fueron del orden del 0,2% para la repetibilidad y 1,3% para la reproducibilidad, mientras que los valores de RSD para las áreas de pico fueron inferiores al 6,7% para la repetibilidad y al 9,6% para la reproducibilidad. A continuación, se obtuvieron las correspondientes rectas de calibrado para los cinco pesticidas (Tabla IV.5.1) a concentraciones comprendidas entre 100 y 500 µg/l, mostrando coeficientes de correlación (R) superiores a 0,9948.

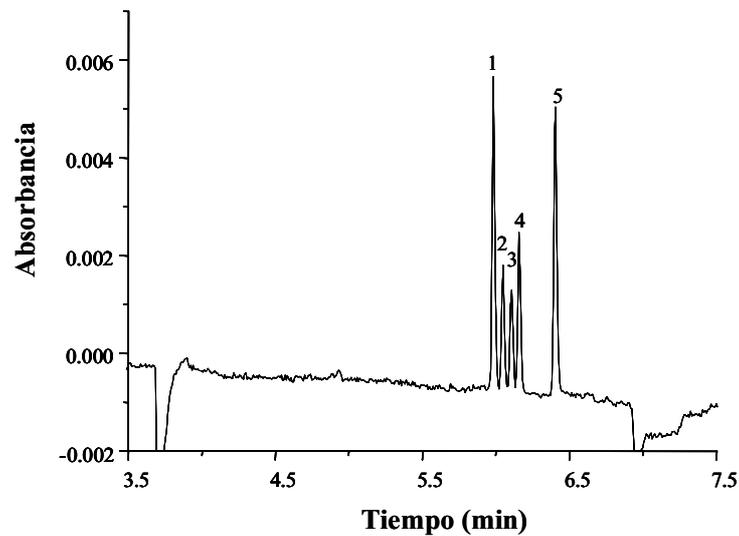


Figura IV.5.3.- Electroferograma FESI-CE-UV de una mezcla de 200 µg/l de cada pesticida en acetonitrilo con 17% de carbonato amónico 16 mM. Inyección: 8 segundos a -8 kV. Tampón de separación: 0,0042% HDB, ácido fórmico 11 mM, carbonato amónico 16 mM, pH 7,6. Longitud total: 67 cm (60 cm efectivos). Voltaje: -20 kV. Temperatura: 21 °C. (1) Flumetsulam. (2) Florasulam. (3) Metilcloransulam. (4) Diclosulam. (5) Metosulam.

Tabla IV.5.1. Datos de validación del método de determinación de los cinco pesticidas por FESI-CE-UV.

Pesticida	Repetibilidad ^{a)}		Reproducibilidad ^{a)}		NTP/m	Recta de calibrado	R	S _{y/x}	LOD ^{b)} (µg/l)	LOQ ^{c)} (µg/l)
	(RSD %, n=3)		(RSD %, n=15)							
	t _m	Área	t _m	Área						
Flumetsulam	0,2	4,0	1,3	8,3	820000	y = (0,553 ± 0,029)x – (0,007 ± 0,007)	0,9973	0,008	14,9	49,7
Florasulam	0,2	4,3	1,3	8,6	480000	y = (0,352 ± 0,020)x – (0,005 ± 0,005)	0,9969	0,005	26,0	86,7
Metilcloransulam	0,2	3,7	1,3	9,3	460000	y = (0,287 ± 0,021)x – (0,003 ± 0,005)	0,9948	0,006	31,5	105
Diclosulam	0,2	6,7	1,2	7,6	400000	y = (0,454 ± 0,028)x – (0,006 ± 0,007)	0,9962	0,008	20,2	67,3
Metosulam	0,2	5,5	1,3	9,6	800000	y = (0,669 ± 0,040)x – (0,013 ± 0,010)	0,9965	0,011	13,0	43,3

a) Datos mostrados para una concentración de 125 µg/l.

b) Calculado como tres veces la relación señal/ruido.

c) Calculado como diez veces la relación señal/ruido.

R: Coeficiente de correlación (n=5). S_{y/x}: Error estándar de la estimación. Intervalos de confianza de la pendiente y ordenada en el origen calculados al 95% de nivel de confianza.

IV.5.3.- SPE-FESI-CE-UV de suelos

Con objeto de aplicar la metodología desarrollada hasta el momento a la determinación de este grupo de pesticidas en suelos, primero se llevó a cabo una extracción asistida por ultrasonidos de 2 g de suelo enriquecido a 500 ng/g, con 75 ml de agua desionizada durante 15 minutos. A continuación, la muestra fue centrifugada y el sobrenadante fue filtrado (filtro de 0,45 μm) y 50 ml del mismo fueron sometidos al procedimiento de SPE descrito para aguas en la sección IV.3. En este estudio preliminar se pudo comprobar que, en las condiciones experimentales, los porcentajes de recuperación obtenidos para los cinco pesticidas eran muy bajos, inferiores a un 20%, de ahí que se intentara modificar diversos parámetros relacionados con la extracción asistida por ultrasonidos, tales como la cantidad de muestra, el tiempo de extracción y la naturaleza del extractante. Cuando en lugar de 75 ml de agua desionizada, se utilizó una mezcla de agua desionizada (75 ml) con 300 μL de una disolución 0,1 M de NaOH, con objeto de aumentar el pH y de favorecer la extracción a tenor de los valores de pK_a de estos compuestos, la extracción mejoró considerablemente. Este hecho, conjuntamente con un aumento del tiempo de extracción hasta 20 minutos, permitió aumentar los porcentajes de recuperación hasta aproximadamente el 55%. En estas condiciones se observó que el sobrenadante obtenido tras la extracción no presentaba mucha turbidez y que, después de ser filtrado y de añadirle 1 ml de HCl 1 M, necesario en el procedimiento de SPE (ver sección IV.3), aparecía con el tiempo un precipitado (ácidos fúlvicos presentes en el suelo). Este hecho hizo necesaria la centrifugación y el posterior filtrado de la muestra tras añadir 1 ml de HCl 1 M (ver sección III.5.3). La introducción de esta nueva etapa permitió mejorar los porcentajes de recuperación para alguno de los pesticidas hasta un 84%.

La Tabla IV.5.2, muestra los porcentajes de recuperación promedio obtenidos para tres extracciones consecutivas de una muestra de suelo enriquecido a dos niveles de concentración diferentes, 200 y 500 ng/g. Como puede apreciarse en la tabla, los porcentajes de recuperación tanto para el flumetsulam como el florasulam y metilcloransulam (70-84%), fueron superiores a los del diclosulam y metosulam. Los

límites de detección obtenidos para la determinación de este grupo de pesticidas en suelos utilizando el procedimiento SPE-FESI-CE-UV oscilaron entre 18,4 ng/g y 34,2 ng/g. Estos límites de detección son del mismo orden de magnitud que los de muchos de los procedimientos existentes en la bibliografía para el análisis de otros pesticidas en suelos, utilizando como técnicas de separación GC o HPLC, tal como muestra el reciente artículo de revisión de Andreu y Picó (2004).

Tabla IV.5.2.- Porcentajes de recuperación promedio (n=3), RSD y límites de detección (LOD) del procedimiento SPE-FESI-CE-UV aplicado a suelos enriquecidos.

Pesticida	Suelo (500 ng/g)		Suelo (200 ng/g)		LOD (ng/g)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	
Flumetsulam	70	2	76	13	18,4
Florasulam	77	6	80	8	29,8
Metilcloransulam	82	10	84	3	34,2
Diclosulam	57	8	65	15	29,8
Metosulam	57	15	50	10	21,9

La Figura IV.5.4 muestra el electroferograma obtenido tras someter al procedimiento de SPE una muestra de suelo enriquecida hasta 200 ng/g de cada pesticida (Figura IV.5.4A), así como el electroferograma obtenido de una muestra sin enriquecer (Figura IV.5.4B). Se puede apreciar en la figura que el suelo no contenía ninguno de los compuestos de interés y que, por otra parte, no existían en el mismo interferencias que impidiesen la determinación de ninguno de ellos.

En el trabajo anteriormente mencionado de Laganá y col. (2000), sus autores consiguieron la extracción de flumetsulam y diclosulam en suelos con recuperaciones comprendidas entre el 65 y 80%, dependiendo del tipo de suelo, con cartuchos Carbograph-1. Estos porcentajes son bastante similares a los obtenidos en este trabajo con cartuchos C₁₈. De la misma forma, los porcentajes de recuperación del metilcloransulam y del flumetsulam, son comparables con los de los métodos no oficiales propuestos por la EPA (EPA MRD Número 419521-07; EPA MRD Número 442315-02) aunque es preciso destacar que el método propuesto en esta Tesis Doctoral es más

simple, económico y rápido que los descritos hasta el momento, en los que se utilizan grandes cantidades de disolventes y diversas etapas de evaporación.

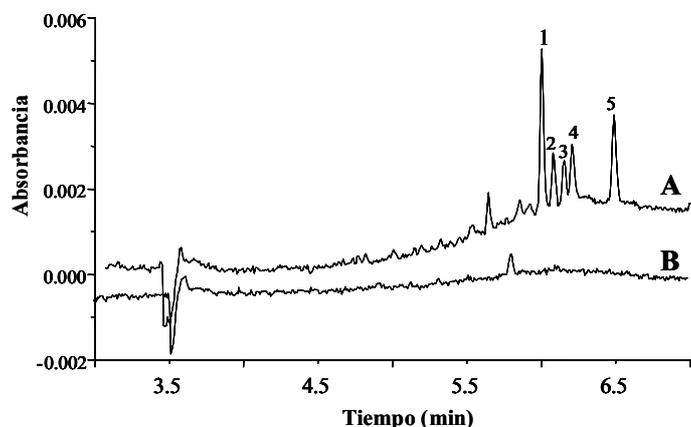


Figura IV.5.4.- A) Electroferograma obtenido tras analizar una muestra de suelo enriquecida a 200 ng/g de cada pesticida mediante el procedimiento SPE-FESI-CE-UV. B) Electroferograma obtenido de la misma muestra de suelo sin enriquecer.

IV.5.4.- Conclusiones

1. Se ha puesto a punto una nueva metodología para la determinación de un grupo de pesticidas (metilcloransulam, metosulam, flumetsulam, florasulam y diclosulam) en suelos mediante SPE-FESI-CE-UV, lo que supone su primera determinación simultánea en este tipo de muestras.

2. Para poder aplicar el FESI, fue necesario utilizar polaridad inversa para lo cual se invirtió el flujo electroosmótico con HDB y se optimizó un nuevo tampón de separación. El tampón de separación en este caso fue el siguiente: 0,0042% HDB, ácido fórmico 11 mM, carbonato amónico 16 mM y α -CD 2,5 mM, pH 7,6.

3. El FESI se ha aplicado como técnica de preconcentración en línea con CE-UV, siendo las condiciones óptimas de inyección 8 segundos a -8 kV, y permitiendo la obtención de límites de detección comprendidos entre 13,0 y 31,5 μ g/l.

4. Se ha optimizado un método de extracción de los pesticidas de muestras de suelo, utilizando una extracción asistida con ultrasonidos y el procedimiento SPE optimizado en la sección IV.3. Este método ha permitido obtener porcentajes de recuperación que oscilan entre 50 y 84% para todos los pesticidas, lo que supone alcanzar límites de detección comprendidos entre 18,4 y 34,2 ng/g.

5. Se trata de un método más simple, rápido y económico que los propuestos hasta ahora en la bibliografía en lo que al análisis de estos pesticidas en suelos se refiere.

Capítulo V

Conclusiones generales

V.- CONCLUSIONES GENERALES

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

1. Se ha puesto a punto una serie de metodologías analíticas para la determinación de diversos grupos de pesticidas en muestras de zumos de frutas, aguas minerales y de estanque, bebidas de soja y suelos.
2. Las nuevas metodologías desarrolladas combinan el uso de la electroforesis capilar con técnicas de preconcentración en línea (NSM, SWMR o FESI) y técnicas de preconcentración fuera de línea (SPE o SPME), con detección ultravioleta-visible y por espectrometría de masas. La combinación de estas técnicas ha permitido alcanzar límites de detección del orden de ng/l o ng/g.
3. Se ha demostrado la utilidad del acoplamiento electroforesis capilar-espectrometría de masas para la determinación de nuevos grupos de pesticidas en muestras reales.
4. Se ha puesto de manifiesto el potencial del diseño experimental en la optimización tanto de las condiciones de extracción y desorción del procedimiento SPME, como de los parámetros de la interfase *electrospray*.
5. Las metodologías analíticas desarrolladas han sido validadas llevando a cabo los correspondientes estudios en las condiciones óptimas, mostrando parámetros de calidad altamente satisfactorios desde el punto de vista analítico.

English Summary

PhD Thesis**“New methods for the analysis of pesticides by capillary electrophoresis”****by Javier Hernández Borges***Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science
University of La Laguna***ENGLISH SUMMARY****Chapter I. Introduction**

Nowadays, approximately 300 000 Tons of pesticides per year are used for agricultural production in Europe and their residues can be found in soil, water, foods, etc. It is clear that the determination of pesticide residues is an intricate problem because of the large number of chemicals involved. As a result, the methods applied should be able to simultaneously determine several pesticides in a single run with good reproducibility, high recovery and adequate limits of detection (Picó et al., 2003).

Pesticides determination can be carried out by different analytical techniques. Thus, gas chromatography (GC) is the most frequently used technique because of its high sensitivity and selectivity for the detection of these compounds. However, the thermal instability of some pesticides makes necessary to prepare stable derivatives and indirectly determine them by GC. A second possibility is to use other techniques such as liquid chromatography (LC) or capillary electrophoresis (CE). Moreover, many new pesticides can also be involatile and, therefore, difficult to analyze by GC. Therefore, new analytical techniques are sought for these new classes of pesticides. Although in recent years the preference for LC methods has increased in the field of pesticide compounds, CE has emerged as a promising analytical tool that provides improved resolution and speed over LC although, in general, with lower sensitivity at trace levels (Karcher and El Rassi, 1999; Sovocool et al., 1999; Tegeler and El Rassi, 2001; Berrada et al., 2003; Picó

et al., 2003).

As mentioned above, one of the main limitations of CE is the low sensitivity of this technique, usually in the mg/l- μ g/l range. This low sensitivity is due to the low sample volumes injected (1-10 nl) and the very limited optical path length employed for on-capillary detection. To overcome this limitation, different alternatives have been proposed: i) developing off-line preconcentration strategies as, liquid-liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE), solid-phase microextraction (SPME) or cloud point extraction (CPE); ii) using on-line preconcentration strategies as normal stacking mode (NSM), field-enhancement sample injection (FESI), stacking with matrix removal (SWMR), sweeping, etc. and/or iii) improving the detection system capabilities (Hempel, 2000; Dabek-Zlotorzunska et al., 2001; Valcárcel et al., 2001; Simonet et al., 2003).

Concerning on-line preconcentration strategies, one of the most commonly used is NSM and consists in the injection of a high amount of sample with lower conductivity than that of the separation buffer. Besides, another on-line preconcentration strategy is SWMR that has also proven to be effective. In this case, the capillary is filled with the sample previously dissolved in a low conductivity matrix. For the analysis of anionic species, once the sample is introduced in the capillary, voltage is applied (reverse polarity) and the matrix is removed from the sample by the EOF, concentrating anionic analytes towards the anode. When the matrix has been mostly removed (the intensity of the current is approximately 97-99% of that of the buffer) polarity is inverted and the separation takes place. The use of this method for the analysis of cationic species requires an anodal EOF that can be achieved by modifying the capillary wall with a suitable cationic surfactant or polymer. Other on-line preconcentration technique is FESI, first described by Chien and Burgi in 1991, which is based on the electrokinetic injection of a sample with a lower conductivity compared with the background electrolyte (BGE). In this case, only charged analytes or neutral analytes interacting with charged micelles can be concentrated.

In this section, a critical and updated revision about the current situation of the

analysis of pesticides by CE is presented. The revision has been written considering two main sections. In the first one, a thorough revision is presented regarding the various off-line and on-line sample preconcentration procedures that have been developed together with CE to analyze these compounds. The second part reviews the various detection strategies (i.e., UV, LIF, MS and electrochemical) and CE modes that have been applied to analyze pesticides.

I.1.- Sample preconcentration procedures for CE analysis of pesticides

Off-line preconcentration methods

Off-line preconcentration procedures have been developed to improve the LODs usually achieved by CE. Thus, LLE, SPE, SPME and CPE have demonstrated their usefulness prior to CE analysis of pesticides. A more exhaustive description about these protocols and other less common off-line enrichment procedures is given below.

Liquid-liquid extraction (LLE): LLE is the classical extraction method for the extraction of pesticides from liquid matrices. The main drawbacks of this procedure are: i) it involves many clean-up steps that are time-consuming, ii) the consumption of great amounts of organic solvents (normally toxics) and iii) inadequate recoveries. Besides, one of the main problems of LLE is the co-extraction of undesired components together with the analytes, being necessary to develop, after the extraction, a suitable clean up procedure for complicated matrices. For all these reasons, LLE procedures have been substituted by others, principally by SPE. In spite of these disadvantages, the use of LLE together with CE for pesticides analysis has repeatedly been described in the literature. As an example, Penmetsa et al. (1997b) determined two sulfonylurea herbicides (primisulfuron and triasulfuron) used for control of weeds in water and soil by MEKC using methylene chloride for the extraction of the herbicides from spiked water samples. For the extraction of spiked soils, methylene chloride was also used after a previous extraction of the herbicides using 100 ml of methanol-0.1 M potassium phosphate buffer (1:1) at pH 7.0. Both pesticides, with average recoveries higher than 90%, could be detected in spiked lake waters at 10 µg/l, and at 50 µg/kg in spiked soil samples.

Guardiño et al. (1998) have determined the organophosphorous pesticide clorpyrifos, in air, leaves and soil samples in a greenhouse using methanol and acetone as extraction solvents. For the analysis of the pesticide, GC, HPLC and CE were used. Other examples of LLE are the determination of fungicides in grains (Malik et al., 1999) and in fruits and vegetables (Eash and Bushway, 2000) using chloroform and dichloromethane as extraction solvents, respectively.

Solid-phase extraction (SPE): Sample preparation using SPE was firstly introduced in the mid-1970s, to replace LLE due to its simplicity, selectivity and the low limits detections that it provides. Recent works (Bruzzonotti et al., 2000; Martínez et al., 2000; Sabik et al., 2000) have reviewed different SPE procedures for the determination of contaminants, pesticides among others, in different samples. In the conventional mode, SPE has two important steps: adsorption of the analytes onto the stationary phase and desorption from the solid material using small amounts of an appropriate elution solvent. SPE is normally used for liquid samples, but it can also be used for solid matrixes using a previous homogenization and dissolving steps.

Generally, SPE procedures for pesticide extraction prior to CE analysis are carried out using disposable cartridges. Most of the cartridges used for pesticide analysis are packed with silica-based phases. Quirino et al. (2000) have determined phenylurea herbicides monuron, isoproturon and diuron (polar herbicides) in spiked pond and tap water by SPE-RM-MEKC using C₁₈ cartridges. SPE in combination with other on-line enrichment procedures have allowed the determinations of these pesticides down to 10-30 µg/l. These types of cartridges have also been used for the determination of other types of pesticides as, for instance, fungicides (Rodríguez et al., 2001b) or triazines and their degradation products (Loos and Niessner, 1999; Carabias Martínez et al., 2000a; Frías et al., 2004a). Other materials have been used as sorbents for cartridge packing for pesticide residue enrichment. Thus, Farrán and Ruiz (2004) used carbopack B columns in the extraction of phenoxy acid and phenylurea herbicides from water samples. Carneiro et al. (2000) have extracted three cationic herbicides (paraquat, diquat and difenzoquat) from tap and river water samples, comparing two types of stationary phases

(silica and porous graphitic carbon PGC). The best results were obtained with the PGC cartridges. Carabias Martínez et al. (2002) have separated and determined chloro- and methyl-thiotriazines in water samples by MEKC and non aqueous CZE (NA-CZE) using a previous preconcentration step with SPE-Oasis HLB cartridges. All triazines could be detected down to 0.1 µg/l in drinking and river waters. The use of NA-CZE after sample preconcentration provides less interferences and more stable baselines than MEKC.

Solid phase microextraction (SPME): Solid-phase microextraction (SPME) was introduced and developed by Pawliszyn and Belardi in 1989 and applied for the first time to pesticides in 1994 (Eisert et al., 1994; Popp et al., 1994). Since its development, it has successfully been used for the extraction of a wide range of pollutants as, for instance, polycyclic aromatic hydrocarbons, phenols, aliphatic and aromatic amines, pesticides, etc (Beltrán et al., 2000; Martínez et al., 2000; Krutz et al., 2003). SPME has been introduced as an alternative to conventional techniques for sample preparation because of its simplicity, solvent-free characteristics and because it can be easily automated for both GC and HPLC instruments. It also exhibits good linearity and sensitivity, however, analyte carryover can also take place and the fiber can easily be damaged or life reduced at extreme pH values or high salt concentrations.

Although on-line coupling of SPME with CE has been described (Nguyen and Luong, 1997; Wang and Pawliszyn, 1998), the general use of such coupling is still a non-resolved problem due to the SPME-CE interface must allow the introduction of very small injection volumes. Therefore, SPME-CE analyses are usually carried out employing the off-line mode. In this sense, Rodríguez et al. (2003) have recently developed a method for the off-line SPME-CE-MS determination of *o*-fenilfenol, haloxyfop, acifluoren, picloram and ioxynil in grapes, apples, oranges and tomatoes using a CW-TPR fiber. The extraction of these pesticides by means of SPME from the homogenized sample in a mixture water:acetone (5:1), allowed the quantification of these compounds at concentrations down to 0.02-5 mg/kg. Recovery percentages ranged between 7% and 94%. This work showed for the first time the great possibilities of the combination of SPME with CE-MS.

Cloud point extraction (CPE): CPE is a surfactant-mediated phase separation that constitutes an interesting alternative to other conventional preconcentration procedures. The principles of this technique and main applications have been described elsewhere (Hinze and Pramauro, 1993; Carabias Martínez et al., 2000b). Basically, CPE is a very simple procedure that uses surfactants that have the property of solubilizing different types of compounds depending on micelles moieties and solute properties. When a non-ionic or doubly ionic surfactant solution is heated, there is a certain temperature value (cloud point temperature) at which two phases appear. When this temperature is reached, the solubilized compounds remain in the surfactant rich phase. This temperature can be modified either by the presence of acids or bases, polymers, salts or even other surfactants.

CPE previous to CE has been described for the analysis of triazines in water samples (Carabias-Martínez et al, 1999, 2003a). Three chloro-substituted triazines and three methylthio-substituted were extracted from water samples using the CPE procedure with the non-ionic surfactant Triton X-114 (Carabias-Martínez et al., 2003a). Once the extraction was carried out, triazines were separated by non aqueous capillary zone electrophoresis using a buffer of acetonitrile-methanol (50:50, v/v), 0.010 M perchloric acid and 0.020 M SDS. Distribution coefficients between the Triton X-114 phase and water were also calculated.

Other off-line enrichment procedures: Supercritical fluid extraction (SFE) and pressurised liquid extraction (PLE) of pesticides have also been proposed as sample preconcentration steps prior to CE separation (Penmetsa et al., 1997; Nemoto and Lehotay, 1998; Lancas et al., 1999). SFE is a very attractive alternative since the extraction selectivity can be tailored by modifying the type of fluid, its temperature and pressure. Among the many existing fluids, CO₂ is the most commonly used for supercritical extraction purposes due to its non-toxicity, non-flammability and easily removal from the extract. On the other hand, PLE is an automated extraction technique that can be used to extract compounds from solids or semi-solids samples using liquid solvents at high temperatures (40-200 °C) and pressures (3500-21000 kPa). As

mentioned above, these techniques have been scarcely applied to the extraction of pesticides prior to CE analysis.

Supported liquid membrane extraction (SLME) is other off-line concentration procedure that has also been used for the extraction of pesticides prior to CE separation (Dzygiel and Wieczorek, 2000; Khrolenko et al., 2002). This preconcentration procedure combines both liquid-liquid extraction and classical membrane processes. Khrolenko et al. (2002) have determined atrazine in fruit juices (grapefruit, blackcurrant, orange and apple) using a combination of SLME and SPE. The combination of both procedures yielded cleaner extracts than with SPE alone. Recoveries were between 40 and 60% for SLME-SPE and the limits of detection were in the $\mu\text{g/l}$ range. Dzygiel and Wieczorek (2000) have also extracted the post emergence herbicide glyphosate, by SLME prior to CE separation. However, LODs were found not suitable due to the high salt content of the acceptor.

On-line preconcentration methods

On-line preconcentration techniques as sample stacking or sweeping (Quirino and Terabe, 1999, 2000, 2003; Shihabi, 2000; Britz-McKibbin and Terabe, 2003) constitute a second powerful tool for increasing sensitivity during CE analysis of pesticides.

Stacking: Sample stacking, a preconcentration mechanism first conceived for ionic solutes, was later extended to the separation of neutral analytes in MEKC as described by Liu et al. (1994). After this pioneering work, several manipulations of the micelle mobility was envisioned and a great number of stacking procedures have been described (Quirino and Terabe, 2000; Shihabi, 2000). In these stacking procedures, about 5-50% of the capillary volume is normally filled with the sample hydrodynamically. It can provide from 10 to > 1000 fold improvement in detection signal/noise ratios, very close to those of HPLC. Many different methods of stacking have been described (*vide infra*), e.g., normal stacking mode (NSM), reversed electrode polarity stacking mode (REPSM), stacking with reverse migrating micelles (SRMM), stacking using reverse

migrating micelles and water plug (SRW), field enhancement sample injection (FESI), FESI with reverse migrating micelles (FESI-RMM), etc. In general, all of them are simple and economical techniques that do not require additional instrumentation.

Turiel et al. (2000) have applied three stacking modes to the MEKC determination of triazines in water samples, namely, NSM, REPSM and FESI. Among them, REPSM gave the best results, allowing the determination of seven triazines down to 3.3-8.5 µg/l. However, the stacking procedure did not allow the determination of the analytes in environmental waters without a previous SPE procedure. Therefore, SPE was used by means of a polystyrene-divinylbenzene disk. The use of SPE allowed the determination of the analytes in the range of the ng/l (15-35 ng/l). The method was validated using a certified reference material. Da Silva et al. (2003) have also analyzed triazines together with other pesticides by CE by means of on-line stacking. Quaternary ammonium herbicides (quats) have also been separated and on-line preconcentrated using the stacking technique (Núñez et al., 2001, 2002b). In both works, cationic pesticides paraquat, diquat and dibenzoquat were determined. As sample stacking procedure they used the EOF to pump out the sample matrix while the stacking is in progress. To apply the stacking technique to cationic pesticides it was necessary to reverse the EOF; for this reason, CTAB was used to modify the capillary wall. Núñez et al. (2002b) improved 35-185 times the detection limits previously achieved by the same group (2001) by developing an off-line SPE procedure previous to the sample-stacking CE separation.

Sweeping: Sweeping technique (Osbourn et al., 2000; Quirino et al., 2002; Britz-McKibbin and Terabe, 2003) was firstly described in electrokinetic chromatography using a charged pseudostationary phase (PS) as, for instance, micelles. Sweeping can provide an improvement of 5000 fold for analytes with high affinity to the PS. The sample is prepared in a matrix that is free of the PS and has a conductivity similar to (or higher than) that of the background solution. Sweeping has place when the PS, which penetrates the sample zone, entraps and accumulates the analytes. One example of on-line preconcentration using the sweeping technique with a high improvement in the detection limits was developed by Núñez et al. (2002c) for the determination of paraquat,

diquat and difenzoquat by using a sweeping-MEKC method. The strong interaction between positive analytes like quats with anionic micelles like sodium dodecyl sulphate (SDS) provided a high sensitivity enhancement. By using a sweeping-MEKC procedure, a sensitivity enhancement of 250-500 fold was achieved. The cation-selective exhaustive injection (CSEI)-sweeping technique yielded a sensitivity improvement of 3000-50000 fold corresponding to a limit of detection between 0.075 and 1 µg/l. Lin et al. (2001) have also used this technique for the separation of neutral methylthio-s-triazine herbicides. In this case, the cationic surfactant TTAB was used as PS. The optimum buffer consisted of 40 mM TTAB in 40 mM phosphate buffer at pH 6.0 while the sample was dissolved in 50 mM phosphate buffer containing less than 5% acetonitrile. As a result, samples could be injected up to 60 sec and detection limits achieved were between 9 and 15 µg/l.

On-line solid phase extraction: Although SPE is normally carried out in the off-line mode, several on-line applications of SPE-CE have been shown (Tomlinson and Naylor, 1995; Figeys et al., 1997; Petersson, et al., 1999; Guzmán, 2003). The on-line mode based in SPE is an effective alternative to other methods performed within the capillary. This SPE mode has the advantage of less sample manipulation, avoiding contaminations of samples and solvents. It can also be used as clean-up to remove undesirable components from the sample. The potential of this procedure to analyze pesticides has been demonstrated in several works. Cai and El Rassi (1992) initially described the on-line preconcentration of triazine herbicides using packed C₁₈ materials. Arce et al. (1997) and Hinsmann et al. (2000) have coupled an automated continuous flow system to a commercial CE instrument for sample preconcentration purposes. Arce et al. (1997) have separated s-triazines by MEKC in spiked water samples. Calibration, pre-concentration, elution and injection into the sample vial were automatically carried out. For the pre-concentration of the samples, a C₁₈ solid-phase mini-column was used allowing the automated on-line preconcentration of the samples in less than 13 minutes. Recoveries between 90 and 114% were achieved for most of the pesticides and LODs were in the µg/l range.

I.2.- Detection modes

As a result of the poor LODs that are frequently achieved by CE, a wide variety of different detection technologies continue to be actively explored and improved for the CE analysis of pesticides. In this section, the detectors more frequently used for CE (i.e., UV, LIF, MS and electrochemical) are described together with their main applications and developments in the analysis of pesticides.

UV-VIS detection: Since most commercial CE instruments are equipped with an UV-VIS absorbance detector, this has been the detector most widely employed for CE until now. Generally, UV-VIS detector is fairly robust, reasonably sensitive, stable under varying separation conditions and it provides a good linear dynamic range. Pesticides have been determined by different CE modes using UV detection in different samples (Eash and Bushway, 2000; Menzinger et al., 2000). As an example, Rodríguez et al. (2001b) have determined eight fungicides in grapes, lettuces, oranges and tomatoes by MEKC-UV at 210 nm. Fruit samples were first homogenized with methanol by sonication. A buffer of 4 mM borate with 75 mM sodium cholate at pH 9.2 was used to separate the pesticides after SPE with a C₁₈ column. All pesticides could be detected between 0.1 and 1 mg/kg. Rodríguez et al. (2001a) have also developed a CZE-UV method for the determination of thiabendazole, procymidone and prochloraz in grapes with detection limits between 0.05-5.00 mg/kg. Other example of CE-UV detection has been the quiral separation of pesticides. An interesting CE approach for the separation of triazole enantiomers has been proposed by Wu et al. (2001). Most triazole fungicides have at least one quiral center that is expected to play an important role in their bioactivity. For this reason, they developed a method for the chiral separation of 14 triazole-type fungicides using cyclodextrins (CDs) as chiral selectors. In this case, 12 of the 14 triazoles could be separated using a phosphate buffer with 2% (w/v) of sulphated- β -CD (pH 3.0) as charged chiral selector. The other two triazoles could be enantio-separated by adding urea to the separation buffer. Zerbinati et al. (2000) have compared the use of three different chiral additives, namely α -CD, hydroxypropyl- β -CD and ethylcarbonate- β -CD, for the separation of the four enantiomers of mecoprop and dichlorprop by CZE with

UV detection at 214 nm. This comparison was developed by means of an experimental design (factorial design) selecting the differences in the migration times of the enantiomers and of the two congeners as response. Concentration of CD and organic modifier (MeOH) were selected as experimental factors. The ethylcarbonate derivative of β -CD was found to be the best chiral selector for this application.

As it has been stated, the small diameter of the capillary (50-100 μm) provides a short optical path-length resulting in low detection limits. This problem can be partially solved by increasing the optical path-length, using rectangular geometries (Tsuda et al., 1990; Cifuentes et al., 1996) or segmented capillaries with z-cell configurations. This latter configuration has been applied by Tegeler and El Rassi (2002) for the CEC determination of pyrethroid and carbamate insecticides. This procedure involves the sequential use of frontal and elution electrochromatography on a segment capillary column. The method allowed an increase in sensitivity of more than 800 fold corresponding to LODs of 10^{-8} - 10^{-9} M for both types of pesticides in tap and lake water. Quirino et al. (2000) have also used this z-cell configuration for the determination of three phenylureas herbicides in spiked tap and pond water by RM-MEKC. In this case, three on-line concentration techniques were evaluated to increase the detection sensitivity. Using the z-shaped detection cell, more than 500 fold increase in peak height was obtained. In this case C_{18} -SPE was also used as sample preparation and preconcentration method. The whole optimized procedure allowed the determination of the three pesticides down to 1 $\mu\text{g/l}$.

Laser induced fluorescence (LIF) detection: LIF detection was first coupled on-line to a CE instrument by Gassman et al. in 1985. LIF constitutes a more sensitive and selective detector than UV, but its use is restricted to molecules with fluorescent properties (*vide infra*). CE instruments have the possibility to use different commercial lasers, namely, Ar-ion ($\lambda_{\text{exc}}=488$ nm), He-Cd ($\lambda_{\text{exc}}=325$ nm), He-Ne ($\lambda_{\text{exc}}=633$ nm) or diode lasers (infrared).

The first application of CE-LIF to pesticide analysis was shown by Jung and

Brumley (1995) for the determination of phenoxy acid herbicides. Since then, several works have been carried out on this topic. Frequently, pesticides do not show native fluorescence and, as a consequence, it is necessary to develop pre- or post-column derivatization steps with a suitable reacting probe.

Also it can be deduced from the literature that, as expected, CE-LIF of pesticides has not been as widely used as CE-UV. Thus, CE-LIF application to the separation of the transformation products of pesticides or metabolites is rather scarce (often metabolites are environmentally persistent and even more toxic than the parent compounds). In this sense, Wall et al. (2001) and Wall and El Rassi (2001) have determined aniline metabolites of phenylurea, carbamate and anilide pesticides in spiked tap and lake water with LIF detection. Amino compounds such as anilines can be transformed into fluorescent derivatives through a wide number of precolumn derivatization agents. In these cases, FITC (Wall and El Rassi, 2001) and 9-fluoroenylmethyl chloroformate (FMOC) (Wall et al., 2001) were used. In the work by Wall and El Rassi (2001) 10 anilines were separated by CZE using a buffer consisting of 50 mM phosphate (pH 2.5). Although they were well separated, LODs were in the 10^{-5} M range using UV detection at 200 nm. To improve the sensitivity, anilines were derivatized with FITC and detected by LIF with an Ar-ion laser, allowing their detection down to 10^{-10} M. However, in the work by Wall et al. (2001) the use of FMOC as a derivatization tag allowed the determination of a higher group of anilines (i.e., 15) down to 10^{-8} M.

Wall et al. (2002) have also reported the determination of derivatized and underivatized phenol pesticide metabolites by CE and CEC. A precolumn derivatization optimization procedure was developed using carbazole-9-N-acetic acid (CRA) as fluorescent tag for LIF detection. This derivatization involved the formation of an ester bond between the carboxyl group of the CRA and the hydroxyl group of the phenol compound. The CRA derivatization was performed at a 5:1 molar ratio, CRA:analyte, at 60 °C overnight. LODs using LIF were from 10^{-7} to 10^{-9} M improving clearly the LODs obtained by CE-UV analysis of the underivatized analytes. Wu et al. (2000b) described the detection of N-methylcarbamates (NMC) by means of MEKC-LIF. Plain capillaries

were used as chambers for simultaneous thermal decomposition, derivatization, separation and detection, without the need of any interface. A reaction medium that was at the same time the separation buffer consisting of 10 mM borate (pH 9.0) containing 40 mM CTAB, 28 mg/l OPA and 200 mg/l 2-mercaptoethanol was used. The derivatization reaction took place inside the capillary after a thermal decomposition of the analytes (the capillary has a heated zone at 120 °C). The addition of CTAB accelerates dramatically the thermal degradation process of NMCs. Detection limits were found to be around 0.5 mg/l for all NMCs. The main limitation of this procedure was a moderate decrease of separation efficiency due to the thermal decomposition step (typical efficiencies were around 50 000 plates/m).

Indirect fluorescence detection is also an alternative for the determination of non fluorescent analytes. Chang and Liao (2002) described the determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid (the main metabolite of glyphosate) by indirect fluorescence detection using 1 mM fluorescein solution at pH 9.5 as the fluorophore buffer and an Ar-ion laser. Glyphosate and glufosinate were determined in commercial herbicides and in spiked ground water samples, with LODs in the μM range.

CE-MS detection: A mass spectrometer as detector provides the molecular weights of solutes, structural information for the identification of analytes and makes easier the analysis of coeluting compounds. Among the different interfaces that have been proposed to couple CE with MS, ESI is considered the method of choice. First because it allows molecules to be transferred directly from the liquid phase into the gas phase and, also, because it allows the determination of high molecular weight solutes as n-charged molecules (as a result, the resulting mass/charge ratio of large compounds can fall inside the mass range scanned by all mass analyzer). Several ESI interfaces formats have been described. Sheath-flow (Smith et al., 1998), liquid-junction (Lee et al., 1989) and sheathless (Olivares et al., 1987) are the three formats used for interfacing CE and MS. Although each design has its own advantages and drawbacks (Gelpi, 2002), the sheath flow interface is more robust and offers more flexibility for buffer selection and, therefore, it has been the only commercial ESI interface and, as a consequence, the most

widely applied in CE-MS so far.

The use of an ESI interface to couple CE and MS involves the use of volatile buffers with low concentration and low ionic strength. A high amount of salts will affect negatively the electrospray formation and will decrease the ionization-desorption yield of the analytes. On the other hand, the use of additives in the separation buffer as, for instance, tensioactives, chiral selectors, etc., will also affect negatively the formation of the electrospray and, therefore, the efficiency of ionization. Moreover, a continuous use of these non-volatile substances can even clog the interface and/or the entrance to the spectrometer. As sheath liquid, several hydro-organic mixtures (generally 1:1, v/v) with acetonitrile, ethanol, propanol or methanol containing a small amount of acid or base are used (normally, the concentration of acid or base is lower than 1% and it depends on the analyte and the ionization mode, positive or negative). The most traditional CE buffers (i.e. TRIS, phosphate, etc.) can only be used at low concentrations (normally lower than 20 mM).

The potential of CE-MS for the determination of pesticides was firstly described by Lee et al. (1989) for sulfonylureas. Since then, it has been applied to the determination of other pesticides like carbamates, triazines, etc. However, its use for the quantitative determination of pesticides is still limited and under development.

Wycherley et al. (1996) developed the separation of a group of simple quaternary ammonium ions including the herbicides choline and clomequat. The separation was first studied with indirect UV detection by adding creatinine to the separation buffer, due to the absence of chromophore groups in these compounds. The buffer used for the CE-ESI-MS analysis was 10 mM creatinine (pH 3.6 with acetic acid). A sheath flow interface and a sheath-liquid composed of methanol:water (50:50 v/v) with 1% of formic acid were used. ESI-MS was used to confirm the identity of the analytes but not as a quantification method. Lazar and Lee (1999) studied the CE-MS separation of diquat and paraquat with different buffers and an ESI-TOF MS instrument. The best separation was achieved using a buffer containing 100 mM ammonium acetate and a mixture of methanol, water and

acetic acid (80:20:0.1 v/v) as sheath-liquid. Although they tried to use hydro-organic buffers or buffers containing phosphate, that provided a good CE-UV separation of the compounds, the same results were not obtained with the CE-TOF-MS coupling. These types of pesticides have also been determined by CE-ESI-MS by Núñez et al. (2002a). The best separation was achieved using as buffer a solution of 200 mM formic acid-ammonium formate (pH 3) with 50% of methanol. The addition of methanol to the separation buffer considerably improved the resolution of the compounds. The sheath-liquid consisted of a mixture methanol:water (9:1) 10 mM acetic acid. LODs achieved were in the range 1-10 µg/l. The method was applied to the analysis of polluted irrigation waters and spiked mineral waters.

Triazines are one of the most important groups of herbicides and one of the most frequently studied by CE in its different separation modes. They have also been determined by CE-MS (Nelson et al., 1996; Yang et al., 1997; Tsai et al., 1998). In this sense, Yang et al. (1997) developed the separation of chlorotriazines herbicides and barbiturates by MEKC-ESI-MS. The pH of the buffer used (containing 10 mM SDS and 10 mM ammonium acetate at pH 5.9) was modified in order to adequately adjust the electroosmotic flow. Under these conditions, negative micelles move to the anode while the analytes migrate to the cathode. Therefore, this type of micelles can be used in the separation without interfering with the ESI-MS detection. Tsai et al. (1998) analyzed a group of 8 triazines inverting the EOF with CTAB using both UV (230 nm) and MS detectors, using a buffer of 50 mM ammonium acetate, 0.7 mM CTAB at pH 3.85. EOF inversion highly improved the resolution of the separation. However, when using MS detection with ESI interface, an important loss of resolution could be observed. The composition of the sheath-liquid was found to be determinant to the separation. In this sense, the best results were obtained with a mixture of 90% methanol:water (80:20 v/v) and 10% 50 mM ammonium acetate buffer pH 3.85, although it was not enough to achieve an appropriate resolution.

Partial filling technique has also been used for the determination of pesticides by CE-MS (Nelson et al., 1996; Molina et al., 2001). One of these examples is the work of

Nelson et al. (1996) in which they reported the use of partial filling MEKC-ESI-MS for the analysis of triazines herbicides. Filling a small portion of the capillary with SDS surfactant provided the CE-MS separation of the neutral molecules without any interference of the surfactant on the subsequent detection. Other example was proposed by Molina et al. (2001) who they described the separation of N-methylcarbamates in three ways: using a partial filling of the capillary with SDS and also reverse migrating micelles (RMMs) under acidic and basic conditions. The use of coated capillaries with an anionic polymer and high pHs (RMMs) allowed a good separation of the N-methylcarbamates with LODs in the range of 0.04-2.0 µg/ml. Besides, Menzinger et al. (2001) studied the different factors that affect the separation of *s*-triazines and phenoxyacids using the partial-filling technique and non aqueous capillary electrophoresis with UV detection. These conditions may be compatible with ESI-MS detection providing LODs of 0.12-0.29 mg/l.

As mentioned above, in CE-MS the use of buffers with non volatile additive as cyclodextrines can contaminate rapidly the ion source reducing considerably the intensity of the MS signal, bringing about, as a result, an important loss of sensitivity. Several chiral CE-MS separations using cyclodextrines have shown this sensitivity decreasing (Sheppard et al., 1995; Lamoree et al., 1996). Otsuka et al. (1998) proposed a CE-MS method for the separation of three phenoxy acid herbicides enantiomers (dichlorprop, fenoprop and mecoprop) using CDs. To achieve a suitable separation a buffer consisting of 20 mM TM-β-CD in 50 mM ammonium acetate (pH 4.6) was used. The sheath-liquid was composed of 50:50 (v/v) of ethanol:water with 1% (v/v) of formic acid. For this particular case in which CDs were used, it was stated the need of a deeper study to evaluate the possible contamination of the ion source and also the sensitivity decreasing.

Moyano et al. (1996) have determined the herbicides mepiquat, chlormequat, diquat, paraquat and difenzoquat in tap water by CE-ESI-MS. 50 mM acetic acid/ammonium acetate at pH 4 with 10% of methanol as modifier was used as separation buffer. The sheath liquid was a mixture methanol:acetic acid (9:1, v/v). LODs under these conditions were 0.7-20 µg/l. Song y Budde (1998) reported the separation of chlorinated acid herbicides and several phenols in water by means of CE-UV and CE-

ESI-MS. The separation of the 16 compounds by CE-ESI-MS was carried out in 5 mM ammonium acetate at pH 10 in isopropanol:water (40:60, v/v) and using pure methanol as sheath liquid. Spiked drinking water samples were directly injected into the CE system without further processing. LODs obtained were in the range of $\mu\text{g/l}$ with large variations from one analyte to another. Rodríguez et al. (2002) described the CE-ESI-MS analysis of thiabendazole and procymidone in fruits and vegetables (apples, grapes, oranges, pears, strawberries, tomatoes). The separation of both analytes was achieved using a buffer of 20 mM formic acid, 12 mM ammonium formate at pH 3.5 with 2% of methanol using the same separation buffer as sheath liquid. The proposed method involved the use of solid phase extraction (C_8 as stationary phase) of the fruits and vegetables samples. Mean recoveries ranged from 61 to 68% and from 71 to 80% for thiabendazole and procymidone, and LOQs were 0.005 mg/kg and 0.05 mg/kg for thiabendazole and procymidone, respectively.

The use of sheathless interfaced CE-MS has also been applied to pesticide analysis. Goodwin et al. (2003) were able to separate and determine herbicides glyphosate and glufosinate and their derivatives (aminomethylphosphonic acid and methylphosphinicpropionic acid) in wheat samples using this type of CE-ESI-MS interface. The separation buffer was 1 mM ammonium acetate/acetic acid at pH 6.3 in a mixture methanol:water (50:50, v/v). The best reproducibility in terms of migration times and peak areas (with RSD % values between 1-2 and 7-12%, respectively) was obtained using a capillary coated with linear polyacrilamide. LOD was 1 μM in water and 2.5 μM in the wheat water-acetone extract.

Electrochemical detection: Electrochemical detection (EC), based on conductimetry, amperometry and potentiometry, has not found widespread use for routine analysis in capillary electrophoresis. Although EC detection (mainly in the amperometric mode) can provide a decrease in the LODs of one or two orders of magnitude compared with UV detection and, in some cases even larger, depending on the redox properties of the analyte, so far EC has been mostly used in research laboratories. Recently a wireless conductivity detector has become commercially available, and it is expected an

increasing number of applications of this universal system; however, its well-known limitations (as e.g., low sensitivity) have to be also considered. On the other hand, amperometric detection provides a much higher sensitivity but it is tedious and requires sophisticated instrumental set-ups that involve the development of adequate electrical decoupling of the CE instrument from the working electrode. Also physical alignment of the electrode within the capillary is necessary to ensure adequate and reproducible measurements. Also, it has to be taken into account that amperometric detection can only be used for electrochemically active compounds. In spite of these disadvantages, the adequate LODs that can be achieved by this procedure for some compounds, together with the possibility to account with an alternative detector have taken some laboratories to work on the development of CE-amperometric methods. As a consequence, electrochemical detection has also been used for the determination of pesticides metabolites (anilines and chlorophenols) (Luong et al., 1999; Asthana et al., 2000) or pesticides like asulam (Chicharro et al., 2002). Chicharro et al. (2002) have presented a new electrochemical cell for the MEKC-EC detection with simultaneous UV detection of asulam in the presence of other herbicides such as simazine, diuron and amitrole. A buffer of 0.020 M boric acid at pH 8.2 containing 0.025 M SDS was used. Under these conditions LODs of 0.4 mg/l could be achieved. Using a previous SPE with C₁₈ cartridges asulam could be detected in tap water down to 0.8 and 1 µg/l with EC and UV detection, respectively.

Chapter II. Objectives

This PhD Thesis has been developed following one of the research lines of our research group "*Chemical analysis applied to the industry, environment and agroalimentary products*". In this research line we develop fast and clean analytical methodologies that allow the determination of pesticides in agroalimentary and environmental samples. Following this research line, the main objective of this Thesis has been the development of new analytical methods for the analysis of pesticides by capillary electrophoresis. The main objective covers the following more concrete goals:

- To increase the sensitivity and selectivity of CE methodologies, by developing more economical and clean preconcentration techniques as, for instance, solid-phase microextraction (SPME) or solid-phase extraction (SPE), for the analysis of pesticides in different sample of environmental interest.
- To investigate different on-line preconcentration strategies to increase the sensitivity obtained by CE.
- To study the use of different detectors (UV, MS) for the capillary electrophoresis determination of different groups of pesticides.
- To develop different mathematical tools, like experimental designs, to optimize either the separation conditions or sample pretreatment procedures.
- To validate the analytical methodologies developed in terms of reproducibility and quantitative capability.
- To apply the different developed methodologies for the quantitative analysis of pesticides in different agroalimentary and environmental samples.

Chapter III. Materials and methods

This chapter describes the experimental part of this Doctoral Thesis, including reagents and chemicals, samples, instrumentation and sample pretreatment procedures.

Chapter IV. Results and discussion

Section IV.1 Highly sensitive analysis of multiple pesticides in foods combining solid-phase microextraction, capillary electrophoresis-mass spectrometry, and chemometrics.

It is generally recognized that mass spectrometry (MS) constitutes an attractive detection method for pesticides due to the high specificity, low limits of detection and structural information that can provide (Richardson, 2001). Thus, the coupling of CE with

MS using electrospray ionization (ESI) has given rise to a powerful analytical technique able to combine the advantages of these procedures (Olivares et al., 1987; Brocke et al., 2001; Tomer, 2001). CE-MS was first applied to the analysis of pesticides by Lee et al. in 1989 and since then, several groups of pesticides (e.g. acidic herbicides, triazines, ammonium quaternary herbicides) have been determined by CE-MS (Moyano et al., 1996; Song y Budde, 1998, Tsai et al., 1998; Rodríguez et al., 2003).

SPME, first applied to pesticides analysis in 1994 (Eisert et al., 1994; Popp et al., 1994), has been on-line coupled with CE several times (Nguyen and Luong, 1997; Wang and Pawliszyn, 1998), but such coupling is still a non-resolved problem and, as a result, SPME-CE analyses are usually carried out employing the off-line mode (Li and Weber, 1997; Fan and Deng, 2002; Rodríguez et al., 2003). Concerning pesticide analysis, to our knowledge, off-line SPME together with CE-ESI-MS has only been applied once (Rodríguez et al., 2003).

One of the main drawbacks of the combined use of SPME and CE-ESI-MS is that many different parameters have to be optimized until adequate analytical conditions are achieved. On one hand, during the optimization of any SPME protocol, parameters such as type of fiber, temperature, time, salt content, etc., have to be taken into account. Moreover, many of these parameters apply to both the adsorption and desorption step. On the other hand, the application of CE-ESI-MS is limited by the use of volatile buffers (Cai and Henion, 1995; Huber et al., 1999; Iavarone et al., 2001) because the presence of non-volatile components into the CE separation buffer decreases the sensitivity, increases the background noise and, under extreme conditions, can clog the system (Niessen et al., 1993; Smith et al., 1993; Huber et al., 1999; Ross, 2001). Apart from the composition of the buffer, several other factors need to be optimized, as for instance sheath liquid composition, nebulizer gas pressure, dry gas temperature and dry gas flow, in order to achieve adequate MS signals.

The optimization strategies used up to now to improve ESI-MS signals and SPME procedures consist of a step-by-step approach even when the number of factors that can

play a role is too high. A step-by-step optimization is laborious and tedious because it normally requires a high number of experiments. Furthermore, and more importantly, it does not consider possible interactions between the factors or quadratic effects. A very useful approach is to take advantage of the use of chemometrics. The use of chemometrics (including experimental designs) brings about the possibility to vary each factor in a more programmed and coherent way, the results obtained can be interpreted following a more rational and fruitful approach and optimum analytical conditions can be reached faster than with a step-by-step method. Following this idea, Rudaz et al. (2001) employed an experimental design to optimize the separation of enantiomers using partial filling techniques and CE-MS. However, since this work involved the enantioseparation of standards (i.e., R- and S-methadone) no sensitivity problems were addressed and, as a consequence, of the many ESI-MS parameters implicated only the drying gas nebulization pressure was included into that experimental design.

The goal of our first work was the development of a highly sensitive procedure to detect multiple pesticides at trace levels in foods. Initially a comparative study between capillary electrophoresis (CE)-UV and CE-mass spectrometry (MS) is carried out analyzing five pesticides not studied up to now (pyrimethanil, pyrifenoxy, cyprodinil, cyromazine and pirimicarb). Cyromazine and pirimicarb are insecticides commonly used in fruits, vegetables and ornamentals (pirimicarb is also used in crops). Pyrifenoxy, cyprodinil and pyrimethanil are fungicides also frequently used in fruits, vegetables and ornamentals (cyprodinil is also used in crops and pyrimethanil in vines). MRLs values for these pesticides in the European Union range between 0.05 and 15 mg/kg. Pyrimethanil has been analyzed in green groceries (grapes, strawberries, tomatoes and ketchup) by Navalon et al. (2002) and in grape skin and pulp (Teixeira et al., 2004). Pyrifenoxy has also been analyzed in oranges and strawberries (Soler et al., 2004), cyprodinil together with fludioxinil have been analyzed in white wines (Rial Otero et al., 2002) and pirimicarb in water samples (Nogueira et al., 2004).

The comparison between CE-UV and CE-MS is established in terms of separation efficiency, speed of analysis, reproducibility and sensitivity. A good separation

of these compounds is achieved by both techniques using a volatile aqueous buffer containing 0.3 M ammonium acetate/acetic acid at pH 4. Time analysis reproducibility is studied for the same day (n=5) and on three different days (n=15), showing no significant differences between CE-UV and CE-MS. The study on peak areas reproducibility shows a slightly worse reproducibility for CE-MS compared with CE-UV. The best limit of detection (LOD) that can be achieved for these pesticides using CE-UV was 0.6 µg/ml. CE-MS provides LODs one order of magnitude better than CE-UV. Chemometrics are used to optimize the multiple parameters that play a role in SPME and CE-MS analysis (e.g., extraction and desorption times, nebulizer pressure, dry gas flow, dry gas temperature, percentage of organic solvent and acid in the sheath liquid, etc). The combined use of chemometrics and SPME-CE-MS clearly improves the LODs that can be achieved allowing the detection of pesticides at concentrations down to 15 ng/ml. The usefulness of this approach is demonstrated detecting these pesticides in grapes and orange juices. The concentrations detected are below the maximum residue limits (MRLs) permitted for these pesticides in foods corroborating the value of our approach. This work demonstrates, for the first time, the good possibilities of the combined use of SPME-CE-MS and chemometrics.

Section IV.2 Combining solid-phase microextraction and on-line preconcentration-capillary electrophoresis for sensitive analysis of pesticides in foods.

The usefulness of sample stacking techniques for pesticides analysis has already been demonstrated by several authors (Núñez et al., 2001, 2002b, 2002c; Rodríguez et al., 2002; Carabias Martínez et al., 2003b). The simplest stacking mode consists on the hydrodynamic injection of large amounts of sample with electrical conductivity lower than that of the separation buffer (*normal stacking mode*, NSM). The use of organic solvents for this purpose can improve considerably the sensitivity. Another variation of this technique is the so-called *stacking with matrix removal* in which the capillary is also filled with the sample previously dissolved in a low conductivity matrix. The use of this method for the analysis of cationic species requires an anodal EOF, which can be achieved

modifying the capillary wall by adding cationic surfactants such as CTAC or CTAB to the BGE. This technique, called *reverse polarity-stacking with matrix removal* (RP-SWMR), has recently been applied to the on-line preconcentration of quaternary ammonium salts (Núñez et al., 2001, 2002b) and thiabendazole and procymidone (Rodríguez et al., 2002). *Field-enhancement sample injection* (FESI) constitutes another procedure for on-line sample stacking, which has also been applied for the analysis of pesticides (Tegeler and El Rassi, 1999; Turiel et al., 2000; Aturki et al., 2001).

In the previous section, detection of cyromazine, pyrifenoxy, pirimicarb, cyprodinil and pyrimethanil in fruit juices at concentrations down to 0.04 mg/l, that is, below their MRLs, was developed by using SPME followed by CE-MS. However, it is evident that CE-MS is an expensive technique not available for most analytical laboratories and, therefore, the goal of our second work was the development of a new and more affordable CE protocol to analyze these pesticides with an adequate sensitivity. To do this, the combined use of SPME and different on-line preconcentration strategies for ultrasensitive CE-UV analysis of five pesticides in a single run is investigated in this work. NSM, FESI and SWMR are explored to increase the sensitivity of the CE-UV analysis of a selected group of pesticides (cyprodinil, cyromazine, pyrifenoxy, pirimicarb and pyrimethanil). It could be observed that RP-SWMR provided the best results in terms of sensitivity (enhancement was up to 272 fold compared with normal injection). The separation buffer consisted of 0.4 mM cetyltrimethylammonium chloride, 0.4 M acetic acid at pH 4 containing 5% of 2-propanol (v/v). This approach was then combined with SPME to determine the pesticides in water, apple and orange juice. The combination of both preconcentration procedures allowed the determination of these pesticides at concentrations down to 2.5 µg/l in water and 3.1 µg/l in juices (i.e., levels well below the maximum residue limits allowed for these compounds). To our knowledge, this is the first report showing the great possibilities of the combined use of SPME, on-line sample preconcentration and CE for pesticide analysis.

Section IV.3 Determination of herbicides in mineral and stagnant waters at ng/l levels using capillary electrophoresis and UV detection combined with solid-phase extraction and sample stacking.

Certain herbicides are post-emergence products which are foliage-applied to control weeds that have emerged in competition with the developing crop. However, many of these herbicides still show residual activity in the soil and therefore they can control late-germination weeds. These types of herbicides together with pre-emergent ones are mostly applied to soils or sprayed over crops and, as a result of their large production and high stability, they can enter as pollutants into rivers, streams or lakes directly from drainage of agricultural lands. Less than 0.1% of applied pesticides actually reach the targeted pests, while the rest (99.9%) has the potential to move into other parts of the environment, including ground and surface waters (Younos et al., 1989). Since water is the primary stream in which pesticides are transported, the need for monitoring herbicides in natural waters is essential for achieving good water quality. Moreover, in most European countries and in the USA, groundwater is the major source of drinking water (Leistra and Boesten, 1989).

Triazolopyrimidine sulfonanilide herbicides include cloransulam-methyl, metosulam, flumetsulam, florasulam and diclosulam (The e-Pesticide manual, 2001), which are frequently used as pre-emergence and/or post-emergence herbicides in soybeans, peanuts, etc. in different countries. Its mode of action is through the inhibition of acetolactate synthase (ALS). Cloransulam-methyl, for example, is a broadspectrum herbicide, applied to the soil surface or incorporated in pre-emergence and post-emergence in soybeans to control broadleaf weeds (Felix et al., 2002). This herbicide, together with diclosulam and flumetsulam, which has been detected in Midwestern US rivers (Battaglin et al., 2000; Furlong et al., 2000), is frequently used in US and registered by the US Environmental Protection Agency (EPA) (<http://www.epa.gov>). Cloransulam-methyl is likely of slight persistence in the surface, but more persistent when leached into the subsurface. Florasulam, however, is also registered by the European Union (EU Commission Directive 2003/60/EC), which recommends paying particular attention to the

potential of groundwater contamination when florasulam is applied in regions with vulnerable soils and/or specific climatic conditions. Metosulam, indeed, is registered and used in several countries around the world. To our knowledge, there is not an EPA-method allowing the simultaneous determination of these pesticides in waters. Moreover, due to their polar nature and ionic character triazolopyrimidine sulfoanilide pesticides are suitable for their determination by capillary electrophoresis.

In this third work we investigate the combined use of SPE and on-line preconcentration strategies as NSM and SWMR for the ultrasensitive and simultaneous CE-UV analysis of five triazolopyrimidine sulfonanilide pesticides (i.e., diclosulam, cloransulam-methyl, flumetsulam, metosulam and florasulam) in different types of water. An adequate separation electrolyte for the separation and stacking of these pesticides was found, considering also its compatibility with MS detection, which consisted of 24 mM formic acid and 16 mM ammonium carbonate at pH 6.4. It was observed that the use of this running buffer together with the SWMR preconcentration method provided the best results in terms of sensitivity (between 6.54 and 11.9 $\mu\text{g/l}$) and peak efficiency (up to 550000 number of theoretical plates/). When this on-line preconcentration procedure was combined with an off-line sample preconcentration step as SPE using C_{18} cartridges, the selected herbicides could be detected in the ng/l range. The optimized SPE-SWMR-CE-UV method was applied to the determination of the selected group of pesticides in spiked and non-spiked mineral and stagnant waters. Recoveries ranged between 55 and 110% and LODs between 131 and 342 ng/l . This work shows the great possibilities of the combined use of SPE-SWMR-CE-UV to overcome the sensitivity problems usually linked to CE analysis.

Section IV.4 Analysis of pesticides in soy milk combining solid-phase extraction and capillary electrophoresis-mass spectrometry.

In spite of the frequent use of multiple triazolopyrimidine herbicides for weed management, these compounds have mostly been analyzed individually by different techniques. Thus, ELISA has been applied to detect metosulam (Parnell and Hall, 1998),

HPLC to analyze cloransulam-methyl (Krieger et al., 2000), MS to analyze florasulam (Jackson et al., 2000), GC-MS for flumetsulam (Rouchaud et al., 22) and radiometric procedures to determine marked diclosulam (Zabik et al., 2001). To our knowledge, only one analytical procedure has been developed so far for the simultaneous analysis of these pesticides by using SPE-CE-UV which has been described in the previous section. This SPE-CE-UV procedure provides good results when applied to their determination in different water samples, including tap and stagnant water.

Since this group of pesticides is frequently used in soybean crops, they could obviously be present in soy milk, a beverage more frequently consumed today. When the SPE-CE-UV optimized in the previous section was applied to soy milk, a huge number of interfering peaks were observed that precluded the determination of this group of pesticides by CE-UV. Therefore, another detection system as MS should be more appropriate for this purpose.

In this fourth work, we address the determination of a group of triazolopyrimidine sulfoanilide herbicides (cloransulam-methyl, metosulam, flumetsulam, florasulam and diclosulam) in soy milk by CE-MS. The main ESI parameters (nebulizer pressure, dry gas flow rate, dry gas temperature and composition of the sheath liquid) are optimized using a central composite design. To increase the sensitivity of the CE-MS method, an off-line sample preconcentration procedure based on SPE is combined with an on-line stacking procedure (i.e. NSM). Samples could be injected up to 100 seconds, providing LODs down to 74 $\mu\text{g/l}$, i.e., in the low ppb level, with relative standard deviation values between 3.8% and 6.4% for peak areas for the same day, and between 6.5% and 8.1% for three different days. The usefulness of the optimized SPE-NSM-CE-MS procedure is demonstrated through the sensitive quantification of the selected pesticides in soy milk samples.

Section IV.5 Analysis of triazolopyrimidine herbicides in soils using field enhancement sample injection-coelectroosmotic capillary electrophoresis combined with solid phase extraction.

Concerning environmental analysis, soils constitute one of the samples of major interest and complexity, especially for pesticide analysis. As a result, determination of pesticides and their degradation products in soils is mainly carried out by GC or HPLC (e.g., Andreu and Pico 2004). Although CE has also been used to determine pesticides in soils, there is a very low number of articles concerning this topic. As an example, sulphonylureas (Dinelli et al., 1995; Penmetsa et al., 1997b; Menne et al., 1999), phenoxyacids (Garrison et al., 1994; Desiderio et al., 1997) and quats (Stransky, 1985) have been determined in soils by CE. To our knowledge, there is not any analytical method developed for the simultaneous determination of triazolopyrimidine sulfoanilide pesticides in soil samples.

In this fifth work, we develop a combined methodology using off-line SPE, on-line FESI and coelectroosmotic CE with UV detection for the sensitive analysis of five triazolopyrimidine sulfonamide pesticides (i.e., flumetsulam, florasulam, clorasulam-methyl, diclosulam and metosulam) in soils. An adequate BGE was obtained for the separation of these pesticides using HDB as EOF modifier. This BGE consisted of 0.00042% HDB, 11 mM formic acid, 16 mM ammonium carbonate and 2.5 mM α -CD at pH 7.6. The use of this running buffer together with the FESI preconcentration method provided LODs between 13.0 and 31.5 μ g/l. The optimized FESI-CE-UV method was combined with off-line SPE using C_{18} cartridges and applied to the determination of the selected group of pesticides in soil samples. Recoveries percentages ranged between 50 and 84% with LODs between 18 and 34 μ g/kg. This work shows the great possibilities of the combined use of SPE-FESI-CE-UV to improve CE sensitivity allowing the achievement of LODs similar to other analytical techniques as GC or HPLC (Andreu and Picó, 2004).

Chapter V. Conclusions.

In this PhD Thesis, the following general conclusions can be established:

1. Several analytical methodologies have been developed for the analysis of different groups of pesticides in fruit juices, mineral and stagnant waters, soy milk and soils.
2. These new methods combine the use of capillary electrophoresis with on-line preconcentration techniques (NSM, SWMR o FESI) and off-line preconcentration procedures (SPE o SPME), with ultraviolet-visible and mass spectrometry detection. The combination of all these techniques allowed achieving detection limits in the ng/l or ng/g range.
3. It has been demonstrated that capillary electrophoresis-mass spectrometry coupling is very useful for the determination of these new groups of pesticides in real samples.
4. The potential of the use of experimental design for the optimization of both extraction and desorption SPME conditions, as well as electrospray nebulization conditons has been shown.
5. The developed methodologies have been validated by carrying out the consequent studies under optimum conditions. Analytical figures of merit provided by each method were highly acceptable.

Anexo

Directrices y normativas publicadas hasta el momento por la Unión Europea en materia de pesticidas.

Commission Decision 2004/432/EC of 29 April 2004 on the approval of residue monitoring plans submitted by third countries in accordance with Council Directive 96/23/EC (notified under document number C(2004) 1624) (Text with EEA relevance) (2004/432/EC).

Commission Directive 2004/95/EC of 24 September 2004 amending Council Directive 90/642/EEC as regards the maximum residues levels of bifenthrin and famoxadone fixed therein (Text with EEA relevance).

Commission Directive 2004/2/EC of 9 January 2004 amending Council Directives 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC as regards maximum residue levels for fenamiphos (Text with EEA relevance).

Commission Directive 2004/61/EC of 26 April 2004 amending the Annexes to Council Directives 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC as regards maximum residue levels for certain pesticides prohibited for use in the European Community (Text with EEA relevance).

Commission Directive 2004/59/EC of 23 April 2004 amending Council Directive 90/642/EEC as regards the maximum levels for bromopropylate residues fixed therein (Text with EEA relevance).

Commission Directive 2003/69/EC of 11 July 2003 amending the Annex to Council Directive 90/642/EEC as regards maximum residue levels for chlormequat, lambda-cyhalothrin, kresoxim-methyl, azoxystrobin and certain dithiocarbamates.

Commission Directive 2003/62/EC of 20 June 2003 amending Council Directives 86/362/EEC and 90/642/EEC in respect of maximum residue levels for hexaconazole, clofentezine, myclobutanil and prochloraz.

Commission Directive 2003/60/EC of 18 June 2003 amending the Annexes to Council Directives 76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC as regards the fixing of maximum levels for certain pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables.

Commission Directive 2002/100/EC of 20 December 2002 amending Council Directive 90/642/EEC in respect of maximum residue levels for azoxystrobin.

Commission Directive 2002/97/EC of 16 December 2002 amending the Annexes to Council Directives 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC as regards the fixing of maximum levels for pesticide residues (2,4-D, triasulfuron and thifensulfuron methyl) in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables (Text with EEA relevance).

Commission Directive 2002/79/EC of 2 October 2002 amending the Annexes to Council Directives 76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC as regards the fixing of maximum levels for certain pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables.

Commission Directive 2002/76/EC of 6 September 2002 amending the Annexes to Council Directives 86/362/EEC and 90/642/EEC as regards the fixing of maximum levels for pesticide residues (metsulfuron methyl) in and on cereals and certain products of plant origin, including fruit and vegetables.

Commission Recommendation 2002/663/EC of 19 August 2002 concerning a coordinated Community monitoring programme for 2003 to ensure compliance with maximum levels of pesticide residues in and on cereals and certain other products of plant origin (Text with EEA relevance) (notified under document number C(2002) 3084).

Commission Directive 2002/71/EC of 19 August 2002 amending the Annexes to Council Directives 76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC as regards the fixing of maximum levels for pesticide residues (formothion, dimethoate and oxydemeton-methyl) in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables.

Commission Directive 2002/66/EC of 16 July 2002 amending the Annexes to Council Directives 76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC as regards the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on fruit and vegetables, cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables respectively.

Commission Directive 2002/63/EC of 11 July 2002 establishing Community methods of sampling for the official control of pesticide residues in and on products of

plant and animal origin and repealing Directive 79/700/EEC.

Commission Directive 2002/42/EC of 17 May 2002 amending the Annexes to Council Directives 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC as regards the fixing of maximum levels for pesticide residues (bentazone and pyridate) in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables.

Commission Directive 2002/23/EC of 26 February 2002 amending the Annexes to Council Directives 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC as regards the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables respectively.

Commission Directive 2002/5/EC of 30 January 2002 amending Annex II to Council Directive 90/642/EEC as regards the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on certain products of plant origin, including fruit and vegetables.

Commission Recommendation 2002/1/EC of 27 December 2001 concerning a coordinated Community monitoring programme for 2002 to ensure compliance with maximum levels of pesticide residues in and on cereals and certain other products of plant origin (Text with EEA relevance) (notified under document number C(2001) 3771).

Commission Directive 2001/57/EC of 25 July 2001 amending the Annexes to Council Directives 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables respectively (Text with EEA relevance).

Commission Directive 2001/48/EC of 28 June 2001 amending the Annexes to Council Directives 86/362/EEC and 90/642/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals and certain products of plant origin, including fruit and vegetables respectively.

Commission Directive 2001/39/EC of 23 May 2001 amending the Annexes to Council Directives 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables respectively.

Commission Directive 2001/35/EC of 11 May 2001 amending the Annexes to

Council Directive 90/642/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on certain products of plant origin, including fruit and vegetables.

Commission Recommendation 2001/42/EC of 22 December 2000 concerning a coordinated Community monitoring programme for 2001 to ensure compliance with maximum levels of pesticide residues in and on cereals and certain products of plant origin, including fruit and vegetables (Text with EEA relevance) (notified under document number C(2000) 4096).

Commission Directive 2000/82/EC of 20 December 2000 amending the Annexes to Council Directives 76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on fruit and vegetables, cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables respectively.

Directive 2000/48/EC of 25 July 2000 amending the Annexes to Council Directives 86/362/EEC and 90/642/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals and certain products of plant origin, including fruit and vegetables respectively (Text with EEA relevance).

Commission Directive 2000/24/EC of 28 April 2000 amending the Annexes to Council Directive 76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables respectively.

Commission Regulation (EC) No 645/2000 of 28 March 2000 setting out detailed implementing rules necessary for the proper functioning of certain provisions of Article 7 of Council Directive 86/362/EEC and of Article 4 of Council Directive 90/642/EEC concerning the arrangements for monitoring the maximum levels of pesticide residues in and on cereals and products of plant origin, including fruit and vegetables, respectively.

Commission Recommendation 2000/43/EC of 17 December 1999 concerning a coordinated Community monitoring programme for 2000 to ensure compliance with maximum levels of pesticide residues in and on cereals and certain products of plant origin, including fruit and vegetables (notified under document number C(1999) 4491) (Text with EEA relevance).

Commission Directive 1999/71/EC of 14 July 1999 amending the Annexes to

Council Directives 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables respectively (Text with EEA relevance).

Commission Directive 1999/65/EC of 24 June 1999 amending Council Directives 86/362/EEC and 90/642/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals and certain products of plant origin including fruit and vegetables respectively (Text with EEA relevance).

Commission Recommendation of 3 March 1999 concerning a coordinated Community monitoring programme for 1999 to ensure compliance with maximum levels of pesticide residues in and on cereals and certain products of plant origin, including fruit and vegetables (notified under document number C(1999) 478) (Text with EEA relevance).

Commission Directive 98/82/EC of 27 October 1998 amending the Annexes to Council Directives 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables respectively (Text with EEA relevance).

Commission Directive 97/71/EC of 15 December 1997 amending the Annexes to Council Directives 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables respectively (Text with EEA relevance).

Commission Recommendation 97/822/EC of 3 November 1997 concerning a coordinated Community monitoring programme for 1998 to ensure compliance with maximum levels of pesticide residues in and on certain products of plant origin, including fruit and vegetables.

Council Directive 97/41/EC of 25 June 1997 amending Directives 76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC relating to the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on, respectively, fruit and vegetables, cereals, foodstuffs of animal origin, and certain products of plant origin, including fruit and vegetables.

Council Directive 96/33/EC of 21 May 1996 amending the Annexes to Directives 86/362/EEC and 86/363/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals and foodstuffs of animal origin respectively.

Council Directive 96/32/EC of 21 May 1996 amending Annex II to Directive 76/895/EEC relating to the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on fruit and vegetables and Annex II to Directive 90/642/EEC relating to the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on certain products of plant origin, including fruit and vegetables, and providing for the establishment of a list of maximum levels.

Council Directive 95/61/EC of 29 November 1995 amending Annex II to Directive 90/642/EEC relating to the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on certain products of plant origin, including fruit and vegetables.

Council Directive 95/39/EC of 17 July 1995 amending the Annexes to Directives 86/362/EEC and 86/363/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals and foodstuffs of animal origin.

Council Directive 95/38/EC of 17 July 1995 amending Annexes I and II to Directive 90/642/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on certain products of plant origin, including fruit and vegetables, and providing for the establishment of a list of maximum levels.

Corrigendum to: 95/38/EC - Official Journal L 155, 28/06/1996.

Council Directive 94/30/EC of 23 June 1994 amending Annex II to Directive 90/642/EEC relating to the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on certain products of plant origin, including fruit and vegetables and providing for the establishment of a list of maximum levels.

Council Directive 94/29/EC of 23 June 1994 amending the Annexes to Directives 86/362/EEC and 86/363/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals and foodstuffs of animal origin respectively.

Council Directive 93/58/EEC of 29 June 1993 amending Annex II to Directive 76/895/EEC relating to the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on fruit and vegetables and the Annex to Directive 90/642/EEC relating to the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on certain products of plant origin, including fruit and vegetables, and providing for the establishment of a first list of maximum levels.

Council Directive 93/57/EEC of 29 June 1993 amending the Annexes to Directives 86/362/EEC and 86/363/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals and foodstuffs of animal origin respectively.

Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market.

Council Directive 90/642/EC of 27 November 1990 - Pesticides MRLs - Plant origin.

Council Directive 89/186/EEC of 6 March 1989 amending Annex II to Directive 76/895/EEC relating to the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on fruit and vegetables.

Council Directive 88/298/EEC of 16 May 1988 amending Annex II to Directives 76/895/EEC and 86/362/EEC relating to the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on fruit and vegetables and cereals respectively.

Council Directive 86/362/EEC of 24 July 1986 - Pesticides MRLs – Cereals.

Council Directive 86/363/EEC of 24 July 1986 - Pesticides MRLs - Animal origin.

Council Directive 82/528/EEC of 19 July 1982 amending Annex II to Directive 76/895/EEC relating to the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on fruit and vegetables.

Council Directive 81/36/EEC of 9 February 1981 amending Annex II to Directive 76/895/EEC relating to the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on fruit and vegetables.

Commission Directive 80/428/EEC of 28 March 1980 amending Annex II to Council Directive 76/895/EEC relating to the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on fruit and vegetables.

Commission Directive 79/700/EEC of 24 July 1979 establishing Community methods of sampling for the official control of pesticide residues in and on fruit and vegetables.

Council Directive 76/895/EEC of 23 November 1976 - Pesticides MRLs - Selected fruit and Vegetables.

Referencias bibliográficas

- Ahmed, F.E., (2001). *Trends Anal. Chem.*, **20**, 649.
- Álvarez-Llamas, G., Fernández de la Campa, M.R., Sanz-Medel, A., (2005). *Trends Anal. Chem.*, **24**, 28.
- Andreu, V., Picó, Y., (2004). *Trends Anal. Chem.*, **23**, 772.
- Arce, L., Ríos, A., Valcárcel, M., (1997). *J. Chromatogr. A*, **791**, 279.
- Arthur, C.L., Killam, L.M., Bucholz, K.D., Pawliszyn, J., (1992). *Anal. Chem.*, **64**, 1960.
- Arthur, C.L., Pawliszyn, J., (1990). *Anal. Chem.*, **62**, 2145.
- Asthana, A., Bose, D., Durgbanshi, A., Sanghi, S.K., Kok, W.Th., (2000). *J. Chromatogr. A*, **895**, 197.
- Aturki, Z., Desiderio, C., Polcaro, C., (2001). *Chromatographia*, **54**, 489.
- Banks, J.F., (1997). *Electrophoresis*, **18**, 2255.
- Barr, D.B., Needham, L.L., (2002). *J. Chromatogr. B*, **778**, 5.
- Bateman, K.P., White, R.L., Thibault, P., (1997). *Rapid Commun. Mass Sepctrom.*, **11**, 307.
- Battaglin, W.A., Furlong, E.T., Burkhardt, M.R., Meter, C.J., (2000). *Sci. Total Environ.*, **248**, 123.
- Beale, S.C., Sudmeier, S.J., (1995). *Anal. Chem.*, **67**, 3367.
- Beltran, J., López, F.J., Hernández, F., (2000). *J. Chromatogr. A*, **885**, 389.
- Berrada, H., Font, G., Montó, J.C., (2003). *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **33**, 19.
- Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., Sgorbini, B., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1024**, 217.
- Boeckelen, A., Niessner, R., (1993). *Fresenius J. Anal. Chem.*, **346**, 435.
- Box, G.E.P., Behnken, D.W., (1960). *Technometrics*, **2**, 455.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, S.J., (1978). *Statistics for experiments*. Wiley, Nueva York.

- Box, G.E.P., Wilson, K.B., (1951). *J. Roy. Stat. Soc.*, **13**, 1.
- Box, J.F., (1978). R.A. Fisher: The life of a scientist. Wiley, Nueva York.
- Britz-McKibbin, P., Terabe, S., (2003). *J. Chromatogr. A*, **1000**, 917.
- Britz-McKibbin, P., Chen, D.Y., (2000). *Anal. Chem.*, **72**, 1242.
- Brocke, A., Nicholson, G., Bayer, E., (2001). *Electrophoresis*, **22**, 1251.
- Bruzzonoti, M.C., Sarzanini, C., Mentasti, E., (2000). *J. Chromatogr. A*, **902**, 289.
- Burnham, A.K., Calder, G.V., Fritz, J.S., Junk, G.A., Svec, H.J., Willis, R., (1972). *Anal. Chem.*, **44**, 139.
- Butler, L.D., Burke, F.M., (1976). *J. Chromatogr. Sci.*, **14**, 117.
- Cai, J., El Rassi, Z., (1992). *J. Liq. Chromatogr.*, **15**, 1179.
- Cai, J., Henion, J., (1995). *J. Chromatogr. A*, **703**, 667.
- Cai, L., Xing, J., Dong, L., Wu, C., (2003). *J. Chromatogr. A*, **1015**, 11.
- Calvo-Seronero, L., Fernández-Laespada, M.E., Pérez-Pavón, J.L., Moreno-Cordero, B., (2000). *J. Chromatogr. A*, **897**, 171.
- Cao, P., Moini, M., (1997). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **8**, 561.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Domínguez-Álvarez, J., Hernández-Méndez, J., (1999). *Anal. Chem.*, **71**, 2468.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Domínguez-Álvarez, J., Hernández-Méndez, J., (2000a). *J. Chromatogr. A*, **869**, 451.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Moreno-Cordero, B., Pérez-Pavón, J.L., García-Pinto, C., Fernández-Laespada, E., (2000b). *J. Chromatogr. A*, **902**, 251.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Domínguez-Álvarez, J., Hernández-Méndez, J., (2002). *Electrophoresis*, **23**, 494.

- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Domínguez-Álvarez, J., Pinto, C.G., Hernández-Méndez, J., (2003a). *J. Chromatogr. A*, **1005**, 23.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., Domínguez-Álvarez, J., (2003b). *J. Chromatogr. A*, **990**, 291.
- Carneiro, M.C., Puignou, L., Galcerán, M.T., (2000). *Anal. Chim. Acta*, **408**, 263.
- Casanova, M., (1983). Résidus de pesticides dans les denrées alimentaires. Les produits antiparasitaires à usage agricole. Ed. Lavoisier, París.
- Casero, I., Sicilia, D., Rubio, S., Pérez-Bendito, D., (1991). *Anal. Chem.*, **71**, 4519.
- Cela, R., Blanco, M., Boqué, R., Coello, J., Maspoch, S., Ortiz, M.C., Riba, J., Rius, F.X., Ruíz, A., Sarabia, L.A., Tomás, X. (1994). Avances en quimiometría práctica. Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de Publicación e Intercambio Científico.
- Cela, R., Lorenzo, R.A., Casais, M.C., (2002). Técnicas de separación en química analítica. Ed. Síntesis, Madrid.
- Chang, S.Y., Liao, C.H., (2002). *J. Chromatogr. A*, **959**, 309.
- Chang, S.Y., Wang, F.Y., (2004). *J. Chromatogr. B*, **799**, 265.
- Chao, W.Y., Shang-Da, H., (1998). *Anal. Chim. Acta*, **373**, 197.
- Chao, H.C., Hanson, J.E., (2003). *J. Sep. Sci.*, **25**, 345.
- Cheng, Y.F., Dovichi, N.J., (1988). *Science*, **242**, 562.
- Chicharro, M., Zarpadiel, A., Bermejo, E., Sánchez, A., (2002). *Anal. Chim. Acta*, **469**, 243.
- Chien, R.L., (2003). *Electrophoresis*, **24**, 486.
- Chien, R.L., Burgi, D.S., (1991). *J. Chromatogr.*, **559**, 141.
- Chien, R.L., Burgi, D.S., (1992). *Anal. Chem.*, **64**, 1046.
- Chong, S.L., Wang, D., Hayes, J.D., Malik, A., (1997). *Anal. Chem.*, **69**, 3889.

- Cifuentes, A., Rodríguez, M.A., García-Montelongo, F.J., (1996). *J. Chromatogr. A*, **737**, 243.
- Cochran, W.G., (1947). *Biometrics*, **3**, 22.
- Cochran, W.G., Cox, G.M., (1957). *Experimental designs*. Wiley, Nueva York.
- Cohen, A.S., Karger, B.L., (1987). *J. Chromatogr. A*, **397**, 409.
- Cortacero-Ramírez, S., Hernáinz-Bermúdez de Castro, M., Segura-Carretero, A., Cruces-Blanco, C., Fernández-Gutiérrez, A., (2003). *Trends Anal. Chem.*, **22**, 440.
- Costa, L.G., Galli, C.L., Murphy, S.D., (1987). *Toxicology of pesticides: Experimental, clinical and regulatory perspectives*. Springer-Verlag, Berlín.
- Dabek-Zlotorzunska, E., Aranda-Rodríguez, R., Keppel-Jones, K., (2001). *Electrophoresis*, **22**, 4262.
- Da Silva, C.L., de Lima, E.C., Tavares, M.F.M., (2003). *J. Chromatogr. A*, **1014**, 109.
- Davis, B.J., (1964). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404.
- Dean, J.R., Wade, G., Barnabas, I.J., (1996). *J. Chromatogr. A*, **733**, 295.
- De Fátima Alpendurada, M., (2000). *J. Chromatogr. A*, **889**, 3.
- DeGiorgio, V., Piazza, R., Corti, M., Minero, C., (1984). *J. Chem. Phys.*, **82**, 1025.
- Desiderio, C., Polcaro, C.M., Padglioni, P., Fanali, S., (1997). *J. Chromatogr. A*, **781**, 503.
- Dinelli, G., Vicari, A., Brandolini, V., (1995). *J. Chromatogr. A*, **700**, 201.
- Dole, M., Hines, R.L., Mack, R.C., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., Alice, M.B., (1968). *J. Chem. Phys.*, **49**, 2240.
- Doong, R.A., Chang, S.M., Sun, Y.C., (2000). *J. Chromatogr. Sci.*, **38**, 528.
- Doong, R.A., Liao, P.L., (2001). *J. Chromatogr. A*, **918**, 177.
- Dzygiel, P., Wieczorek, P., (2000). *J. Chromatogr. A*, **889**, 93.

-
- Eash, D.T., Bushway, R.J., (2000). *J. Chromatogr. A*, **880**, 281.
 - Edmonds, C.G., Loo, J.A., Barinaga, C.J., Udseth, H.R., Smith, R.D., (1989). *J. Chromatogr.*, **474**, 21.
 - Eiguren-Fernández, A., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., (1999). *Analyst*, **124**, 487.
 - Eisert, R., Levsen, K., Wünsch, G., (1994). *J. Chromatogr. A*, **683**, 175.
 - Eisert, R., Levsen, K., (1995). *Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **6**, 1119.
 - Eisert, R., Levsen, K., (1996). *J. Chromatogr. A*, **737**, 59.
 - EPA MRD Número 419521-07, DowElanco, Método de análisis de residuos.
 - EPA MRD Número 442315-02, DowElanco, Método de análisis de residuos GRM 95.10, Estudio RES95068.
 - EPA MRD Número 442315-03, DowElanco, Método de análisis de residuos GRM 96.04, Estudio RES96059.
 - EPA MRD Número 445878-03, Dow AgroSciences LLC, Método de análisis de residuos GRM 97.10, Estudio RES97118.
 - Evdokimov, E, van Wandruszka, R., (1998). *Anal. Lett.*, **31**, 2289.
 - Everaerts, F.M., Geurts, M., Mikkers, F.E.P., Verheggen, T.P.E.M., (1976). *J. Chromatogr.*, **119**, 129.
 - Fan, X., Deng, Y., (2002). *J. Chromatogr. A*, **979**, 417.
 - Fan, L., Zang, R., Williams, E.R., Zare, R.N., (1994). *Anal. Chem.*, **66**, 3696.
 - Farrán, A., Ruiz, S., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1024**, 267.
 - Félix, J., Doohan, D.J., Ditmarsen, S.C., Schultz, M.E., Wright, T.R., Flood, B.R., Rabaey, T.L., (2002). *Crop Prot.*, **21**, 763.
 - Fernández-Laespada, M.E., Pérez-Pavón, J.L., Moreno-Cordero, B., (1993). *Analyst*, **118**, 209.
 - Ferrer, R., Beltrán, J.L., Guiteras, J., (1996). *Anal. Chim. Acta*, **330**, 199.

- Figeys, D., Ducret, A., Aebersold, R., (1997). *J. Chromatogr. A*, **763**, 295.
- Frías, S., Sánchez, M.J., Rodríguez-Delgado, M.A., (2004a). *Anal. Chim. Acta*, **503**, 271.
- Frías-García, S., Sánchez, M.J., Rodríguez-Delgado, M.A., (2004b). *J. Sep. Sci.*, **27**, 660.
- Friedberg, M.A., Hinsdale, M., Shihabi, Z.K., (1997). *J. Chromatogr. A*, **781**, 35.
- Fritz, J.S., (1999). *Analytical solid-phase extraction*. Wiley-VCH, Nueva York.
- Furlong, E.T., Burkhardt, M.R., Gates, P.M., Werner, S.L., Battaglin, W.A., (2000). *Sci. Total Environ.*, **248**, 135.
- García, M.A., Díez-Masa, J.C., Marina, M.L., (1996). *J. Chromatogr. A*, **732**, 345.
- García-Campaña, A.M., Gámiz-Gracia, L., Baeyens, W.R.G., Alés-Barrero, F., (2003). *J. Chromatogr. B*, **793**, 49.
- García-Ruiz, C., Álvarez-Llamas, G., Puerta, A., Blanco, E., Sanz-Medel, A., Marina, M.L., (2005). *Anal. Chim. Acta*, **543**, 77.
- Garrison, A.W., Schmitt, P., Kettrup, A., (1994). *J. Chromatogr. A*, **668**, 317.
- Gaskell, S.J., (1997). *J. Mass Spectrom.*, **32**, 677.
- Gassman, E., Kuo, J.E., Zare, R.N., (1985). *Science*, **230**, 813.
- Gbatu, T.P., Ceylan, O., Sutton, K.L., Rubinson, J.F., Galal, A., Caruso, J.A., Mark Jr., H.B., (1999). *Anal. Commun.*, **36**, 203.
- Gelpi, E., (2002). *J. Mass Spectrom.*, **37**, 241.
- Gonçalves, C., Alpendurada, M.F., (2002). *J. Chromatogr. A*, **968**, 177.
- González-Barreiro, C., Lores, M., Casais, M.C., Cela, R., (2000). *J. Chromatogr. A*, **896**, 373.
- Goodwin, L., Startin, J.R., Keely, B.J., Goodall, D.M., (2003). *J. Chromatogr. A*, **1004**, 107.
- Green, J.S., Jorgenson, J.W., (1984). *J. High Resol. Chromatogr.*, **7**, 529.

- Groom, C.A., Halasz, A., Paquet, L., Thiboutot, S., Ampleman, G., Hawari, J., (2005). *J. Chromatogr. A*, **1072**, 73.
- Guan, F., Watanabe, K., Ishii, A., Seno, H., Kumazawa, T., Hattori, H., Suzuki, O., (1998). *J. Chromatogr. B*, **71**, 205.
- Guardiola, X., Obiols, J., Rosell, M.G., Farrán, A., Serra, C., (1998). *J. Chromatogr. A*, **823**, 91.
- Guttman, A., Cohen, A.S., Heiger, D.N., Karger, B.L., (1990). *Anal. Chem.*, **63**, 137.
- Guzmán, N.A., (2003). *Electrophoresis*, **24**, 3718.
- Hanglund, H., Tiselius, A., (1950). *Acta Chem. Scand.*, **4**, 957.
- Harvey, S.D., Nelson, D.A., Wright, B.W., Grate, J.W., (2002). *J. Chromatogr. A*, **954**, 217.
- Heegaard, N.H.H., Nilsson, S., Guzmán, N.A., (1998). *J. Chromatogr. B*, **715**, 29.
- Heegaard, N.H., Jakobsen, D.R., Klattschou, D., (1997). *Anal. Bioanal. Chem.*, **14**, 213.
- Hempel, G., (2000). *Electrophoresis*, **21**, 691.
- Hernández-Borges, J., Neusüb, C., Cifuentes, A., Pelzing, M., (2004). *Electrophoresis*, **25**, 2257.
- Hernández, M., Borrull, F., Calull, M., (2003). *Trends Anal. Chem.*, **22**, 416.
- Higashijima, T., Fuchigami, T., Imasaka, T., Ishibashi, N., (1991). *Anal. Chem.*, **64**, 711.
- Hinsmann, P., Arce, L., Ríos, A., Valcárcel, M., (2000). *J. Chromatogr. A*, **866**, 137.
- Hinze, W.L., Pramauro, E., (1993). *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **24**, 133.
- Hjertén, S., (1969). *Chromatogr. Rev.*, **9**, 122.
- Hjertén, S., Zhu, M., (1985). *J. Chromatogr.*, **346**, 265.
- Holland, R.D., Sepaniak, M.J., (1993). *Anal. Chem.*, **65**, 1140.
- Horstkotter, C., Kober, S., Spahn-Langguth, H., Mutschler, E., Blaschke, G., (2002). *J. Chromatogr.*

B, **769**, 107.

- <http://www.epa.gov>
- <http://www.fao.org>
- <http://www.hdrss.demon.co.uk>
- <http://www.iso.org>
- Huber, C.G., Premstaller, A., Kleindienst, G., (1999). *J. Chromatogr. A*, **849**, 175.
- Huikko, K., Kotiaho, T., Kostianen, R., (2002). *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1562.
- Iavarone, A.T., Jurchen, J.C., Williams, E.R., (2001). *Anal. Chem.*, **73**, 1455.
- Isaac, H.J., Janini, G.M., Chan, K.C., Veenstra, T.D., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1053**, 37.
- Jackson, R., Ghosh, D., Paterson, G., (2000). *Pest Manag. Sci.*, **56**, 1065.
- Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., (1981a). *J. Chromatogr.*, **218**, 209.
- Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., (1981b). *Anal. Chem.*, **53**, 1298.
- Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., (1983). *Science*, **222**, 266.
- Juan-García, A., Font, G., Picó, Y., (2005a). *Electrophoresis*, **26**, 1550.
- Juan-García, A., Picó, Y., Font, G., (2005b). *J. Chromatogr. A*, **1073**, 229.
- Jung, M., Brumley, W.C., (1995). *J. Chromatogr. A*, **717**, 299.
- Kabir, A., Hamlet, C., Yoo, K.S., Newkome, G.R., Malik, A., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1034**, 1.
- Kakehi, K., Susami, A., Taga, A., Suzuki, S., Honda, S., (1994). *J. Chromatogr. A*, **680**, 209.
- Kannamkumarath, S.S., Wrobel, K., Wrobel, K., B'Hymer, J., Caruso, J.A., (2002). *J. Chromatogr. A*, **975**, 245.

- Karcher, A., El Rassi, Z., (1997). *Electrophoresis*, **18**, 1173.
- Karcher, A., El Rassi, Z., (1999). *Electrophoresis*, **20**, 3280.
- Karcher, A., El Rassi, Z., (2000). *Electrophoresis*, **21**, 2043.
- Kataoka, H., Lord, H.L., Pawliszyn, J., (2000). *J. Chromatogr. A*, **880**, 35.
- Kellner, R., Mermet, J.M., Otto, M., Widmer, H.M., (1998). *Analytical chemistry*. Wiley-VCH, Nueva York.
- Kempthorne, O., (1952). *The design and analysis of experiments*. Wiley, Nueva York.
- Khaledi, M.G., (1998). *High Performance Capillary Electrophoresis*, Wiley, Nueva York.
- Kim, T.Y., Alhooshani, K., Kabir, A., Fries, D.P., Malik, A., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1047**, 165.
- Kim, J.B., Quirino, J.P., Otsuka, K., Terabe, S., (2001). *J. Chromatogr. A*, **916**, 123.
- Kim, J.B., Terabe, S., (2003). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1625.
- Knox, J.H., Grant, I.H., (1978). *Chromatographia*, **24**, 135.
- Koster, E.H.M., Crescenzi, C., den-Hoedt, W., Ensing, K., de-Jong, G.J., (2001). *Anal. Chem.*, **73**, 3140.
- Koziel, J.A., Jia, M.Y., Pawliszyn, J., (2000). *Anal. Chem.*, **72**, 5178.
- Krejčí, M., Roudná, M., Vavrouch, Z., (1974). *J. Chromatogr.*, **91**, 549.
- Krieger, M.S., Wynn, J.L., Yoder, R.N., (2000). *J. Chromatogr. A*, **897**, 405.
- Krieger, M.S., Cook, K.D., Ramsey, R.S., (1995). *Anal. Chem.*, **67**, 385.
- Khrolenko, M., Dzygiel, P., Wieczorek, P., (2002). *J. Chromatogr. A*, **975**, 219.
- Krough, M., Grefslie, H., Rasmussen, K.E., (1997). *J. Chromatogr. B*, **689**, 357.
- Krutz, L.J., Senseman, S.A., Sciumbato, A.S., (2003). *J. Chromatogr. A*, **999**, 103.

- Laganá, A., Fago, G., Marino, A., Penáis, V.M., (2000). *Anal. Chim. Acta*, **415**, 41.
- Lamoree, M.H., Sprang, A.F.H., Tjaden, U.R., vand der Greef, J., (1996). *J. Chromatogr. A*, **742**, 235.
- Lancas, F.M., Rissato, S.R., Galhiane, M.S., (1999). *Chromatographia*, **50**, 35.
- Lazar, I.M., Lee, M.L., (1999). *J. Microcol. Sep.*, **11**, 117.
- Lee, E.D., Mück, W., Henion, J.D., (1988) *J. Chromatogr.*, **458**, 313.
- Lee, E.D., Mück, W., Henion, J.D., Covey, T.R., (1989). *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **18**, 844.
- Lee, M.R., Lee, R.J., Lin, Y.W., Chen, C.M., Hwang, B.H., (1998a). *Anal. Chem.*, **70**, 1963.
- Lee, M.R., Yeh, Y.C., Hsiang, W.S., Hwang, B.H., (1998b). *J. Chromatogr. A*, **806**, 317.
- Leistra, M., Boesten, J.J.T.I., (1989). *Agric. Ecosyst. Environ.*, **26**, 369.
- Li, S., Weber, S.G., (1997). *Anal. Chem.*, **69**, 1217.
- Lin, Y.W., Chiu, T.C., Chang, H.T., (2003). *J. Chromatogr. B*, **793**, 37.
- Lin, C.E., Liu, Y.C., Yang, T.Y., Wang, T.Z., Yang, C.C., (2001). *J. Chromatogr. A*, **916**, 239.
- Lindman, B., Wennerstrom, H., (1991). *J. Phys. Chem.*, **95**, 6053.
- Liška, I., (2000). *J. Chromatogr. A*, **885**, 3.
- Little, J.N., Fallick, G.J., (1975). *J. Chromatogr.*, **112**, 389.
- Liu, J.Y., Yiang, G.B., Zhou, Q.F., Yang, K.W., (2001). *J. Sep. Sci.*, **24**, 459.
- Liu, Y., Lee, M.L., Hageman, K.J., Yang, Y., Hawthorne, S.B., (1997). *Anal. Chem.*, **69**, 5001.
- Liu, Z., Sam, P., Sirimanne, S.R., McClure, P.C., Grainger, J., Patterson Jr., D.G., (1994). *J. Chromatogr. A*, **673**, 125.
- Loos, R., Niessner, R., (1999). *J. Chromatogr. A*, **835**, 217.

- Luong, J.H.T., Hilmi, A., Nguyen, A.L., (1999). *J. Chromatogr. A*, **864**, 323.
- Malik, A.K., Seidel, B.S., Faubel, W., (1999). *J. Chromatogr. A*, **857**, 365.
- Martínez, D., Borrull, F., Calull, M., (1999). *Trends Anal. Chem.*, **48**, 282.
- Martínez, D., Cugat, M.J., Borrull, F., Calull, M., (2000). *J. Chromatogr. A*, **902**, 65.
- Martos, P.A., Pawliszyn, J., (1997). *Anal. Chem.*, **69**, 206.
- Mateo, R., Carrillo, J., Guitart, R., (2000). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **65**, 780.
- May, W.E., Chesler, S.N., Cram, S.P., Gump, B.H., Hertz, H.S., Enagonio, D.P., Dyszel, S.M., (1975). *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 535.
- Mazereeuw, M., Hofte, J.P., Tjaden, U.R., van der Greef, J., (1997). *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 981.
- McCourt, J., Burdin, G., Rodríguez, A.R., (2003). *J. Chromatogr. A*, **990**, 259.
- Mechref, Y., El Rassi, Z., (1996). *Anal. Chem.*, **68**, 1771.
- Menne, H.J., Janowitz, K., Berger, B.M., (1999). *J. AOAC Int.*, **82**, 1534.
- Menzinger, F., Schmitt-Kopplin, Ph., Freitag, D., Kettrup, A., (2000). *J. Chromatogr. A*, **891**, 45.
- Menzinger, F., Schmitt-Kopplin, Ph., Frommberger, M., Freitag, D., Kettrup, A., (2001). *Fresenius J. Anal. Chem.*, **371**, 25.
- Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Peek, J.A.F., (1979a). *J. Chromatogr.*, **168**, 293.
- Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Peek, J.A.F., (1979b). *J. Chromatogr.*, **168**, 317.
- Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Verheggen, Th.P.E.M., (1979c). *J. Chromatogr.*, **169**, 1.
- Miura, J., Ishii, H., Watanabe, H., (1976). *Bunseki Kagaku*, **25**, 808.
- Mohín, M., (2002). *Anal. Bioanal. Chem.*, **373**, 466.

- Molina, M., Wiedmer, S.K., Jussilla, M., Silva, M., Riekkola, M.L., (2001). *J. Chromatogr. A*, **927**, 191.
- Molnár-Pert, I., Füzfa, Z., (2005). *J. Chromatogr. A*, **1073**, 201.
- Monton, M.R.N., Terabe, S., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1032**, 203.
- Morin, S.E., Reel, R.T., van Soest, R.E.J., (1993). *Anal. Chem.*, **65**, 3454.
- Moroi, Y., (1992). *Micelles-Theoretical and applied aspects*. Plenum Press. Nueva York.
- Moyano, E., Games, D.E., Galcerán, M.T., (1996). *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1379.
- Muijselaar, P.G., Otsuka, K., Terabe, S., (1998). *J. Chromatogr. A*, **802**, 3.
- Mullett, W.M., Levsen, K., Bortak, J., Wu, J., Pawliszyn, J., (2002). *Anal. Chem.*, **74**, 1695.
- Mullett, W.M., Pawliszyn, J., (2002). *Anal. Chem.*, **74**, 1081.
- Mullett, W.M., Pawliszyn, J., (2003). *J. Sep. Sci.*, **26**, 251.
- Navalón, A., Prieto, A., Araujo, L., Vilchez, J.L., (2002). *J. Chromatogr. A*, **975**, 355.
- Nelson, W.N., Lee, C.S., (1996). *Anal. Chem.*, **68**, 3265.
- Nelson, W.N., Tang, Q., Harrata, A.K., Lee, C.S., (1996). *J. Chromatogr. A*, **749**, 219.
- Nemoto, S., Lehotay, S.J., (1998). *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 2190.
- Newkome, G.R., Yoo, K.S., Kabir, A., Malik, A., (2001). *Tetrahedron Lett.*, **42**, 7537.
- Nguyen, A.L., Luong, J.H.T., (1997). *Anal. Chem.*, **69**, 1726.
- Nielen, M.W.F., (1995). *J. Chromatogr. A*, **712**, 269.
- Niessen, W.M.A., (1997). *J. Chromatogr. A*, **794**, 407.
- Niessen, W.M.A., Tjaden, U.R., Van der Greef, J., (1993). *J. Chromatogr. A*, **636**, 3.
- Nilsson, S.L., Andersson, C., Sjöberg, P.J.R., Bylund, D., Petersson, P., Jörnten-Karlsson, M.,

- Markides, K.E., (2003). *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 2267.
- Nogueira, J.M.F., Sandra, T., Sandra, P., (2004). *Anal. Chim. Acta*, **505**, 209.
 - Núñez, O., Moyano, E., Puignou, L., Galcerán, M.T., (2001). *J. Chromatogr. A*, **912**, 353.
 - Núñez, O., Moyano, E., Galcerán, M.T., (2002a). *J. Chromatogr. A*, **974**, 243.
 - Núñez, O., Moyano, E., Galcerán, M.T., (2002b). *J. Chromatogr. A*, **946**, 275.
 - Núñez, O., Kim, J.-B., Moyano, E., Galcerán, M.T., Terabe, S., (2002c). *J. Chromatogr. A*, **961**, 65.
 - Núñez, O., Sentellas, S., (2002). *Cromatografía y técnicas afines (CTA)*, **23**, 28.
 - Olivares, J.A., Nguyen, N.T., Yonker, C.R., Smith, R.D., (1987). *Anal. Chem.*, **59**, 1230.
 - Okumura, D., (1991). *Rev. Ent. Cont. Tox.*, **118**, 87.
 - Ornstein, L., (1964). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321.
 - Osbourn, D.M., Weiss, D.J., Lunte, C.E., (2000). *Electrophoresis*, **24**, 486.
 - Otsuka, K., Smith, C.J., Grainger, J., Barr, J.R., Patterson Jr., D.G., Tanaka, N., Terabe, S., (1998). *J. Chromatogr. A*, **817**, 75.
 - Otsuka, K., Matsumura, M., Kim, J.-B., Terabe, S., (2003). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1861.
 - Palmer, C.P., Tanaka, N., (1997). *J. Chromatogr. A*, **792**, 105.
 - Pang, H.M., Kenseth, J., Coldiron, S., (2004). *Drug Discovery Today*, **9**, 1072.
 - Parnell, J.S., Hall, J.C., (1998). *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 152.
 - Pawliszyn, J., (1997). *Solid Phase Microextraction Theory and Practice*, Wiley, Nueva York.
 - Petmetsa, K.V., Leidy, R.B., Shea, D., (1996). *J. Chromatogr. A*, **745**, 201.
 - Pentmetsa, K.V., Leidy, R.B. Shea, D., (1997a). *Electrophoresis*, **18**, 235.

- Pentmetsa, K.V., Leidy, R.B., Shea, D., (1997b). *J. Chromatogr. A*, **746**, 225.
- Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Sanz, A., Bravo, E., (2005). *Chromatographia*, **61**, 493.
- Petersson, M., Wahlund, K.G., Nilsson, S., (1999). *J. Chromatogr. A*, **841**, 249.
- Picó, Y., Rodríguez, R., Mañes, J., (2003). *Trends Anal. Chem.*, **22**, 133.
- Pleasance, S., Thibault, P., Kelly, J., (1992) *J. Chromatogr.*, **591**, 325.
- Popp, P., Kalbitz, K., Oppermann, G., (1994). *J. Chromatogr. A*, **687**, 133.
- Pospichal, J., Gebauer, P., Bocek, P., (1989). *Chem. Rev.*, **89**,419.
- Prado Rosales, R.C., Herrera, M.C., Luque García, J.L., Luque de Castro, M.D., (2004). *J. Chromatogr. A*, **953**, 133.
- Qi, S., Cui, S., Chen, X., Hu, Z., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1059**,191.
- Quina, F.H., Hlnze, W.L., (1999). *Ind. Eng. Chem. Res.*, **38**, 4150.
- Quirino, J.P., Ionue, N., Terabe, S., (2000). *J. Chromatogr. A*, **892**, 187.
- Quirino, J.P., Terabe, S., Otsuka, K., Vincent, J.B., Vigh, G., (1999). *J. Chromatogr. A*, **838**, 3.
- Quirino, J.P., Terabe, S., (1998a). *J. Chromatogr. A*, **798**, 251.
- Quirino, J.P., Terabe, S., (1998b). *Anal. Chem.*, **70**, 1893.
- Quirino, J.P., Terabe, S., (1998c). *Science*, **282**, 465.
- Quirino, J.P., Terabe, S., (1997). *J. Chromatogr. A*, **781**, 119.
- Quirino, J.P., Terabe, S., (2000). *J. Chromatogr. A*, **902**,119.
- Quirino, J.P., Kim, J.B., Terabe, (2002). *J. Chromatogr. A*, **965**, 357.
- Reinhoud, N.J., Tjaden, U.R., Irth, H., van der Greef, J., (1992). *J. Chromatogr.*, **574**, 327.

- Rial-Otero, R., Yagüe-Ruiz, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándar, J., (2002). *J. Chromatogr. A*, **942**, 41.
- Riley, J.P., Taylor, D., (1969). *Anal. Chim. Acta*, **46**, 307.
- Rivero, J.M., (1960). *Bol. INIA*, **42**, 213.
- Roach, M.C., Gozel, P., Zare, R.N., (1988). *J. Chromatogr.*, **426**, 129.
- Rodríguez, M.A., Armstrong, D.W., (2004). *J. Chromatogr. B*, **800**, 7.
- Rodríguez, R., Boyer, I., Font, G., Picó, (2001a). *Analyst*, **126**, 2134.
- Rodríguez, R., Picó, Y., Font, G., Mañes, J., (2001b). *J. Chromatogr. A*, **924**, 387.
- Rodríguez, R., Mañes, J., Picó, Y., (2003). *Anal. Chem.*, **75**, 452.
- Rodríguez, R., Picó, Y., Font, G., Mañes, J., (2002). *J. Chromatogr. A*, **949**, 359.
- Ross, G.A., (2001). *LC-GC Europe*, January, 2-6.
- Rouchaud, J., Neus, O., Eelen, H., Bulcke, R., (2002). *Bull. Environ. Contam. Tox.*, **69**, 785.
- Rudaz, S., Cherkaoui, S., Gauvrit, J.Y., Lantéri, P., Veuthey, J.L., (2001). *Electrophoresis*, **22**, 3316.
- Sabik, H., Jeannot, R., Rondeau, B., (2000). *J. Chromatogr. A*, **885**, 217.
- Saitoh, T., Hinze, W.L., (1991). *Anal. Chem.*, **63**, 2530.
- Saitoh, T., Tani, H., Kamidate, T., Watanabe, (1995). *Trends Anal. Chem.*, **14**, 213.
- Sakamoto, M., Tsutsumi, T., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1028**, 63.
- Salafranca, J., Domeño, C., Fernández, C., Nerón, C., (2003). *Anal. Chim. Acta*, **477**, 257.
- Schweitz, L., Petersson, M., Johansson, T., Nilsson, S., (2000). *J. Chromatogr. A*, **892**, 203.
- Sellergren, B., Lanza, F., (2000). *Molecularly imprinted polymers*. Elsevier, Amsterdam.

- Shepard, H.H., (1939). The chemistry and toxicology of insecticides. Burgess Publ. Co., Minneapolis.
- Sheppard, R.L, Tong, X., Cai, J., Henion, J.D., (1995). *Anal. Chem.*, **67**, 2054.
- Shihabi, Z.K., (1998). *J. Chromatogr. A*, **817**, 25.
- Shihabi, Z.K., (2000). *J. Chromatogr. A*, **902**, 107.
- Sicilia, D., Rubio, S., Pérez-Bendito, D., Mariasso, N., Zagatto, E.A.G., (1999). *Anal. Chim. Acta*, **392**, 29.
- Simonet, B.M., Ríos, A., Valcárcel, M., (2003). *Trends Anal. Chem.*, **22**, 605.
- Simplicio, A.L., Boas, L.V., (1999). *J. Chromatogr. A*, **833**, 35.
- Smith, R.D., Barinaga, C.J., Udseth, H.R., (1988). *Anal. Chem.*, **60**, 1948.
- Smith, R.D., Wahl, J.H., Goodlett, D.R., Hofstadler, S.A., (1993). *Anal. Chem.*, **65**, 574A.
- Smyth, W.F., (1999). *Trends Anal. Chem.*, **18**, 335.
- Soini, H., Novotny, M.V., (1992). *J. Microcolumn Sep.*, **4**, 313.
- Soler, C., Mañes, J., Picó, Y., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1048**, 41.
- Somsen, G.W., Mol, R., de Jong, G.J., (2003). *J. Chromatogr. A*, **1000**, 953.
- Song, X., Budde, W.L., (1998). *J. Chromatogr. A*, **829**, 327.
- Sovocool, G.W., Brumley, W.C., Donnelly, J.R., (1999). *Electrophoresis*, **20**, 3297.
- Stevens, M.P., (1999). *Polymer Chemistry*, Oxford University Press, Nueva York.
- Stransky, Z., (1985). *J. Chromatogr.*, **32**, 219.
- Sun, L., Lee, H.K., (2003). *J. Chromatogr. A*, **1014**, 165.
- Tanaka, Y., Otsuka, K., Terabe, S., (2003). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1889.

- Taylor, J.A., Yeung, E.S., (1991). *J. Chromatogr.*, **550**, 831.
- Tegeler, T., El Rassi, Z., (2001). *Electrophoresis*, **22**, 4281.
- Tegeler, T., El Rassi, Z., (1999). *J. AOAC Int.*, **82**, 1542.
- Teixeira, M.J., Aguiar, A., Afonso, C.M.M., Alves, A., Bastos, M.M.S.M., (2004). *Anal. Chim. Acta*, **513**, 333.
- Terabe, S., Otsuka, K., Ando, T., (1985). *Anal. Chem.*, **57**, 834.
- Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T., (1984). *Anal. Chem.*, **56**, 111.
- The e-pesticide manual, British Crop Protection Council (2001). Wise & Loveys Information Services Ltd., Herts.
- The WHO recommended classification of pesticides by hazard and Guidelines to classification, 2004. World Health Organization, International programme on chemical safety, 2005.
- Tiselius, A., (1937). *Trans. Faraday Soc.*, **33**, 524.
- Tomer, K.B., (2001). *Chem. Rev.*, **101**, 297.
- Tomlinson, A.J., Benson, L.M., Guzman, N.A., Taylor, S., (1996). *J. Chromatogr. A*, **744**, 3.
- Tomlinson, A.J., Naylor, S., (1995). *J. Liq. Chromatogr.*, **18**, 3591.
- Tracht, S., Toma, V., Sweedler, J.V., (1994). *Anal. Chem.*, **66**, 2382.
- Tsai, C., Chen, Y., Her, G., (1998). *J. Chromatogr. A*, **813**, 379.
- Tsuda, T., Sweedler, J.V., Zare, R., (1990). *Anal. Chem.*, **62**, 2149.
- Turiel, E., Fernández, P., Pérez-Conde, C., Cámara, C., (2000). *Analyst*, **125**, 1725.
- Valcárcel, M., Arce, L., Ríos, A., (2001). *J. Chromatogr. A*, **924**, 3.
- Vas, G., Vekey, K., (2004). *J. Mass Spectrom.*, **39**, 233.

- Villa, S., Finizio, A., Díaz-Díaz, R., Vighi, M., (2003). *Water, Air and Soil Pollut.*, **146**, 335.
- Vinther, A., Soeberg, H., (1991). *J. Chromatogr.*, **559**, 3.
- Wahl, J.H., Smith, R.D., (1994). *J. Cap. Elec.*, **1**, 62.
- Wahl, J.H., Gale, D.C., Smith, R.D., (1994). *J. Chromatogr. A*, **659**, 217.
- Wall, W., Chan, K., El Rassi, Z., (2001). *Electrophoresis*, **22**, 2320.
- Wall, W., El Rassi, Z., (2001). *Electrophoresis*, **22**, 2312.
- Wall, W., Li, J., El Rassi, Z., (2002). *J. Sep. Sci.*, **25**, 1231.
- Wang, Z.Y., Xiao, C.H., Wu, C.Y., Han, H.M., (2000). *J. Chromatogr. A*, **893**, 157.
- Wang, C.W., Pawliszyn, J., (1998). *Anal. Commun.*, **35**, 353.
- Watanabe, H., Tanaka, H., (1978). *Talanta*, **25**, 585.
- Williams, D.C., Soper, S.A., (1995). *Anal. Chem.*, **67**, 3427.
- Wu, X., (2003). *Trends Anal. Chem.*, **22**, 48.
- Wu, J., Pawliszyn, J., (1999). *Analyst*, **124**, 643.
- Wu, N., Li, B., Sweedler, J.V., (1994a). *J. Liq. Chromatogr.*, **17**, 1917.
- Wu, N., Sweedler, J.V., Lin, M., (1994b). *J. Chromatogr. B*, **654**, 185.
- Wu, J., Yu, X., Lord, H., Pawliszyn, J., (2000a). *Analyst*, **125**, 391.
- Wu, Y.S., Lee, H.K., Li, S.F.Y., (2001). *J. Chromatogr. A*, **912**, 171.
- Wu, Y.S., Lee, H.K., Li, S.F.Y., (2000b). *Anal. Chem.*, **72**, 1441.
- Wycherley, D., Rose, M.E., Giles, K., Hutton, T.M., Rimmer, D.A., (1996). *J. Chromatogr. A*, **734**, 339.
- Xiao, C.H., Han, S.Q., Wang, Z.Y., Xing, J., Wu, C.Y., (2001). *J. Chromatogr. A*, **927**, 121.

- Yamashira, M., Fenn, J.B., (1984). *J. Phys. Chem.*, **88**, 4671.
- Yang, L., Harrata, A.K., Lee, C.S., (1997). *Anal. Chem.*, **69**, 1820.
- Yang, Q., Tomlinson, A.J., Naylor, S., (1999). *Anal. Chem.*, **71**, 183A.
- Yates, F., (1934). *J. Am. Statist. Assoc.*, **29**, 52.
- Yates, F., (1937). Tech. Comm. Nº35, *Imperial Bureau of Soil Sciences*, Londres.
- Yuan, H., Mullett, W.M., Pawliszyn, J., (2001). *Analyst*, **126**, 1456.
- Younos, T.M., Wigmann, D.L., (1989). *J. Water Pollut. Control Fed.*, **60**, 369.
- Zabik, J.M., van Wesenbeeck, I.J., Peacock, A.L., Kennard, L.M., Roberts, D.W., (2001). *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3284.
- Zambonin, C.G., Quinto, M., De Vietro, N., Palmesano, F., (2004). *Food Chem.*, **86**, 269.
- Zeng, Z., Qiu, W., Yang, M., Wei, Z., Huang, Z., Li, F., (2001). *J. Chromatogr. A*, **934**, 51.
- Zerbinati, O., Trotta, F., Giovannoli, C., (2000). *J. Chromatogr. A*, **875**, 423.
- Zumbado, M., Goethals, M., Luzardo, O.P., Serra, L., Cabrera, F., Domínguez-Boada, L., (2004). *Ecosistemas*, **3**, 1-8.