

**AUTOMATIZACION Y MINIATURIZACION DE  
SISTEMAS DE SCREENING Y DETERMINACION  
DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS  
EN MUESTRAS AGROALIMENTARIAS**

**AUTOMATION AND MINIATURIZATION  
OF SYSTEMS FOR THE SCREENING AND  
DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES  
IN AGRICULTURAL SAMPLES**



Universidad de Córdoba  
Dpto. Química Analítica y Ecología



Tesis Doctoral

**ALMUDENA COLUME DIAZ**

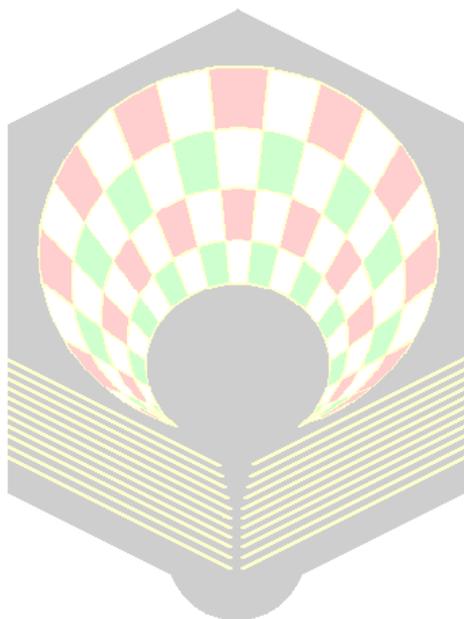
Departamento de Química Analítica y Ecología  
Universidad de Córdoba



# AUTOMATIZACION Y MINIATURIZACION DE SISTEMAS DE SCREENING Y DETERMINACION DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS AGROALIMENTARIAS

***AUTOMATION AND MINIATURIZATION  
OF SYSTEMS FOR THE SCREENING AND  
DETERMINATION OF PESTICIDE  
RESIDUES IN AGRICULTURAL SAMPLES***

***Tesis Doctoral***



***Almudena Columé Díaz  
Córdoba, Diciembre 2001***

**AUTOMATIZACION Y MINIATURIZACION DE SISTEMAS DE  
SCREENING Y DETERMINACION DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS  
EN MUESTRAS AGROALIMENTARIAS**

LOS DIRECTORES,

Fdo. Miguel Valcárcel Cases  
Catedrático del Departamento de  
Química Analítica y Ecología de  
la Universidad de Córdoba

Fdo. Mercedes Gallego Fernández  
Profesora Titular del Departamento  
de Química Analítica y Ecología de  
la Universidad de Córdoba

Fdo. M. Soledad Cárdenas Aranzana  
Profesora Asociada del Departamento  
de Química Analítica y Ecología de la  
Universidad de Córdoba

Trabajo presentado para aspirar  
al Grado de Doctor en Ciencias Químicas  
con la mención “Doctorado Europeo”

LA DOCTORANDA,

Fdo. Almudena Columé Díaz  
Licenciada en Ciencias y Tecnología de los Alimentos  
Licenciada en Farmacia



**Miguel Valcárcel Cases**, Catedrático del Departamento de Química Analítica y Ecología de la Universidad de Córdoba, **Mercedes Gallego Fernández**, Profesora Titular del citado Departamento y **M. Soledad Cárdenas Aranzana**, Profesora Asociada del citado Departamento, en calidad de directores de la Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Ciencias y Tecnología de los Alimentos y en Farmacia, Almudena Columé Díaz.

**CERTIFICAN:** Que la Tesis Doctoral “AUTOMATIZACION Y MINIATURIZACION DE SISTEMAS DE SCREENING Y DETERMINACION DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS AGROALIMENTARIAS” ha sido desarrollada totalmente en los Laboratorios del Departamento de Química Analítica y Ecología de la Universidad de Córdoba y del Analytical Chemistry Institute de la Universidad Técnica de Viena, y que a nuestro juicio, reúne todos los requisitos exigidos a este tipo de trabajo.

Y para que conste y surta los efectos pertinentes, expiden el presente certificado en la ciudad de Córdoba, a 16 de Octubre de 2001.

**MIGUEL VALCARCEL CASES**

**MERCEDES GALLEGO FERNÁNDEZ**

**M. SOLEDAD CARDENAS ARANZANA**



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

1. Se cuenta con los informes favorables de dos doctores pertenecientes a Instituciones de Enseñanza Superior de países europeos distintos al nuestro.
2. En el Tribunal que ha de evaluar la Tesis existe un miembro de un centro de Enseñanza Superior de otro país europeo.
3. Parte de la defensa de la Memoria se realizará en la lengua oficial de otro país europeo.
4. La doctoranda ha realizado una parte del trabajo experimental en el *Analytical Chemistry Institute* de la Universidad Tecnológica de Viena (Austria), gracias a la concesión de la beca Marie Curie para estancias en el extranjero de la Comisión Europea para la Investigación.



A mis directores de Tesis, Mercedes Gallego, mi *profe* de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, gracias por orientarme en el maravilloso mundo de la química; Marisol Cárdenas, que ha trabajado conmigo codo con codo incansablemente; y Miguel Valcárcel, por brindarme la oportunidad de entrar en el mundo científico.

A mis compañeros del Departamento de Química Analítica, por los buenos ratos que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros de grupo, especialmente a Andrés y Pepi, por ser mis amigos además de compañeros. Compartir las horas de trabajo (y almuerzo) con vosotros ha sido un placer.

A Carmen, Diego y José Manuel, por ayudarme siempre. Las cervecitas al mediodía han sido fuente de relajación y buenos ratos.

A mis amigos, Carmen, Fé y Elier, que han soportado mis buenos y malos momentos.

A Bernhard y a mis compañeros de Viena, Peter, Sepp, Mike, Eva, Andrea y Bárbara. Für meine Freunde aus Wien Peter, Sepp und Mike: ich danke ihnen für die freundliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe und für die vielen gemeinsam verbrachten Stunden in Labor. Ganz besonders die Abende im Lokal "Big Party", diverse Festl bis 5 Uhr in der Früh und Ausflüge, die mir immer in Erinnerung bleiben werden.

A Malin, que ha sido mucho más que una amiga. Muchas gracias a todos por hacer de mi estancia un recuerdo inolvidable. Till Malin, som är mycket mer än bara en vän. Tack så mycket kära syster för alla de fina stunder du gav mig och för att du fanns där även vid de svåra. Kommer aldrig att glömma dig.

A toda mi familia política, especialmente Marga, Juan y Mónica, que me han hecho sentir en Córdoba como en mi casa.

A mis padres, Pepi y Juan Miguel, a mi hermana Celeste y a mi hermano Juan Miguel, por todo el apoyo que me han dado desde siempre. Sin ellos nunca hubiera llegado hasta aquí. A mi cuñado Ilde, por todos los buenos ratos que hemos pasado en los veranitos y fines de semana.

Ante todo, a Jesús, que ha estado a mi lado todo el tiempo.



Special thanks should be given to Dr. Bernhard Lendl, for offering me the opportunity to work in his group at the Analytical Chemistry Institute of Technology University of Vienna. Working with him and his friendly group has been an unforgettable experience.

I would like to thank to European Researcher Commission for the concession of a Marie Curie fellowship, which allows me the stage in the Training Site on Advanced and Applied Vibrational Spectroscopy (ADVIS) in Vienna.



*A mis padres*



*A Jesús*



**INDICE**

<b>OBJETO</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCCION GENERAL</b>	<b>25</b>
1. Generalidades sobre plaguicidas	31
2. Toma de muestra	60
3. Directrices generales sobre la determinación de plaguicidas	69
4. Metodologías desarrolladas para la determinación de residuos de plaguicidas organoclorados y piretroides	75
Referencias	
<b>CAPITULO I. HERRAMIENTAS ANALITICAS</b>	<b>99</b>
<b>CAPITULO II. PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS EN HORTALIZAS Y FRUTAS FRESCAS</b>	<b>113</b>
<i>Introducción</i>	
<b>II.1.</b> <i>Semiautomatic method for the screening and determination of 23 organochlorine pesticides in horticultural samples by gas chromatography with electron-capture detection</i>	<b>119</b>
<b>II.2.</b> <i>Simplified method for the determination of chlorinated fungicides and insecticides in fruits by gas chromatography</i>	<b>139</b>
<b>CAPITULO III. PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS Y PIRETROIDES EN HORTALIZAS Y FRUTAS LIOFILIZADAS</b>	<b>161</b>
<i>Introducción</i>	
<b>III.1.</b> <i>Selective enrichment of 17 pyrethroids from lyophilised agricultural samples</i>	<b>165</b>
<b>III.2.</b> <i>Multiresidue screening of pesticides in fruits using an automatic solid-phase extraction system</i>	<b>185</b>
<b>III.3.</b> <i>Semiautomatic multiresidue gas chromatographic method for the screening of vegetables for 25 organochlorine and pyrethroid pesticides</i>	<b>211</b>

---

---

<b>CAPITULO IV. PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS Y PIRETROIDES EN MUESTRAS ACUOSAS</b>	<b>235</b>
<i>Introducción</i>	
<b>IV.1. Evaluation of an automatic solid-phase extraction system for the enrichment of organochlorine pesticides from waters</b>	<b>241</b>
<b>IV.2. Assessment of FTIR spectrometry for pesticide screening of aqueous samples</b>	<b>263</b>
<b>CAPITULO V. ORGANOCORADOS Y METABOLITOS DE PIRETROIDES EN FLUIDOS BIOLÓGICOS</b>	<b>283</b>
<i>Introducción</i>	
<b>V.1. Solid-phase extraction method for the screening and determination of pyrethroid metabolites and organochlorine pesticides in human urine</b>	<b>289</b>
<b>CAPITULO VI. RESULTADOS Y CONCLUSIONES</b>	<b>309</b>
<b>VI.1. Discusión general de los resultados</b>	<b>311</b>
<i>Referencias</i>	
<b>VI.2. Conclusiones más relevantes</b>	<b>367</b>
<b>VI.3. Futuras líneas de investigación</b>	<b>370</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>375</b>
<b>A. Acrónimos</b>	<b>377</b>
<b>B. Producción científica fruto de esta Memoria</b>	<b>381</b>

---

OBJETO

AIM





El objeto de esta Memoria se centra en la automatización de las operaciones previas del proceso analítico para conseguir la simplificación y automatización del mismo así como su aplicación directa a muestras con matrices complejas (frutas y hortalizas). Esto permitirá conseguir ventajas sustanciales respecto a las metodologías convencionales, en términos de calidad informativa (más y mejor) y de calidad productiva (mínimos esfuerzos, costes y riesgos para el operador y el medio ambiente). Además, se evalúa la posible contaminación por las especies determinadas (plaguicidas) que experimenta la propia doctoranda durante el desarrollo de esta Memoria. Los objetivos más específicos que se han marcado son:

a) Desarrollar analizadores de flujo automáticos basados en la extracción en fase sólida para la limpieza de los extractos y preconcentración de los plaguicidas en muestras hortofrutícolas.

b) Demostrar la utilidad de la liofilización de las muestras hortofrutícolas en el ámbito de la determinación de residuos de plaguicidas.

c) Desarrollar metodologías analíticas simples y rápidas que permitan el screening/determinación de estos analitos en muestras de interés agroalimentario, a niveles de concentración inferiores a los Límites Máximos de Residuos (LMRs) establecidos.



The aim of the work described in this Thesis was to automate the preliminary operations of the analytical process with a view to simplifying and automating the process itself, as well as to enable its direct application to samples having complex matrices (*viz.* fruits and vegetables). This would result in substantial advantages with respect to existing conventional methodologies in terms of information quality (*viz.* more, better information) and production quality (*viz.* minimum effort, cost and hazards for the operator and the environment). In addition, potential contamination with the studied species (pesticides) of the doctorand herself during development of this work was assessed. The specific goals of the research were as follows:

a) To develop automatic flow analysers based on solid-phase extraction for sample clean-up and pesticide preconcentration from fruits and vegetables.

b) To demonstrate the usefulness of freeze-drying fruit and vegetables samples with a view to determining pesticide residues.

c) To develop straightforward, expeditious analytical methodologies for the screening and determination of the target analytes at concentrations below the established Maximum Residues Limits (MRLs) in agricultural food samples.



INTRODUCCION  
GENERAL

GENERAL  
INTRODUCTION



INTRODUCCION



En la Introducción General de esta Memoria se aborda en primer lugar una panorámica general sobre los plaguicidas para continuar con la normativa vigente en materia de toma de muestra y determinación de residuos de plaguicidas en alimentos de origen vegetal y aguas potables. Finalmente, se recogen las metodologías desarrolladas hasta la fecha en la determinación de residuos de plaguicidas organoclorados y piretroides, concluyendo con las innovaciones aportadas por las nuevas tendencias en química analítica en relación con la automatización, miniaturización y sistemas de screening o criba.



El uso de plaguicidas en agricultura es actualmente el método más extendido en el mundo para el control de plagas, así como de especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria, por ejemplo, las que causen daño durante su transporte o almacenamiento. Son elementos indispensables para garantizar la cantidad, calidad y regularidad de las producciones agrícolas, y difícilmente se puede imaginar la agricultura, tal como la tenemos concebida actualmente, sin su utilización [1].

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los plaguicidas son biocidas y, por tanto, sustancias peligrosas. Su utilización supone un riesgo desde diferentes puntos de vista: peligrosidad en su fabricación y formulación, peligrosidad para el aplicador que pueda entrar en contacto con ellos al realizar el tratamiento, peligrosidad ecológica, referida a su acción sobre el medio ambiente con sus secuelas de efectos secundarios indeseables (desequilibrios biológicos, aparición de nuevas plagas, resistencias, fitotoxicidades, acción sobre la fauna silvestre terrestre y acuática, etc.) y, por último, peligrosidad para el consumidor de productos vegetales tratados a causa de los residuos de plaguicidas que estos alimentos pudieran contener. Los problemas relacionados con el uso de estas sustancias están adquiriendo una importancia creciente y la opinión pública está ejerciendo una presión cada vez mayor [2]. De hecho, la reciente crisis de las dioxinas ha puesto claramente de manifiesto los riesgos relacionados con la contaminación de los alimentos [1].

El sector agroalimentario tiene gran importancia en el conjunto de la economía europea, con una producción anual cercana al 15% de la producción industrial total y un

volumen de exportaciones que asciende a 50 000 millones de Euros al año [1]. La importancia económica y la ubicuidad de los alimentos en nuestra vida sugieren que la seguridad alimentaria ha de ser uno de los principales intereses del conjunto de la sociedad y, especialmente de los poderes públicos y de los productores del sector. Una política efectiva de seguridad alimentaria exige determinar y supervisar los riesgos para la salud de los consumidores, siendo necesario para ello una serie de Reglamentaciones y Normativas eficaces que gestionen estos riesgos y supervisen y garanticen la aplicación de las mismas [1]. En este contexto, tanto la legislación española y comunitaria, como la de otros países (US-FDA) y organismos internacionales (FAO, OMS), han establecido los llamados Límites Máximos de Residuos (LMRs), que para un plaguicida y en un alimento determinado, se definen como *la concentración máxima de residuos de un plaguicida, en la superficie o en la parte interna de productos alimenticios, para que se permita legalmente su uso para consumo humano y/o de piensos* [3,4]. Por “Residuo de plaguicida” se entiende *cualquier sustancia específicamente presente en el alimento o producto agrícola como consecuencia del uso de un plaguicida, incluyendo cualquier derivado del mismo como productos de conversión, metabolitos y productos de reacción* [5].

Los datos sobre residuos de plaguicidas pueden utilizarse para comprobar el cumplimiento de los LMRs, servir de base a medidas de aplicación de la normativa o evaluar la exposición de los consumidores a los plaguicidas. La determinación de estos residuos en alimentos es difícil y resulta, por ello, fundamental disponer de métodos adecuados [6].

## **1. GENERALIDADES SOBRE PLAGUICIDAS**

La denominación de plaguicida incluye todas aquellas sustancias que se utilizan para proteger los cultivos y los productos vegetales contra las enfermedades, el ataque de insectos, los parásitos, las malas hierbas y los microorganismos dañinos [7].

### *1.1. COMPOSICION*

En la formulación de un plaguicida sólo pueden estar presentes cuatro compuestos, según queda establecido en la legislación española [8]:

- Ingrediente activo, o producto técnico, que es la sustancia que ejerce la acción. No es un producto puro (pureza 75-95%) y necesita estar formulado con el resto de los componentes para ejercer una correcta acción sobre las zonas de cultivo.
- Coadyuvantes, sustancias sin acción plaguicida pero que son fundamentales para que el ingrediente activo realice su acción. Un ejemplo lo constituyen los tensoactivos, que disminuyen la tensión superficial, con lo que el plaguicida disuelto en el agua es capaz de extenderse más, aumentando el rendimiento de su aplicación, puesto que la disolución impregna mucho mejor la superficie a tratar. Algunos son totalmente inocuos.
- Productos inertes, sustancias sin acción plaguicida, que se usan para modificar las condiciones de dosificación del plaguicida, por ejemplo, los disolventes. Hay que señalar que algunos tienen carácter tóxico, como los disolventes orgánicos.

- Aditivos, sustancias sin acción plaguicida, que se añaden a la formulación para cumplir determinadas restricciones legales, principalmente relativas a aspectos de seguridad. Por ejemplo, se añaden repelentes que le dan mal olor a la formulación, o colorantes que proporcionan un color fuerte a aquellas disoluciones incoloras de plaguicidas que, por ello, puedan parecer inocuas.

## 1.2. NOMENCLATURA

Las normas ISO y otros organismos internacionales definen los nombres comunes de los plaguicidas (ej. Lindano). También existen los nombres comerciales que son diferentes según la casa comercial y su formulado (Lindano 25% EPAME Gama 25, Inorgosa; Lindano 80% GAMOAN Flo, Aragonesas). El nombre químico establecido por la IUPAC es el que identifica inequívocamente a la sustancia activa (1,2,3,4,5,6-gamma-hexaclorociclohexano) [9].

Además, como identificación también inequívoca e internacional se establecen: Chemical Abstracts name (C.A. name, (1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,4 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,)-gamma-hexaclorociclohexano), que es el nombre sistemático de acuerdo con las reglas establecidas en 9<sup>th</sup> *Collective Index period of the Chemical Abstracts Service* y el número de registro que dicho servicio le asigna (CAS RN, [58-89-9]) [9,10].

### 1.3. CLASIFICACIONES

Los plaguicidas pueden clasificarse [11] según los siguientes criterios:

- Naturaleza química:

Organoclorados	Ftalimidas
Piretroides	Organoestánicos
Piretrinas	Bipiridílicos
Organoazufrados	Dinitrofenoles
Organofosforados	Triazinas
Aceites minerales	Tricloropicolínicos
Clorofenoxi	Derivados de la urea
Carbamatos	Compuestos de cobre
Carboxamidas	Guanidinas y naftoquinonas
Tiocarbamatos	Tricloroacéticos

- Toxicidad, según su peligro de ingestión:

Muy tóxicos	DL <sub>50</sub> oral <25 mg/Kg
Tóxicos	DL <sub>50</sub> oral: 25-200 mg/Kg
Nocivos	DL <sub>50</sub> oral: 200-2000 mg/Kg

Siendo la DL<sub>50</sub>: *dosis letal de un tóxico que ingerida de una sola vez, produce la muerte de un 50% de los animales de ensayo*. Se expresa en miligramos del tóxico por kilo de peso del animal ensayado y da una idea de la toxicidad relativa de diferentes sustancias.

- Organismos que controlan:

Insecticidas	Nematicidas	Herbicidas
Acaricidas	Bactericidas	Ovicidas
Rodenticidas	Molusquicidas	
Funguicidas	Avicidas	

- Destino de aplicación:

Fitosanitario	Forestal
Pecuario	Doméstico
Industria alimentaria	Higiene personal

- Modos de acción:

De contacto	De ingestión
Sistémicos	Fumigantes
Repelentes	Defoliantes

Los más utilizados son los organoclorados, piretroides, organofosforados y carbamatos. De entre ellos, los insecticidas, funguicidas y herbicidas copan el 95% del mercado de la UE, con una distribución en función del destino de aplicación:

Sector agrario, 85%

Campañas sanitarias, 10%

(eliminación de vectores de enfermedades transmisibles por animales e insectos)

Otros, 5%

#### 1.4. CRONOLOGIA DEL DESARROLLO DE LOS PLAGUICIDAS

La progresión general del desarrollo de los plaguicidas ha variado desde los altamente tóxicos y peligrosos, persistentes y con capacidad de bioacumulación (como el DDT), hacia los plaguicidas que se degradan rápidamente en el medio ambiente y son menos tóxicos para los organismos a los que no van dirigidos [12].

**Tabla 1.4.1.** Evolución de los plaguicidas.

Periodo	Ejemplos	Procedencia	Características
1800-1920	Nitrofenoles, clorofenoles, creosato, naftaleno, aceites de petróleo	Química orgánica, productos colaterales de la producción del carbón, etc.	La mayoría sin especificidad y tóxicos para los usuarios y los organismos a los que no van dirigidos
1945-1955	Organoclorados, DDT, HCH, ciclodienos clorados	Síntesis orgánica	Persistentes, buena selectividad, buenas propiedades agrícolas, resistentes, ecológicamente dañinos
1945-1970	Inhibidores de la acetilcolinesterasa, organofosforados, carbamatos	Síntesis orgánica, buen uso del binomio estructura-actividad	Menor persistencia, menos tóxicos para los usuarios, algunos problemas medioambientales
1970-1985	Piretroides sintéticos, avamectacina, mimetizadores de hormonas sexuales, plaguicidas biológicos	Refinamiento del binomio estructura-actividad, nuevos sistemas hacia los que van dirigidos	No demasiado selectivos, resistentes, costosos, persistencia variable
1985-	Organismos de ingeniería genética	Transferencia de genes con actividad plaguicida a otros organismos y dentro de plantas y animales beneficiosos. Alteración genética de plantas para hacerlas resistentes a los efectos de los plaguicidas no específicos	Posibles problemas con mutaciones, disrupción en la ecología microbiológica, monopolio de los productos

### 1.5. CONSIDERACIONES TOXICOLÓGICAS

Como ya se ha comentado, los plaguicidas son biocidas, es decir, actúan contra seres vivos. Los plaguicidas que normalmente se utilizan son de naturaleza química muy variada y, en efecto, existen grandes diferencias en su modo de acción, penetración en el organismo, metabolismo, eliminación y toxicidad para los seres humanos, lo que hace difícil las generalizaciones sobre su peligrosidad [2].

La peligrosidad de los residuos de un plaguicida en concreto está determinada por diversos factores, siendo los más destacados la toxicidad intrínseca de la molécula del plaguicida, sus características físicas y químicas, las características del producto técnico y de su formulación, su metabolismo y degradación en la planta después de su aplicación, transformaciones metabólicas en el organismo humano y del grado de exposición del hombre a los mismos [2,13].

#### *a) Toxicidad propia de la molécula del plaguicida*

Por toxicidad se entiende la cualidad que tiene una sustancia o sus metabolitos, en ciertas dosis, de ocasionar un perjuicio a la salud. Podemos diferenciar entre toxicidad aguda y toxicidad crónica, pero desde el punto de vista de los residuos, las toxicidades agudas (dérmica, oral e inhalatoria) tienen un valor relativo, puesto que el peligro de ingerir una dosis superior a la  $DL_{50}$  oral aguda, sólo ocurre por error, ignorancia o suicidio. Por otra parte, plaguicidas con una  $DL_{50}$  oral aguda alta, es decir, que son poco tóxicos ingeridos de una sola vez, pueden ser muy peligrosos por ingestión repetida y continuada. Por ello, desde el punto de vista de los residuos

interesa más su toxicidad a corto y medio plazo (toxicidad subcrónica) y sobre todo a largo plazo (toxicidad crónica). Estas toxicidades se determinan utilizando lotes de animales a los que se les administra repetida y diariamente el tóxico, con diferentes dietas.

En relación con esta toxicidad crónica interesa conocer los siguientes aspectos [2]:

- Posibilidades cancerígenas.
- Efectos mutagénicos.
- Efectos teratogénicos o alteraciones en la reproducción.
- Efectos sobre la reacción inmunológica y sistemas endocrino y renal. Acción hepática.
- Metabolismo de la sustancia en el organismo, con las características toxicológicas de los metabolitos. Mecanismos de acción de estas sustancias.
- Neurotoxicidad.
- Posibles efectos retardados.
- Potenciación de / por los efectos de otros tóxicos.

Previamente a la homologación y registro de una materia activa, las autoridades exigen un considerable estudio toxicológico de la misma. Las autoridades comunitarias europeas fijan las exigencias al respecto en la Directiva relativa al registro y comercialización de productos fitosanitarios [14].

En el siguiente diagrama se esquematizan las categorías de exposición, el tipo de toxicidad y sus manifestaciones.



**Figura 1.5.1.** Relaciones entre la toxicidad de un plaguicida, su grado de exposición y la sintomatología producida por su intoxicación.

#### *b) Características químicas y físicas*

La evaluación de estas propiedades hace posible conocer su influencia en el comportamiento del plaguicida durante su aplicación y después de la misma, con la consecuente aproximación a la posible presencia o no de sus residuos en diferentes partes del producto hortofrutícola.

Sobre su posible desaparición después de la aplicación, influyen considerablemente:

- Volatilidad.
- Estabilidad en disolución acuosa.
- Estabilidad a la radiación ultravioleta.

También es de gran interés la capacidad del plaguicida para penetrar en los tejidos de la planta (o del hombre), lo cual depende de su solubilidad en agua y en disolventes orgánicos, es decir, su coeficiente de partición en agua-octanol ( $K_{OW}$ ) [13].

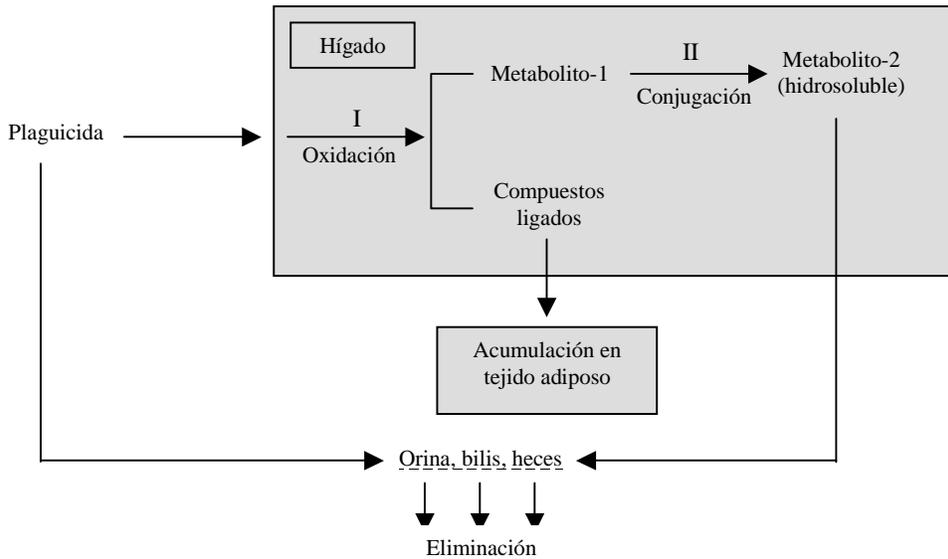
*c) Metabolismo y degradación en la planta después de su aplicación*

Una de las principales vías de desaparición de los plaguicidas tras su aplicación, es su degradación química y metabólica, en diferentes proporciones que dependen de las características químicas del propio compuesto y de otras circunstancias, como son la temperatura, humedad, luz, superficie de los cultivos, pH del líquido de la formulación, composición de los suelos y otros factores. El estudio de su metabolismo proporciona fundamentalmente información sobre la composición cuali y cuantitativa y del comportamiento del compuesto y sus metabolitos, que a veces pueden ser moléculas más tóxicas que las originales [2,13].

*d) Transformaciones metabólicas en el organismo humano*

El plaguicida, una vez absorbido, puede ser metabolizado en el organismo, almacenado en el tejido adiposo, o bien excretado sin cambio alguno. En los animales superiores las biotransformaciones sufridas por los plaguicidas se localizan

principalmente en el hígado. En general, las biotransformaciones [2] podrían esquematizarse tal como sigue:



**Figura 1.5.2.** Esquema de las biotransformaciones que puede sufrir un plaguicida en un organismo animal superior (R. Coscolla, 1993).

#### *e) Características del producto técnico y su formulación*

La materia activa de un plaguicida raramente se obtiene en un 100% de pureza, ya que durante su síntesis pueden quedar impurezas que, a veces, pueden ser peligrosas. Para una misma sustancia activa, distintos productos técnicos, pueden presentar distinta peligrosidad desde el punto de vista de los residuos, según el proceso de fabricación, o según su calidad, pudiendo contener o no, en mayor o menor proporción, determinadas impurezas con significación toxicológica mayor incluso que la de la propia materia activa.

Además, la formulación y los componentes de la misma pueden influir en la peligrosidad de los residuos. Así, determinados coadyuvantes (disolventes, tensoactivos, agentes de penetración, etc.) pueden exaltar la toxicidad propia de la materia activa, por sinergismo o activación [2,13].

Por otro lado, además de todos estos factores que determinan la peligrosidad de un plaguicida, hay que tener presente el posible efecto de acumulación a través de la cadena alimentaria. El hombre no sólo ingiere alimentos de origen vegetal, sino también de origen animal, donde se han podido acumular estos residuos. Cuando se trata de residuos de cierta persistencia y son solubles en grasas, pueden acumularse en los tejidos adiposos y grasa en general. De esta manera, puede darse una magnificación o acumulación progresiva de los residuos a través de la cadena alimentaria [2].

*f) Grado de exposición del ser humano a los residuos de plaguicidas*

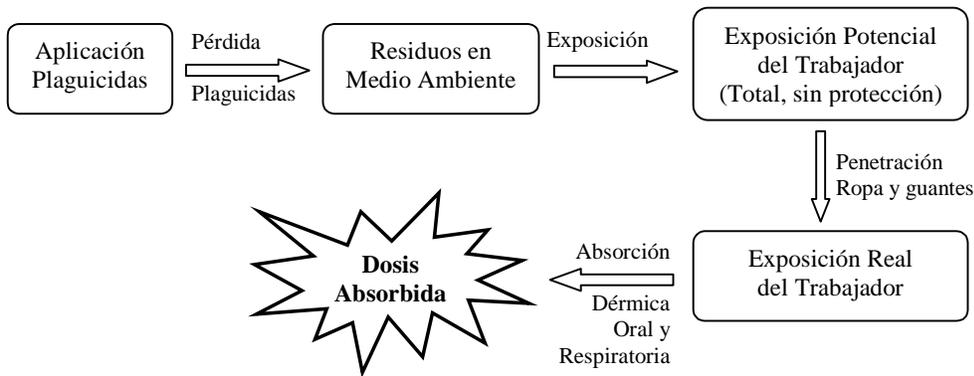
Podemos dividir la exposición en dos grandes grupos, la laboral y la extralaboral. La primera afectaría a los trabajadores que están en contacto con las formulaciones de plaguicidas en plantas de fabricación, formulación, transporte, aplicadores y operarios, mientras que la segunda está relacionada con el consumo de alimentos, de origen animal o vegetal, y agua [2,11].

En general, la exposición laboral está caracterizada por ser de duración variable e intermitente, tener niveles de exposición muy diversos a un gran número de productos cuya absorción dérmica varía en función del tipo de trabajo. Así, por ejemplo, para un aplicador, los factores que influyen en su exposición [11] serían:

- Tipo de cultivo: alto, bajo, frondoso, exterior, de invernadero.
- Técnica de aplicación, en función del tamaño de gota.
- Tipo de formulación, siendo en gránulo más seguro que en polvo.
- Condiciones climáticas, viento, temperatura, humedad.
- Tiempo de exposición.
- Actitud del trabajador y su formación.

Las fases de esta exposición laboral podríamos esquematizarlas de la siguiente

forma:

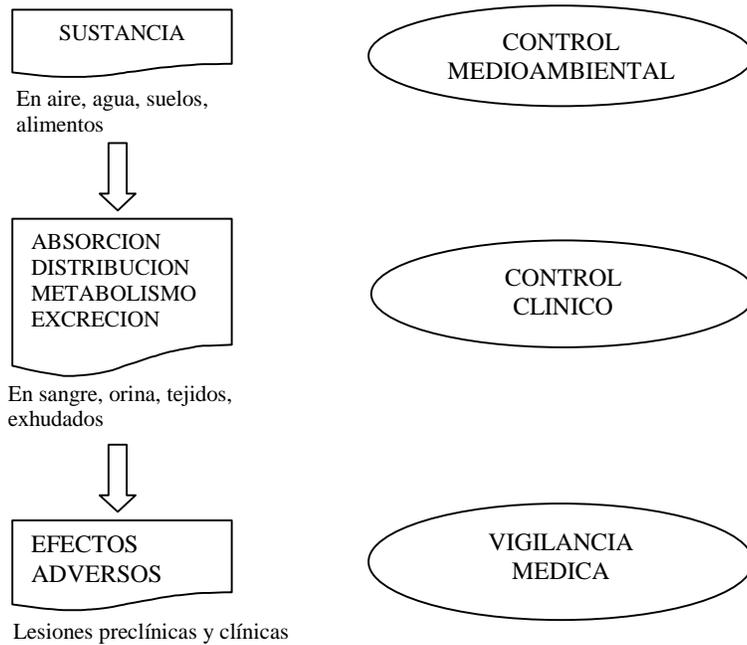


**Figura 1.5.3.** Exposición a plaguicidas sufrida por un aplicador y su relación con la dosis absorbida.

Por otro lado, la exposición extralaboral depende de dos factores: a) los tratamientos agrícolas que se efectúen en una determinada zona, que condicionarán el tipo de plaguicida, la cantidad de residuos que quede según la dosis utilizada y la frecuencia de aplicación, así como la aparición de dichos residuos en función de cuándo

se efectúen los tratamientos y de su frecuencia; y b) la composición de la dieta media de la zona considerada, puesto que de esta manera se puede estimar la ingestión diaria media de los distintos plaguicidas en una población en función de la proporción en que se encuentran los alimentos en dicha dieta y de los residuos que cada uno de ellos pueda contener [2].

Así pues, después de estas consideraciones de carácter toxicológico de los plaguicidas, se podrían esquematizar los controles a llevar a cabo en la siguiente Figura.



**Figura 1.5.4.** Esquema de los tipos de controles a ejercer ante una exposición a plaguicidas.

### 1.6. CONCEPTO Y CRITERIOS PARA LA FIJACION DE LMRs

Como hemos visto, la preocupación por los residuos de plaguicidas en los alimentos, debido a sus características tóxicas, en relación con la salud humana, ha llevado a que algunos plaguicidas tengan su uso completamente prohibido (DDT, isómeros del HCH diferentes al lindano, etc.) y otros lo tengan más o menos restringido. Los plaguicidas que más se utilizan tienen autorizado su empleo en determinados cultivos pero se fijan unos límites máximos de residuos (LMRs) o tolerancias en los alimentos con ellos tratados. Como ya se ha definido en el inicio de esta Introducción, el LMR es la concentración máxima permitida de un residuo, en o sobre un alimento, que puede aceptarse para el consumo humano (o animal) a largo plazo, y que está estipulada por la ley [2].

Para fijar estos LMR, las autoridades (españolas, europeas, internacionales) consideran dos criterios básicos: toxicológico y agronómico. En estos criterios se tiene en cuenta que, por un lado, la ingestión diaria de plaguicidas sea menor que la que pudiese provocar efectos tóxicos, y por otro lado, que en la aplicación agrícola del plaguicida se alcance la eficacia adecuada para combatir la plaga en cuestión [2,13].

#### *a) Criterio toxicológico*

Para determinar la ingestión diaria de cada plaguicida que no provoque efectos adversos en la salud, es necesario llevar a cabo una serie de cálculos para establecer los valores de determinados parámetros [2,13].

El primer parámetro es el llamado NEL (non effect level), NOEL (non observed effect level) o NOAEL (non observed adverse effect level), y representa la cantidad de plaguicida que, ingerido diariamente durante toda la vida de los animales de experimentación, no les provoca efectos adversos. El valor de NOEL se expresa en miligramos de plaguicida por Kilogramo de peso del animal y día (mg/Kg/día). Este valor se obtiene a partir de experimentos con animales, por lo que es necesario extrapolarlo a la especie humana. Para ello, el valor del nivel sin efecto, establecido para la especie animal más sensible, se divide por el coeficiente de seguridad 100, establecido teniendo en cuenta la variabilidad interespecífica (entre especies) y la intraespecífica (variabilidad dentro de una misma especie). De esta forma, se obtiene la cantidad de residuo de plaguicida que, ingerida diariamente durante una vida entera, no muestra riesgos apreciables, que se conoce como IDA (ingestión diaria admisible) y se expresa como miligramos de plaguicida por Kilogramo de peso del hombre y día. Una vez establecido este segundo parámetro, únicamente es necesario calcular el nivel permisible de residuo para el hombre en alimentos. Para ello, basta con multiplicar el valor IDA por el peso promedio del hombre (60 Kg) y dividirlo por el factor alimentario. Este factor alimentario, expresado en Kilogramo, es el promedio per cápita del consumo del alimento (o alimentos) que pudiesen contener los residuos del plaguicida que se esté evaluando. De aquí la necesidad de conocer la dieta media de la zona geográfica en cuestión. Este factor alimentario para productos hortofrutícolas en los países europeos se estima en 0.4 Kg [2,13].

Por tanto, teniendo en cuenta todo lo expuesto, para el cálculo del nivel permisible (expresado en miligramos plaguicida por Kilogramo de alimento, o sea, ppm) de un plaguicida en un producto vegetal, habría que seguir la ecuación:

$$\text{nivel permisible} = \frac{\text{NOEL} \times \text{Peso promedio cuerpo humano (60Kg)}}{\text{Factor de seguridad (100)} \times \text{Factor alimentario (0.4Kg)}}$$

Algunos autores [2] opinan que la IDA debería repartirse entre los alimentos de origen vegetal y el agua de bebida, asignándole a ésta entre 1-10% del valor de la IDA.

*b) Criterio agronómico*

Basándose en las condiciones establecidas en las Buenas Prácticas Agrícolas, se efectúan ensayos de campo para estimar la cantidad de residuo de plaguicida que queda en los alimentos tras efectuar los tratamientos. De esta manera, y puesto que las condiciones de empleo del plaguicida han de ser las mínimas necesarias y suficientes para lograr el grado de protección deseado, la cantidad de residuo será la mínima derivada de ese uso racional del plaguicida [2,13].

Por tanto, el LMR será fijado normalmente como el valor de ese residuo mínimo que quede en el alimento tras aplicarse el plaguicida según las Buenas Prácticas Agrícolas, siempre que éste sea inferior al nivel permisible calculado sobre la base de la IDA. Si el valor fuese superior, el plaguicida no podría autorizarse o bien estar

restringido su uso sólo a un número de cultivos de forma que no se superase ese valor del nivel permisible [2,13].

En algunas ocasiones, el nivel de residuos presentes en un alimento tras el tratamiento del cultivo con un plaguicida, siempre siguiendo las Buenas Prácticas Agrícolas, es tan bajo que resulta difícil medirlo con los métodos analíticos actuales. En base a este hecho nacen los LMRs establecidos al nivel de determinación. Estos límites están indicados con un asterisco después del valor numérico establecido como LMR (0.02\*), y están referidos al límite de determinación práctico, diferente del establecido para cada método analítico concreto [13].

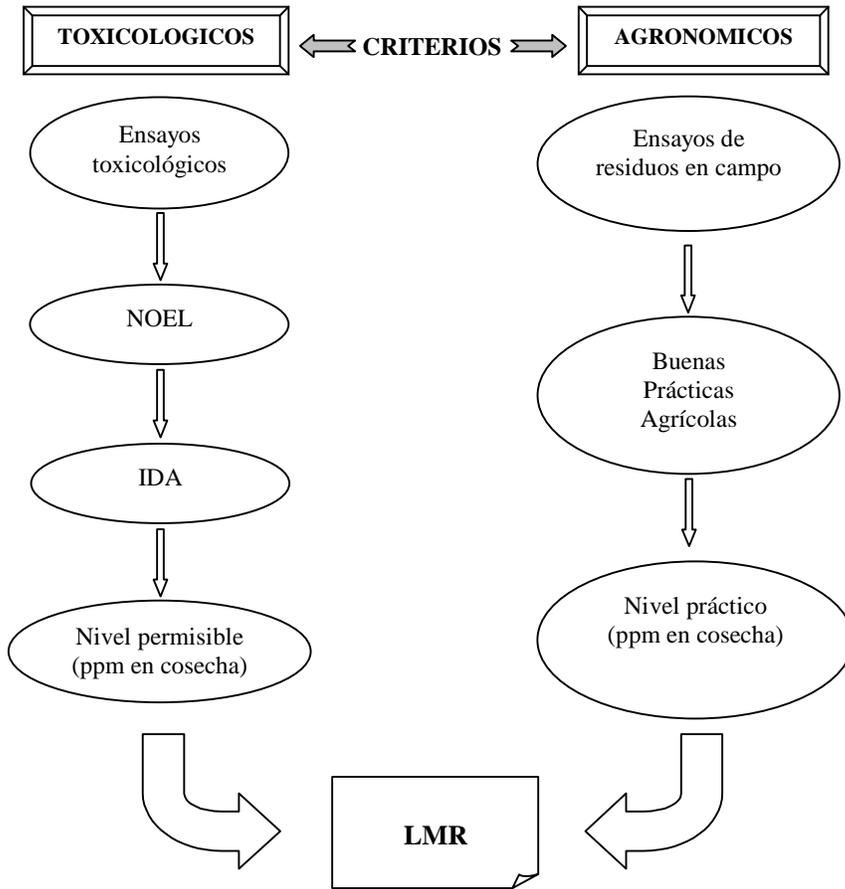
Por último, y como conclusión, decir que un LMR muy bajo puede deberse, además de lo expuesto para el límite de determinación, a que:

- El plaguicida tenga una elevada toxicidad crónica.
- La plaga en cuestión sea de escasa gravedad.
- La plaga requiera poca dosis.
- La aplicación del plaguicida se produzca mucho antes de la recolección, por ser en ese periodo cuando es posible el ataque de la plaga.

Y en cuanto a un valor cercano a cero, por:

- Plaguicida no autorizado en un país concreto porque no practique el cultivo en el cual se emplea.
- La plaga que combate el plaguicida no se encuentra presente en determinado país.
- No lo haya solicitado el fabricante.

En definitiva, para resumir de forma esquemática todo lo comentado para el establecimiento de los LMRs, se expone el siguiente diagrama.



**Figura 1.6.1.** Diagrama de los factores que intervienen en la fijación de LMR.

*1.7. DISMINUCION DE RESIDUOS POR TRATAMIENTOS DOMESTICOS*

El contenido en residuos de un producto hortofrutícola puede verse afectado considerablemente cuando son sometidos a algún tratamiento doméstico o culinario

antes de ser consumidos. Esta eliminación puede ser más o menos intensa dependiendo del tipo de plaguicida, de su localización en el alimento, del tipo de alimento y de la naturaleza e intensidad del tratamiento aplicado. Por otro lado, el efecto final de estos tratamientos es aditivo, por lo cual, la cantidad de residuos presentes en el alimento puede verse disminuida notablemente e incluso eliminada [2,15].

De esta manera, lavar los productos frescos antes de ser consumidos es un hábito muy saludable, ya que se pueden reducir y, a menudo, eliminar los posibles residuos presentes en los vegetales y frutas. Lógicamente, la efectividad de este tratamiento será mayor cuando se trate de plaguicidas hidrosolubles, aunque el efecto mecánico del lavado también juega un papel importante. Así, el lavado debe hacerse con abundante agua y, si es posible, frotarla con un cepillo, puesto que la mayor proporción de los plaguicidas se queda en la superficie de estos productos hortofrutícolas. Por esta misma razón, también es importante pelar las frutas y hortalizas, así como eliminar las primeras hojas de verduras como la lechuga. De hecho, en los cítricos, con gran cantidad de aceites esenciales en su corteza, los plaguicidas liposolubles se quedan acumulados en dicha corteza sin pasar a la pulpa. Por último, la cocción o cualquier tratamiento con calor, favorece la degradación de los residuos, que normalmente se transformarán en compuestos menos tóxicos o inocuos (hay algunas excepciones, como los residuos de etilenbisditiocarbamatos, que al degradarse por la acción del calor dan lugar a un metabolito algo más tóxico) [2,15].

### *1.8. LEGISLACION APLICABLE SOBRE LMRs*

La normativa sobre los niveles máximos de residuos se inició en Europa en los años 60 y 70, y ha sufrido numerosas modificaciones posteriores. En España, la primera lista de LMRs se promulgó en 1979, pero ésta ha sido sustituida y derogada varias veces hasta la entrada de España en la Unión Europea. A partir de ese momento, la legislación española sobre plaguicidas surge por trasposición de la europea, a la que se suman los LMRs que la legislación europea aún no contempla pero que la española ha ido estableciendo y, por tanto, son de obligado cumplimiento en el territorio español.

La legislación europea recoge estos listados en Directivas que publica en el Boletín Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE). De esta forma, al tratarse de Directivas Comunitarias afectan a todo el ámbito de la UE, marcando un plazo para su transposición a la legislación de cada Estado Miembro, transcurrido el cual, son de obligado cumplimiento en todo el territorio de la UE. A continuación se expone la relación de las Directivas Comunitarias publicadas en DOCE a fecha de 15 de Septiembre de 2001, relativas a la fijación de los contenidos máximos de residuos de plaguicidas en las frutas y hortalizas, teniendo en cuenta que las tres últimas (Directivas 2001/39/CE, 2001/48/CE y 2001/57/CE) no entran en vigor hasta el año 2002.

#### *Legislación Comunitaria:*

- Directiva 76/895/CEE, de 23 de noviembre de 1976.
- Directiva 80/428/CEE, de 28 de marzo de 1980.
- Directiva 81/36/CEE, de 09 de febrero de 1981.

- Directiva 82/528/CEE, de 19 de julio de 1982.
- Directiva 88/298/CEE, de 16 de mayo de 1988.
- Directiva 89/186/CEE, de 06 de marzo de 1989.
- Directiva 90/642/CEE, de 27 de noviembre de 1990.
- Directiva 93/58/CEE, de 29 de junio de 1993.
- Directiva 94/30/CE, de 23 de junio de 1994.
- Directiva 95/38/CE de 17 de julio de 1995.
- Directiva 95/61/CE de 29 de noviembre de 1995.
- Directiva 96/32/CE de 21 de mayo de 1996.
- Directiva 97/41/CE de 25 de mayo de 1997.
- Directiva 97/71/CE de 18 de diciembre de 1997.
- Directiva 98/82/CE de 27 de octubre de 1998.
- Directiva 99/65/CE de 24 de junio de 1999.
- Directiva 99/71/CE de 14 de julio de 1999.
- Directiva 2000/24/CE de 28 de abril de 2000.
- Directiva 2000/42/CE de 22 de junio de 2000.
- Directiva 2000/48/CE de 25 de julio de 2000.
- Directiva 2000/57/CE de 22 de septiembre de 2000.
- Directiva 2000/58/CE de 22 de septiembre de 2000.
- Directiva 2000/81/CE de 18 de diciembre de 2000.
- Directiva 2001/35/CE de 11 de mayo de 2001.

- Directiva 2001/39/CE de 23 de mayo de 2001.  
Entrada en vigor en EEMM: 01-01-02.
- Directiva 2001/48/CE de 28 de junio de 2001.  
Entrada en vigor en EEMM: 01-03-02.
- Directiva 2001/57/CE de 25 de julio de 2001.  
Entrada en vigor en EEMM: 01-03-02.

Por otro lado, la legislación española publica los listados de LMRs de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal en el Boletín Oficial del Estado (BOE), mediante Reales Decretos y Ordenes Ministeriales. La relación de la normativa vigente en el Estado Español a 15 de septiembre de 2001 se expone seguidamente.

*Legislación Española:*

- Real decreto 280/1994.
- Orden de 27 de febrero de 1996.
- Orden de 5 de diciembre de 1996.
- Orden de 26 de agosto de 1997.
- Orden de 25 de septiembre de 1997.
- Orden de 14 de mayo de 1998.
- Orden de 31 de mayo de 1999.

- Real decreto 198/2000.
- Orden de 3 de marzo de 2000.
- Orden de 14 de marzo de 2000.
- Orden de 12 de abril de 2000 .
- Orden de 1 de diciembre de 2000.
- Orden de 22 de enero de 2001.
- Orden de 27 de marzo de 2001.

Teniendo en cuenta la legislación presentada, tanto española como comunitaria, se ha elaborado la relación de los LMRs establecidos para los plaguicidas estudiados en los diferentes productos hortofrutícolas abordados en esta Memoria y que se exponen a continuación. Para la correcta interpretación de estas tablas hay que aclarar que en ocasiones el LMR no ha sido aún establecido por la UE pero sí por España, o que, sólo ocasionalmente, no es el mismo. Por tanto, si el LMR es común, sólo aparecerá un valor, mientras que cuando no lo sea se indicará al pie de la Tabla el establecido por la UE. También se encuentran indicados en la tabla aquellos plaguicidas cuyo uso está prohibido en España. Merece la pena destacar el hecho de que las Directivas Comunitarias que aún no han sido traspuestas a la legislación española no afectan a los plaguicidas contemplados en la Memoria, y que, por tanto, la legislación que actualmente se les aplica continuará vigente.

**Tabla 1.8.1.** Valores de LMR (mg/Kg) establecidos en frutas para los plaguicidas organoclorados contemplados en esta Memoria, según la legislación española y comunitaria.

Plaguicida	Naranja	Manzana	Pera	Cereza	Melocotón	Nectarina	Ciruela	Fresa	Plátano	Kiwi	Melón
HCH ( $\alpha+\beta+\delta$ ) <sup>a,b</sup>	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
HCB <sup>a,b</sup>	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*
Diclorán <sup>b</sup>	0.50	2.00	2.00	0.01	0.01	0.01	0.01	5.00	0.01	0.01	5.00
Lindano	1.00	1.00	1.00	0.50	0.50	0.50	0.50	1.00	1.00	1.00	1.00
Vinclozolina	0.05*	1.00	1.00	0.50	0.05*	0.05*	2.00	5.00	0.05*	10.00	1.00
Heptacloro <sup>a</sup>	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*
Diclofuanida	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	10.00	5.00	5.00	5.00
Aldrín <sup>a,b,c</sup> + Dieldrín <sup>a,b,c</sup>	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*
Dicofol	2.00	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.50
Captán	0.50 <sup>e</sup>	3.00	3.00	2.00	2.00	2.00	2.00	3.00	0.10*	0.10*	0.10*
Procimidona	0.02*	0.02*	1.00	0.02*	2.00	2.00	2.00	5.00	0.02*	5.00	1.00
Clorbenside <sup>a</sup>	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*
Clordane <sup>a,b</sup>	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*
Endosulfán <sup>d</sup> ( $\alpha+\beta$ +sulfato)	0.50	0.30	0.30	0.05*	0.50	0.50	0.05*	0.05*	0.05*	0.05*	0.30
Endrín <sup>a</sup>	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*
Iprodiona	5.00 <sup>e</sup>	10.00	10.00	5.00	5.00	5.00	5.00	10.00	3.00	5.00	0.30
Captafol <sup>a</sup>	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
Metoxicloro	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*

<sup>a</sup>Plaguicida de uso prohibido en España; <sup>b</sup>LMR no establecidos por la UE; <sup>c</sup>Suma de aldrín y dieldrín, expresado como dieldrín; <sup>d</sup>Suma de alfa y beta endosulfán y sulfato; <sup>e</sup>Valor establecido por la UE en 0.02\*; \*Indica el límite de determinación analítica.

**Tabla 1.8.2.** Valores de LMR (mg/Kg) establecidos en hortalizas para los plaguicidas organoclorados contemplados en esta Memoria, según la legislación española y comunitaria.

Plaguicida	Zanahoria	Cebolla	Tomate	Pimiento	Berenjena	Pepino	Coliflor	Lechuga	Espinaca	Acelga	Champiñón	Patata
HCH ( $\alpha+\beta+\delta$ ) <sup>a,b</sup>	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
HCb <sup>a,b</sup>	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*
Diclorán <sup>b</sup>	0.01	0.01	5.00	0.01	5.00	5.00	0.01	5.00	0.01	0.01	0.01	0.01
Lindano	0.10	1.00	0.50	1.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	2.00	1.00	0.10 <sup>c</sup>
Vinclozolina	0.50	1.00	0.05*	3.00	3.00	1.00	0.05*	5.00	0.05*	0.05*	0.05*	0.05*
Heptacloro <sup>a</sup>	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*
Diclofuanida	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	10.00	5.00	5.00	5.00	0.10
Aldrín <sup>a,b,c</sup> + Dieldrín <sup>a,b,c</sup>	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*
Dicofol	0.02*	0.02*	0.02 <sup>e</sup>	0.02*	0.02*	0.20	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
Captán	0.10*	0.10*	3.00	0.10*	3.00	0.10*	0.10*	2.00	0.10*	0.10*	0.10*	0.10*
Procimidona	0.02*	0.20	2.00	2.00	2.00	1.00	0.02*	5.00	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
Clorbenside <sup>a</sup>	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*
Clordane <sup>a,b</sup>	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*
Endosulfán <sup>d</sup> ( $\alpha+\beta$ +sulfato)	0.05*	0.05*	0.50	0.05*	0.05*	0.05*	0.05*	0.05*	0.05*	0.05*	0.05*	0.05*
Endrín <sup>a</sup>	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*
Iprodiona	0.30	5.00	5.00	5.00	5.00	2.00	0.05	10.00	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
Captafol <sup>a</sup>	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
Metoxicloro	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*

<sup>a</sup>Plaguicida de uso prohibido en España; <sup>b</sup>LMR no establecidos por la UE; <sup>c</sup>Suma de aldrín y dieldrín, expresado como dieldrín;

<sup>d</sup>Suma de alfa y beta endosulfán y sulfato; <sup>e</sup>Valor establecido por la UE en 1.00; \*Indica el límite de determinación analítica.

**Tabla 1.8.3.** Valores de LMR (mg/Kg) establecidos en frutas para los plaguicidas piretroides contemplados en esta Memoria, según la legislación española y comunitaria.

Plaguicida	Naranja	Manzana	Pera	Cereza	Melocotón	Nectarina	Ciruela	Fresa	Plátano	Kiwi	Melón
Butóxido de piperonilo <sup>a</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Bifentrín <sup>a</sup>	0.10	0.20	0.20	0.01*	0.20	0.20	0.01*	0.50	0.01*	0.01*	0.20
Fenpropatrín <sup>a</sup>	2.00	0.10	0.10	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.10
λ-Cihalotrín	0.02*	0.10	0.10	0.10	0.20	0.20	0.10	0.50	0.02*	0.02*	0.05
Permetrín (cis+trans)	0.50	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.05*	1.00	0.10
Ciflutrín (I+II+III+IV)	0.02*	0.20	0.20	0.20	0.50	0.50	0.20	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
Cipermetrín (I+II+III+IV)	2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	1.00	0.05*	0.05*	0.05*	0.20
Cis-Fenvalerato	0.02*	0.05	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
Trans-Fenvalerato	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
Deltametrín	0.05*	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.05*	0.05*	0.05*	0.05*

<sup>a</sup>LMR no establecidos por la UE; \*Indica el límite de determinación analítica.

**Tabla 1.8.4.** Valores de LMR (mg/Kg) establecidos en hortalizas para los plaguicidas piretroides contemplados en esta Memoria, según la legislación española y comunitaria.

Plaguicida	Zanahoria	Cebolla	Tomate	Pimiento	Berenjena	Pepino	Coliflor	Lechuga	Espinaca	Acelga	Champiñón	Patata
Butóxido de Piperonilo <sup>a</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Bifentrín <sup>a</sup>	0.01*	0.01*	0.20	0.20	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*
Fenpropatrín <sup>a</sup>	0.02	0.02	0.50	0.50	0.50	0.10	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
λ-Cihalotrín	0.02*	0.02*	0.50	0.10	0.50	0.10	0.10	1.00	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
Permetrín (cis+trans)	0.05*	0.05*	0.50	0.50	0.50	0.10	0.10	2.00	1.00	1.00	0.05*	0.05*
Ciflutrín (I+II+III+IV)	0.02*	0.02*	0.05	0.30*	0.02*	0.10	0.05	0.50	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
Cipermetrín (I+II+III+IV)	0.05*	0.10	0.50	0.50	0.50	0.20	0.50	2.00	0.50	0.50	0.05*	0.05*
Cis-Fenvalerato	0.02*	0.02*	0.05*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
Trans-Fenvalerato	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*	0.02*
Deltametrín	0.05*	0.10	0.20	0.20	0.20	0.10	0.10	0.50	0.50	0.50	0.05*	0.05* <sup>b</sup> 0.50 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>LMR no establecidos por la UE; <sup>b</sup>Valor establecido para patatas tempranas; <sup>c</sup>Valor establecido para patatas para almacenar; \*Indica el límite de determinación analítica.

En lo referente a las aguas de consumo público, la legislación europea [16] y la española [17], fijan la presencia de residuos con un único LMR establecido para plaguicidas de forma individual e independientemente del compuesto que se trate, con una valor de 0.1 microgramos por litro de muestra acuosa. A su vez, también establece otro LMR para la cantidad global de plaguicidas presentes, es decir, la suma de las diferentes cantidades de plaguicidas presentes en la muestra acuosa y, que en este caso, está fijado en 0.5 microgramos por litro de muestra acuosa.

#### *1.9. PRECEDENTES LEGISLATIVOS DE LOS PLAGUICIDAS OBJETO DE ESTA TESIS DOCTORAL*

Dentro del gran grupo de los plaguicidas, los organoclorados constituyen una de las familias más antiguas, remontándose su utilización a las décadas de los 40 y 50. Sus características hacen que sean muy persistentes gracias a su resistencia y capacidad de acumulación en tejido adiposo y, aunque eficaces, son muy dañinos para el medio ambiente y el hombre. Es por ello que algunos, generalmente los más antiguos y tóxicos, están prohibidos, como es el caso del DDT. De hecho, los residuos de DDT, a pesar de encontrarse prohibido su empleo desde los 70, se encuentran presentes hoy día en suelos, aguas, etc., debido a su poder de acumulación y resistencia. La legislación contempla estos hechos adjudicando LMRs al nivel de detección analítica para aquellos plaguicidas prohibidos y, por otro lado, fijándolos para el resto de plaguicidas organoclorados en valores en torno a 50 ng/g, en la mayor parte de los casos.

En cuanto a los piretroides, es éste un grupo de creación mucho más reciente (años 70-80). Aparecen como los derivados sintéticos de las piretrinas, insecticidas naturales de origen vegetal bastante caros. Estos plaguicidas son ya menos tóxicos que los organoclorados gracias, principalmente, a su menor persistencia. Cabría esperar, por tanto, que sus LMRs fuesen más elevados y, aunque superiores que para la mayoría de los plaguicidas organoclorados, tampoco lo son de manera excesiva. De hecho, sus LMRs se sitúan entre 100 y 500 ng/g. Esto se debe a que, como ya ha sido comentado, los LMRs no se fijan teniendo en cuenta únicamente los criterios toxicológicos de los plaguicidas, sino también los agrícolas. Así, y puesto que son poco persistentes, tras efectuar los tratamientos bajo las normas de las Buenas Prácticas Agrícolas, la presencia de residuos en los productos ha de ser mínima. Aunque la práctica totalidad de los plaguicidas piretroides tienen su utilización permitida debido a sus características, no por ello los órganos de vigilancia de la UE (y otros organismos) dejan de tenerlos en cuenta en sus evaluaciones periódicas. De hecho, el empleo de fenvalerato se está cuestionando y es por ello que su LMR ha sido reducido en poco tiempo, hallándose actualmente fijado en el límite de determinación analítica (0.02\* ng/g).

## 2. TOMA DE MUESTRA

### 2.1. TOMA DE MUESTRA EN PRODUCTOS HORTOFRUTICOLAS

El objetivo de la toma de muestra, en el ámbito de la determinación de plaguicidas, es que se pueda obtener una muestra representativa de un lote para realizar un análisis, con el fin de determinar su conformidad con los límites máximos de residuos. En el caso de productos vegetales, los LMR se aplican a una muestra a granel compuesta, procedente de 1 a 10 muestras primarias [18]. Previa a la descripción del procedimiento de muestreo, es conveniente definir los términos que a lo largo del mismo aparecen. Según establece la legislación española [3], la comunitaria [19] y la Comisión FAO/OMS [18], y siempre en relación con la determinación de plaguicidas, se define como:

- *Lote*: cantidad de un producto alimenticio entregado en un momento determinado, del cual el encargado del muestreo sabe o supone que tiene características uniformes, como por ejemplo origen, productor, variedad, envasador, tipo de envasado, marcas, etc. Cada lote será objeto de análisis por separado.

- *Muestra elemental, primaria o bruta*: una o más muestras tomadas de un solo lugar en un lote.

- *Muestra a granel, global o agregada*: el total combinado y perfectamente mezclado de las muestras primarias tomadas de un lote.

- *Muestra de laboratorio*: muestra enviada al laboratorio o recibida por éste. Cantidad representativa de material extraído de la muestra a granel. La muestra de laboratorio podrá ser la totalidad o una parte de la muestra a granel.

- *Muestra analítica o test*: material destinado al análisis, preparado a partir de la muestra de laboratorio separando la porción de producto que ha de analizarse y luego mezclando, triturando, cortando finamente, etc., para poder disponer de porciones analíticas con el mínimo error de muestreo.

- *Porción analítica o alícuota*: cantidad representativa de material extraído de la muestra analítica, de tamaño adecuado para determinar la concentración de residuos.

- *Muestra*: una o más unidades seleccionadas entre una población de unidades, o una porción de material seleccionada entre una cantidad mayor de material. Al efecto de la determinación de plaguicidas, la intención de una muestra representativa es ser representativa del lote, de la muestra a granel, etc. con respecto a su contenido en residuos de plaguicidas y no necesariamente con respecto a otros atributos.

- *Muestreo*: procedimiento empleado para extraer y constituir una muestra.

- *Tamaño de la muestra*: número de unidades, o cantidad de material, que constituyen la muestra.

- *Unidad*: parte discreta más pequeña de un lote que deberá extraerse para formar la totalidad o parte de una muestra primaria. En el caso de frutas y hortalizas, cada fruta, hortaliza o racimo natural de éstas (uvas) entero constituirá una unidad, salvo en el caso de que sea pequeño.

Durante la toma de muestra y hasta la preparación de la muestra analítica se deberán tomar precauciones con objeto de evitar cualquier alteración que pueda modificar el contenido en residuos, afectar a los análisis o a la representatividad de la muestra analítica. El procedimiento de muestreo [3,18,19] sigue los siguientes pasos:

1. *Recogida de muestras primarias o elementales.* El número mínimo de muestras primarias que han de tomarse de un lote viene determinado en la Tabla 2.1.1. Cada muestra primaria se tomará de un lugar del lote elegido al azar, en la medida de lo posible. Las muestras primarias deberán contener material suficiente para proporcionar la muestra o muestras de laboratorio necesarias procedentes del lote.

**Tabla 2.1.1.** Número mínimo de muestras primarias que han de tomarse de un lote.

Peso del lote (Kg)	Número mínimo de muestras primarias
<50	3
50-500	5
>500	10

2. *Preparación de la muestra a granel o global.* Las muestras primarias se mezclarán y combinarán perfectamente para formar la muestra global.

3. *Preparación de la muestra de laboratorio.* Cuando la muestra a granel sea mayor que la necesaria para una muestra de laboratorio, se dividirá para obtener una porción representativa. Podrá utilizarse un instrumento de muestreo, un sistema de división en cuatro partes u otro procedimiento apropiado de reducción del tamaño, pero no deberán cortarse o dividirse las unidades de productos de origen vegetal. Los tamaños mínimos para las muestras de laboratorio se indican en la Tabla 2.1.2.

**Tabla 2.1.2.** Descripción de las muestras primarias y tamaño mínimo de las muestras de laboratorio.

Clasificación de los productos	Tamaño mínimo de muestra de laboratorio
Productos de tamaño pequeño (unidad <25g)	1 Kg
Productos de tamaño medio (unidad entre 25-250g)	1 Kg (10 unidades al menos)
Productos de tamaño grande (unidad >250g)	2 Kg (5 unidades al menos)

4. *Preparación de la muestra analítica.* La parte del producto que vaya a analizarse, es decir, la muestra analítica, se separará lo antes posible. Cuando haya que calcular el nivel de residuos incluyendo partes que no se analizan, se hará constar el peso de las partes por separado. La relación de estas partes que quedan excluidas está también contemplada en la legislación [3,18,19], y reflejan el procedimiento utilizado en la obtención de los LMRs. En la siguiente Tabla, se recogen las partes que se han de analizar de los productos hortofrutícolas estudiados en esta Memoria.

**Tabla 2.1.3.** Parte de los productos hortofrutícolas que se analizan para la determinación de plaguicidas.

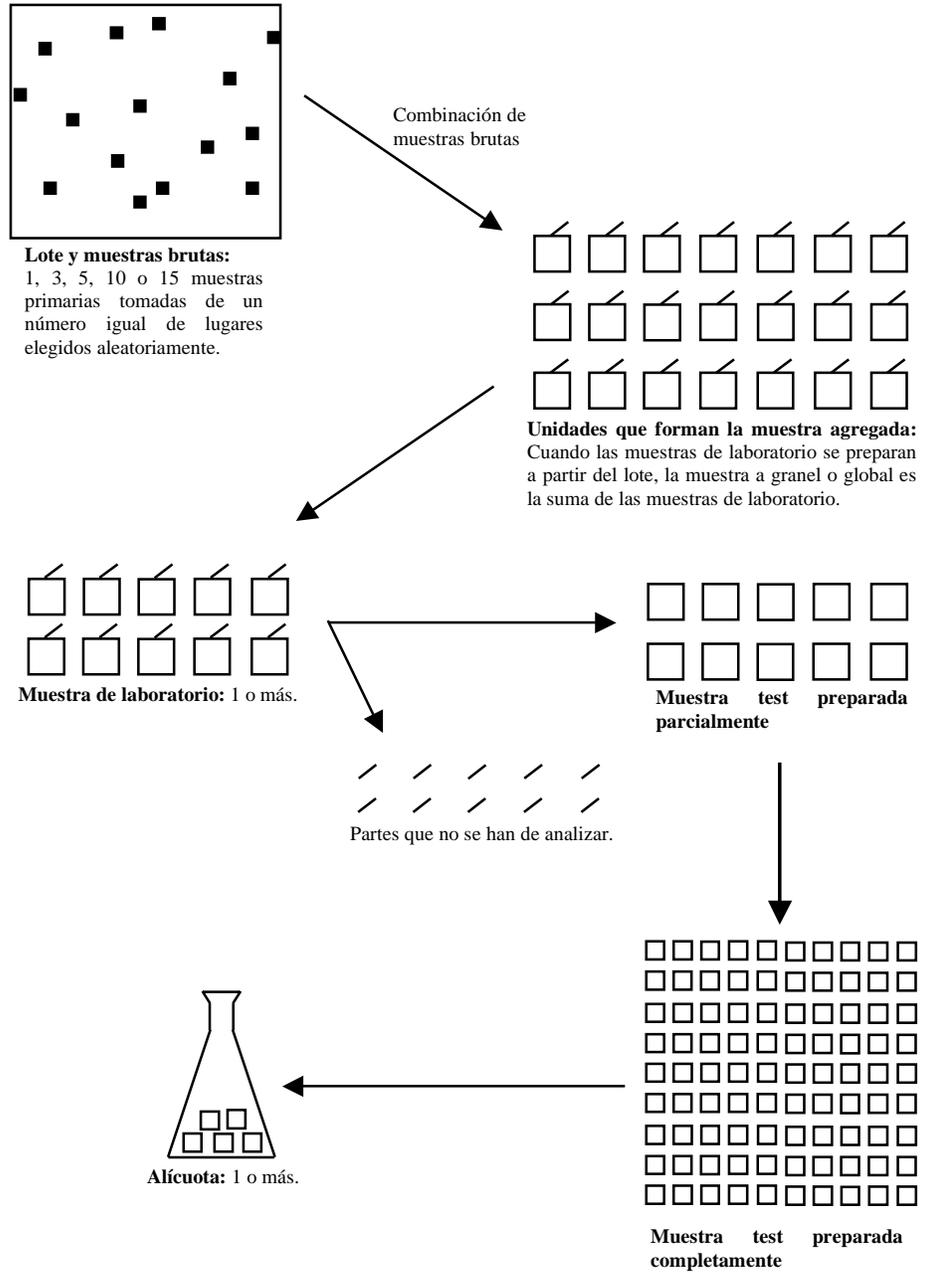
Producto hortofrutícola	Parte del producto que se analiza
Pera	Producto entero sin pedúnculo
Manzana	
Melón	
Fresa	Producto entero sin cáliz ni pedúnculo
Plátano	Producto entero sin corona ni pedúnculo
Nectarina	Producto entero sin pedúnculo ni hueso,
Melocotón	pero calcular y expresar el residuo en
Ciruela	relación con el producto entero sin
Cereza	pedúnculo

**Tabla 2.1.3. (Continuación).**

Producto hortofrutícola	Parte del producto que se analiza
Cebolla	Producto entero sin tierra <sup>1</sup> , raíces y las túnicas fácilmente desprendibles
Lechuga	Producto entero sin las hojas exteriores
Espinaca	marchitas, raíces y tierra <sup>1</sup>
Acelga	
Zanahoria	Producto entero sin corona, raíces y tierra <sup>1</sup>
Pimiento	Producto entero sin pedúnculo
Tomate	
Berenjena	
Pepino	
Patata	Producto entero sin tierra <sup>1</sup>
Coliflor	Únicamente la inflorescencia, sin hojas
Champiñón	Producto entero sin tierra <sup>1</sup> ni medio de cultivo

<sup>1</sup>Para eliminar la tierra se puede utilizar un cepillo suave.

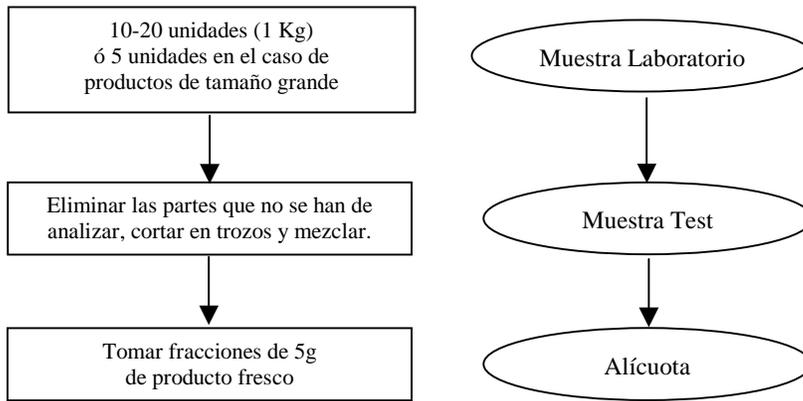
5. *Preparación de la porción analítica.* La muestra analítica se triturará, si procede, y se mezclará perfectamente, para que se puedan extraer porciones analíticas representativas. El método de análisis y la eficacia del mezclado determinarán el tamaño de la porción analítica. Los métodos para triturar y mezclar no deberán afectar a los residuos presentes en la muestra analítica. Si las porciones analíticas han de almacenarse antes del análisis, el método y la duración del almacenamiento no deberán afectar al nivel de residuos presentes. La Figura 2.1.1 representa de forma esquemática la totalidad del procedimiento de muestreo descrito.



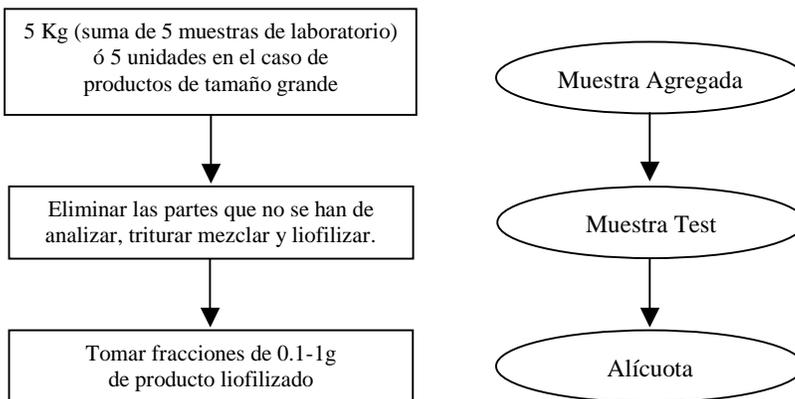
**Figura 2.1.1.** Presentación esquemática del muestreo de productos hortofrutícolas (FAO/OMS, 1999).

El procedimiento de muestreo seguido en esta Memoria para la determinación de plaguicidas en frutas y verduras contempla los pasos descritos en este apartado, teniendo en cuenta que las muestras de laboratorio se prepararon a partir del lote, siendo, por tanto, la muestra global la suma de las muestras de laboratorio. Así, podemos esquematizarlo como sigue:

• *Muestreo realizado en Capítulo II.*



• *Muestreo realizado en Capítulo III.*



Los resultados analíticos deben obtenerse de una o más muestras de laboratorio y en condiciones idóneas para el análisis. Los resultados no deberán corregirse con miras a los resultados de los estudios de recuperación. Cuando un residuo exceda un LMR, se confirmará su identidad y su concentración mediante el análisis de una o más porciones analíticas adicionales obtenida de la muestra de laboratorio original [18].

## *2.2. TOMA DE MUESTRA EN MUESTRAS ACUOSAS*

La toma de muestras acuosas, en relación con la determinación de plaguicidas, está establecida en la legislación europea [20], y la española [21]. De esta forma, las muestras de agua deberán ser representativas de la calidad del agua en el punto de la extracción. Los recipientes que contengan las muestras, los agentes o métodos utilizados para su conservación y transporte o almacenamiento, así como su preparación para el análisis, no deberán ocasionar una modificación significativa de sus resultados.

Teniendo en cuenta todo ello, la toma de muestras acuosas procedentes de agua de abastecimiento público, se realizó tras dejar correr el agua diez minutos, para evitar recoger los posibles depósitos acumulados en las tuberías de conducción de la misma, siendo el volumen de muestra de 5 litros. Por otro lado, las aguas procedentes de ríos, lagunas, pozos y pantanos, fueron tomadas a diferentes profundidades (superficial, media y profunda), con un volumen de muestra de 1.5 L en cada una, para finalmente ser homogenizadas y constituir así la muestra global.

Los recipientes utilizados fueron botellas de vidrio, para evitar la posible adsorción de los plaguicidas sobre las paredes, y de color ámbar, para proteger a los

analitos de la radiación solar directa. Además, para su conservación se añadió tiosulfato sódico y se ajustó el pH entre 5 y 6. De esta forma se evita, las interferencias del cloro si ha sido añadido para la potabilización de las aguas recogidas de la red de abastecimiento público, o de los ácidos húmicos y fúlvicos, si están presentes en las muestras. El ajuste del pH evita la degradación de los analitos bajo condiciones alcalinas, puesto que la mayoría de las muestras presentaron un pH en torno a 8. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta el momento de su análisis.

### **3. DIRECTRICES GENERALES SOBRE LA DETERMINACION DE PLAGUICIDAS**

Para originar una información de calidad y propiciar la confianza y satisfacción de sus clientes, los laboratorios que realizan las determinaciones de residuos de plaguicidas en diferentes matrices deberán tener implantado un sistema de calidad basado en la norma ISO 17025-1999, la cual especifica los requisitos de gestión y técnicos para asegurar la calidad. Además, la Unión Europea [6] y la Comisión FAO/OMS [22] han elaborado una serie de documentos específicos en los que se expone los factores de los que depende la fiabilidad de los resultados analíticos en el análisis de residuos de plaguicidas. Dichos factores quedan agrupados en tres bloques: la experiencia del analista, los recursos básicos necesarios y la disponibilidad de métodos analíticos validados.

En relación con el analista encargado, éste ha de estar convenientemente cualificado y poseer experiencia y competencia en el análisis de residuos, y el personal debe poseer una sólida formación y experiencia en el uso correcto de los equipos y la aplicación de las técnicas de laboratorio apropiadas.

Los recursos básicos están referidos tanto a los del laboratorio como a los de equipos y suministros. El laboratorio y sus instalaciones deben estar proyectados de forma que las distintas tareas se efectúen en zonas bien determinadas, con la máxima seguridad y la mínima posibilidad de contaminación de las muestras. Asimismo, el laboratorio deberá estar suficientemente abastecido de electricidad, agua y distintos gases. Es imprescindible disponer de un suministro adecuado de reactivos, disolventes,

material de vidrio, material para cromatografía, etc. La calibración es fundamental en los instrumentos de medición. Será necesario contar con una gama suficiente de plaguicidas de referencia de pureza conocida y convenientemente alta. Todos los patrones analíticos, las disoluciones concentradas y los reactivos deberán etiquetarse claramente con la fecha de caducidad y almacenarse en las condiciones adecuadas. Es importante garantizar la estabilidad de los compuestos de referencia. Asimismo, es importante que durante el almacenamiento las disoluciones patrón de los plaguicidas no se descompongan por efecto de la luz o el calor o se concentren a causa de la evaporación del disolvente.

En cuanto al análisis propiamente dicho, son numerosos los factores a tener en cuenta. Por ello, se exponen a continuación de forma resumida los aspectos más importantes.

- *Toma, transporte, tratamiento y conservación de las muestras.*

En la Sección 2 de esta Introducción ya han sido tratados ampliamente varios de estos aspectos. Señalar que deben transportarse al laboratorio en recipientes limpios y sólidamente envasadas, quedando identificadas de forma clara e indeleble. Los métodos de tratamiento y conservación no pueden afectar de forma significativa a los residuos estudiados. En condiciones ideales, las muestras deben almacenarse a temperatura de refrigeración (1-5°C), sin exponerlas a la luz solar directa, y ser analizadas en el plazo de pocos días. Para periodos más largos la temperatura de almacenamiento será de -20°C aproximadamente.

- *Extracción y concentración.*

Las porciones analíticas deben desintegrarse totalmente antes de la extracción o durante la misma, para maximizar la eficacia de la extracción. Si se sabe que la temperatura, pH, etc. afectan a la eficacia de la extracción o a la estabilidad del plaguicida, será necesario controlar estos parámetros. Los extractos y la disolución analítica final no deberán exponerse a la luz solar directa. Es necesario extremar el cuidado cuando deba evaporarse un extracto hasta su secado, ya que de esta manera pueden perderse de las superficies cantidades traza de muchos plaguicidas.

- *Calibración analítica e integración cromatográfica.*

En una secuencia de determinaciones, cada secuencia debe iniciarse y terminarse con una calibración. Cuando un patrón de calibración de un plaguicida esté formado por una mezcla de isómeros, podrá aceptarse generalmente que la respuesta del detector es similar, teniendo en cuenta la molaridad, con cada componente. Cuando el plaguicida se detecte como producto derivado o de degradación, las disoluciones de calibración deben prepararse a partir de un patrón de referencia de dicho producto derivado o de degradación, cuando se pueda. La calibración con patrones isómeros mezclados puede utilizar la suma de las áreas (alturas) de picos, o la medida correspondiente a un solo componente, según la posibilidad que se muestre más exacta.

- *Métodos analíticos.*

En principio, el método analítico debe ser capaz de proporcionar una recuperación repetible (en caso de plaguicidas añadidos a niveles superiores a unas cinco veces sus límites de detección) dentro de la banda 70-110%, de todos los

compuestos investigados por el método, y, a ser posible, con una recuperación media de cada compuesto situada entre el 80 y el 100%. Cuando los resultados se expresen en peso seco deberá ser constante el método utilizado para determinar el peso seco.

- *Determinaciones de recuperación.*

La recuperación de los plaguicidas debe determinarse mediante adición del analito a una muestra de matriz blanca, similar a la estudiada. El nivel de adición podrá ser de una a diez veces el nivel mínimo de cuantificación, el LMR o algún otro nivel importante para muestras concretas. Es preferible saber que el material blanco elegido no contiene niveles mensurables del analito.

- *Confirmación de los resultados.*

Principios de confirmación:

- Es imposible demostrar la ausencia completa de residuos. La adopción del límite de comunicación o nivel práctico más bajo (NPMB) al nivel mínimo cuantificable (NMC) evita el elevado coste de demostrar la presencia o ausencia de residuos a niveles tan bajos que los datos dejan de tener sentido. Estos valores de NPMB en relación con los LMRs establecidos quedan establecidos en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Valores de NPMB con relación a los LMR establecidos.

LMR (mg/Kg)	NPMB (mg/Kg)
≥5	0.5
0.5-5	0.1 (aumentando hasta 0.5 en los LMR más elevados)
0.05-0.5	0.02 (aumentando hasta 0.1 en los LMR más elevados)
<0.05	0.5 x LMR

- Los resultados al NMC o por encima necesitan una prueba adicional para considerarse confirmados. El requisito mínimo es el nuevo análisis de los extractos, con una calibración adecuada de los plaguicidas detectados.

Enfoques de la confirmación:

- La confirmación del analito detectado debe ser cuali y cuantitativa.
- Los ensayos basados en detector de captura de electrones tienden a necesitar la confirmación debido a su falta de especificidad.
- Cuando un residuo supere el LMR o cuando no deba estar presente en la muestra, el resultado deberá confirmarse por el método menos inequívoco disponible y mediante análisis de una o más porciones analíticas adicionales.

Confirmación por espectrometría de masas:

- Puede proporcionar la confirmación casi inequívoca de residuos de la mayoría de los plaguicidas, pero los datos de confirmación deben cumplir unos requisitos mínimos. El espectro de masas de referencia debe proceder del patrón de referencia o de una disolución de éste en disolvente puro.
- Los espectros de exploración completa ( desde  $m/z$  50 hasta más allá de la región de iones moleculares) proporcionan la identificación más concluyente, pero la sensibilidad puede mejorarse mediante la exploración de una banda limitada de masas o mediante monitorización selectiva de iones. En lo que respecta a la cuantificación, los iones que se controlen deberán ser los más específicos de la sustancia analizada, los que sufran menos interferencias y en los que la relación señal/ruído sea buena.

- *Expresión de los resultados.*

Para el cálculo de los resultados, los datos de los residuos no deben corregirse para tener en cuenta la recuperación. Cuando se hayan analizado dos o más porciones analíticas, se comunicará la media aritmética de los resultados más exactos obtenidos con cada porción. Cuando se realice una buena trituración o mezclado de las muestras, la RDS de los resultados entre las porciones analíticas no deberá superar el 30% si el residuo medido se encuentra en una concentración significativamente superior al límite de detección. En cuanto a la incertidumbre de las medidas, ésta constituye un indicador cuantitativo útil de la confianza que puede asignarse a los resultados, y puede usarse la desviación estándar de la repetibilidad o de la reproducibilidad interna. Los datos sobre la incertidumbre deben referirse al plaguicida concreto y es conveniente que se hayan obtenido a partir de la matriz correspondiente, a un nivel próximo al de la muestra.

En general, al comunicar los resultados, para aquellos inferiores a 0.1 mg/Kg, deberá redondearse a una cifra significativa; los resultados entre 0.1 y 10 mg/Kg, deben redondearse a dos cifras significativas; y los resultados por encima de 10 mg/Kg pueden redondearse a tres cifras significativas o al número entero más próximo.

Por último, cuando los residuos medidos en las muestras tomadas de un lote no superen los LMR, el lote será conforme a los LMR. Sólo deberán comunicarse los datos comprobados, que se expresarán tal como se definen en los LMR.

#### **4. METODOLOGIAS PARA LA DETERMINACION DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS Y PIRETROIDES**

El desarrollo de métodos analíticos para la determinación de residuos de plaguicidas responde a necesidades toxicológicas (el compuesto a identificar es potencialmente perjudicial para la salud del hombre o del medio ambiente), o bien a la necesidad de identificar un residuo final en una muestra (medidas de inspección y monitorización en alimentos y muestras medioambientales). En cualquiera de los dos casos, es necesario identificar y cuantificar pequeñas cantidades de estos compuestos.

En esta revisión bibliográfica, que no pretende ser exhaustiva sino ofrecer una panorámica general, se han abordado las metodologías desarrolladas para la determinación de residuos de plaguicidas organoclorados y piretroides en matrices biológicas, medioambientales y de alimentos, incluyendo el pretratamiento de la muestra y las técnicas cromatográficas de determinación y confirmación. Todos estos aspectos se han sistematizado en la Tabla 4.1. La parte final de esta sección recoge los avances en automatización, miniaturización y técnicas de screening en este campo.

##### ***4.1. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA: EXTRACCION Y LIMPIEZA***

El primer paso en el pretratamiento de la muestra para la determinación de este tipo de plaguicidas no polares es la extracción, que puede ser simple o repetitiva (con el mismo disolvente, combinando finalmente los extractos). El extractante y el método empleado dependen fundamentalmente de la naturaleza de la muestra. Así, como se contempla en la Tabla 4.1, para muestras sólidas la extracción puede realizarse con un

solo disolvente, principalmente acetona, acetonitrilo y acetato de etilo, o bien con una mezcla binaria de los mismos e incluso ternaria, en la que la acetona se combina con otros disolventes menos polares (principalmente n-hexano).

Para las muestras acuosas se emplea generalmente una extracción simple con un disolvente no polar (n-hexano o diclorometano).

Sin embargo, junto con los analitos también se extraen otros compuestos procedentes de la matriz. Por ello, es necesaria una etapa de limpieza del extracto, la cual depende del sistema de detección empleado. Así, si el detector utilizado es suficientemente selectivo, no se necesita una limpieza demasiado rigurosa del extracto, pero si no es así, entonces esta etapa debe ser lo suficientemente efectiva para eliminar la mayor parte posible de los coextractos que pueden interferir en la determinación. Además, puesto que la concentración de los analitos en este extracto no permitiría alcanzar los LMRs establecidos, es necesario incluir una etapa de preconcentración (evaporación del extracto y redisolución en un volumen menor).

Las técnicas de limpieza y preconcentración más utilizadas son la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE). La extracción líquido-líquido es una técnica muy conocida y utilizada para la separación de los plaguicidas de sus coextractos. En este caso, se utiliza en la primera extracción un disolvente polar, como la acetona, para después realizar la partición con un disolvente totalmente no polar. De esta forma, los plaguicidas quedan en la fase orgánica no polar, mientras que los coextractos quedan en la fase polar.

Sin embargo, las tendencias actuales están reemplazando la extracción líquido-líquido a favor de la extracción en fase sólida (ver Tabla 4.1). Es posible emplear SPE como única etapa de limpieza, o bien como una adicional tras la extracción líquido-líquido. Así, para muestras complejas, como son las frutas y hortalizas y los fluidos biológicos, generalmente se usa una extracción líquido-líquido seguida de una extracción en fase sólida [23,24,28,30,36], para intentar eliminar la mayor parte posible de coextractos en el extracto final.

Los adsorbentes que se utilizan para la preconcentración de plaguicidas organoclorados y piretroides son aquellos que retienen la fracción liposoluble del extracto, la cual luego puede ser eluida con disolventes de baja polaridad. Los sólidos adsorbentes más utilizados en estos casos se recogen en la Tabla 4.1, entre los que destacan el Florisil y la sílica-gel o sílica. RP-C<sub>18</sub> se ha empleado fundamentalmente con muestras de aguas.

La cromatografía en gel (GPC), también es una técnica de limpieza utilizada en el análisis de residuos de plaguicidas. Esta técnica se emplea para la separación de proteínas y biomoléculas, en base al tamaño molecular, partición o adsorción. Así, las diferentes fracciones del eluido pueden contener diferentes tipos de compuestos, separando los plaguicidas de sus coextractos. Los geles más utilizados son Bio-Beads SX-3 [27,37,41] y Envirogel [26]. Esta técnica es eficaz en limpieza de extractos, pero consume grandes volúmenes de disolventes orgánicos y requiere mucho tiempo.

También existen otras técnicas, relativamente recientes, que están empezando a utilizarse en la determinación de plaguicidas, pero que aún no están muy extendidas:

-Extracción con fluidos supercríticos (SFE) [61-63]. Presenta la ventaja de que ahorra tiempo y disolventes, siendo el disolvente más utilizado el dióxido de carbono por su temperatura (31°C) y su presión (73 atm.) críticas moderadas. Además, el CO<sub>2</sub> no es inflamable, ni tóxico, y no es demasiado caro. El metanol puede utilizarse como modificador para ajustar el poder de disolución del fluido.

-Microextracción en fase sólida (SPME) [64-67]. Los analitos se adsorben en una fibra recubierta con polímeros, bien al sumergirla en la muestra si ésta es líquida, o bien utilizando la técnica de espacio de cabeza si son sólidas. La desorción de los analitos se realiza por calentamiento brusco, colocando la fibra directamente en el portal de inyección de un cromatógrafo de gases, o bien, con disolventes en la interfase SPME/LC.

-Extracción con disolventes asistida por microondas (MAE) [39,41]. Esta técnica utiliza la energía de las microondas para favorecer y acelerar la extracción con disolventes, siendo más eficaz que la clásica extracción Soxhlet.

-Microextracción con disolventes (SME) [68,69]. Es una extracción líquido-líquido que emplea microvolúmenes de un disolvente orgánico para la extracción de analitos desde una fase acuosa.

En la Figura 4.1.1 podemos ver la distribución de los trabajos relacionados con la determinación de residuos de plaguicidas organoclorados y piretroides en muestras agrícolas y medioambientales, en función del tipo de pretratamiento empleado.

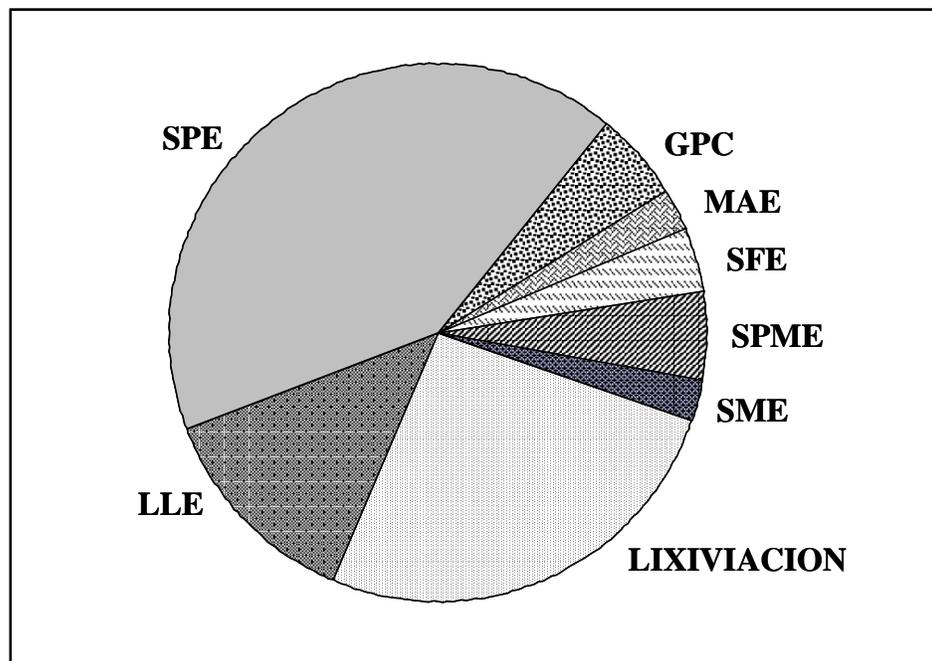


Figura 4.1.1. Distribución de publicaciones en función del pretratamiento de la muestra, en el contexto de la determinación de residuos de plaguicidas en muestras agrícolas y medioambientales. (Fuente: CD-ROM Analytical Abstracts, WinSPIRS Silver Platter Co. 1980-Abril 2001).

#### 4.2. SEPARACION CROMATOGRAFICA

La mayor parte de los métodos analíticos para la determinación de plaguicidas organoclorados y piretroides están basados en técnicas de separación cromatográficas. Los plaguicidas organoclorados suelen determinarse por cromatografía de gases y, dado su carácter fuertemente halogenado, empleando como detector el de captura de electrones (ECD). La espectrometría de masas (MS) también está ampliamente extendida y, aunque en menor medida, se encuentran referencias del empleo de los detectores de conductividad electrónica (DEC) [24,57] y de emisión atómica (AED) [27] para la determinación de residuos de plaguicidas organoclorados.

Por otro lado, la cromatografía de gases es también la técnica de primera elección para el análisis de residuos de piretroides. Muchos de los piretroides poseen varios átomos de halógenos en su molécula (ej. bifentrín, fenpropatrín, cipermetrín, ciflutrín, permetrín, fenvalerato, deltametrín,  $\lambda$ -cihalotrín), lo que los hace muy sensibles al detector de captura de electrones. También es posible llevar a cabo derivatizaciones para introducir un grupo sensible al ECD en la molécula de aquellos piretroides que no posean átomos de halógenos (ej. alletrín, resmetrín, fenotrín, tetrametrín) [35]. El detector de ionización de llama (FID) puede utilizarse para la determinación de piretroides no halogenados [43,55], aunque su sensibilidad no es muy alta.

Por último, la cromatografía líquida (LC) permite la cuantificación de aquellos compuestos que no son volátiles o son termolábiles, sin necesidad de derivatización. Así, la cromatografía líquida con detección ultravioleta (UV) se emplea

fundamentalmente en el estudio teórico de separación de enantiómeros [70-72], mientras que asociada al detector de espectrometría de masas (MS) se utiliza en el análisis de residuos de piretroides en muestras medioambientales y de alimentos [73,74].

#### *4.3. CONFIRMACION POR ESPECTROMETRIA DE MASAS*

La espectrometría de masas es una herramienta excelente para confirmar resultados obtenidos empleando detectores que, aunque proporcionen una elevada sensibilidad (fundamental para alcanzar los LMR), no permiten una identificación inequívoca del compuesto. Un espectro completo de masas de un plaguicida proporciona una información estructural del mismo que sólo le corresponde a él. La mayoría de los estudios que se han realizado hasta hoy día utilizan la técnica de ionización por impacto electrónico (EI) a una determinada energía (normalmente 70 eV). La espectrometría de masas acoplada a GC ha sido empleada para este propósito en la determinación de residuos de plaguicidas organoclorados y piretroides [31,34,48,50].

**Tabla 4.1.** Métodos desarrollados para la determinación de residuos de plaguicidas en los ámbitos medioambiental, agroalimentario y clínico.

Ref	Muestra	Analito	Pretratamiento de la muestra			Detección cromatográfica
			Lixiviación	LLE	SPE Otro	
23	Frutas y hortalizas	Piretroides	Acetonitrilo o Acetona		Florisil	GC-ECD
24	Frutas y hortalizas	Organoclorados	Acetona		Carbón activado	GC-DEC
25	Frutas	Piretroides	Acetona		Florisil	GC-ECD
26	Hierbas	Organoclorados y piretroides	Acetona	Diclorometano		GPC GC-MS Envirogel
27	Alimentos	Organoclorados	Acetona	Diclorometano		GPC GC-AED Bio Beads SX-3
28	Frutas y hortalizas	Piretroides	Acetona	Hexano	Florisil	GC-ECD
29	Tejido animal	Organoclorados	Acetonitrilo		RP-C <sub>18</sub>	GC-ECD
30	Frutas y hortalizas	Piretroides	Acetonitrilo	Hexano	Florisil	GC-ECD
31	Huevos de pescado	Piretroides	Acetonitrilo		Alúmina + Sílica	GC-ECD/MS
32	Frutas y hortalizas	Organoclorados	Acetato etilo			GC-MS
33	Lechuga	Organoclorados	Acetato etilo			GC-ECD
34	Fruta de la pasión	Piretroides	Acetato etilo		Alúmina + Sílica	GC-ECD/MS
35	Polvo	Piretroides no halogenados	Acetato etilo		Florisil	GC-ECD Derivatización
36	Frutas y hortalizas	Organoclorados	Isopropanol	Éter petróleo	Florisil	GC-ECD
37	Alimentos grasos	Organoclorados	Diclorometano			GPC GC-MS BioBeads SX-3
38	Frutas	Piretroides	Acetona + hexano		Florisil	GC-ECD

**Tabla 4.1. (Continuación).**

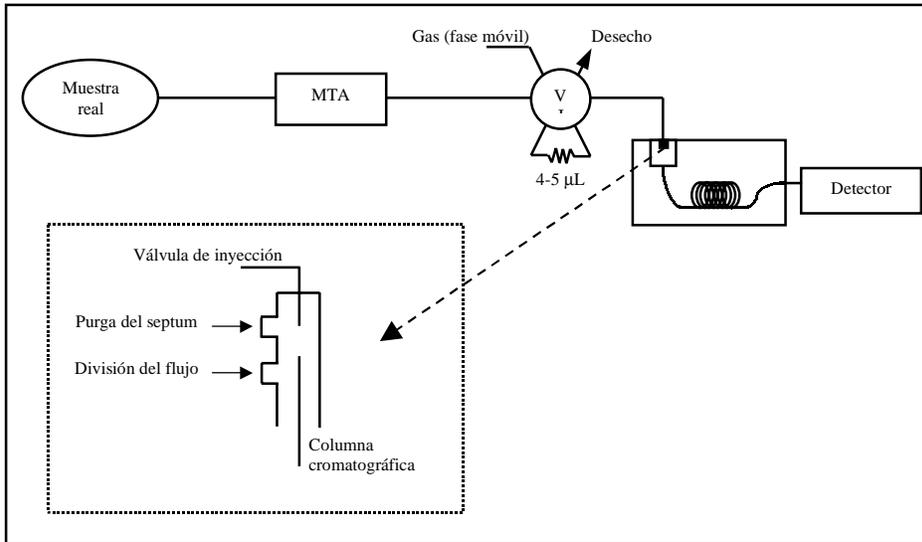
Ref	Muestra	Analito	Pretratamiento de la muestra				Detección cromatográfica
			Lixiviación	LLE	SPE	Otro	
39	Sedimentos	Organoclorados	Acetona + hexano MAE		Alúmina + Sílica		GC-MS
40	Fresas	Organoclorados	Acetona-éter petróleo				GC-ECD
41	Pescado	Organoclorados	Acetato etilo+ ciclohexano MAE			GPC Bio Beads SX-3	GC-ECD
42	Frutas y hortalizas	Organoclorados	Acetonitrilo + tolueno		Carbón activado		GC-MS
43	Frutas	Piretroides no halogenados	Heptano + dietiléter		Si-2OH		GC-FID
44	Frutas	Organoclorados	Acetona + diclorometano + hexano				GC-MS
45	Aguas	Organoclorados		Hexano	Florisil		GC-ECD
46	Aguas	Piretroides		Hexano	Florisil		GC-ECD
47	Orina	Metabolitos de piretroides		Hexano			GC-MS
48	Aguas	Organoclorados		Diclorometano	Florisil		GC-ECD/MS
49	Orina	Metabolitos de piretroides		Diclorometano	Sílica		GC-ECD
50	Aceite de cítricos	Organoclorados			Sílica		GC-ECD/MS
51	Aguas	Organoclorados			Si-2OH		GC-ECD
51	Aguas	Organoclorados			Si-CN		GC-ECD
53	Aguas	Organoclorados			RP-C <sub>18</sub>		GC-ECD
54	Aguas	Organoclorados			RP-C <sub>18</sub>		GC-MS
55	Orina y sangre	Piretroides no halogenados			RP-C <sub>18</sub>		GC-FID
56	Aguas	Organoclorados			RP-C <sub>18</sub>		GC-ECD
57	Aguas	Piretroides			RP-C <sub>18</sub>		GC-DEC

**Tabla 4.1. (Continuación).**

Ref	Muestra	Analito	Pretratamiento de la muestra				Detección cromatográfica
			Lixiviación	LLE	SPE	Otro	
58	Orina	Metabolitos de piretroides			RP-C <sub>18</sub>		GC-MS
59	Aguas	Piretroides			RP-C <sub>18</sub>		GC-ECD
60	Agua de lluvia	Organoclorados			Amberlita XAD-2		GC-ECD
61	Aguas	Organoclorados				SFE	GC-ECD
62	Aguas	Organoclorados				SFE	GC-MS
63	Hortalizas	Piretroides				SFE	GC-MS
64	Aguas	Piretroides				SPME	GC-ECD
65	Aguas	Organoclorados				SPME	GC-MS
66	Aguas	Organoclorados				SPME	GC-ECD
67	Aguas	Organoclorados				SPME	GC-ECD
68	Aguas	Organoclorados				SME (hexano)	GC-ECD
69	Aguas	Organoclorados				SME (hexano)	GC-ECD

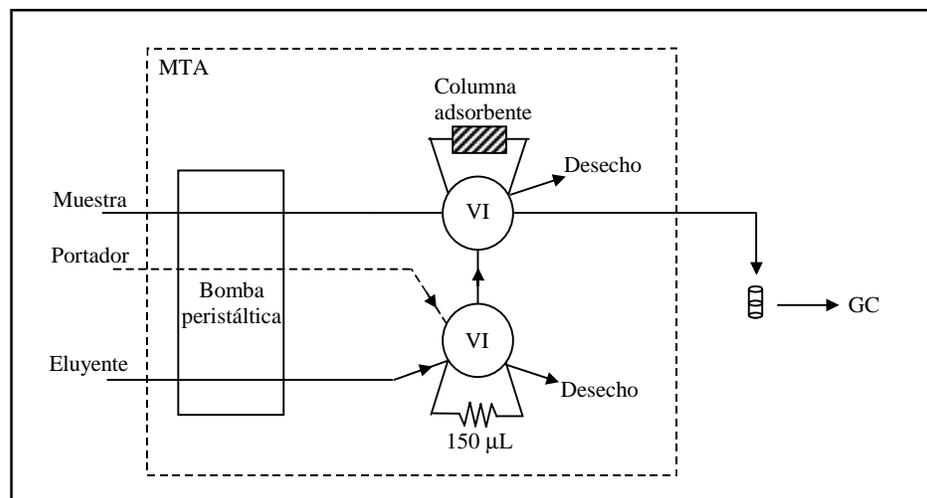
#### 4.4. AUTOMATIZACION Y MINIATURIZACION

La química analítica actual, al igual que otros campos científicos y tecnológicos, tiende a la automatización, miniaturización y simplificación de los procesos analíticos. Sin embargo, la mayoría de los métodos desarrollados en el ámbito del análisis de residuos de plaguicidas son métodos manuales. La transformación de un método manual en automático, casi siempre implica un grado más o menos intenso de miniaturización y simplificación. La automatización total o parcial de un proceso analítico implica la eliminación, o reducción, de la intervención humana. Con los sistemas en línea, todas las etapas del proceso tienen lugar de forma continua y automática, haciendo uso de un módulo de tratamiento automático (MTA) que está conectado directamente (a través de tubos de conexión y válvulas) al instrumento de medida. La mayoría de los sistemas automáticos en línea desarrollados se basan en configuraciones en flujo (FA, flow analysis) de alta o baja presión, siendo el elemento clave la interfase. Así, por ejemplo, el diseño más simple de una interfase entre un MTA y un cromatógrafo de gases, utiliza una válvula de inyección, tal como se muestra en la Figura 4.4.1.



**Figura 4.4.1.** Conexión de un MTA basado en una configuración en flujo a un cromatógrafo de gases.

Sin embargo, también existe otra alternativa mixta en la que se utiliza un MTA para desarrollar todas las operaciones previas del proceso analítico, pero sin estar conectado directamente al instrumento, aunque esta última etapa también se puede automatizar utilizando un automuestreador. Esta es la alternativa preferida en los laboratorios de rutina, que suelen dedicar el día de trabajo al tratamiento de las muestras, disponiendo de los extractos finales en los viales del automuestreador para que el instrumento los analice durante la noche. Un ejemplo de este tipo de sistemas se encuentra esquematizado en la figura siguiente.

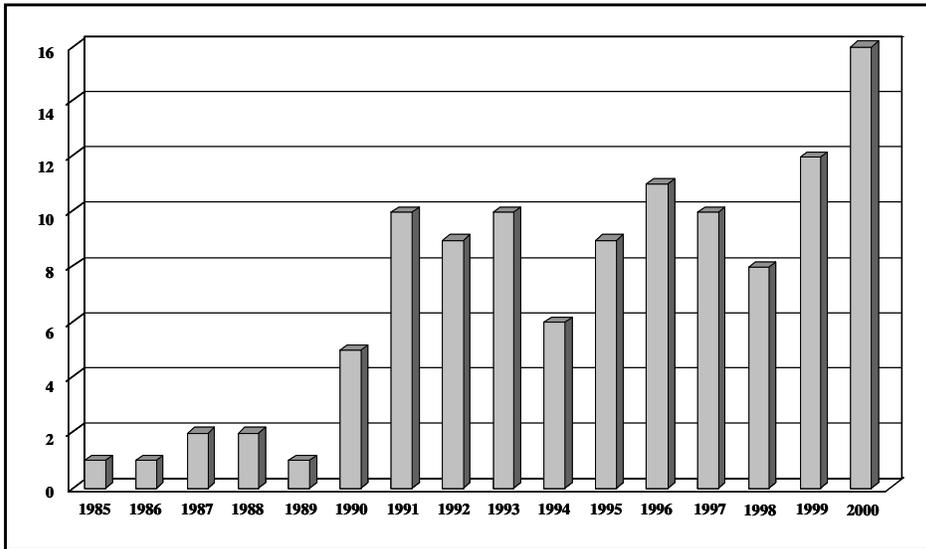


**Figura 4.4.2.** Esquema de un MTA fuera de línea con el cromatógrafo de gases.

La aplicación de los módulos de tratamiento automático en el análisis de residuos de plaguicidas supone una serie de ventajas, entre las que destacan la disminución del consumo de reactivos y disolventes, la disminución en el volumen de productos de desecho, así como de la intervención humana y del tiempo necesario para desarrollar el análisis. Todo ello redundará en una disminución del coste del análisis y del riesgo de contaminación del operario [75].

En los últimos años, el análisis en flujo se ha desarrollado enormemente, automatizando operaciones clásicas en química, como son la extracción líquido-líquido, separaciones por precipitación, reacciones de derivatización, extracción en fase sólida y técnicas de preconcentración, que actualmente se pueden llevar a cabo de forma continua. En este contexto, podemos ver que del total de 10447 referencias (Fuente: CD-ROM Analytical Abstracts, WinSPIRS Silver Platter Co. 1980-Abril 2001) sobre

utilización de técnicas automáticas, 113 están relacionadas con la determinación de residuos de plaguicidas. La aparición de trabajos dedicados a la automatización en relación a plaguicidas, se ha ido incrementando, como podemos observar en la Figura 4.4.3.



**Figura 4.4.3.** Evolución de las publicaciones relacionadas con la automatización de metodologías para la determinación de residuos de plaguicidas. (Fuente: CD-ROM Analytical Abstracts, WinSPIRS Silver Platter Co. 1980-Abril 2001).

Uno de los primeros trabajos que aparece en la bibliografía sobre la determinación de plaguicidas utilizando métodos automatizados (1990) se debe a A. Farrán et al. [76] quienes determinaron plaguicidas organofosforados en agua utilizando un sistema continuo de inyección en flujo en el cual se realizaba, de manera automática,

la extracción del plaguicida con heptano y la posterior separación de fases con un separador de membrana, conectado de forma continua con LC-UV.

#### *4.5. SISTEMAS DE SCREENING*

Los sistemas de screening o criba están constituidos por las herramientas y los procesos analíticos que proporcionan con gran rapidez información analítica [75]. Están directamente relacionados con la automatización, miniaturización y simplificación, que son las tendencias básicas comentadas en el apartado anterior. Estos sistemas se caracterizan por:

1. Presentar un mayor énfasis cualitativo que cuantitativo.
2. Rapidez.
3. Ofrecer una respuesta binaria SI/NO que requiere una confirmación mediante la aplicación de una metodología analítica adicional.
4. Empleo inmediato de la respuesta binaria obtenida para la toma de decisiones.

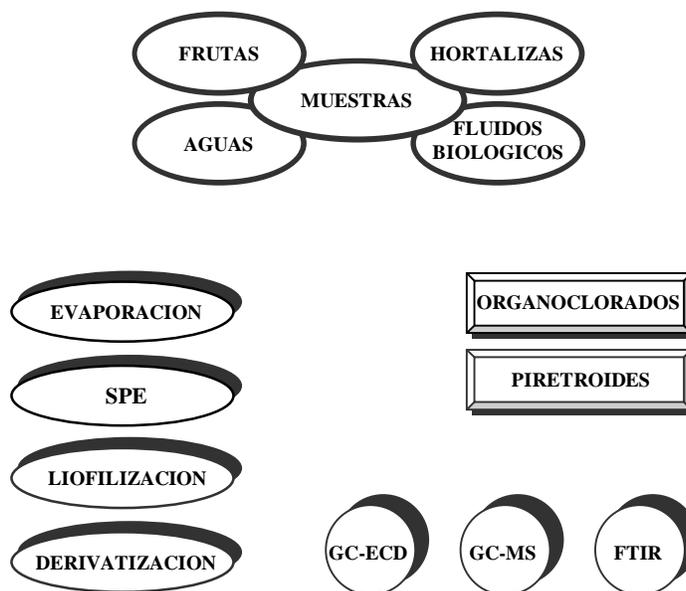
Los sistemas desarrollados pueden dividirse en dos grandes grupos, dependiendo de cuál sea el objeto del screening.

- Sistemas de screening de muestras. Tienen como objetivo identificar y seleccionar un grupo de muestras en un conjunto de las mismas que tengan un analito (o grupo de los mismos) por encima de un determinado nivel de concentración.

- Sistemas de screening de analitos. Se refieren a la identificación de un analito o grupo de los mismos en un determinado tipo de muestra o sistema.

La presente Memoria centra uno de sus objetivos en el desarrollo de métodos automáticos basados en el análisis en flujo para la determinación de residuos plaguicidas en muestras agroalimentarias. Además, estos métodos han de ser rápidos (screening de muestras) y eficaces, para ser factible su implantación en laboratorios de rutina, y suficientemente sensibles para alcanzar los LMR establecidos en la legislación.

La Memoria se encuentra estructurada de forma que al inicio de cada capítulo se muestra la combinación de muestras, analitos, metodologías y detectores que entran a formar parte del mismo. El esquema al que se hace referencia es el siguiente:



De esta forma se pretende ofrecer una información inicial sobre los tópicos que se pretenden abordar en cada uno de los capítulos.

**REFERENCIAS**

- [1] Comisión de las Comunidades Europeas, *Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria*, Bruselas, 2000.
- [2] R. Coscolla, *Residuos de Plaguicidas en Alimentos Vegetales*, Mundi-Prensa, Madrid, 1993.
- [3] *Real Decreto 280/1994*, BOE nº 58, Ministerio de la Presidencia, Madrid, 1994.
- [4] *Directiva Comunitaria 76/895/CEE*, DO L 340, Comunidad Europea, Bruselas, 1976.
- [5] Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, *Codex Alimentarius*, Comisión del Codex Alimentarius, Roma, 1997.
- [6] *Recomendación Comunitaria 153/99/COL*, DO L 74, Comunidad Europea, Bruselas, 1999.
- [7] H. D. Belitz, W. Grosch, *Química de los Alimentos*, Acribia S.A., Zaragoza, 1997.
- [8] *Real Decreto 3349/1983*, BOE nº 20, Ministerio de la Presidencia, Madrid, 1983.
- [9] C. Tomlin (Editor), *The Pesticide Manual*, 10<sup>th</sup> edn., British Crop Protection, The Royal Society of Chemistry, London, 1994.
- [10] C. Liñán Vicente (Editor), *Vademécum de productos Fitosanitarios y Nutricionales*, 14<sup>th</sup> edn., Agrotécnicas S.L., Madrid, 1998.

- 
- [11] E. Alday et al., *Toxicología Laboral Básica*, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Sevilla, 1989.
- [12] E. D. Ongley, *Control of Water Pollution from Agriculture*, FAO/OMS, Roma, 1996.
- [13] FAO, *Manual on the Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data for the Estimation of Maximum Residue Levels in Food and Feed*, Roma, 1997.
- [14] *Directiva Comunitaria 91/414/CEE*, DO L 230, Comunidad Europea, Bruselas, 1991.
- [15] Excepted from FDA Consumer, *FDA Reports on Pesticides in Foods*, FDA, 1993.
- [16] *Directiva Comunitaria 80/778/CEE*, DO L 229, Comunidad Europea, Bruselas, 1980.
- [17] *Real Decreto 1138/1990*, BOE nº 226, Ministerio de la Presidencia, Madrid, 1990.
- [18] Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, *Métodos de Muestreo Recomendados para la Determinación de Plaguicidas a Efectos del Cumplimiento de los LMRs*, Roma, 1999.
- [19] *Directiva Comunitaria 79/700/CEE*, DO L 207, Comunidad Europea, Bruselas, 1980.
- [20] *Directiva Comunitaria 80/778/CEE*, DO L 229, Comunidad Europea, Bruselas, 1979.
-

- 
- [21] *Orden de 8 de Febrero de 1998*, BOE nº 53, Ministerio de la Presidencia, Madrid, 1998.
- [22] Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, *Directrices sobre Buenas Prácticas en el Análisis de Residuos de Plaguicidas*, Roma, 1993.
- [23] G. F. Pang, Y. Z. Cao, C. L. Fan, J. J. Zhang, X. M. Li, *J. AOAC* 82 (1999) 186.
- [24] F. J. Schenck, V. Howard-King, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63 (1999) 277.
- [25] A. di Muccio, D. A. Barbini, T. Generali, P. Pelosi, A. Ausili, F. Vergori, I. Camoni, *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 39.
- [26] P. D. Johnson, D. A. Rimmer, R. H. Brown, *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 3.
- [27] H. J. Stan, M. Linkerhaegner, *J. Chromatogr. A* 750 (1996) 369.
- [28] M. Imanaka, M. Kadota, K. Kumashiro, T. Mori, *J. AOAC* 79 (1996) 538.
- [29] M. V. Russo, *Chromatographia* 51 (2000) 71.
- [30] G. F. Pang, Y. Z. Chao, C. L. Fan, J. J. Zhang, X. M. Li, T. S. Zhao, *J. AOAC* 78 (1995) 1481.
- [31] E. Bolygo, S. T. Hadfield, *J. High Resolut. Chromatogr.* 13 (1990) 457.
- [32] A. Agüera, L. Piedra, M. D. Hernando, A. R. Fernández-Alba, M. Contreras, *Analyst* 125 (2000) 1397.
- [33] S. A. Denloye, G. R. van der Hoff, E. A. Hogendoorn, R. A. Baumann, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2729.
- [34] H. S. Dorea, F. M. Lancas, *J. Microcolumn Separations* 11 (1999) 367.
-

- 
- [35] T. J. Class, R. Bacher, W. Boehner, M. Bergmann, *GIT Fachz Lab.* 39 (1995) 305.
- [36] A. Ramesh, M. Balasubramanian, *J. AOAC* 82 (1999) 725.
- [37] A. Sannino, P. Mambriani, M. Bandini, L. Bolzoni, *J. AOAC* 79 (1996) 1434.
- [38] S. Navickiene, L. Polese, P. V. Minelli, M. L. Ribeiro, *Chromatographia* 49 (1999) 212.
- [39] I. Silgoner, R. Krska, E. Lombas, O. Gans, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, *Fresenius J. Anal. Chem.* 362 (1998) 120.
- [40] A. Stensvand, A. Christiansen, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 917.
- [41] M. Weichbrodt, W. Vetter, B. Luckas, *J. AOAC* 83 (2000) 1334.
- [42] L. E. Sojo, A. Brocke, J. Fillion, S. M. Price, *J. Cromatogr. A* 788 (1997) 141.
- [43] F. Modeste, M. Cauren, P. Devaux, *J. High Resolut. Chromatogr.* 19 (1996) 535.
- [44] E. Lacassie, M. F. Dreyfuss, J. L. Daguët, M. Vignaud, P. Marquet, G. Lachatre, *J. Chromatogr. A* 805 (1998) 319.
- [45] S. Muralidharan, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65 (2000) 35.
- [46] H. Lutnicka, T. Bogacka, L. Wolska, *Water Research* 33 (1999) 3441.
- [47] G. Leng, K. H. Kuehn, A. Leng, W. Gries, J. Lewalter, H. Idel, *Chromatographia* 46 (1997) 265.
- [48] A. M. A. Abd-Allah, *J. AOAC* 82 (1999) 391.
- [49] C. Aprea, A. Stridori, G. Sciarra, *J. Chromatogr. B* 695 (1997) 227.
-

- [50] M. Saitta, G. di Bella, F. Salvo, S. lo Curto, G. Dugo, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 797.
- [51] M. V. Russo, *Chromatographia* 52 (2000) 93.
- [52] M. V. Russo, G. Goretti, T. Nevigato, *Chromatographia* 50 (1999) 446.
- [53] L. Wolska, M. Wiergowski, K. Galer, T. Gorecki, J. Namiesnik, *Chemosphere* 39 (1999) 1477.
- [54] J. B. Fournier, M. El'Hourch, J. Fournier, *Analisis* 27 (1999) 726.
- [55] J. Liu, O. Suzuki, *Forensic Sci. Int.* 99 (1999) 159.
- [56] M. A. Fernández, C. Alonzo, M. J. González, L. M. Hernández, *Chemosphere* 38 (1999) 33.
- [57] M. J. Hengel, C. R. Mourer, T. Shibamoto, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59 (1997) 171.
- [58] J. Angerer, A. Ritter, *J. Chromatogr. B* 695 (1997) 217.
- [59] G. Rene van der Hoff, F. Pelusio, U. A. T. Brinkman, R. A. Baumann, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A* 719 (1996) 59.
- [60] M. F. Sincik, R. M. Hoff, W. M. J. Strachan, C. W. Sweet, I. Basu, R. A. Hites, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 361.
- [61] I. N. Glazkov, I. A. Revelsky, I. P. Efimov, Y. A. Zolotov, *J. Microcolumn Separations* 11 (1999) 729.
- [62] R. Fuoco, A. Ceccarini, M. Onor, L. Marrara, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 387.

- [63] R. J. Argauer, K.I. Eller, R. M. Pfeil, R. T. Brown, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 180.
- [64] W. R. Barrionuevo, F. M. Lancast, *J. High Resolut. Chromatogr.* 23 (2000) 485.
- [65] M. Guidotti, G. Ravaioli, *Ann. Chim.* 89 (1999) 919.
- [66] C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocurull, J. Ferre, F. Borrull, R. M. Marce, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 425.
- [67] P. Popp, A. Paschke, *Chromatographia* 49 (1999) 686.
- [68] L. S. de Jager, A. R. J. Andrews, *Analyst* 125 (2000) 1943.
- [69] L. S. de Jager, A. R. J. Andrews, *Chromatographia* 50 (1999) 733.
- [70] A. Navas Díaz, F. García Sánchez, A. García Pareja, *J. Chromatogr. Sci.* 36 (1998) 36.
- [71] M. Dondi, M. Flieger, J. Olsovska, C. M. Polcaro, M. Sinibaldi, *J. Chromatogr. A* 859 (1999) 133.
- [72] E. I. Davidyuk, V. F. Demchenko, M. A. Klisenko, *J. Anal. Chem.* 52 (1997) 1058.
- [73] A. Lamiri, A. Medvedovici, F. David, V. David, P. Sandra, *Chem. Anal.* 44 (1999) 977.
- [74] I. A. Fleet, J. J. Monaghan, D. B. Gordon, G. A. Lord, *Analyst* 121 (1996) 55.
- [75] M. Valcárcel, M. S. Cárdenas, *Automatización y Miniaturización en Química Analítica*, Springer, Barcelona, 2000.
- [76] A. Farran, J. L. Cortina, J. de Pablo, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta* 243 (1990) 119.



**CAPITULO I:  
HERRAMIENTAS ANALITICAS**

CHAPTER I:  
ANALYTICAL TOOLS

**CAPITULO I**



Para el desarrollo experimental de esta Memoria se ha recurrido a diferentes herramientas analíticas, desde reactivos, disolventes y material de vidrio, a cromatógrafos y espectrómetros, así como los diferentes componentes que entran a formar parte de los módulos automáticos de flujo continuo. En este capítulo de la Memoria se enumeran dichas herramientas junto con sus características más relevantes.

## **I.1. ESTANDARES Y REACTIVOS**

### *I.1.1 Estándares de plaguicidas/metabolitos*

- a) Estándares de plaguicidas organoclorados y piretroides. La pureza de todos estos estándares es del 99% y pertenecen a la casa comercial Riedel-DeHaën. La mayoría de ellos son sólidos y todos vienen presentados en frascos de color topacio para evitar su degradación con la luz. Además, para su correcta conservación se mantuvieron en un lugar seco y a menos de 20 °C. La relación de dichos estándares de plaguicidas es la siguiente.

## a.1) Estándares de plaguicidas organoclorados:

- $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Hexaclorohexano (1:1:1:1, p/p), ( $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -HCH)
- Lindano, ( $\gamma$ -HCH)
- Hexaclorobenceno, (HCB)
- $\alpha,\beta$ -Endosulfán (3:1, p/p)
- Endosulfán sulfato
- Heptacloro
- Aldrín
- Dieldrín
- Endrín
- Dicofol
- Clordane
- Clorbenside
- Iprodiona
- Captafol
- Metoxicloro
- Diclorán
- Vinclozolina
- Diclofluanida
- Captán
- Procimidona

## a.2) Estándares de plaguicidas piretroides:

- Butóxido de piperonilo
- Bifentrín
- Fenpropatrín
- $\lambda$ -Cihalotrín
- Cipermetrín (I+II+III+IV)
- Ciflutrín (I+II+III+IV)
- $\alpha$ -Cipermetrín
- $\beta$ -Ciflutrín
- Permetrín
- Fenvalerato
- Deltametrín

Ciflutrín y cipermetrín están formados por 4 isómeros: 1(RS)cis, $\alpha$ (RS) que es el isómero I; 1(RS)trans, $\alpha$ (RS), isómero III; 1(RS)cis, $\alpha$ (SR), isómero II; y 1(RS)trans, $\alpha$ (SR), isómero IV;  $\alpha$ -cipermetrín es el isómero III de cipermetrín y  $\beta$ -ciflutrín es la mezcla de los isómeros II y IV de ciflutrín en la proporción 1:2.

b) Estándares de metabolitos de piretroides. La pureza de todos estos estándares es del 99.5% y pertenecen a la casa comercial Dr. Ehrenstorfer. Todos ellos vienen preparados en disolución de metanol, a concentraciones de 2 y 20 ppm, presentados en ampollas de color topacio para evitar su degradación con la luz. Para su correcta conservación se mantuvieron a 4°C. La relación de dichos estándares de plaguicidas es la siguiente:

- Ácido carboxílico cis y trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil-(1-ciclopropano), (cis y trans-DCCA)
- Ácido carboxílico cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetil-(1-ciclopropano), (cis-DBCA)
- Ácido 3-fenoxibenzoico, (PBA)

### 1.1.2. Sólidos adsorbentes

Aunque fueron varios los sólidos adsorbentes que se ensayaron, únicamente dos de ellos son los que finalmente se utilizaron en esta Memoria. Con estos sólidos se

rellenaron las columnas adsorbentes utilizadas en las configuraciones continuas en flujo, para realizar el proceso automatizado de la extracción en fase sólida.

- RP-C<sub>18</sub>. Las características de este adsorbente, que presenta la casa comercial Sigma en un envase de 10 g, son las de un polvo de tamaño de partícula 15-40  $\mu\text{m}$ , con un diámetro de 60 Å y un área superficial de 500 m<sup>2</sup>/g.
- Sílica. La casa comercial Varian presenta cartuchos Bond Elut con fase de sílica de 500 mg. Dicha cantidad ocupa un volumen de 3 cm<sup>3</sup> en el cartucho. Sin embargo, los cartuchos no fueron utilizados como tales, sino que se vaciaron y con su contenido se rellenaron las columnas adsorbentes utilizadas.

### 1.1.3. Reactivos derivatizadores

En el Cap. V de esta Memoria se aborda la determinación de plaguicidas organoclorados y de metabolitos de piretroides en muestras de orina. Pero debido al hecho de que dichos metabolitos no son suficientemente volátiles ni sensibles al ECD, para su determinación por cromatografía de gases es necesario derivatizarlos. Los reactivos empleados, suministrados por Aldrich, son:

- 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol, (HFIP)
- diisopropilcarbodiimida, (DIC)

En esta derivatización, los metabolitos (DCCA, DBCA y PBA) son hexafluorados, mediante un enlace éster con la molécula de HFIP. El papel de DIC es el de catalizador de la reacción. Ambos reactivos se añaden al eluyente utilizado en el proceso de extracción en fase sólida, en una proporción DIC:HFIP:acetato de etilo,

5:8:85 (v/v/v). De esta forma, la reacción de derivatización se lleva a cabo simultáneamente a la elución.

#### *1.1.4. Otros reactivos*

- Disolventes orgánicos. Se han utilizado para preparar las disoluciones de patrones, sus diluciones, como eluyentes de los sistemas de flujo y para limpiar las columnas adsorbentes y acondicionarlas antes de hacer pasar por ellas cada muestra. Estos disolventes, de calidad HPLC y suministrados por Merck, son: éter de petróleo, acetona, n-hexano, acetato de etilo, etanol, isopropanol, acetonitrilo y metanol.
- Ácidos y bases. En diferentes capítulos de esta Memoria ha sido necesario el ajuste de pH (muestras acuosas y de orina y disolución de Brine), para lo cual se han empleado disoluciones de hidróxido sódico, hidróxido potásico, ácido clorhídrico y de ácido nítrico de concentraciones variables. También se ha utilizado ácido sulfúrico concentrado para la hidrólisis ácida de las muestras de orina (Cap. V), y la llamada disolución de Brine (Cap. II.2), compuesta por una disolución reguladora de fosfato potásico saturada con cloruro sódico. Todos ellos, de grado analítico o superior, fueron suministrados por la casa comercial Merck.
- Otros reactivos. Bajo este epígrafe tan amplio se engloban los siguientes reactivos: agua destilada; carbón activo para decolorar (Norit SA3, Aldrich), sin propiedades adsorbentes para los plaguicidas, utilizado para decolorar el

extracto orgánico procedente de la extracción de frutas frescas (Cap. II.2) antes de ser introducido en el sistema de flujo; sulfato sódico anhidro (Merck), para secar las fases orgánicas antes de ser inyectadas en los sistemas cromatográficos; tiosulfato sódico (Merck), empleado como agente decolorante en muestras acuosas (Cap. IV). En el módulo automático de evaporación/redisolución, utilizado para el cambio de disolvente en el Cap. II, así como en la evaporación del disolvente orgánico necesaria en el Cap. IV.2, se empleó gas nitrógeno de calidad 1, suministrado por Air Liquide.

- Material de vidrio común en laboratorio, clase A. Todo el material de vidrio se lavó antes de ser utilizado, manteniéndolo sumergido en una disolución jabonosa durante 12 horas, y posteriormente de forma secuencial con agua destilada, acetona y el disolvente con el que se fuera a utilizar.

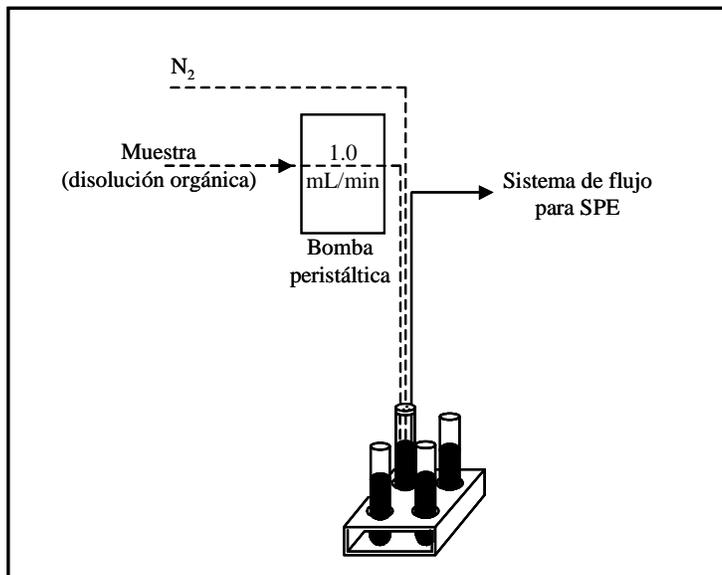
## **I.2. COMPONENTES DE LOS SISTEMAS DE FLUJO CONTINUO**

Los sistemas de flujo empleados en esta Memoria han estado enfocados a la automatización de las técnicas de extracción, de cambio de disolvente y de extracción en fase sólida, evitando tediosos procedimientos manuales que conllevan mayor gasto de disolventes y tiempo, así como una mayor intervención por parte del operario. En estos sistemas de flujo se han empleado los siguientes componentes:

- Bombas peristálticas (Gilson Minipuls 2), para la aspiración de las muestras y reactivos a través de los tubos de bomba.

- Tubos de bomba, de cloruro de polivinilo para muestras acuosas y Solvaflex para disolventes orgánicos, de diferentes diámetros.
- Tubos de conducción de PTFE, de 0.5 mm de diámetro interno, para fabricar reactores, bucles y serpentines.
- Conectores de PTFE (Omnifit), para unir los tubos de conducción con los diferentes componentes del sistema de flujo.
- Válvulas de inyección, Rheodyne, de 6 vías, donde se insertan las minicolumnas adsorbentes o los bucles que determinan el volumen de disolvente eluyente necesario en cada metodología desarrollada.
- Minicolumnas adsorbentes. La mayor parte de ellas son de propia fabricación en el laboratorio, a partir de tubos de vidrio de 4 mm de diámetro interno, donde se empaqueta el sólido adsorbente (RP-C<sub>18</sub> o sílica) y se sellan con pequeñas porciones de algodón o lana de vidrio para evitar pérdidas del material adsorbente. Sin embargo, en otras ocasiones (Cap. II.1, IV.1 y V.1) se ha empleado una columna de vidrio comercial (Omnifit) de 2 cm de longitud y 2.5 mm de diámetro interno.

- Unidad de evaporación/redisolución. En el Cap. II los plaguicidas organoclorados se extraen de las muestras hortofrutícolas con disolventes orgánicos, los cuales no permiten una retención cuantitativa de los plaguicidas en las columnas adsorbentes diseñadas para la extracción en fase sólida. Por ello es necesaria una etapa de cambio de disolvente, desde el disolvente orgánico a agua destilada. Para automatizar esta etapa se desarrolló la unidad de evaporación/redisolución que se muestra en la Figura I.1. En esta unidad, la fase orgánica cae, gota a gota, en un tubo de vidrio, provisto de un tapón con tres orificios, que contiene 5 mL de agua destilada y, simultáneamente, es evaporada mediante una corriente de  $N_2$  que borbotea, ayudando a la homogeneización de la disolución.



**Figura I.1.** Unidad de evaporación/redisolución diseñada para cambio de disolvente.

- Unidades de filtración. Al igual que en el caso de las minicolumnas adsorbentes, se han empleado unidades de filtración de fabricación propia, elaboradas con tubos de vidrio de distintas longitudes y de 4 mm de diámetro interno y rellenas de algodón (Cap. III y V.1), o un filtro comercial (Omnifit 3303, con disco de papel Whatman nº 1) (Cap. II.1). En cualquier caso, las unidades de filtración se situaron a la entrada del canal de la muestra para evitar la aspiración de pequeñas partículas sólidas en suspensión (que ocasionalmente pudiesen aparecer en los extractos), que pudieran obstruir el sistema de flujo.
- Unidad de decoloración. Esta unidad utilizada para decolorar el extracto orgánico procedente de la extracción de frutas frescas (Cap. II.2), también es de fabricación en el laboratorio. Para ello se utilizó un tubo de vidrio de 5 cm de longitud y 4 mm de diámetro interno que se rellenoó con el material decolorante. Además, esta unidad también hizo las veces de filtro, por lo que no fue necesario incluir una unidad de filtración adicional.

### **I.3. INSTRUMENTOS**

Para el desarrollo de esta Memoria se utilizaron dos cromatógrafos de gases, con diferentes detectores, y un espectrómetro de infrarrojo.

- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890 A, equipado con un detector de captura de electrones (ECD) de  $^{63}\text{Ni}$  y otro de ionización de llama (FID). Cuenta con dos portales de inyección, uno para columnas

---

empaquetadas y otro para columnas capilares y semicapilares. Sin embargo, únicamente se ha utilizado el ECD y el portal para columnas capilares (Cap. II, III y IV.1). El volumen de inyección de muestra fue de 1  $\mu\text{L}$  (medido con una jeringa de precisión Hamilton de 5  $\mu\text{L}$ ), empleándose el modo de división de flujo (1:25) y nitrógeno de calidad 2 (Air Liquide) como gas portador a un caudal de 1 mL/min. La temperatura del portal de inyección se fijó en 225°C. La separación de los plaguicidas se realizó en una columna capilar HP-5 de 30 m x 0.25 mm, de fase estacionaria 5% fenilmetilpolisiloxano, con un espesor de película de 0.25  $\mu\text{m}$ . El detector se mantuvo a 325°C, empleándose como gas auxiliar  $\text{N}_2$  a un caudal de 60 mL/min. Las señales procedentes del detector fueron recogidas y transducidas por un integrador Hewlett-Packard modelo 3392.

- Cromatógrafo de gases Thermo Instruments modelo GC8060 series, acoplado a un espectrómetro de masas Thermo Instruments modelo MD800. La interfase consiste en una línea de transferencia que introduce el capilar de la columna cromatográfica en la cámara de ionización del analizador cuadrupolar, la cual se mantuvo a 200°C para evitar la condensación de los analitos. Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  del extracto orgánico, empleando una jeringa de precisión Hamilton de 5  $\mu\text{L}$  y manteniendo una división flujo 1:25. El gas portador fue Helio ultrapuro (Air Liquide) a un caudal de 1 mL/min. La columna cromatográfica fue similar a la anterior, pero de bajo sangrado (HP-

5MS) para una mejor compatibilidad con el detector. El instrumento está controlado por el software MASSLAB, de Thermo Instruments, instalado en un ordenador personal donde también se encuentran instaladas las bibliotecas de espectros *Pesticide* y *Nist*. Este cromatógrafo ha sido utilizado como técnica de confirmación de los resultados positivos de plaguicidas en productos hortofrutícolas y muestras acuosas (Cap. II, III, IV.1), y también para la determinación y cuantificación de los mismos en fluidos biológicos (Cap. V).

- Espectrómetro de infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) Bruker, modelo IFS 66, equipado con una celda horizontal de reflectancia total atenuada (ATR) de SensIR Technologies, modelo Dura SamplIR, y un detector de sulfato de triglicina (DTGS). El espectrómetro se controló mediante el software OPUS OS/2 3.0/IR (Bruker). Los espectros se recogieron en el rango de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  (infrarrojo medio), y cada espectro requirió 128 scans a una resolución espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Este espectrómetro fue utilizado en la determinación de plaguicidas en muestras acuosas en el Cap. IV.2.
- Otros instrumentos:
  - Balanza analítica de precisión (Ohaus, modelo Explorer).
  - pH-metro (Crison, modelo micropH 2000).

#### **I.4. APARATOS**

Los aparatos empleados en esta Memoria se enumeran a continuación:

- Liofilizador Hetosicc, modelo CD 53-1, equipado con una cámara de liofilización que cuenta con 3 bandejas de distribución. Este aparato se utilizó en la liofilización de muestras hortofrutícolas requerida en el Cap. III.
- Baño de aceite termostataado (Selecta), utilizado para la hidrólisis ácida de muestras de orina en el Cap. V.
- Agitador magnético (Selecta, modelo SBS), utilizado en la automatización de la etapa de extracción de muestras hortofrutícolas (Cap. II.2, III).

# CAPITULO II: PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS EN HORTALIZAS Y FRUTAS FRESCAS

## CHAPTER II: ORGANOCHLORINE PESTICIDES IN FRESH VEGETABLES AND FRUITS

CAPITULO II





Los métodos analíticos para la determinación de plaguicidas [1] se pueden englobar en dos grandes grupos:

1. Métodos multiresiduos (MRMs), capaces de determinar simultáneamente más de un residuo en un solo análisis [2,3]. Tienen un amplio espectro de aplicabilidad por lo que son eficaces en el análisis de muestras de las que se desconoce qué tratamiento con plaguicidas se ha aplicado.
2. Métodos diseñados para la determinación de un sólo plaguicida [4,5], utilizados cuando se sabe qué residuo se pretende determinar y/o cuando el residuo de interés no puede ser determinado por un MRM. A veces también se aplican a la determinación de varios compuestos análogos, como es el caso de la determinación de plaguicidas ditiocarbamatos (ej. zirám, tirám, metirám) [6,7].

La metodología de los MRMs requiere, por definición, determinadas etapas que permitan la separación de los analitos entre sí para que cada uno pueda ser identificado y cuantificado individualmente. Tanto la cromatografía de gases (GC) como la líquida (LC) poseen dicha capacidad, aunque GC es mucho más utilizada. La aplicación de GC

---

está restringida a analitos que puedan evaporarse sin sufrir degradación térmica, mientras que LC ofrece una alternativa para los compuestos termolábiles [8]. Sin embargo, debido a la relativa simplicidad y robustez de GC, es ésta la técnica de elección para la separación de los analitos en la determinación de residuos de plaguicidas, siempre que sea aplicable.

A su vez, los MRMs se pueden subdividir en:

- MRM selectivos, cuando el MRM está diseñado para determinar residuos de plaguicidas de una sola familia [9-12].
- MRM multiclase, cuando está diseñado para determinar residuos de plaguicidas de varias familias [2,3,13].

En este capítulo de la Memoria se aborda el desarrollo de MRM selectivos, para la determinación de plaguicidas organoclorados en muestras frescas de hortalizas (Cap. II.1) y frutas (Cap. II.2). En estas metodologías se han introducido módulos de tratamiento automático de las muestras, basados en sistemas de flujo continuo. Se ha empleado cromatografía de gases para la separación de los analitos, puesto que estos presentan las características adecuadas para ello; y gracias a la presencia de átomos halogenados en la molécula de estos plaguicidas, se seleccionó el detector de captura de electrones, empleándose la espectrometría de masas como herramienta para la confirmación de los resultados positivos en relación con la presencia de residuos de plaguicidas en las muestras hortofrutícolas analizadas.

**REFERENCIAS**

- [1] FDA, *Pesticide Analytical Manual*, 3<sup>rd</sup> Ed., US-FDA, 1999.
- [2] J. Fillion, F. Sauve, J. Selwyn, *J. AOAC* 83 (2000) 698.
- [3] W. N. Sawaya, F. A. Al-Awadhi, T. Saeed, A. Al-Omair, N. Ahmad, A. Husain, S. Khalafawi, H. Al-Omirah, B. Dashti, H. Al-Amiri, J. Al-Saqer, *J. AOAC* 82 (1999) 1458.
- [4] M J. Incorvia-Mattina, W. Iammucci-Berger, L. Dykas, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1909.
- [5] S. Navickiene, L. Polese, E. V. Minelli, M. L. Ribeiro, *Chromatographia* 49 (1999) 212.
- [6] A. R. Cassella, R. Jorgensen-Cassella, S. Garrigues, R. E. Santelli, R. C. de Campos, M. de la Guardia, *Analyst* 125 (2000) 1829.
- [7] H. van Lishaut, W. Schwack, *J. AOAC* 83 (2000) 720.
- [8] A. Kaihara, K. Yoshii, Y. Tsumura, Y. Nakamura, S. Ishimitsu, Y. Tonogai, *J. Health-Sci.* 46 (2000) 336.
- [9] E. N. Barkatina, A. L. Pertsovsky, V. I. Murokh, N. D. Kolomiets, O. V. Shulyakovskaya, O. N. Venger, V. I. Makarevich, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63 (1999) 235.
- [10] E. N. Barkatina, V. I. Murokh, N. D. Kolomietz, A. L. Pertsovskii, O. V. Shulyakovskaya, *J. Anal. Chem.* 53 (1998) 861.
- [11] M. Szerletics-Turi, K. Soos, J. Sohar, K. Matyasovszky, *Int. Lab.* 29 (1999) 15.

- [12] G. F. Pang, Y. Z. Cao, C. L. Fan, J. J. Zhang, X. M. Li, *J. AOAC* 82 (1999) 186.
- [13] J. Cook, M. P. Beckett, B. Reliford, W. Hammock, M. Engel, *J. AOAC* 82 (1999) 1419.



ELSEVIER

Journal of Chromatography A 849 (1999) 235-243

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A

## Semiautomatic method for the screening and determination of 23 organochlorine pesticides in horticultural samples by gas chromatography with electron-capture detection

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel

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

*Received 2 February 1999; received in revised form 20 April 1999; accepted 20 April 1999*

### Abstract

A rapid, simple, efficient device for the extraction-preconcentration of 23 organochlorine pesticides currently applied to vegetables is proposed. Pesticide residues are extracted from chopped samples by using a mixture of distilled water and light petroleum (1:1, v/v). After phase separation, an aliquot of the organic layer is continuously evaporated to dryness under a N<sub>2</sub> stream as it is dropped into a glass tube containing distilled water. The aqueous phase, containing the analytes, is then passed through a miniaturized RP-C<sub>18</sub> column for preconcentration, clean-up and subsequent elution with 150 µL of ethyl acetate. A volume of 1 µL of the extract containing pesticides is injected into the gas chromatograph, fitted with an electron capture detector, for their selective determination. Limits of detection vary between 0.04 and 10 ng/mL, with linear ranges from 0.2 to 500 ng/mL; the average relative standard deviation at the low nanogram-per-millilitre level is 5.3 %. The potential of the proposed method was realized by applying it to the screening/determination of organochlorine pesticides in horticultural commodities.

## 1. INTRODUCTION

Public concern over pesticide residues has risen over the past decade to the point where it has become a significant food safety issue. This concern has materialized in the joint issuance by the European Union and the governments of its member countries of maximum residue limits (MRLs) for pesticide residues in a variety of agricultural foods [1]. Analytical methods for pesticide residues are mainly used to control foods for human consumption (particularly fruits and vegetables, which usually receive direct applications of pesticides) [2]. Organochlorine pesticides (OCPs) are of special interest in this context as their high chemical stability results in their persistence and bioaccumulation in the environment and animal tissues [3]. Sensitive, rapid, reliable methods for the routine determination of OCP residues in fruit and vegetables are thus much needed. The high sensitivity required arises from the need to meet established MRLs which can be as low as 10 ng/Kg depending on the particular pesticide and sample type [1].

The more frequently used methods for analysing OCP residues involve gas chromatographic separation and selective detection by electron capture [4-9], electrolytic conductivity [9-11], atomic emission [9,12] detectors or mass spectrometry for confirmation of positives [4,13,14]. However, these detectors are inadequately selective in many cases and several extraction and clean-up steps are required to avoid deterioration of the chromatographic column. Methods involving sample preparation for OCP determination have been developed for different types of matrices. In most cases, the analytes are extracted by using large volumes of organic solvents such as ethyl acetate [4,7,8], acetone [5,10], 2-

propanol/light petroleum [6] or acetonitrile [9,11-14]. At present, multiresidue solvent extraction with ethyl acetate is superseding earlier extraction methods by virtue of its simplicity and expeditiousness, which result in decreased costs. However, this solvent also extracts a number of indigenous compounds present in most agricultural commodities [4]; in this regard, the use of solid-phase clean-up in combination with selective liquid-liquid back-extractions is recommended to diminish the presence of potential interferents in the final extract [4,6,9]. In any case, evaporation to dryness is needed to preconcentrate the analytes and make them compatible with the chromatographic system, taking into account that no losses are observed for these compounds.

The purpose of this work was to develop a simple, efficient one-step extraction method for the screening and determination of organochlorine pesticides in vegetables. After manual extraction of the chopped sample, the extract is cleaned-up, preconcentrated and eluted on a short RP-C<sub>18</sub> column, all on-line; in this way, up to 23 OCP residues can be identified and determined. The high preconcentration factor achieved enables the determination of pesticide residues at their MRLs.

## **2. EXPERIMENTAL**

### *2.1. Chemicals, standards and samples*

All chemicals and sorbents were of analytical grade or better. The following organochlorine pesticides, Pestanal quality, were studied: aldrin, captan, captafol, chlordane, dichlofuanid, dicloran, dicofol, dieldrin,  $\alpha$ - and  $\beta$ -endosulfan (3:1),

endosulfan sulphate, endrin, hexachlorobenzene (HCB), heptachlor, iprodione,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - and  $\gamma$ -hexachlorohexane ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - and  $\gamma$ -HCH 1:1:1:1), lindane ( $\gamma$ -HCH), methoxychlor, procymidone, and vinclozolin, all of which were obtained from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). 2,4-Dichlorophenol (internal standard), and RP-C<sub>18</sub> HPLC sorbent were supplied by Sigma (Madrid, Spain). All other reagents and solvents [ethyl acetate, acetone, dichloromethane, light petroleum (b.p. 50-70°C), ethanol and sodium sulphate] were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Stock standard solutions of the OCPs were prepared in acetone (except HCB, which was dissolved in dichloromethane), at concentrations of 5 mg/mL, and stored in glass stoppered bottles in the dark at 4°C.

Vegetables were purchased at a local market in Córdoba, Spain. Because legally tolerated limits of pesticide residues have been set for raw materials, samples were analysed unwashed and in the raw state [15]. Sampling was done according to the protocol established by legislation [16]. Thus, a raw sample consisting of 10-20 units (~1 Kg) was initially selected and subsequently reduced to 3-5 units following the most appropriate procedure (mainly quartering). These units are then cut into slices about 1 cm thick and then chopped into smaller pieces to obtain the 5g fractions required by the proposed method.

## 2.2. Apparatus

Experiments were carried out by using a Hewlett-Packard 5890A gas chromatograph equipped with a <sup>63</sup>Ni electron-capture detection (ECD) system.

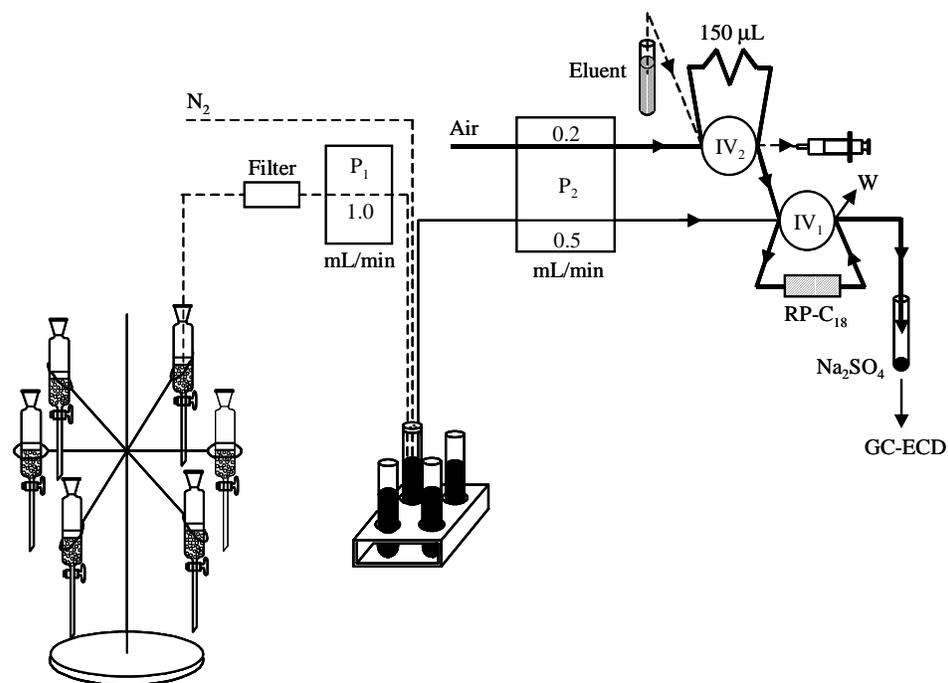
Chromatographic separation was achieved by using a fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.) coated with 5% phenyl-methylpolysiloxane (film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ) (Supelco, Madrid, Spain). Peak areas were measured with a Hewlett-Packard 3392 A integrator. The injector and detector temperatures were kept at 225°C and 325°C throughout. The column temperature was raised from 120°C (hold 2 min) to 180°C (hold 4 min) at 8°C/min, then to 255°C (hold 10 min) at 8°C/min and finally to 270°C (hold 2 min) at 10°C/min.

Two Gilson Minipuls-2 peristaltic pumps fitted with poly(vinyl chloride) and Solvaflex pumping tubes for aqueous solutions and ethanol, respectively, were employed. Two Rheodyne 5041 injection valves, PTFE tubing and commercially available connectors were also used. The sorbent column was prepared by packing a commercial Omnifit glass column (2 cm x 2.5 mm i.d.) with ~40 mg of RP-C<sub>18</sub> sorbent material; small cotton beads were used on the ends to prevent material losses. The sorbent column was conditioned with distilled water for 3 min prior retention. An Omnifit 3303 PTFE filter furnished with a paper disk (Whatman No. 1) was used to filtrate the organic phase; the filter was modified by using circular channels in both ends to increase the chamber inner volume to 100  $\mu\text{L}$  and the filtration area to ~3  $\text{cm}^2$ . It was washed upstream with water after ~5 analyses.

### 2.3. Procedure

The flow system designed for the determination of OCPs is depicted in Figure 1. An amount of 5.0 g of chopped sample was placed in an extraction funnel and 50 mL of the

extractant (distilled water-light petroleum, 1:1, v/v) were added. The mixture was mechanically shaken for ~10 min and allowed to settle for 2-3 min. Then, the organic phase, containing the analytes, was continuously aspirated for 5 min (5 mL) and filtered; the filtrate was collected in a 10 mL graduated glass tube containing 5 mL of distilled water and evaporated to dryness under a N<sub>2</sub> stream as it dropped into the tube; also, bubbling N<sub>2</sub> in the tube favoured homogenization of the solution. As P<sub>1</sub> was stopped and P<sub>2</sub> started, the aqueous solution was aspirated at a flow-rate of 0.5 mL/min and passed through the RP-C<sub>18</sub> sorbent column, located in the loop of an injection valve (IV<sub>1</sub>). Simultaneously, the loop of the second injection valve (IV<sub>2</sub>) was filled with eluent (ethyl acetate) containing the internal standard (1 µg/mL 2,4-dichlorophenol) by means of a syringe. On switching both injection valves, the loop contents were carried by an air stream at a flow-rate of 0.2 mL/min. The eluent was passed through the column and eluted analytes collected in a glass vial containing anhydrous sodium sulphate. A 1 µL aliquot of the dried solution was injected into the GC-ECD system for analysis. The organic phase remaining in the funnel can be sequentially aspirated into the flow system in order to perform replicate analyses per sample. After each sample, the sorbent column was washed with 3 mL of ethanol to remove potentially adsorbed interferences and then conditioned with 3 mL of water. To simplify tube changeover during the evaporation step (see Figure 1), a cylindrical piece of PTFE tubing with three small holes for insertion of the three channels and a larger one to allow solvent evaporation was used. The tubes were washed with water between samples to avoid contamination.



**Figure 1.** Experimental set-up used for the screening and determination of OCPs in horticultural samples. P=peristaltic pump; IV= injection valve; W=waste; GC-ECD= gas chromatography-electron-capture detector.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Clean-up and preconcentration device

Preliminary experiments were carried out in order to find the best sorbent and eluent for the solid-phase extraction (SPE) system. For this purpose, RP-C<sub>18</sub>, Amberlite XAD-2, Florisil, silica gel, alumina, LiChrolut-EN and activated carbon were tested. First, the adsorption efficiency was examined by using columns packed with 70 mg of each sorbent material. The aqueous solution, containing ~0.3 µg/mL of OCPs, was aspirated at

0.5 mL/min through each column. Fractions of 1 mL sample were collected in glass vials before and after the sorbent column and extracted with 1 mL of ethyl acetate; after evaporation to dryness under N<sub>2</sub>, the residue was redissolved in 200 µL of ethyl acetate, a 1 µL aliquot of the extract being analysed by GC. After each sample was processed, the column was rinsed with ethyl acetate and water for 1 min to remove potentially adsorbed analytes. High retention (> 80%) was obtained in all instances; however, activated carbon, silica gel and RP-C<sub>18</sub> exhibited the best sorption properties. Different eluents (ethyl acetate, n-hexane and light petroleum) were evaluated with the three sorbents. Incomplete elution was obtained with activated carbon (<10%) and silica gel (< 50%) whichever the solvent. RP-C<sub>18</sub> was thus selected as it exhibited optimal sorption and desorption properties. Ethyl acetate was the best eluent (~100% elution), if even surpassed n-hexane and light petroleum supplied with 2-propanol in order to increase their polarity. The amount of sorbent material was optimized by varying the length of the column (packed with 20-80 mg of RP-C<sub>18</sub>). Chromatographic signals increased with increasing amount of sorbent up to 30 mg, beyond which they remained virtually constant. A working column packed with 40 mg RP-C<sub>18</sub>, and ethyl acetate as eluent, were adopted for further experiments.

Optimization experiments were carried out by aspirating 5 mL of a standard solution containing 20-60 ng/mL of each OCP in distilled water, into the SPE system. The eluate from the sorbent column (200 µL) was collected in 5 mL glass vials containing anhydrous sodium sulphate and 1 µL fractions were injected into the chromatograph.

The influence of the sample pH was studied over the range 1-11, using aqueous

standards adjusted with HNO<sub>3</sub> or NaOH solutions. Pesticides exhibited three distinct types of variation in this respect. Thus, lindane,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\delta$ -HCH, captafol, chlordane, dichlofuanid, dicloran, dicofol, endosulfan sulphate and methoxychlor were not affected by pH over the range studied. On the other hand, aldrin, chlorbensid, dieldrin, endrin, HCB and heptachlor were optimally retained under weakly alkaline conditions, whereas captan,  $\alpha$ - and  $\beta$ -endosulfan, iprodione, procymidone and vinclozolin were best extracted in a weakly acidic medium. Some of these compounds, however, decompose in the alkaline medium [17] and give spurious results. For this reason, and taking into account the poor retention of some under acid conditions, the pesticides were prepared in distilled water prior to continuous SPE as a compromise.

The effect of the sample flow-rate through the column during the preconcentration step was studied between 0.3 and 0.9 mL/min. Signals remained almost constant throughout this range; exceptionally, the signals for chlorbensid and  $\alpha$ - and  $\beta$ - endosulfan decreased above 0.6 mL/min. A flow-rate of 0.5 mL/min was selected for all OCPs. The effect of the eluent (ethyl acetate) flow-rate was studied over the range 0.1-0.5 mL/min, using an air stream as carrier. Chlorbensid and dicloran elution was markedly affected by the eluent flow-rate; in fact, a very low flow-rate was required to ensure efficient elution, so 0.2 mL/min was chosen. The influence of the eluent volume was studied by changing the loop of IV<sub>2</sub>. Obviously, as the eluent volume was increased, desorption was more efficient but also the analytes were more dilute. Because of these two opposing effects, the only way to correctly determine the most appropriate eluent volume was to dilute the extracts to a

constant volume using the same solvent. Thus, the column effluent (between 50 and 500  $\mu\text{L}$  of ethyl acetate) was always diluted to 500  $\mu\text{L}$  with ethyl acetate. The desorption efficiency increased with increasing injected volume up to 150  $\mu\text{L}$  and remained constant above this value. An ethyl acetate injected volume of 150  $\mu\text{L}$  was selected as optimal. A second injection with the same eluent volume revealed the absence of carry-over; complete elution of analytes was thus obtained with a single injection of 150  $\mu\text{L}$  of ethyl acetate.

### 3.2. Analytical figures of merit

All the pesticides studied exhibited good gas chromatographic properties and could be identified in a direct manner as they were well resolved under these chromatographic conditions. Analytical curves for standards of organochlorine pesticides were obtained by using the SPE system depicted in Figure 1 and passing 5 mL of aqueous standards containing variable concentrations (0.1-500 ng/mL) of the pesticides through the sorbent column. The curves were constructed by plotting the analyte-to-I.S. peak area ratio against the analyte concentration. 2,4-Dichlorophenol was used as I.S. in preference to others because it was found to be compatible with the chromatographic behaviour of the analytes as well as with ECD; it was added to the eluent at a concentration of 1  $\mu\text{g/mL}$ . The results obtained are listed in Table 1. All the OCPs tested fitted a straight line with a correlation coefficient of 0.990-0.999. Limits of detection, calculated on the basis of a signal/noise ratio of 3/1 are also given in Table 1. The lowest was that of dicloran (the most sensitive). For the other pesticides, they ranged from 0.2 to 0.5 ng/mL. The slightly broadened peak for

iprodione resulted in the highest detection limit (10 ng/mL); in any case, its MRL in agricultural commodities ranges from 20 ng/mL to 10 µg/mL, so there should be no problem to detect it.

The within-day precision (repeatability), expressed as relative standard deviation, was calculated for 11 standards containing 20-60 ng/mL of each OCP in water. The precision obtained was acceptable for all the compounds, the average being 5.3%.

**Table 1.** Figures of merit for the determination of 23 organochlorine pesticides using an SPE system.

Compound	LOD (ng/mL)	Regression equation <sup>a</sup>	Linear range (ng/mL)	RSD (%)
α-HCH	0.3	$Y = 5.8 \times 10^2 X + 6 \times 10^{-3}$	1-200	5.2
HCB	0.4	$Y = 3.8 \times 10^2 X + 7 \times 10^{-3}$	2-200	4.7
Dicloran	0.04	$Y = 2.3 \times 10^1 X + 2 \times 10^{-2}$	0.2-100	4.7
β-HCH	0.4	$Y = 6.7 \times 10^2 X + 2 \times 10^{-3}$	2-200	4.3
Lindane	0.2	$Y = 9.4 \times 10^2 X + 7 \times 10^{-3}$	1-200	5.2
δ-HCH	0.2	$Y = 1.2 \times 10^1 X + 3 \times 10^{-3}$	1-200	4.0
Vinclozolin	0.2	$Y = 1.2 \times 10^1 X + 2 \times 10^{-3}$	1-200	5.8
Heptachlor	0.4	$Y = 3.3 \times 10^2 X + 7 \times 10^{-3}$	2-200	5.4
Dichlofuanid	0.5	$Y = 6.1 \times 10^2 X + 7 \times 10^{-3}$	2-200	5.9
Aldrin	0.2	$Y = 6.0 \times 10^2 X - 2 \times 10^{-3}$	1-200	5.6
Dicofol	1.0	$Y = 1.1 \times 10^2 X + 2 \times 10^{-3}$	5-400	4.3
Captan	0.3	$Y = 1.4 \times 10^1 X - 4 \times 10^{-3}$	1-200	5.5
Procymidone	0.4	$Y = 6.2 \times 10^2 X + 2 \times 10^{-3}$	2-200	6.0
Chlorbensid	1.0	$Y = 1.7 \times 10^2 X + 2 \times 10^{-3}$	5-400	5.1
Chlordane	2.0	$Y = 5.0 \times 10^{-3} X + 1 \times 10^{-4}$	10-500	5.2
α-Endosulfan	0.4	$Y = 3.4 \times 10^2 X + 6 \times 10^{-3}$	2-200	5.4
Dieldrin	0.5	$Y = 2.3 \times 10^2 X - 3 \times 10^{-3}$	2-200	5.7
Endrin	0.4	$Y = 2.5 \times 10^2 X - 3 \times 10^{-3}$	2-200	5.9
β-Endosulfan	0.4	$Y = 2.6 \times 10^2 X + 2 \times 10^{-3}$	2-200	6.0
Endosulfan sulphate	0.4	$Y = 6.8 \times 10^2 X - 3 \times 10^{-3}$	2-200	5.6
Iprodione	10.0	$Y = 5.3 \times 10^2 X + 2 \times 10^{-3}$	25-500	5.7
Captafol	0.5	$Y = 8.9 \times 10^2 X - 4 \times 10^{-3}$	2-200	5.3
Methoxychlor	1.0	$Y = 1.0 \times 10^2 X + 2 \times 10^{-3}$	5-400	5.1

<sup>a</sup> Y, analyte-to-internal standard area ratio; X, concentration (ng/mL).

### 3.3. Screening and determination of OCPs in horticultural samples

The main purpose of this work was to develop an extraction procedure, as simple as possible, that would allow both quantitative extraction and preconcentration of OCPs from samples and clean extracts from a variety of horticultural commodities. In order to select the best possible extractant, different samples of 5.0 g of chopped lettuce (test sample) were spiked with 500 ng of the pesticides and allowed to stand overnight to simulate the weathering process. Then, 25 mL of extractant were added to each test sample and the mixture was mechanically shaken for 10 min. An aqueous medium of variable pH was initially tested for extraction prior to direct insertion into the manifold; the recoveries thus obtained were all below 40% (due to their poor solubilities in water). Therefore, acetone, acetonitrile, ethyl acetate and light petroleum were assayed as extractants because they are common organic solvents for these samples [4-14]. As the extract also contained other compounds present in the sample and the sorption of OCPs on the column was only achieved in aqueous media, several additional steps were required prior SPE preconcentration. Four 5 mL aliquots of the organic phases were evaporated to dryness under N<sub>2</sub> and the residue was redissolved in 5 mL of distilled water for continuous introduction into the SPE system. Although high recoveries were obtained in all cases, light petroleum diminished the presence of peaks due to the matrix; also, the time required for evaporation of the acetone or acetonitrile phases was too long, probably due to the presence of a large amount of co-extractives (mainly natural pigments), which resulted in dirtier chromatograms. Light petroleum as extractant is also advantageous because it is compatible

with the pumping tubes, so it allows the on-line aspiration and simultaneous filtration of the extract in order to prevent solid particles from entering the flow system and clogging the sorbent column. Careful examination of the results, in terms of relative standard deviation of the peak area for each pesticide, revealed that it was much higher than that for the standards. This can be ascribed to the presence of coextractives hindering the redissolution step.

From the previous method, two modifications were introduced in the extraction procedure. One was the use of a mixture of water and light petroleum as extractant in order to remove potentially interfering water-soluble compounds; the other, avoiding redissolution of the dry residue. The finally adopted extractant was water-light petroleum (1:1, v/v) and the filtered organic phase was evaporated under a nitrogen stream as it dropped into a glass tube containing 5 mL of distilled water. Good precision was obtained by operating in this way so fortified samples were extracted and evaporated as described above. Finally, the effect of the ratio of amount of sample to extractant volume (w/v) was optimized. For this purpose, different samples of 5.0 g of chopped lettuce were fortified with variable amounts of pesticides depending on the extractant volume, and allowed to stand overnight. Then the samples were extracted with 10, 20, 50 and 100 mL of water/light petroleum (1:1, v/v), respectively. A portion of 5 mL of the organic phase (always containing 500 ng of each OCP) was treated following the procedure above-described. Satisfactory results were obtained in all cases, so the sample/extractant ratio can be varied between 2 and 20 mL of extractant per gram of sample with little difference. In order to obtain replicate results, a volume of 50 mL of extractant (~25 mL of extract) was selected. In this way, amounts of

2.5 to 25 g of sample can be extracted with 50 mL of extractant. This operational sequence was the most efficient procedure, and was applied to the determination of OCPs in nine different horticultural commodities.

No samples containing pesticide residues at detectable concentrations could be found, so a recovery test was carried out. For this purpose, the analytes were added to each uncontaminated vegetable according to use and occurrence/appearance [15,18]. Since all the pesticides studied are administered by foliar application [18], most of their residues remain on plant surfaces. Therefore, in order to ensure acceptable simulation of the real situation, the fortification process was carried out as follows: 1 mL of acetone containing variable amounts of OCPs between 75 and 1000 ng was added to 5.0 g of chopped sample and allowed stand overnight at room temperature in a closed fume hood to avoid contamination. Each sample was spiked three times and then analysed in triplicate (n=9), using the proposed method. The recoveries obtained (Table 2) ranged from 64 to 112% and are comparable to or better than those provided by existing methods for the determination of these compounds in horticultural samples. No interference from the matrices studied was observed, which testifies to the high selectivity of the proposed method. By way of example, Figure 2 shows the gas chromatograms for a spinach sample unfortified and fortified with the OCPs listed in Table 2.

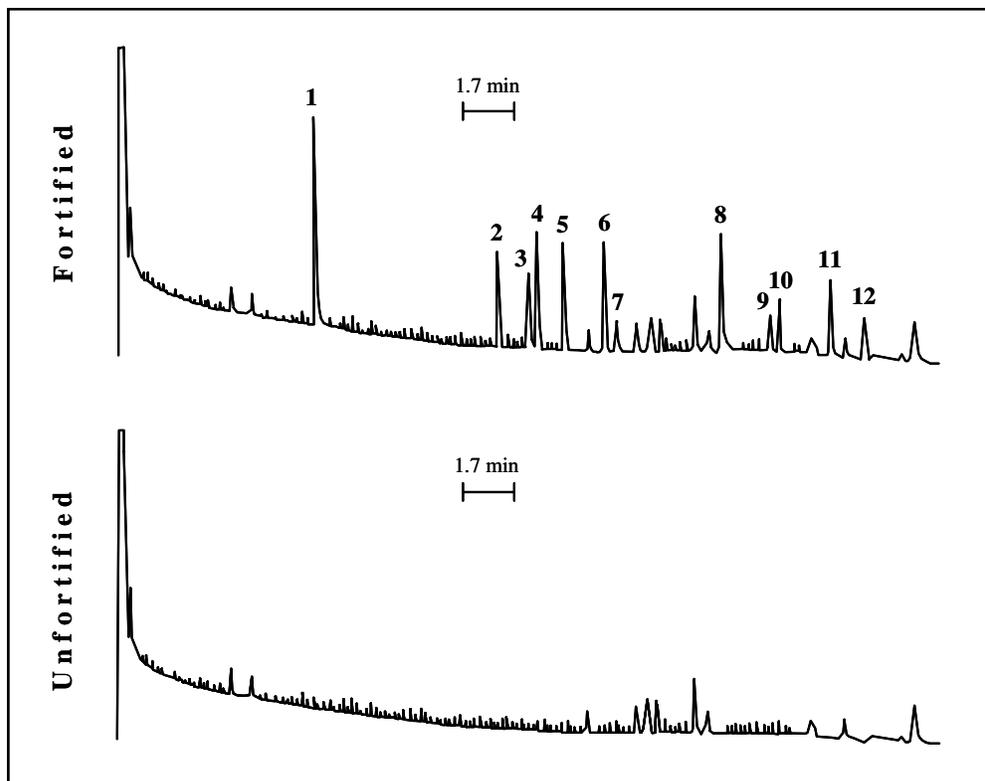
**Table 2.** Percent recovery ( $\pm$  SD) of organochlorine pesticides added to horticultural samples\*.

Commodity	Compound	Recovery
Onion	Dichlofuanid <sup>c</sup>	95 $\pm$ 6
	Dichloran	87 $\pm$ 5
	Heptachlor	102 $\pm$ 6
	Procymidone <sup>a</sup>	83 $\pm$ 5
	Vinclozolin	93 $\pm$ 6
Lettuce	Captan	75 $\pm$ 4
	Chlordane	92 $\pm$ 5
	Dichloran	96 $\pm$ 5
	$\alpha$ - HCH	94 $\pm$ 6
	$\beta$ - HCH	93 $\pm$ 4
	$\delta$ - HCH	93 $\pm$ 5
	Heptachlor	94 $\pm$ 5
	Lindane	97 $\pm$ 6
	Procymidone <sup>a</sup>	86 $\pm$ 6
Carrot	Aldrin	104 $\pm$ 6
	Captan	70 $\pm$ 4
	Chlorbensid	96 $\pm$ 5
	Dicofol <sup>c</sup>	84 $\pm$ 4
	Dieldrin	88 $\pm$ 6
	HCB	102 $\pm$ 5
	Heptachlor	105 $\pm$ 7
	Methoxychlor <sup>c</sup>	96 $\pm$ 6
Green pepper	Aldrin	97 $\pm$ 6
	Chlorbensid	79 $\pm$ 4
	Dichloran	98 $\pm$ 5
	Dicofol <sup>c</sup>	90 $\pm$ 5
	Dieldrin	97 $\pm$ 6
	Endrin	91 $\pm$ 6
	$\alpha$ - Endosulfan <sup>b</sup>	93 $\pm$ 6
	$\beta$ - Endosulfan	104 $\pm$ 7
	Endosulfan Sulphate	96 $\pm$ 6
	Lindane	100 $\pm$ 6
	Procymidone <sup>a</sup>	99 $\pm$ 6
Vinclozolin	93 $\pm$ 7	
Aubergine	Captafol <sup>c</sup>	81 $\pm$ 6
	Captan	66 $\pm$ 4
	Chlorbensid	91 $\pm$ 5
	Dicofol <sup>c</sup>	93 $\pm$ 5
	HCB	103 $\pm$ 6
	Iprodione <sup>d</sup>	94 $\pm$ 6
	Methoxychlor <sup>c</sup>	89 $\pm$ 5

**Table 2 (continue).**

Commodity	Compound	Recovery
Tomato	Captan	64 ± 3
	Chlordane	91 ± 5
	HCB	100 ± 5
	α - HCH	96 ± 5
	β - HCH	85 ± 4
	δ - HCH	103 ± 5
	Lindane	101 ± 6
	Vinclozolin	93 ± 6
Spinach	Endrin	93 ± 6
	α - Endosulfan <sup>b</sup>	88 ± 6
	β - Endosulfan	92 ± 6
	Endosulfan Sulphate	97 ± 7
	α - HCH	95 ± 5
	β - HCH	94 ± 4
	δ - HCH	93 ± 4
	Heptachlor	96 ± 6
	Lindane	99 ± 5
	Methoxychlor <sup>c</sup>	99 ± 6
Vinclozolin	102 ± 6	
Potato	Aldrin	97 ± 6
	Chlorbensid	89 ± 5
	Chlordane	86 ± 4
	Dicofol <sup>c</sup>	99 ± 5
	Dieldrin	95 ± 6
	Endrin	100 ± 6
	α - Endosulfan <sup>b</sup>	96 ± 6
	β - Endosulfan	102 ± 6
	Endosulfan Sulphate	103 ± 7
	HCB	99 ± 5
	α - HCH	103 ± 5
	β - HCH	102 ± 4
	δ - HCH	102 ± 4
	Lindane	103 ± 5
Methoxychlor <sup>c</sup>	106 ± 6	
Cucumber	Aldrin	112 ± 7
	Chlordane	109 ± 6
	Dichloran	98 ± 5
	Dieldrin	92 ± 6
	Endrin	103 ± 6
	Lindane	97 ± 6
	Procymidone <sup>a</sup>	96 ± 6
	Vinclozolin	98 ± 6

\*Spiked level was 15 ng/g for all OCPs, except those with superscripts <sup>a</sup> (25 ng/g), <sup>b</sup> (45 ng/g), <sup>c</sup> (50 ng/g) and <sup>d</sup> (200 ng/g).



**Figure 2.** Gas chromatograms for a 5.0 g sample of spinach unfortified and fortified with 11 OCPs at the concentrations listed in Table 2. 1=internal standard; 2= $\alpha$ -HCH; 3= $\beta$ -HCH; 4=lindane; 5= $\delta$ -HCH; 6=vinclozolin; 7=heptachlor; 8= $\alpha$ -endosulfan; 9=endrin; 10= $\beta$ -endosulfan; 11=endosulfan sulphate and 12=methoxychlor.

#### 4. CONCLUSIONS

A rapid, sensitive method involving semiautomatic sample treatment and low solvent consumption was developed and proved effective for the screening of the more commonly used OCPs in the matrices studied. An evaporation step is used to facilitate solvent changeover in order to make the analytes compatible with the SPE system. Liquid-

liquid extraction, the most common choice in this context, cannot be used here because back-extraction of the pesticides from light petroleum to aqueous phase is unfeasible at any pH. The proposed method is an effective alternative to more costly and time-consuming conventional methods, as well as to highly sophisticated clean-up procedures.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

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

---

**REFERENCES**

- [1] *Community Directive 93/58 EEC*. Off. J. Eur. Commun. L 211/6, European Community, Brussels, 1993.
- [2] *FAO. Agriculture towards 2010*; C 93/24 Document of 27<sup>th</sup> Session of FAO Conference, Rome, 1993.
- [3] C. Nerín, A.R. Tornés, C. Domeño, J. Cacho, *Fresenius J. Anal. Chem.* 352 (1995) 364.
- [4] A.R. Fernández-Alba, A. Valverde, A. Agüera, M. Contreras, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 263.
- [5] Y. Nakamura, Y. Tonogai, Y. Sekiguchi, Y. Tsumura, N. Nishida, K. Takakura, M. Isechi, K. Yuasa, M. Nakamura, N. Kifune, K. Yamamoto, S. Teresawa, T. Oshima, M. Miyata, K. Kamakura, Y. Ito, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 2508.
- [6] H.M. Pylypiw Jr., *J. AOAC Int.* 76 (1993) 1369.
- [7] L. Kadenczki, Z. Arpad, I. Gardi, A. Ambrus, L. Gyorfí, G. Reese, W. Ebing, *J. AOAC Int.* 75 (1992) 53.
- [8] A. Valverde-García, E. González-Pradas, J. Martínez-Vidal, A. Agüera-López, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 2188.
- [9] S.M. Lee, P.L. Wylie, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 2192.
- [10] J.A. Casanova, *J. AOAC Int.* 79 (1996) 936.
- [11] S.M. Lee, M.L. Papatkakis, H.C. Feng, G.F. Hunter, J.E. Carr, *Fresenius J. Anal. Chem.* 339 (1991) 376.

- [12] K. Ting, P. Kho, *J. AOAC Int.* 74 (1991) 991.
- [13] J. Fillion, R. Hindle, M. Lacroix, J. Selwyn, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 1252.
- [14] W. Liao, T. Joe, W.G. Cusik, *J. AOAC Int.* 74 (1991) 554.
- [15] R. Coscolla, *Residuos de Plaguicidas en Alimentos Vegetales*, Mundi-Prensa, Madrid, 1993.
- [16] *Community Directive 79/700/EEC*. Off. J. Eur. Commun., European Community, Brussels, 1979
- [17] C. Tomlin (Editor), *The Pesticide Manual*, 10<sup>th</sup> edn., British Crop Protection, The Royal Society of Chemistry, London, 1994.
- [18] C. Liñán Vicente (Editor), *Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales*, 14<sup>th</sup> edn., Agrotécnicas S.L., Madrid, 1998.



ELSEVIER

Journal of Chromatography A 882 (2000) 193-203

---

---

**JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A**

---

---

## Simplified method for the determination of chlorinated fungicides and insecticides in fruits by gas chromatography

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel

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

### Abstract

A fast, reliable method for the determination of more than twenty chlorinated fungicides and insecticides in a variety of fruit samples is presented. The pesticides are extracted from chopped samples with magnetic stirring, after adding 13 mL of acetone:phosphate buffer/Brine solution (12:1, v/v), with 5 mL of n-hexane. The continuous module employed allows, sequential decolourization of the organic phase, solvent changeover and solid-phase extraction for clean-up and preconcentration purposes. A 1  $\mu$ L aliquot of the pesticides in ethyl acetate (eluent) is finally injected into the gas chromatograph for their separation and identification. The method provides excellent clean-up despite the complexity of the matrices involved. Fruit samples (5-20 g) containing 0.1-1250 ng/g pesticides were analysed with a high precision (4-6%). After contamination of the fruit samples for 12 h, average recoveries > 90 % at fortification levels of 5-25 ng/g were obtained for most of the pesticides. Positive findings of these pesticides in fruits purchased at local markets were confirmed by GC-MS.

## **1. INTRODUCTION**

The number of pesticides that are routinely applied to agricultural commodities to both lessen the detrimental effect of weeds, insects or diseases, and boost crop production, has dramatically increased in recent years. As a consequence, the determination of pesticide residues in crops has been strictly regulated by governments in all countries, with two basic aims, namely to detect the presence of forbidden pesticides on a particular commodity and to determine whether the concentrations of the pesticides used exceed their maximum residue limit (MRLs) [1,2]. The determination of pesticide residues in fresh fruits requires rapid, robust, efficient methods because of the short time between harvest and sale in markets. Undoubtedly, chlorinated fungicides and insecticides constitute one of the most important groups of hazardous organic contaminants owing to their high persistence and impact on human health [3].

A literature survey of available methods for the determination of chlorinated residues in fruits leads to the conclusion that these matrices are among the most troublesome. The procedures used are tedious and time-consuming, and involve several extraction and clean-up steps to remove the huge amount of potentially interfering compounds (mainly plant pigments and endogenous acids), which are generally present at higher concentrations than the pesticide residues themselves. The large volumes of organic solvents employed in the first step (typically acetone [4-7], acetonitrile [8-11] and, more recently, ethyl acetate [12,13]), 50-200 mL, pose major hazards for both the environment and the operator. Moreover, conventional liquid-liquid partition

sometimes results in emulsification, which can lower the accuracy and reproducibility of the analytical results [14]. In this regard, solid-phase extraction (SPE) is an effective tool for clean-up purposes. However, liquid-liquid extraction (LLE) cannot be replaced by SPE, although it can be used at a later stage. The typically low concentrations of pesticides in fruits and their also low MRLs (in some cases a few ng/Kg) call for an additional preconcentration step by evaporation under a nitrogen stream; this is done by redissolving the dry residue in the most appropriate solvent for chromatographic separation. The separation, detection and identification of chlorinated pesticides has usually been carried out by gas chromatography (GC), using highly selective detectors such as electron-capture [4,5,11-13,15,16], or atomic emission [11,17] models for screening, and mass spectrometric ones for confirmation [5,6,8,9,13,18]. Recently, a semi-automatic method for the determination of organochlorine pesticides in vegetables was proposed [16]. The method uses a single LLE step to separate the analytes from the matrix; after simultaneous evaporation/redissolution of the residue in distilled water, analytes are preconcentrated/cleaned-up on an RP-C<sub>18</sub> column, eluted with ethyl acetate and injected into a gas chromatograph for analysis.

This work was aimed at developing a method as simple as possible, involving minimal sample manipulation, for the screening and the sensitive and selective determination of chlorinated fungicides and insecticides in fruits. LLE of the analytes from the chopped sample is unavoidable, and is followed by automated clean-up. For this purpose, a continuous-flow system similar to one described elsewhere [16] was suited to the proposed application. The method is highly sensitive: it allows the

identification and quantitation of up to 23 residual chlorinated fungicides and insecticides residues in amounts below their MRLs. In addition, the high efficiency of the clean-up procedure provides good blanks and avoids the interference of coextractives.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Standards and sampling

Stock standard solutions of aldrin, captan, captafol, chlorbensid, chlordane, dichlofuanid, dicloran, dicofol, dieldrin,  $\alpha$ - and  $\beta$ -endosulfan (3:1, w/w), endosulfan sulphate, endrin, hexachlorobenzene (HCB), heptachlor, iprodione,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - and  $\gamma$ -hexachlorohexane ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - and  $\gamma$ -HCH 1:1:1:1, w/w), lindane ( $\gamma$ -HCH), methoxychlor, procymidone, and vinclozolin [all obtained from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany)], were prepared in acetone (by exception, HCB was dissolved in dichloromethane), at concentrations of 5 mg/mL, and stored in glass stoppered bottles at 4°C in the dark. A 2 M potassium phosphate buffer/Brine solution was prepared by dissolving 87 g of  $K_2HPO_4$  and 68 g of  $KH_2PO_4$  in ~250 mL of distilled water. The pH was adjusted to 7.0 with dilute HCl or KOH and the solution made up to volume (500 mL). Finally, sodium chloride was added to the buffer solution up to saturation under constant stirring. 2,4-Dichlorophenol (internal standard), activated carbon and RP-C<sub>18</sub> HPLC sorbent were supplied by Sigma (Madrid, Spain). All other reagents and solvents, in analytical grade or better, were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Fruits were purchased at local markets in Córdoba, Spain. Because the legally tolerated limits of pesticide residues have been set for raw materials, samples were analysed unwashed, in a raw state [19]. Sampling was done according to the legally established protocol [20]. Thus, a raw laboratory sample consisting of 10-50 units (depending on the fruit) was reduced to 3-20 units following the most appropriate procedure (mainly quartering). For melon, 5 units were cut into slices of ~200 g and then reduced similarly to the other fruits. These units were cut into slices and some of them were chopped into smaller pieces to obtain the 5-20 g fractions required by the proposed method.

## 2.2. Instruments and apparatus

Chlorinated fungicides and insecticides were chromatographed on a fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.) coated with 5% phenyl-methylpolysiloxane (film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ) (Supelco, Madrid, Spain). Analyses were performed on a Hewlett-Packard 5890A gas chromatograph equipped with a  $^{63}\text{Ni}$  electron-capture detection (ECD) system. Nitrogen, at a flow-rate of 1.0 mL/min, was used as carrier gas. The injector port and detector temperatures were kept at 225°C and 325°C throughout. The oven temperature program was as follows: 120°C, held for 2 min; 8°C/min ramp to 180°C (hold 4 min); 8°C/min ramp to 255°C (hold 10 min) and 10°C/min ramp to 270°C (hold 2 min). Peak areas were measured with a Hewlett-Packard 3392A integrator. Confirmatory analyses were carried out on a Fisons 8000 GC instrument interfaced to a Fisons MD800 mass spectrometer and controlled by a

---

computer running MASSLAB software (Thermo, Madrid, Spain); the chromatographic column and temperature program were both similar to those used with ECD. Ultrapure helium (6.0 Air Liquide), at a flow-rate of 1.0 mL/min, was employed as carrier gas. The injection port and transfer line temperatures were maintained at 225°C and 300°C, respectively. The ion source temperature was 200°C for the 70 eV electron impact mode, with scanning from  $m/z$  50 to 500. In all analyses, 1  $\mu$ L of the organic extract was injected in the split mode (1:25 ratio).

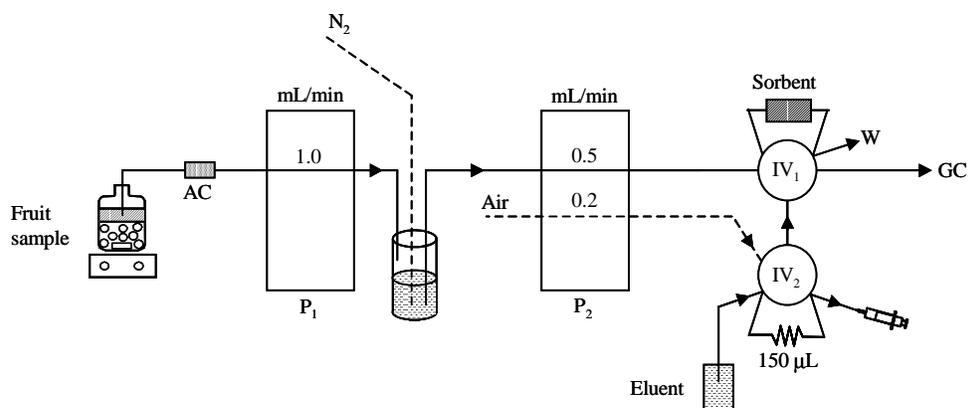
The flow system comprised two peristaltic pumps (Gilson Minipuls-2) and two Rheodyne 5041 injection valves. Poly(vinyl chloride) and Solvaflex pumping tubes for aqueous solutions and n-hexane/methanol, respectively, PTFE tubing (0.5 mm i.d.) and commercially available connectors were also employed. A sorbent column was prepared by packing a commercial Omnifit glass column (2 cm x 2.5 mm i.d.) with ~40 mg of RP-C<sub>18</sub> sorbent material; small cotton beads were used on the ends to prevent material losses. A home-made glass column (5 cm x 4 mm i.d.) packed with ~100 mg of activated carbon was also constructed to decolourize the organic extracts from the fruit samples. A magnetic stirrer (Selecta, Barcelona, Spain) was also employed

### 2.3. Procedure

The flow system used to extract the chlorinated fungicides and insecticides from the fruits is depicted in Figure 1. A 5-20 g amount of chopped sample was weighed inside a 50 mL glass bottle and 13 mL of a solution containing the

acetone:phosphate buffer/Brine solution mixture, (12:1 v/v) was added, followed by 5 mL of extractant (n-hexane); once stoppered, the slurry was magnetically stirred for 5 min. After 1 min of standing, a volume of 2 mL of the upper organic phase, containing the pesticides, was aspirated at 1 mL/min (sampling time 2 min) and passed through an activated carbon column for decolourization (0% adsorption of pesticides) and also to prevent suspended particles from reaching the continuous unit. The eluate was evaporated under a N<sub>2</sub> stream as it dropped into 5 mL of distilled water held in a glass tube. The nitrogen also helps to homogenize the solution. Once evaporation/redissolution was complete, the second pump was started, which allowed the analytes, dissolved in the 5 mL of water, to be instantaneously retained on the sorbent column, located in the loop of IV<sub>1</sub>, at a flow-rate of 0.5 mL/min (bold line in Figure 1). The loop of IV<sub>2</sub> (150 µL) was simultaneously filled with ethyl acetate (eluent) containing the internal standard (2,4-dichlorophenol, 1 µg/mL) by means of a syringe. In the elution step, both valves were switched simultaneously and the analytes eluted at 0.2 mL/min, using air as carrier. The whole organic extract (150 µL) was collected in a glass vial containing anhydrous sodium sulphate and a 1 µL aliquot injected into the gas chromatograph for analysis. Between samples, the activated carbon and the sample aspiration channel were flushed with 3 mL of methanol; the RP-C<sub>18</sub> sorbent column and connectors were flushed with 3 mL of 0.2 M ammonium hydroxide to remove potentially retained interferents and then conditioned with 3 mL of water.

Under these conditions, the activated carbon column was serviceable for about 25 analysis while the sorbent column remained active for 3 months.



**Figure 1.** Scheme of the clean-up/preconcentration steps used for the screening and determination of chlorinated fungicides and insecticides in fruits. P=peristaltic pump; IV=injection valve; W=waste; AC=activated carbon; GC=gas chromatograph with ECD or MS detector.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Selection and optimisation of the clean-up/preconcentration process

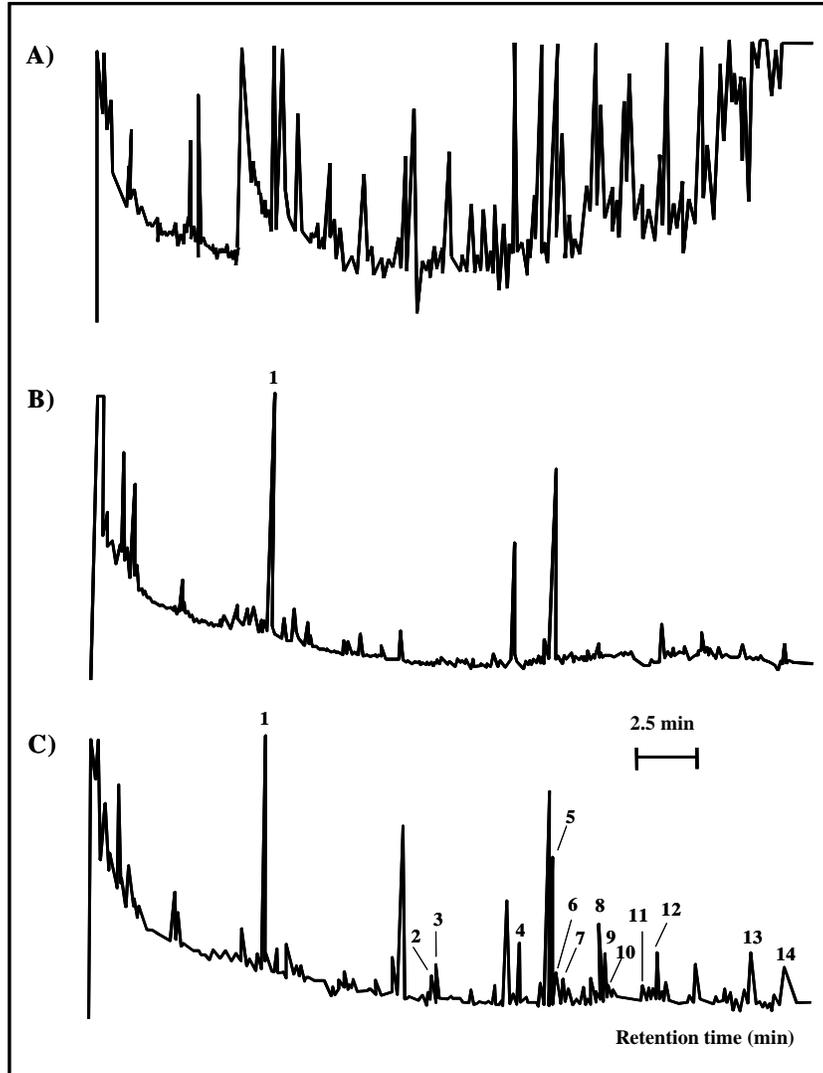
Pesticide residue analyses usually involve the extraction of the analytes from the fruit by using an organic solvent. Preliminary experiments were thus focused on examining the retention of the analytes, in an organic medium, onto a sorbent column, in order to minimize sample pretreatment (simultaneous preconcentration and clean-up). Various sorbents [RP-C<sub>18</sub>, Florisil, silica-gel, activated carbon, Serdolit, alumina, LiChrolut-EN and Amberlites (XAD-2 and XAD-7)] were assayed by preparing solutions of the analytes in acetone, acetonitrile, n-hexane and ethyl acetate. In the most

favourable situation (1 g of silica-gel as sorbent and 4 mL of n-hexane as sample medium) only a preconcentration factor of four was achieved. In addition, the retention of the analytes spiked to a strawberry sample was found to be lower than that with the standards; also, the chromatograms were very dirty, hindering identification of some analytes and poor reproducibility was obtained.

From these results, the chemical conditions found in previous experiments for the automatic clean-up and preconcentration of organochlorine pesticides from vegetables [16], were assayed in the present work. Thus, aqueous medium for the extraction of organochlorine pesticides prior to direct insertion into the manifold for their adsorption on RP-C<sub>18</sub>, was discarded as it provided low recoveries (~40%). Therefore, organic extractants are required, which involves a solvent changeover step to aqueous medium before preconcentration on RP-C<sub>18</sub> sorbent. In the proposed method, a flow system similar to that depicted Figure 1 was used, and the first variable studied was the organic extractant. Thus, the chopped test fruit sample was placed together with the extractant in a glass bottle and, after magnetic stirring, aliquots of the organic extract were continuously aspirated into the clean-up/preconcentration system (Figure 1). Acetone and acetonitrile are commonly used extractants for this purpose on account of their miscibility with plant material, so they were tested with the strawberry samples. However, both extractants provided poor results (polar coextractives and pigments were also extracted, redissolved and eluted, leading to dirty chromatograms). Phase separation and pesticide re-extraction can also be accomplished by salting out with

saturated NaCl in phosphate buffer [11], which prevents partitioning of endogenous organic acids (viz., citric, oxalic and tannic acids) into the aqueous-acetone layer. This method was assayed and the effect of the ratio acetone:phosphate buffer/Brine solution (v/v) optimised. For this purpose, different samples of 5.0 g of strawberries were spiked with 100 ng per gram of fruit (1 mL of acetone containing 500 ng/mL of the pesticides to 5 g of fruit) and, after 12 h of standing (to simulate native analytes), the mixed solution was added, with a fixed acetone volume of 12 mL (for quantitative extraction) and a variable buffer volume (1 to 10 mL); this slurry was extracted with 5 mL of n-hexane. The cleanest extracts were obtained by using 12 mL of acetone and 1 mL of phosphate buffer/Brine solution, so this combination was selected for further experiments. The need of the buffer solution can be inferred from Figure 2, which shows the chromatograms for an uncontaminated strawberry blank, without (A) and with buffer addition (B). Finally, the n-hexane volume was varied between 5 and 20 mL, taking into account that the final concentration of the pesticides in the organic phase remained constant, by spiking variable concentrations of the pesticides to the strawberry test sample. No significant differences were observed over the interval studied, so a volume of 5 mL of n-hexane was selected in order to increase the sensitivity of the proposed method; aliquots of 2 mL were inserted into the solid-phase separation unit as shown in Figure 1.

As the n-hexane phase was yellowish, a glass column packed with 100 mg of activated carbon was placed at the entry to the sample aspiration channel in order to



**Figure 2.** Gas chromatograms for 5.0 g of unfortified strawberry sample extracted without (A) and with (B) a phosphate buffer/Brine solution; same as (B) but fortified (C) with the 13 chlorinated fungicides and insecticides listed in Table 3. 1=internal standard; 2= HCB; 3=dicloran; 4=vinclozolin; 5=dichlofuanid; 6=aldrin; 7=dicofol; 8=captan; 9=chlorbensid; 10=chlordan; 11=dieldrin; 12=endrin; 13=captafol and 14=methoxychlor.

remove natural pigments present in the fruits. This resulted in cleaner chromatograms and an increased RP-C<sub>18</sub> column lifetime; moreover, activated carbon did not retain pesticides (0% adsorption) when they are passed in a low polarity solvent as n-hexane; so, this column was only used for clean-up purposes. The n-hexane phase containing the analytes was then evaporated and redissolved in 5 mL of distilled water as in previous work [16]. In this aqueous medium, several sorbent materials (viz. RP-C<sub>18</sub>, Amberlite XAD-2, silica gel and activated carbon) were assayed, and RP-C<sub>18</sub> exhibited the best sorption properties (~90%). Different eluents (ethyl acetate, n-hexane and petroleum ether) were evaluated using RP-C<sub>18</sub> as sorbent. Ethyl acetate was the best eluent (~100%). Taking into account that the sorbent and eluent were coincident with those of the elsewhere described method [16], the optimal values found for the variables (viz. amount of sorbent material, sample and eluent flow-rate and eluent volume) were also adopted here (see Figure 1).

### 3.2. Analytical GC performance

All the pesticides studied exhibited good gas chromatographic properties and could be identified in a direct manner without overlap. The strawberry blank was spiked with the 23 pesticides. The addition procedure was as follows: 1 mL of standard solutions in acetone containing all pesticides at variable concentrations was spiked to individual amounts of 5 g of fruit blanks, in the interval 0.4-1250 ng/g, held in 50 mL glass bottles; the strawberry sample was then extracted with 13 mL of acetone:buffer solution (12:1, v/v) + 5 mL of n-hexane in the manifold of Figure 1. This addition

procedure ensured that the analytes in the strawberry sample would be present primarily in a deposited state; as a result, the recoveries for the 23 pesticides in these spiked strawberries were higher than 95 %, relative to aqueous standards directly inserted into the solid-phase extraction unit (100%). Based on these results, the fruit blank was used to run calibration graphs for the 23 pesticides. The regression equations were obtained by plotting the analyte-to-internal standard peak area ratio against the analyte concentration, using eight points per curve. The sensitivity (slope of the calibration graph) and the linear ranges are listed in Table 1.

The limits of detection were calculated as the minimum concentrations providing chromatographic signals three times higher than background noise; iprodione exhibited the highest limit of detection (25 ng/g) by virtue of its slightly broadened peak. Repeatabilities (obtained from 11 injections of the same sample containing 5-25 ng/g of each pesticide except iprodione, which was used at 80 ng/g), expressed as relative standard deviation, are also listed in Table 1. In any case, the sensitivity of the method can be increased 4 times by using greater amount of fruit (viz. 20 g), with negligible changes in precision. The  $m/z$  values used for identification in the electron impact ionization mode are shown in Table 1.

**Table 1.** Figures of merit for the determination of chlorinated fungicides and insecticides using an SPE system.

Compound	Sensitivity <sup>a</sup> (10 <sup>-2</sup> )	Linear range (ng/g)	LOD (ng/g)	RSD (%)	<i>m/z</i> <sup>b</sup>
α-HCH	2.3	2.5-500	0.7	5.4	111, <b>181</b> ,219
HCB	1.5	5.0-500	1.0	4.9	249,282, <b>284</b>
Dicloran	9.2	0.4-250	0.1	4.6	<b>124</b> ,176,206
β-HCH	2.7	5.0-500	1.0	4.6	<b>109</b> ,181,219
Lindane	3.8	2.5-500	0.5	5.6	111, <b>181</b> ,219
δ-HCH	4.8	2.5-500	0.5	4.0	111, <b>181</b> ,219
Vinclozolin	4.8	2.5-500	0.5	5.7	187, <b>212</b> ,285
Heptachlor	1.3	5.0-500	1.0	5.5	<b>100</b> ,272,370
Dichlofuanid	2.5	5.0-500	1.2	5.8	<b>123</b> ,224,332
Aldrin	2.4	2.5-500	0.5	5.4	<b>66</b> ,263,298
Dicofol	0.9	6.2-500	1.2	4.8	111, <b>139</b> ,250
Captan	5.6	2.5-500	0.7	5.0	<b>79</b> ,264,299
Procymidone	2.5	5.0-500	1.0	5.9	67, <b>96</b> ,283
Chlorbensid	0.7	12.5-1000	2.5	6.0	<b>125</b> ,127,268
Chlordane	0.2	25.0-1250	5.0	5.1	202, <b>373</b> ,408
α-Endosulfan	1.4	5.0-500	1.0	5.8	<b>195</b> ,241,339
Dieldrin	0.9	5.0-500	1.2	6.0	<b>79</b> ,378,380
Endrin	1.0	5.0-500	1.0	5.9	<b>67</b> ,317,319
β-Endosulfan	1.1	5.0-500	1.0	5.7	<b>195</b> ,241,339
Endosulfan sulphate	2.7	5.0-500	1.0	5.4	<b>272</b> ,387,420
Iprodione	2.1	63.0-1250	25.0	5.3	<b>56</b> ,314,329
Captafol	3.6	5.0-500	1.2	5.7	<b>79</b> ,347,349
Methoxychlor	0.4	12.5-1000	2.5	5.9	<b>227</b> ,228,344

<sup>a</sup> Relative area (analyte/internal standard peak area ratio)/ng/g.

<sup>b</sup> *m/z* values in italics are M<sup>+</sup> values; those in bold face correspond to the base peak.

### 3.3. Application to fruit samples

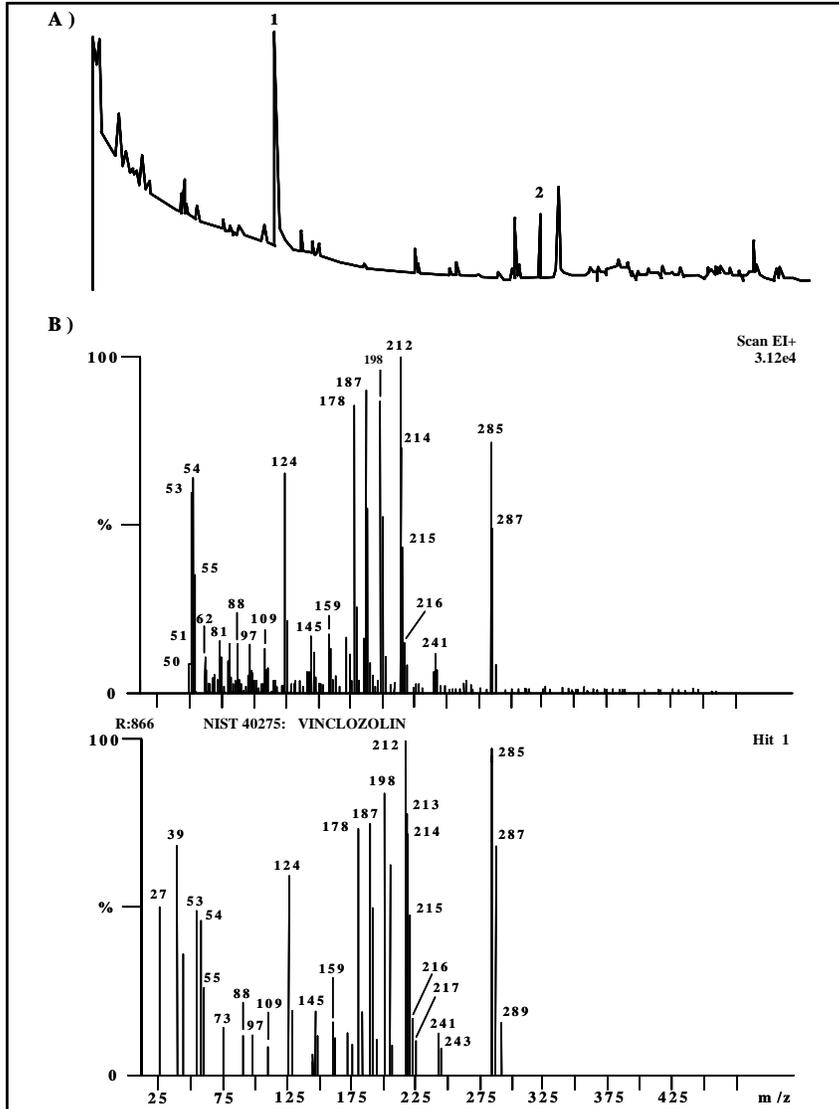
Various types of fruit were used to examine the effect of the matrix on recoveries, separation and interfering peaks. For this purpose, 40 fruit samples of 10 different types (namely, nectarine, melon, peach, pear, apple, orange, red plum, cherry, strawberry and banana), purchased at various local markets were analysed. Sampling

was done as described in Section 2.1 and laboratory samples were analysed as soon as received, using the procedure described in Section 2.3. Initially, 5.0 g of each fruit was weighed and analysed; when negative results were obtained, the sample amount was increased to 20 g. In all instances, quantitation was done by ECD and positive findings were confirmed by MS. Only six samples were found to contain chlorinated residues at detectable levels. The results thus obtained, for 5 g of sample are listed in Table 2. As can be seen, the concentrations found were lower than the EU maximum residue limits (see Table 2) for all compounds examined. The presence of the residues was confirmed by GC-MS, using 20 g of sample as the sensitivity was ten times lower than with ECD. By way of example, Figure 3A shows the chromatogram for the peach sample containing only vinclozolin, obtained with electron capture detection. Figure 3B illustrates the identification of vinclozolin by comparing the mass spectrum for the corresponding peak with that in the library. Spectral comparison resulted in coincidence above 85%.

**Table 2.** Summary of the chlorinated fungicides and insecticides found in fruit samples ( $\pm$ SD, n=6) analysed by using the proposed method and GC-ECD.

Sample	Pesticide found	Concentration (ng/g)	MRL <sup>a</sup> ( $\mu$ g/g)
Peach	Vinclozolin	6.0 $\pm$ 0.3	2
Nectarine	Captan	5.0 $\pm$ 0.2	2
Banana	Dicofol	7.3 $\pm$ 0.4	2
Strawberry	Dichlofuanid	6.4 $\pm$ 0.4	10
Apple	Lindane	4.5 $\pm$ 0.3	1
Strawberry	Vinclozolin	4.8 $\pm$ 0.3	5

<sup>a</sup> Established by the European Union.



**Figure 3.** Chromatogram for a chlorinated pesticide found in a peach sample (A): 1=internal standard; 2=vinclozolin. Full-scan EI mass spectra for vinclozolin in the fruit sample and from NIST library (B).

Recoveries of the proposed method were assessed by adding, to each previously analysed uncontaminated fruit, the pesticides according to use and occurrence/appearance [19,21,22]. In order to ensure reliable simulation of the actual leaf applications [22], 5.0 g of chopped sample was spiked with 1 mL of acetone containing variable concentrations of chlorinated pesticides and fungicides between 25 and 125 ng/mL, except for iprodione (400 ng/mL), and allowed to stand overnight at room temperature in a closed fume hood to avoid contamination. Each sample was spiked three times and then analysed in duplicate (n=6), using the proposed method; the results obtained are listed in Table 3. All compounds were correctly identified and average recoveries (90-101%) were acceptable for all matrices. The lower values obtained for captan, procymidone and vinclozolin (77-80%) can be ascribed to their being either partially irreversibly bound to the matrices or degraded during contamination time. Matrix interferences were reduced during the clean-up steps. Figure 2 shows the chromatograms for a strawberry sample, both unfortified (B) and after fortifying with the 13 chlorinated fungicides and insecticides listed in Table 3 (C).

#### 4. CONCLUSIONS

The aim of this work was satisfactorily fulfilled, especially with regard to obtaining clean extracts from the fruits. These matrices are among the most troublesome to analyse, not only because of the bright colour of the natural pigments they contain (e.g. strawberries), but also because of the many major and minor compounds that are initially co-extracted with the analytes. Liquid extraction of the

**Table 3.** Percent recovery (mean of six determinations  $\pm$  SD) of chlorinated fungicides and insecticides added to fruit samples at 5-25 ng/g.

Commodity	Compound	Recovery (%)	Commodity	Compound	Recovery (%)	
Nectarine	Aldrin	101 $\pm$ 6	Orange	Aldrin	99 $\pm$ 6	
	Captan	75 $\pm$ 4		Captafol	100 $\pm$ 5	
	Chlorbensid	97 $\pm$ 6		Captan	79 $\pm$ 4	
	Dichlofuanid	107 $\pm$ 7		Chlorbensid	99 $\pm$ 6	
	Dieldrin	96 $\pm$ 5		Chlordane	92 $\pm$ 5	
	$\alpha$ -Endosulfan	91 $\pm$ 5		Dichlofuanid	102 $\pm$ 6	
	$\beta$ -Endosulfan	109 $\pm$ 5		Dichloran	88 $\pm$ 4	
	Endosulfan sulphate	83 $\pm$ 6		Dicofol	109 $\pm$ 4	
	Endrin	103 $\pm$ 5		Dieldrin	99 $\pm$ 7	
	HCB	97 $\pm$ 7		Endrin	96 $\pm$ 4	
	$\alpha$ -HCH	87 $\pm$ 5		HCB	96 $\pm$ 5	
	$\beta$ -HCH	89 $\pm$ 5		Heptachlor	88 $\pm$ 6	
	$\delta$ -HCH	101 $\pm$ 6		Lindane	103 $\pm$ 5	
	Lindane	103 $\pm$ 5		Procymidone	84 $\pm$ 5	
	Procymidone	83 $\pm$ 7		Methoxychlor	90 $\pm$ 5	
				Vinclozolin	81 $\pm$ 4	
Melon	Aldrin	100 $\pm$ 6	Red plum	Aldrin	89 $\pm$ 5	
	Chlorbensid	98 $\pm$ 6		Captafol	89 $\pm$ 6	
	Dichlofuanid	99 $\pm$ 6		Chlorbensid	93 $\pm$ 6	
	Dichloran	83 $\pm$ 5		Chlordane	91 $\pm$ 6	
	Dicofol	102 $\pm$ 4		Dichloran	84 $\pm$ 5	
	Dieldrin	105 $\pm$ 7		Dieldrin	100 $\pm$ 5	
	Endrin	104 $\pm$ 6		Endrin	108 $\pm$ 7	
	HCB	92 $\pm$ 5		HCB	99 $\pm$ 6	
	$\alpha$ -HCH	91 $\pm$ 6		Heptachlor	94 $\pm$ 6	
	$\beta$ -HCH	96 $\pm$ 5		Methoxychlor	92 $\pm$ 4	
	$\delta$ -HCH	103 $\pm$ 4		Procymidone	70 $\pm$ 5	
	Heptachlor	88 $\pm$ 5		Vinclozolin	71 $\pm$ 5	
	Lindane	91 $\pm$ 6				
	Methoxychlor	102 $\pm$ 6		Cherry	Aldrin	90 $\pm$ 6
	Procymidone	72 $\pm$ 4			Chlorbensid	99 $\pm$ 6
	Vinclozolin	81 $\pm$ 5			Chlordane	85 $\pm$ 5
		Dichlofuanid	90 $\pm$ 6			
Peach	Aldrin	95 $\pm$ 5	Dichloran	82 $\pm$ 6		
	Dichloran	95 $\pm$ 6	Dicofol	90 $\pm$ 7		
	Dieldrin	101 $\pm$ 6	Dieldrin	91 $\pm$ 6		
	$\alpha$ -Endosulfan	92 $\pm$ 6	$\alpha$ -Endosulfan	103 $\pm$ 6		
	$\beta$ -Endosulfan	106 $\pm$ 7	$\beta$ -Endosulfan	101 $\pm$ 7		
	Endosulfan sulphate	91 $\pm$ 6	Endrin	96 $\pm$ 5		
	Endrin	101 $\pm$ 6	HCB	84 $\pm$ 6		
	HCB	91 $\pm$ 4	$\alpha$ -HCH	95 $\pm$ 7		
	Methoxychlor	100 $\pm$ 4	$\beta$ -HCH	96 $\pm$ 7		
	Procymidone	78 $\pm$ 5	$\delta$ -HCH	97 $\pm$ 5		
	Vinclozolin	80 $\pm$ 5	Lindane	99 $\pm$ 5		
			Methoxychlor	98 $\pm$ 6		
			Vinclozolin	71 $\pm$ 4		

**Table 3 (continue).**

Commodity	Compound	Recovery (%)	Commodity	Compound	Recovery (%)
Pear	Aldrin	105 ± 6	Strawberry	Aldrin	98 ± 6
	Captafol	94 ± 4		Captafol	95 ± 5
	Chlorbensid	103 ± 6		Captan	87 ± 5
	Dichlofuanid	90 ± 5		Chlorbensid	95 ± 6
	Dichloran	95 ± 4		Chlordane	81 ± 5
	Dicofol	105 ± 5		Dichlofuanid	94 ± 6
	Dieldrin	92 ± 5		Dichloran	91 ± 5
	α-Endosulfan	93 ± 6		Dicofol	98 ± 5
	β-Endosulfan	97 ± 6		Dieldrin	93 ± 6
	Endosulfan sulphate	92 ± 5		Endrin	101 ± 5
	Endrin	93 ± 5		HCB	87 ± 5
	Methoxychlor	104 ± 6		Methoxychlor	92 ± 5
	Procymidone	78 ± 6		Vinclozolin	81 ± 5
	Vinclozolin	70 ± 4			
Apple	Aldrin	90 ± 6	Banana	Aldrin	90 ± 5
	Chlorbensid	91 ± 6		Captafol	90 ± 6
	Chlordane	93 ± 6		Chlorbensid	102 ± 7
	Dichlofuanid	102 ± 6		Dicofol	90 ± 4
	Dichloran	98 ± 7		Dieldrin	95 ± 6
	Dicofol	90 ± 5		α-Endosulfan	106 ± 5
	Dieldrin	94 ± 5		β-Endosulfan	96 ± 6
	α-Endosulfan	95 ± 6		Endrin	102 ± 7
	β-Endosulfan	98 ± 6		HCB	98 ± 4
	Endosulfan sulphate	90 ± 5		α-HCH	92 ± 5
	Endrin	90 ± 6		β-HCH	98 ± 5
	HCB	88 ± 4		δ-HCH	102 ± 5
	Heptachlor	82 ± 5		Heptachlor	99 ± 5
	Lindane	93 ± 7		Lindane	106 ± 7
	Vinclozolin	82 ± 6		Vinclozolin	78 ± 5
	Iprodione	86 ± 5			

pesticides from the sample could not be avoided with any of the approaches tested. The sensitivity of the method complies with the limits established by legislation; the method uses amounts of a few grams of sample that can be increased if required. This is therefore a competitive, simple, fast and inexpensive method.

#### ACKNOWLEDGMENTS

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

---

**REFERENCES**

- [1] *Community Directive 93/58 EEC*. Off. J. Eur. Commun. L 211/6, European Community, Brussels, 1993.
- [2] *FAO. Agriculture towards 2010*; C 93/24 Document of 27<sup>th</sup> Session of FAO Conference, Rome, 1993.
- [3] S.T. Hadfield, J.K. Sadler, E. Bolygo, I.R. Hill, *Pestic. Sci.* 34 (1992) 207.
- [4] D. Beil, M. Moeller, A. Paschke, H. Steinhart, J. Ring, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 93 (1997) 242.
- [5] C.M. Torres, Y. Pico, J. Manes, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 127.
- [6] M. Anastassiades, E. Scherbaum, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 93 (1997) 316.
- [7] J.A. Casanova, *J. AOAC Int.* 79 (1996) 936.
- [8] Y. Akiyama, N. Yoshioka, M. Tsuji, *Shokuhin. Eiseigaku. Zasshi.* 39 (1998) 303.
- [9] L.E. Sojo, A. Brocke, J. Fillion, S.M. Price, *J. Chromatogr. A* 788 (1997) 141.
- [10] K.A. Barnes, R.J. Fussell, J.R. Startin, M.K. Pegg, S.A. Thorpe, S.L. Reynolds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 117.
- [11] S.M. Lee, P.L. Wylie, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 2192.
- [12] F. Sicbaldi, A. Sarra, G.L. Copeta, *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 23.
- [13] A.R. Fernández-Alba, A. Valverde, A. Agüera, M. Contreras, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 263.
- [14] M. Okihashi, H. Obana, S. Hori, *Analyst* 123 (1998) 711.

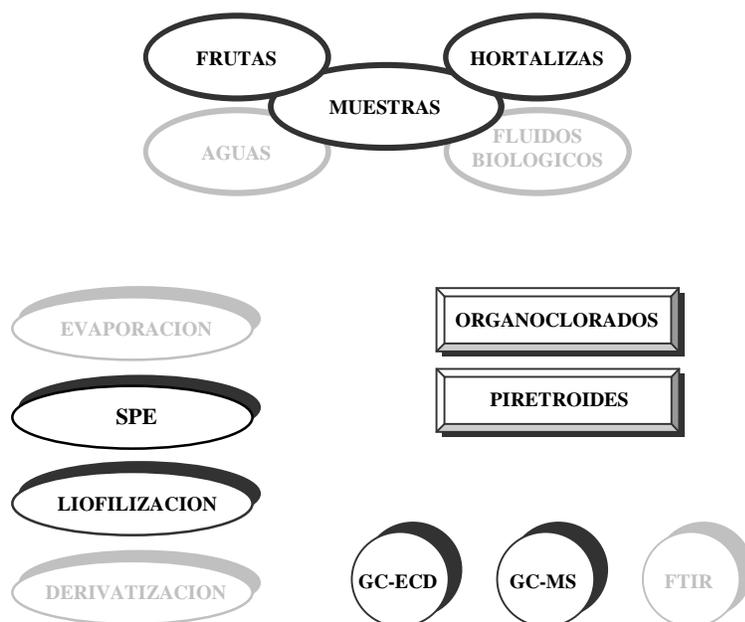
- 
- [15] P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, F.M. Pirisi, V. Brandolini, F. Cabitza, M. Cubeddu, *J. Agric. Food. Chem.* 46 (1998) 3772.
- [16] A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 235.
- [17] K. Ting, P. Kho, *J. AOAC Int.* 74 (1991) 991.
- [18] J. Fillion, R. Hindle, M. Lacroix, J. Selwyn, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 1252.
- [19] R. Coscolla, *Residuos de Plaguicidas en Alimentos Vegetales*, Mundi-Prensa, Madrid (Spain), 1993.
- [20] *Community Directive 79/700/EEC*. Off. J. Eur. Commun., European Community, Brussels, 1979.
- [21] C. Tomlin (Editor), *The Pesticide Manual*, 10<sup>th</sup> edn., British Crop Protection, London, 1994.
- [22] C. Liñán Vicente (Editor), *Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales*, 14<sup>th</sup> edn., Agrotécnicas S.L., Madrid (Spain), 1998.



**CAPITULO III:  
PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS  
Y PIRETROIDES EN HORTALIZAS  
Y FRUTAS LIOFILIZADAS**

**CHAPTER III:  
ORGANOCHLORINE AND PYRETHROID  
PESTICIDES IN LYOPHILISED  
VEGETABLES AND FRUITS**

**CAPITULO III**





En este Cap. III de la Memoria se aborda el desarrollo de un MRM selectivo, para la determinación de plaguicidas piretroides (Cap. III.1), y de MRMs multiclase para la determinación de plaguicidas organoclorados y piretroides (Cap. III.2 y III.3), ambos en muestras de frutas y hortalizas liofilizadas. De nuevo en este capítulo se ha utilizado la cromatografía de gases acoplada a los detectores de captura de electrones y espectrometría de masas, así como también se han automatizado los procesos analíticos.

Los métodos descritos para la determinación de estos plaguicidas en productos hortofrutícolas emplean muestras frescas para su extracción directa [1,2]. Sin embargo, la liofilización ha sido utilizada en la determinación de estos residuos en muestras liofilizadas de alimentos de origen animal [3,4], de suelos y sedimentos [5], e incluso en muestras acuosas utilizando un soporte inerte sobre el que quedan adsorbidos los plaguicidas tras la sublimación del agua que constituye la muestra [6]. La liofilización constituye también una alternativa ventajosa en el pretratamiento de muestras hortofrutícolas. El alto contenido en agua de estos productos los hace muy perecederos, siendo además el vehículo en el que tienen lugar numerosas reacciones químicas y biológicas, que pueden ocasionar también la degradación del plaguicida presente. De hecho, además de simplificar la metodología de extracción, la liofilización aumenta la estabilidad de la muestra durante su conservación, sin que tengan lugar pérdidas de estos analitos.

**REFERENCIAS**

- [1] A. R. Fernández Alba, A. Valverde, A. Aguera, M. Contreras, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 263.
- [2] H. B. Wan, M. K. Wong, P. Y. Lim, C. Y. Mok, *J. Chromatogr. A* 662 (1994) 147.
- [3] M. Weichbrodt, W. Vetter, E. Scholz, B. Luckas, K. Reinhardt, *Int. J. Environ. Anal. Chem* 73 (1999) 309.
- [4] M. J. Gradwell, T. W. M. Fan, A. N. Lane, *Anal. Biochem.* 263 (1998) 139.
- [5] A. Pastor, E. Vázquez, R. Ciscar, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 241.
- [6] C. Charreteur, N. Kerbaol, J. J. Peron, *Analisis* 24 (1996) 336.



ELSEVIER

Journal of Chromatography A 912 (2001) 83-90

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A

## Selective enrichment of seventeen pyrethroids from lyophilised agricultural samples

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel

*Analytical Chemistry Division, Campus de Rabanales, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain*

Received 29 June 2000; received in revised form 9 October 2000; accepted 9 January 2001

### Abstract

The screening of agricultural samples to determine 17 synthetic pyrethroids was investigated. Samples were lyophilised without losses of the insecticides, and then extracted with n-hexane. A simple, continuous preconcentration-elution system was developed, which included a silica sorbent column (packed with 50 mg) and used an air stream to carry the eluent (ethyl acetate) which minimised the eluate volume thus increasing the preconcentration factor; so no evaporation step was required. Pyrethroids were determined by gas chromatography-electron capture detection (GC-ECD) by using a 5% phenylmethylpolysiloxane-coated fused-silica capillary column; gas chromatography/mass spectrometry was used to identify the pyrethroids detected by GC-ECD monitoring. Limits of detection varied between 0.1 and 0.8 ng/mL (except for piperonyl butoxide, 25 ng/mL) with linear ranges from 1 to 200 ng/mL; the precision of the method was high (3-6 %). Recoveries of 17 insecticides from 14 different agricultural samples fortified at levels of 20-100 ng/g ranged from 66 to 102 % (bifenthrin and deltamethrin were those providing the lowest values, 66-87 %). Pyrethroids were detected in eight samples (from the one-hundred unfortified agricultural samples tested) at concentrations lower than the established maximum residue limits (MRLs).

## 1. INTRODUCTION

Pyrethroids are a relatively new developed group of insecticides widely used in the control of agricultural, forestry and stored products pests [1]. Considering that they are harmless for mammals under normal circumstances and the absence of toxic metabolites, their maximum residue limits (MRLs) are, in general, higher than those of organophosphorous, organochlorine or carbamate pesticides [2]. Notwithstanding their relatively low toxicity, the residue analysis of pyrethroids in crops, foods and environmental matrices is of importance in agricultural and environmental sciences. Almost all the analytical methods for the determination of pyrethroid residues in agricultural commodities are based on the use of chromatographic techniques [3-23], mainly gas chromatography (GC).

Despite the chromatographic technique used, extensive sample pretreatment is required, including preconcentration and clean-up steps. In a general procedure, representative subsamples from fresh vegetables/fruits are homogenised and extracted once or several times using either a single solvent [5-9,13,14] or a binary solvent mixture [10]. When a water miscible solvent is used, subsequent liquid-liquid partition with an immiscible one such as n-hexane [5,13,14] or toluene [7,8] is included. The clean-up of the final organic extract is then carried out by solid-phase extraction [5-10,21] or gel permeation chromatography [6,15]. Supercritical fluid extraction [18,19] as well as the matrix solid-phase dispersion [11,20] have also been proposed for this determination. All these methods have been applied to the determination of residues of pyrethroids in fresh agricultural samples. However, lyophilisation can be used for

---

sample pretreatment, particularly for sample preservation. In the case of agricultural and food analysis, the use of freeze-drying led to the solution of a variety of problems encountered in the storage of these type of samples [24].

The aim of this work was to develop a simple and fast method, which allows the screening of agricultural samples for the determination of synthetic pyrethroids. The organic extractant was added to the lyophilised samples and the analytes retained on a silica column inserted into a flow configuration more simple than that described elsewhere for organochlorine pesticides [25] with the view of carrying out the analyte preconcentration and matrix clean-up in a single step. The high sensitivity and selectivity of the proposed method allows the determination of 16 synthetic pyrethroids and piperonyl butoxide (a synergist found in combination with pyrethroids) in lyophilised fruit and vegetable samples at concentrations lower than their MRLs.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Chemicals and standards

All reagents were of analytical grade or better. Bifenthrin, lambda-cyhalothrin, deltamethrin, fenpropathrin, fenvalerate (cis and trans isomers), permethrin (cis and trans isomers), cyfluthrin isomers,  $\beta$ -cyfluthrin, cypermethrin isomers,  $\alpha$ -cypermethrin, synergist piperonyl butoxide and endosulfan sulphate (internal standard, IS) were obtained from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Cyfluthrin and cypermethrin have four isomers: 1(RS)cis, $\alpha$ (RS) which is isomer I; 1(RS)trans, $\alpha$ (RS), isomer III; 1(RS)cis, $\alpha$ (SR), isomer II; and 1(RS)trans, $\alpha$ (SR), isomer IV;  $\alpha$ -cypermethrin is the

isomer III of cypermethrin and  $\beta$ -cyfluthrin is the mixture of isomers II and IV of cyfluthrin at ratio 1:2. The silica sorbent was obtained from Varian (Zug, Switzerland). Solvents (ethyl acetate, n-hexane, isopropanol, acetonitrile) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Stock standard solutions of each pyrethroid and piperonyl butoxide (synergist for pyrethrins) were prepared in n-hexane at concentrations of 5 mg/mL and stored in glass stoppered bottles in the dark at 4 °C.

## 2.2. Instruments and apparatus

Experiments were carried out by using a Hewlett-Packard 5890 A gas chromatograph equipped with a  $^{63}\text{Ni}$  electron-capture detection (ECD) system. Chromatographic separation was achieved by using a fused-silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.) coated with 5% phenylmethylpolysiloxane (film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ) (Supelco, Madrid, Spain). Peak areas were measured with a Hewlett-Packard 3392 A integrator. The injector and detector temperatures were maintained at 225°C and 325°C throughout. The column temperature was raised from 170°C (hold 2 min) to 255°C (hold 15 min) at 10°C/min and then to 285°C (hold 6 min) at 8°C/min. Nitrogen (6.0, Air Liquide, Seville, Spain) at a flow-rate of 1 mL/min was used as carrier gas. Confirmatory analyses were carried out on a Fisons 8000 GC instrument interfaced to a Fisons MD800 mass spectrometer and controlled by a computer running MASSLAB software (Thermo, Madrid, Spain); the chromatographic column and temperature program were both similar to those used with ECD, using ultrapure helium (6.0 Air

Líquido), as carrier gas (1 mL/min). The injection port and transfer line temperatures were maintained at 225°C and 300°C, respectively. The ion source temperature was 200°C for the 70 eV electron impact mode, with scanning from  $m/z$  70 to 500. In all analyses, 1  $\mu$ L of the organic extract was injected in the split mode (1:25 ratio).

The flow system consisted of a Gilson Minipuls-2 peristaltic pump fitted with Solvaflex pumping tubes, two Rheodyne 5041 injection valves, PTFE tubing (0.5 mm i.d.) and commercially available connectors. A laboratory-made glass column (2 cm x 4 mm i.d.) packed with ~ 50 mg of silica was also employed; small cotton beads were used on the ends to prevent material losses. The sorbent column was sequentially conditioned with 0.5 mL of acetonitrile and 1 mL of n-hexane prior retention. A glass column (3 cm x 5 mm i.d., packed with cotton wool) was also constructed for filtration purposes. A Hetosic laboratory freeze-dryer, type CD-53-1 (Birkerød, Denmark) was also employed.

### 2.3. Sample preparation

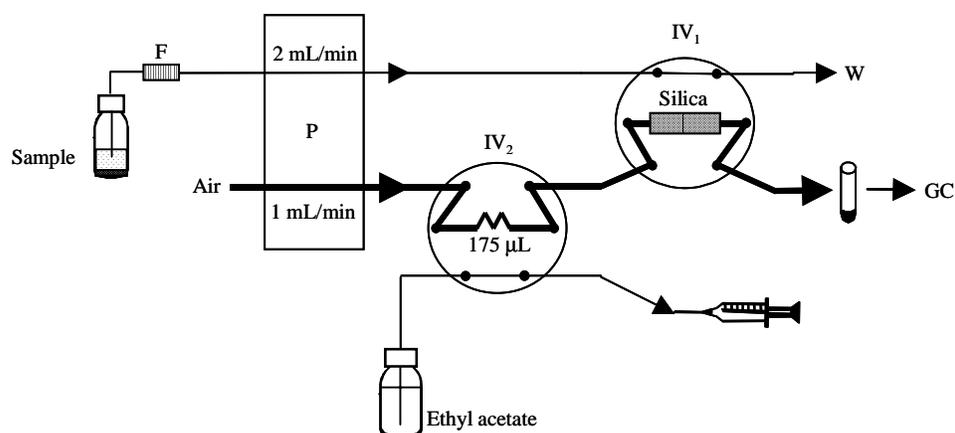
Vegetables and fruits were purchased at local markets in Córdoba. Because the legally established limits of pyrethroid residues have been set for raw materials, samples were analysed unwashed, in a raw state [26]. Sampling was done according to the legally established protocol [27]. Thus, a raw global sample consisting of ~5 Kg was reduced by quartering to ~500 g and then pulped in a high-speed blender and fractions of ~50 g lyophilised by freeze-drying at 6 Pa for 8 h. Lyophilised sample were

conserved in glass containers, at -20°C in the dark, until analysis, the concentration of pyrethroids remaining constant for at least three months. An accurately weighed amount of 0.1-1 g of lyophilised sample was placed into a 100 mL amber glass bottle with 15 mL of n-hexane and 0.1 mL of 0.75 µg/mL endosulfan sulphate (IS). Once stoppered, the mixture was shaken (10 min) and 5 mL of the n-hexane phase was continuously aspirated and filtered into the manifold of Figure 1.

#### 2.4. Screening procedure

The continuous preconcentration and elution system designed is shown in Figure 1. In the preconcentration step, a volume of 5 mL of standard solution or treated sample containing 1-200 ng/mL of each pyrethroid in n-hexane, was continuously introduced into the system at 2 mL/min. A cotton column was used to filter fine particles in order to avoid clogging the sorbent column. The analytes were retained on the silica column (50 mg), located in the loop of injection valve (IV<sub>1</sub>), the sample matrix being sent to waste. Simultaneously, the loop of the second valve (IV<sub>2</sub>) was filled with the eluent (ethyl acetate) Prior to the elution, by switching IV<sub>1</sub>, residual organic solution inside the column and the connectors were flushed by passing an air stream through the carrier line of the IV<sub>2</sub> at 1 mL/min for 4 min. In the elution step, IV<sub>2</sub> was switched and 175 µL of the eluent were injected into an air stream and passed through the sorbent column to elute the pyrethroids (position in bold lines). The extract

was collected in a glass vial and 1  $\mu\text{L}$  aliquot injected into the gas chromatograph. After each determination, the sorbent column was cleaned with 0.5 mL of isopropanol to remove residual compounds from the matrix and then conditioned with 0.5 mL of acetonitrile and 1 mL of n-hexane.



**Figure 1.** Scheme of the solid-phase extraction unit designed for the screening and determination of pyrethroids and piperonyl butoxide in lyophilised agricultural samples. F=filter; P=peristaltic pump; IV=injection valve; W=waste; GC=gas chromatograph with ECD or MS detector.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Lyophilisation of the samples

Fresh vegetables and fruits contain abundant amount of water —normally more than 80%—, which favours biodegradations and hydrolysis reactions. Lyophilisation of fresh samples provides at least three advantages, namely: to facilitate both the storage and conservation of the samples, and to simplify the extraction procedure. In this way, preliminary experiments were focused on the lyophilisation of the samples; spinach and apple were selected as vegetable and fruit sample tests, respectively.

For this purpose, chopped fresh test samples (~100 g) were spiked with the 17 analytes studied at a concentration of 50 ng/g; the resulting mixture was split in two fractions. One half was manually extracted first with acetone and then with n-hexane, according to the standard method [14] and the other half was lyophilised, directly extracted with n-hexane, and the standard method followed. Results of these experiments (repeated four times) provided the following conclusions: (i) studied pyrethroids and the synergist were not evaporated during the lyophilisation process; (ii) although the percentages of recovery were similar (~80%) in the two parallel sets, the precision was higher in lyophilised samples than in fresh ones; and (iii) the direct extraction of the lyophilised samples with n-hexane provided cleaner extracts than those of fresh ones.

### *3.2. Solid-phase extraction unit*

The optimisation of the solid-phase extraction (SPE) system was done by using a standard solution containing 100 ng/mL of each pyrethroid and 1 µg/mL of piperonyl butoxide (according to its lower sensitivity by ECD) in n-hexane. Several sorbents (LiChrolut-EN, RP-C<sub>18</sub>, Florisil, alumina, Bond Elut-CN, Bond Elut-2OH and silica) were assayed using 5 mL of standard solution. The whole eluate was collected in glass vials, evaporated to dryness under N<sub>2</sub> and the residue redissolved in 200 µL of ethyl acetate. Complete retention was only achieved with silica (>95 %); the other sorbents provided lower efficiency (viz. 10-40%). Different organic solvents (ethyl acetate, acetonitrile, isopropanol and acetone) were assayed as eluent. Ethyl acetate was the best eluent (~ 100 % elution). A column packed with 50 mg of silica and an eluent volume of 175 µL were selected as optimum. The influence of the sample and eluent flow-rates were examined over the range 0.2-4.0 mL/min. Complete retention and elution were achieved at flow-rates lower than 2.4 and 1.2 mL/min, respectively. A sample and eluent flow-rates of 2.0 and 1.0 mL/min were finally chosen.

In order to attain the highest enrichment factor, the breakthrough volume was evaluated by passing different volumes of standard solutions, containing 100 ng of each pyrethroid and 1 µg of piperonyl butoxide, in n-hexane. Sample volumes up to 25 mL can be used with negligible changes in the chromatographic signal. However, a sample volume of 5 mL is enough to reach concentrations lower than the MRLs established for these pesticides, thanks to the high sensitivity of the method. Finally, endosulfan

sulphate was selected as internal standard among others compounds as it was quantitatively retained on the silica column and eluted with ethyl acetate; it was added directly to the standards or samples, at concentration of 5 ng/mL.

To ensure the applicability of the optimised SPE unit to real samples, 0.5 g of lyophilised test samples (spinach and apple) were extracted with 10 mL of n-hexane for 10 min. The yellowish extracts were spiked with 100 ng of each pyrethroid (1 µg of piperonyl butoxide) and a volume of 5 mL was aspirated into the SPE system. The peaks corresponding to target compounds were correctly identified in both chromatograms against those corresponding to sample matrices, without overlapping. Therefore, the proposed system can be applied to the determination of these pesticides in agricultural samples.

### *3.3. Linearity and precision*

Calibration graphs were obtained by using aliquots of 5 mL of n-hexane containing each pesticide at known concentrations (1-200 ng/mL for pyrethroids and 50-1500 ng/mL for piperonyl butoxide). In the case of mixture of isomers, the global analytical signal was obtained by summing the peak areas of all isomers. Figures of merit are listed in Table 1. The precision of the method as relative standard deviation (RSD, n=20) was acceptable for all pesticides.

**Table 1.** Analytical figures of merit of the proposed method.

Compound	Sensitivity <sup>a</sup> (10 <sup>-2</sup> )	Linear range (ng/mL)	LOD (ng/mL)	RSD (%)	<i>m/z</i> <sup>b</sup>
Piperonyl butoxide	0.5	50-1500	25	4.4	149, <b>176</b> , 338
Bifenthrin	16.5	1-200	0.1	5.3	152, 165, <b>181</b>
Fenpropathrin	17.9	1-200	0.1	5.0	<b>97</b> , 181, 349
λ-Cyhalothrin	22.9	1-200	0.1	3.3	141, <b>181</b> , 209
Permethrin	5.6	2-200	0.8	6.2	163, <b>183</b> , 390
Cyfluthrin	28.8	1-200	0.4	4.7	<b>77</b> , 163, 227
β-Cyfluthrin	19.2	1-200	0.2	4.9	<b>77</b> , 163, 227
Cypermethrin	14.0	1-200	0.4	3.8	77, 181, <b>209</b>
α-Cypermethrin	21.2	1-200	0.1	3.1	77, 181, <b>209</b>
Fenvalerate	18.0	1-200	0.2	5.7	<b>169</b> , 181, 419
Deltamethrin	14.3	1-200	0.2	6.3	<b>181</b> , 209, 253

<sup>a</sup>Relative area (analyte/internal standard peak area ratio) ng/mL; sample volume, 5 mL.

<sup>b</sup>*m/z* values in italics are M<sup>+</sup> ions; those in bold face correspond to the base peak.

### 3.4. Screening and determination of pyrethroids in agricultural samples

Prior to the screening of agricultural samples, the n-hexane volume and the extraction time were optimised. For this purpose, several amount of 1 g of lyophilised test samples (fortified with variable amounts of pesticides depending on the extractant volume) were extracted with 15, 25 and 50 mL of n-hexane and the mixture was mechanically shaken for different times (5 to 20 min). In all cases, 5 mL of the extract was introduced into the SPE system. The influence of the volume of extractant was negligible and the optimum extraction time was 10 min.

A total of 100 agricultural samples of 14 different types (namely: spinach, chard, tomato, green pepper, potato, cauliflower, mushroom, strawberry, apple, pear, orange, kiwi, peach and plum) purchased at various local markets were analysed

following the proposed method. Initially, 0.1 g of lyophilised sample was weighed and analysed; when negative results were obtained, the sample amount was increased to 1 g; in all instances, quantitation was done by ECD. Positive findings were confirmed by MS, using 2 g of lyophilised sample with 30 mL of extractant and aspirating 25 mL of extract into the SPE unit. As can be seen in Table 2, only eight samples were found to contain pyrethroids at detectable levels and in all cases the concentrations found were lower than the established MRLs. By way of example, Figure 2 shows the chromatograms for strawberry, spinach and apple samples.

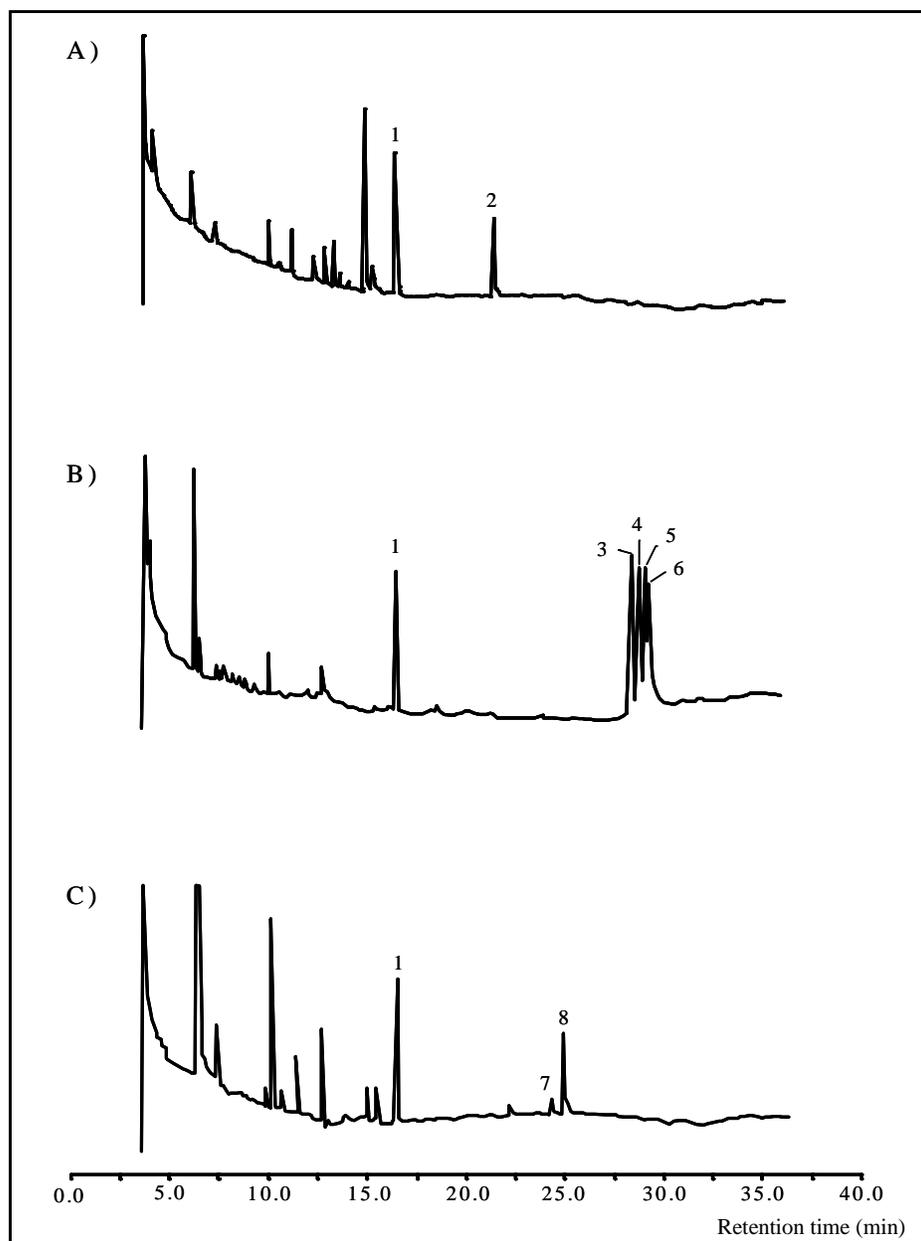
**Table 2.** Summary of the pyrethroids found in agricultural samples ( $\pm$ SD, n=6).

Sample	Water (% w/w)	Pyrethroid found	Concentration (ng/g) <sup>a</sup>	MRL <sup>a,b</sup> ( $\mu$ g/g)
Spinach	90	Cypermethrin	420 $\pm$ 20	0.50
Chard	92	Cypermethrin	90 $\pm$ 5	0.50
Strawberry	91	$\lambda$ -Cyhalothrin	24 $\pm$ 2	0.02
Pear	82	$\lambda$ -Cyhalothrin	55 $\pm$ 3	0.10
Apple	83	Permethrin	170 $\pm$ 12	1.00
Green pepper	91	Bifenthrin	96 $\pm$ 7	NE
Tomato	93	Fenvalerate	650 $\pm$ 40	1.00
Orange	81	Bifenthrin	85 $\pm$ 5	NE

<sup>a</sup>Amount per g of fresh sample.

<sup>b</sup>Established by the European Union, NE: value non established.

In all cases, the identification of pyrethroids was done by comparing the mass spectrum for the corresponding peak with that in the pesticide library. Spectral comparisons resulted in coincidence above 85%.



**Figure 2.** GC-ECD chromatograms for (A) 5 g of strawberry; (B) 2.5 g of spinach and (C) 2.5 g of apple. Peaks: 1=internal standard; 2= $\lambda$ -cyhalothrin; 3=cypermethrin I, 4=cypermethrin III; 5= cypermethrin II; 6= cypermethrin IV; 7=permethrin cis; 8=permethrin trans.

Finally, in order to assess the potential of the proposed method, 14 uncontaminated agricultural samples, including those listed above, were spiked at three different levels. Fortification process was carried out as follows: 2 mL of acetone containing 1-5  $\mu\text{g}$  of each pyrethroid (10-50  $\mu\text{g}$  of piperonyl butoxide) was added to 50 g of the blended commodity, slightly shaken and left stand for ~20 min for acetone evaporation. Samples were then frozen prior to lyophilisation. Each sample was spiked three times and analysed in duplicate ( $n=6$ ). Tables 3 and 4 list the average recovery values obtained for each analyte spiked to the seven vegetable and seven fruit samples studied at the three spiked concentrations [average results of seven samples and each sample analysed six times ( $n=42$ )]. From the results obtained, several conclusions can be addressed, namely: (i) average recoveries increased as the amount spiked increased; (ii) average recovery values were slightly higher for vegetables than for fruits (especially for permethrin and  $\beta$ -cyfluthrin); (iii) bifenthrin and deltamethrin provided the lowest recoveries in all the samples studied (~66-87 %), probably as consequence of their higher degradation during sample treatment by interaction with food fluids. Among the samples studied, spinach for vegetables and strawberry for fruits provided recovery values that fitted the average values given in Tables 3 and 4, respectively, and can therefore be used as model samples. Figure 3 shows the chromatograms for an unfortified and fortified tomato sample. The efficiency of the clean-up step is also showed in the upper part of this Figure. Few peaks from the matrix appear in the

chromatograms, the majority of them located at the beginning of the chromatogram, before the internal standard, so, they do not interfere with analyte determination.

**Table 3.** Average recovery ( $\pm$  standard deviation) of spiked pyrethroids from the seven vegetable samples tested. For details, see text.

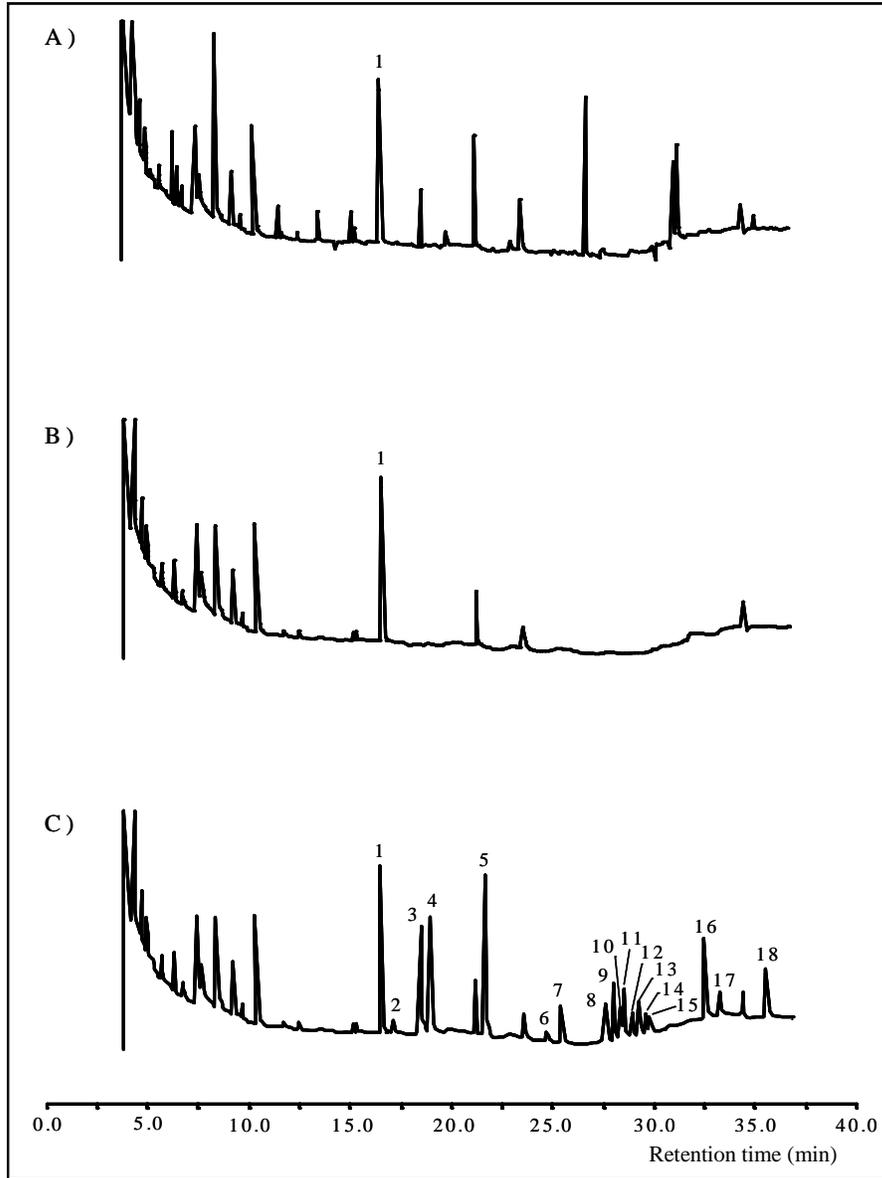
Compound	20 ng/g <sup>a</sup>	40 ng/g <sup>a</sup>	100 ng/g <sup>a</sup>
Piperonyl butoxide <sup>b</sup>	87 $\pm$ 2	91 $\pm$ 2	96 $\pm$ 4
Bifenthrin	67 $\pm$ 3	69 $\pm$ 4	73 $\pm$ 5
Fenpropathrin	86 $\pm$ 3	94 $\pm$ 3	98 $\pm$ 4
$\lambda$ -Cyhalothrin	87 $\pm$ 6	95 $\pm$ 4	102 $\pm$ 5
Permethrin	83 $\pm$ 2	87 $\pm$ 3	93 $\pm$ 6
Cyfluthrin	91 $\pm$ 7	93 $\pm$ 5	96 $\pm$ 2
$\beta$ -Cyfluthrin	87 $\pm$ 1	92 $\pm$ 3	96 $\pm$ 4
Cypermethrin	91 $\pm$ 6	96 $\pm$ 6	99 $\pm$ 7
$\alpha$ -Cypermethrin	87 $\pm$ 4	90 $\pm$ 4	97 $\pm$ 3
Fenvalerate	86 $\pm$ 4	90 $\pm$ 4	94 $\pm$ 2
Deltamethrin	75 $\pm$ 2	77 $\pm$ 5	84 $\pm$ 4

<sup>a</sup>Concentration spiked; <sup>b</sup>Spiked level was 10 times higher than for pyrethroids.

**Table 4.** Average recovery ( $\pm$  standard deviation) of spiked pyrethroids from the seven fruit samples tested. For details, see text.

Compound	20 ng/g <sup>a</sup>	40 ng/g <sup>a</sup>	100 ng/g <sup>a</sup>
Piperonyl butoxide <sup>b</sup>	85 $\pm$ 6	93 $\pm$ 4	96 $\pm$ 2
Bifenthrin	66 $\pm$ 2	72 $\pm$ 6	74 $\pm$ 5
Fenpropathrin	85 $\pm$ 2	95 $\pm$ 4	99 $\pm$ 4
$\lambda$ -Cyhalothrin	91 $\pm$ 4	97 $\pm$ 6	101 $\pm$ 4
Permethrin	86 $\pm$ 2	92 $\pm$ 5	100 $\pm$ 5
Cyfluthrin	88 $\pm$ 4	95 $\pm$ 4	99 $\pm$ 4
$\beta$ -Cyfluthrin	91 $\pm$ 6	95 $\pm$ 4	99 $\pm$ 4
Cypermethrin	90 $\pm$ 7	94 $\pm$ 3	98 $\pm$ 4
$\alpha$ -Cypermethrin	87 $\pm$ 4	91 $\pm$ 2	97 $\pm$ 2
Fenvalerate	84 $\pm$ 6	91 $\pm$ 4	96 $\pm$ 3
Deltamethrin	76 $\pm$ 5	82 $\pm$ 6	87 $\pm$ 5

<sup>a</sup>Concentration spiked; <sup>b</sup>Spiked level was 10 times higher than for pyrethroids.



**Figure 3.** GC-ECD chromatograms for a sample of tomato (4 g) unfortified without (A) and with (B) clean-up step and fortified (C) with 40 ng/g of each pyrethroid and 400 ng/g of piperonyl butoxide. Peaks: 1=internal standard; 2=piperonyl butoxide; 3=bifenthrin; 4=fenpropathrin; 5= $\lambda$ -cyhalothrin; 6= permethrin cis; 7=permethrin trans; 8=cyfluthrin I; 9= cyfluthrin III; 10= cyfluthrin II; 11= cyfluthrin IV; 12=cypermethrin I; 13= cypermethrin III; 14= cypermethrin II; 15= cypermethrin IV; 16= fenvalerate cis; 17=fenvalerate trans; 18=deltamethrin.

#### **4. CONCLUSIONS**

The proposed method is simple and sensitive enough for application to agricultural samples containing the analytes at concentrations lower than the MRLs. Its most salient advantage over conventional methods is that it requires a single manual extraction with an organic solvent; the following steps corresponding to preconcentration, clean-up and elution are carried out in an automatic way, using an extraordinary simple flow injection configuration. The simplicity of the method developed can be ascribed to sample lyophilisation which minimised the presence of natural pigments as well as other concomitants in the final extract. Although the lyophilisation of the agricultural samples is the most time-consuming step, it allows simultaneous processing of a large number of samples.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

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

---

**REFERENCES**

- [1] J.H. Davies, In: J.P. Leahey (Ed.), *The Pyrethroid Insecticides*, Taylor & Francis, London, 1985.
- [2] *Community Directive 93/58 EEC*, Off. J. Eur. Commun. L 211/6, European Community, Brussels, 1993.
- [3] A. Andersson, H. Palsheden, *Fresenius J. Anal. Chem.* 339 (1991) 365.
- [4] J.P. Kutter, T.J. Class, *Chromatographia* 33 (1992) 103.
- [5] Y. Nakamura, Y. Tonogai, Y. Tsumura, Y. Ito, *J. AOAC Int.* 76 (1993) 1348.
- [6] E. Papadopoulou-Mourkidou, in J. Sherma and T. Cairnes (Editors), *Comprehensive Analytical Profile of Important Pesticides*, CRC Press, New York, 1993, p. 3-146.
- [7] G.F. Pang, C.L. Fan, Y.Z. Chao, T.S. Zhao, *J. Chromatogr. A* 667 (1994) 348.
- [8] H.B. Wan, M.K. Wong, P.Y. Lim, C.Y. Mok, *J. Chromatogr. A* 662 (1994) 147.
- [9] A.R. Fernández-Alba, A. Valverde, A. Agüera, M. Contreras, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 263.
- [10] G.F. Pang, C.L. Fan, Y.Z. Chao, T.S. Zhao, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 738.
- [11] Y.C. Ling, I.P. Huang, *J. Chromatogr. A* 695 (1995) 75.
- [12] G.F. Pang, Y.Z. Chao, X.S. Liu, C.L. Fan, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 1474.
- [13] G.F. Pang, Y.Z. Chao, C.L. Fan, J.J. Zhang, X.M. Li, T.S. Zhao, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 1481.

- 
- [14] G.F. Pang, Y.Z. Chao, C.L. Fan, J.J. Zhang, X.M. Li, Y.M. Liu, T.S. Zhao, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 1489.
- [15] Z. Chen, Y. Wang, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 367.
- [16] H.J. Stan, M. Linkerhaegner, *J. Chromatogr. A* 750 (1996) 369.
- [17] C. M. Torres, Y. Pico, J. Manes, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 301.
- [18] R. Stefani, M. Buzzi, R. Grazzi, *J. Chromatogr. A* 782 (1997) 123.
- [19] R.J. Argauer, K.I. Eller, R.M. Pfeil, R.T. Brown, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 180.
- [20] H.S. Dorea, F. M. Lancas, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 367.
- [21] H. Obana, K. Akutsu, M. Okihashi, S. Kakimoto, S. Hori, *Analyst* 124 (1999) 1159.
- [22] D. Kasaj, A. Rieder, L. Krenn, B. Kopp, *Chromatographia* 50 (1999) 607.
- [23] G. R. van der Hoff, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A* 843 (1999) 301.
- [24] M.D. Luque de Castro, A. Izquierdo, *J. Autom. Chem.* 12 (1990) 267.
- [25] A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 235.
- [26] R. Coscolla, *Residuos de Plaguicidas en Alimentos Vegetales*, Mundi-Prensa, Madrid, 1993.
- [27] *Community Directive 79/700/EEC*, Off. J. Eur. Commun., European Community, Brussels, 1979.
-



J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 1109-1116

## Multiresidue screening of pesticides in fruits using an automatic solid-phase extraction system

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel

*Analytical Chemistry Division, Campus de Rabanales, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain*

Received 22 September 2000; received in revised form 7 December 2000; accepted 17 December 2000

### Abstract

About 20 pesticides were determined in lyophilised fruits using a semi-automatic multiresidue method, based on solid-phase extraction (SPE) with a silica column. The lyophilisation of the sample besides the SPE procedure selected, provided clean extracts despite the complexity of the matrices studied. In addition, the lyophilisation process allows sample preservation for at least three months without changes in the concentration of the pesticides. Determination and quantitation of organochlorine and pyrethroid residues was carried out using a gas chromatograph equipped with an electron capture detector (GC-ECD) and a mass spectrometric detector (GC-MS) for confirmation purposes. Organochlorine pesticides provided average recoveries (spiked at three concentration levels in eight different fruits) near  $93 \pm 4 \%$ , being lower ( $89 \pm 8 \%$ ) for pyrethroids as consequence of their higher degradation/interaction with the sample matrix. On the other hand, the detection limits achieved for all pesticides (0.5-8 ng per g of lyophilised fruit) allow their determination at the MRLs established by the European Union, with good precision ( $\sim 5\%$ ). Finally, from the 100 different fruits screened, only 10 positive responses were obtained, which were further confirmed by GC-MS.

## 1. INTRODUCTION

Pesticides are necessary and essential in agricultural production. With their use, the risk of residues remaining on the food consumed is present. For this reason, governments and international organisations have published a list of pesticides and their tolerances or maximum residues limits (MRLs) [1]. Fresh fruits must be screened for pesticide residues before marketing, but because of their short life-time, a rapid, simple analytical process as well as high accuracy in the identification and quantitation of the analytes detected is required. Organochlorine and pyrethroid pesticides are a large group of fungicides and insecticides extensively used in recent decades against pests all over the world [2]. Organochlorine pesticides (OCPs) are very persistent because of their high lipophilic properties and stability [3,4]. Pyrethroids are less harmful for mammals; only the parent pyrethroids show toxicity as the existence of significant toxic metabolites has not yet been proved [2]. In any case, the identification and quantitation of pyrethroid residues, along with OCPs, is necessary to monitor and regulate their usage on crop to protect the consumers from unsafe levels.

Most determinations of OCPs and pyrethroids have been developed using chromatographic techniques, mainly gas chromatography (GC). Some of these pesticides have one or more halogen atoms in their chemical structure, so the electron capture detector (ECD) is used because of its high selectivity [5-8]. For confirmation purposes, mass spectrometry (MS) is also employed [5,6].

Fruits are very complex matrices, requiring a pre-treatment step, which usually includes extraction and clean-up processes, normally tedious and time consuming, to

provide clean extracts. Basically, a homogenised sample is extracted, once or several times, with a single solvent, typically acetonitrile [9,10], ethyl acetate [6,11,12], acetone [5,7] or n-hexane [13]; or a solvent mixture, such as toluene-acetonitrile [14], acetone-dichloromethane-hexane [15], acetone-n-hexane [16] or acetone- petroleum ether [17]. Normally, there are too many co-extractives and the extracts obtained must be cleaned-up by liquid-liquid partition (LLP) and/or solid phase extraction (SPE). If a polar solvent is used as the first extractant, a LLP is subsequent carried out with a non polar solvent [7]. The SPE can be applied on RP-C<sub>18</sub> [9], silica-gel [11], Florisil [7,16] or alumina [6].

The majority of the methods developed to date are based on the direct extraction of the pesticides from fresh samples. However, lyophilisation of fruits and vegetables leads to a higher stability of the samples without losses of analytes. In this regard, few contributions have been recently published [8,18] although only the latter implements the automatic extraction of pyrethroids from lyophilised agricultural samples. In this paper, the solid-phase extraction system proposed elsewhere [18] for pyrethroids determination was initially adopted, but we studied other solvents and sorbents in order to extent the use of the system to organochlorine pesticides. Fruit samples were lyophilised after collection in a raw state, then conserved at -20°C to retain the concentrations of OCPs and pyretroids residues at constant levels for at least three months. The method is rapid and does not require either laborious sample manipulation or use of a complicated SPE system. The sensitivity and selectivity of the

method allows the screening of at least 19 pesticides at concentrations lower than their established MRLs.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Apparatus

Analyses were performed on a Hewlett-Packard 5890 A gas chromatograph equipped with a  $^{63}\text{Ni}$  electron-capture detector (ECD) and a fused-silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.) coated with 5% phenylmethylpolysiloxane (film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ) (Supelco, Madrid, Spain), connected to a Hewlett-Packard 3392 A integrator. The injector and detector were operated at 225°C and 325°C, respectively. The chromatographic temperature program was: 150°C for 2 min, raised to 170°C (8°C/min), and held for 4 min; then raised to 255°C (8°C/min), and held for 15 min; and finally raised to 285°C (5°C/min) and held for 6 min. Nitrogen (6.0, Air Liquide, Seville, Spain) at a flow-rate of 1 mL/min was used as carrier gas. To confirm the identity of eluted GC peaks, a Fisons 8000 GC instrument interfaced to a Fisons MD800 mass spectrometer and controlled by a computer running MASSLAB software (Thermo, Madrid, Spain) was also used; the chromatographic column and temperature program were both similar to those used with ECD. Ultrapure helium (6.0, Air Liquide), at a flow-rate of 1 mL/min, was employed as carrier gas. The injection port and transfer line temperatures were maintained at 225°C and 300°C, respectively. The ion source temperature was 200°C for the 70 eV electron impact mode. Mass spectra

were recorded from  $m/z$  70 to 500. Samples (1  $\mu\text{L}$ ) were injected in the split mode (1:25 ratio).

The flow system was constructed with a Gilson Minipuls-2 peristaltic pump (Villiers-le-Bel, France) furnished with Solvaflex pumping tubes, two Rheodyne 5041 injection valves, PTFE tubing (0.5 mm i.d.) and commercially available connectors. The sorbent glass column (2 cm x 4 mm i.d.) was hand-packed with 50 mg of silica and sealed at both ends with small cotton beads to prevent material losses. The sorbent column was sequentially conditioned with 0.5 mL of acetonitrile and 1 mL of n-hexane prior to retention. This column can be reused for at least three months, working daily, including a washing step with 0.5 mL of isopropanol before conditioning. A glass column (3 cm x 5 mm i.d., packed with cotton wool) was used to filtrate the n-hexane phase.

A Hetosic laboratory freeze-dryer, type CD-53-1 (Birkerød, Denmark) was also employed.

## 2.2. Chemicals and standard solutions

All chemicals and sorbents were of analytical grade or better. The following pesticides, were studied: dicloran, lindane, vinclozolin, dichlofuanid, captan, procymidone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -endosulfan (3:1), endosulfan sulphate, bifenthrin, lambda-cyhalothrin, deltamethrin, fenpropathrin, fenvalerate (cis and trans isomers), permethrin (cis and trans isomers), cyfluthrin isomers,  $\beta$ -cyfluthrin isomers, cypermethrin isomers,

$\alpha$ -cypermethrin and piperonyl butoxide (internal standard, IS) were obtained from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Cyfluthrin and cypermethrin have four isomers: 1(RS)cis, $\alpha$ (RS) = isomer I; 1(RS)trans, $\alpha$ (RS) = isomer III; 1(RS)cis, $\alpha$ (SR) = isomer II; and 1(RS)trans, $\alpha$ (SR) = isomer IV;  $\alpha$ -cypermethrin is the isomer III of cypermethrin and  $\beta$ -cyfluthrin is the mixture of isomers II and IV of cyfluthrin at ratio 1:2. The RP-C<sub>18</sub> HPLC sorbent was supplied by Sigma (Madrid, Spain) and the silica sorbent was obtained from Varian (Zug, Switzerland). Solvents (ethyl acetate, n-hexane, isopropanol, acetonitrile) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Stock standard solutions of each pesticide were prepared in n-hexane at concentrations of 5 mg/mL, and stored in glass stoppered bottles in the dark at 4 °C. Working standard solutions were obtained by appropriate dilution with n-hexane.

### 2.3. Fruit materials and sample preparation

The trial was carried out with fruits purchased at local markets in Córdoba. Due to the legally established limits of pesticides residues have been set for raw materials, samples were analysed unwashed, in a raw state [19]. Sampling was done according to the legally established protocol of the EU [20]. Thus, a raw global sample consisting of ~5 Kg of each fruit was reduced by quartering it to ~500 g (laboratory sample). For melon, the raw sample (~5 units) was cut into slices of ~100 g and then reduced by quartering to ~500 g. Laboratory samples were pulped in a high-speed blender and fractions of ~50 g lyophilised by freeze-drying at 6 Pa for 8 h, after which they were

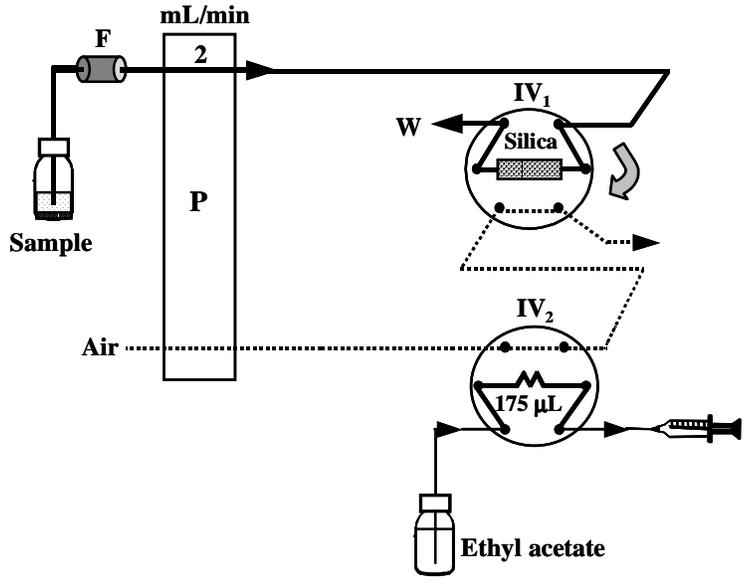
conserved in glass containers, at  $-20^{\circ}\text{C}$  in the dark, until analysis. Under these conditions, the concentration of the pesticides assayed remained constant for at least three months.

The lyophilised sample was prepared by the following method. An accurately weighed amount of 0.1-1 g ( $n=5$ ) containing between 2 ng and 2  $\mu\text{g}$  of pesticides, was placed into a 50 mL amber glass bottle with 10 mL of n-hexane and 0.1 mL of 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  piperonyl butoxide (IS). After the bottle was stoppered, the mixture was mechanically shaken for 10 min and allowed to settle. Then, 5 mL of the n-hexane phase, containing the analytes and the IS, was continuously aspirated and filtered into the SPE system of Figure 1.

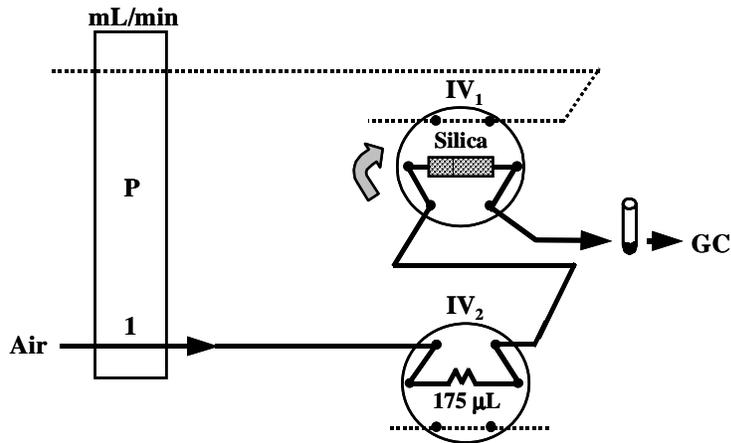
#### 2.4. Analytical method

The SPE system used for the screening and determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruits is depicted in Figure 1. In the preconcentration step, 5 mL of a standard solution or the treated sample containing 0.2-200 ng/mL of pesticides (for lyophilised samples, between 2 ng/g and 2  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) plus 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of IS in n-hexane, was continuously aspirated at 2 mL/min through the cotton column, which filters fine particles, occasionally present in the organic phase, to avoid clogging the system, and then passed through the sorbent column (50 mg of silica), located in the loop of the injection valve 1 ( $\text{IV}_1$ ), being the analytes retained and the sample matrix being wasted, (position in bold lines). Simultaneously, the loop of the second valve ( $\text{IV}_2$ ) was filled

**Preconcentration step**



**Elution step**



**Figure 1.** FI manifold for the on-line preconcentration of pesticides and their off-line determination by gas chromatography. F=filter; P=pump; IV= injection valve; W=waste.

with the eluent (ethyl acetate) by means of a syringe. Prior to the elution, by switching IV<sub>1</sub>, residual organic solution inside the column and the connectors were flushed by passing an air stream through the carrier line of the IV<sub>2</sub> at 1 mL/min for 4 min. In the elution step, by switching IV<sub>2</sub>, 175 µL of the eluent was injected into an air stream and passed through the sorbent column (in the direction opposite to that of the sample) to elute the pesticides (position in bold lines). The eluate was collected in a glass vial, containing anhydrous sodium sulphate and 1 µL aliquot was injected into the gas chromatograph. After each determination, the sorbent column was cleaned with 0.5 mL of isopropanol to remove residual compounds from the matrix and then conditioned with 0.5 mL of acetonitrile and 1 mL of n-hexane.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Solid-phase extraction system

Recently, our working group has developed a flow system for the determination of organochlorine pesticides (OCPs) in fresh fruits [21], and other one for the screening of pyrethroids in lyophilised fruits [18]. Petroleum ether/n-hexane and RP-C<sub>18</sub>/silica were found to be the most efficient extraction solvents and sorbents for OCPs/pyrethroids, respectively. In both cases, the eluent was ethyl acetate. In this work, the development of a multiresidue method for both types of pesticides using the same SPE system was afforded. Therefore, taking into account that lyophilised samples gave better results than fresh ones for pyrethroids [18], through a simplified extraction procedure which provided cleaner chromatograms as well as higher recoveries, the

stability of the OCPs during the lyophilisation process was initially studied using melon as model fruit. For this purpose, 100 g of fresh melon, free from OCPs, was chopped and spiked with 20 ng/g of each of the OCPs studied, and then divided in two fractions. One of them was extracted following a standard method [7], which used sequential extraction with acetone and n-hexane. The n-hexane extract was further evaporated, redissolved and extracted again; finally, Florisil cartridges were used for clean up purposes, and the extract was evaporated and redissolved in n-hexane prior to its injection into the GC-ECD instrument. The other fraction of 50 g of sample was lyophilised at 6 Pa, for 8 h, and then directly extracted with n-hexane following the procedure described above for the fresh fraction. This operation was repeated four times. Based on the results obtained, it was concluded that no losses of OCPs occurred during lyophilisation process. In addition, chromatograms for lyophilised melon were cleaner than those for fresh melon. Therefore, all samples were lyophilised for further experiments.

The study of the extractant and sorbent was carried out using a flow system similar to that depicted in Figure 1. For this purpose, two working standard solutions containing 10 ng/mL of each OCP and 20 ng/mL of each pyrethroid, plus 2 µg/mL of the IS were prepared in n-hexane and petroleum ether. Two columns packed with 60 mg of RP-C<sub>18</sub> and silica were separately inserted in to the flow system, with an eluent of 250 µL of ethyl acetate in all instances. A volume of 5 mL of each working standard solution was aspirated through the flow system first with the RP-C<sub>18</sub> column and then with the silica column. On the assumption that ethyl acetate provided quantitative

elution, the following conclusions can be addressed: silica was a much better sorbent than RP-C<sub>18</sub> because all pesticides in both organic solvents were only retained onto RP-C<sub>18</sub> sorbent up to 20% while pyrethroids were quantitatively retained (100%) onto the silica column and for OCPs retention efficiency varied from 40% (e.g. lindane, dicloran) to 90% (e.g. captan, endosulfan sulphate). On the other hand, n-hexane and petroleum ether behave equally as solvents for standards preparation. To select the most efficient extractant for real samples, two fractions of 0.5 g of lyophilised melon were spiked with 150 ng and 300 ng of each OCP and pyrethroid respectively, extracted with 15 mL of n-hexane or petroleum ether and then passed through the flow system with the silica column; n-hexane showed slightly better extraction properties than petroleum ether because it provided cleaner chromatograms. So, n-hexane as extractant and silica as sorbent were finally selected.

The following experiments were carried out by aspirating into the SPE system a volume of 5 mL of a working standard solution containing 10 ng/mL of each OCP, 20 ng/mL of each pyrethroid and 2 µg/mL of IS. The amount of silica material was optimised into the range 25-100 mg, with the optimum being 50 mg. The influence of the flow rate was studied for the sample and the eluent (using an air stream as carrier), over the range 0.1-5.0 mL/min. Pyrethroids were more affected than OCPs for both variables; sample and eluent flow rates of 2 and 1 mL/min, respectively were selected. The volume of the eluent (ethyl acetate) was examined by changing the loop of IV<sub>2</sub> (Figure 1), the optimum volume being 175 µL. A second elution with the same eluent volume showed the absence of carry over.

As has been stated above, pyrethroids were quantitatively retained onto silica whereas retention for OCPs was not complete. So, after the SPE system was optimised, the sorbent capacity of the silica column for OCPs was evaluated. For this purpose, a standard solution containing 10 ng/mL of each OCP and 2 µg/mL of IS in n-hexane was prepared; an aliquot of 5 mL was passed through the SPE system and collected at the end of the column (this eluate fraction corresponds to unretained OCPs). The standard solution (5 mL) (100% adsorption) and the collected eluate fraction were evaporated near dryness and reconstructed with 200 µL of n-hexane (for preconcentration purposes). A 1 µL aliquot of each extract was injected into the GC-ECD. The chromatograms obtained (the process was repeated four times) were compared. The highest retention (80-90%) was obtained for procymidone, β-endosulfan, dichlofuanid, captan and endosulfan sulphate, and the lowest retention (40-50%) corresponded to lindane, α-endosulfan and dicloran (vinclozolin excepted ~65%). Finally, piperonyl butoxide was selected as an internal standard among other compounds as it was quantitatively retained on the silica column and eluted with ethyl acetate; it was added directly to the standards or samples at a concentration of 2 µg/mL, thus acting as a procedural internal standard.

The breakthrough volume, defined as the sample volume above which the analyte starts to elute from the column bottom (it depends on the strength with which the analytes are retained by each sorbent, on the amount of sorbent and on packing efficiency of the sorbent bed), was evaluated in the optimised SPE system in order to

know the maximum sample volume that can be used and hence the maximum preconcentration factor that can be achieved. For this purpose, different volumes of n-hexane containing always the same amount of analytes (50 ng of each OCP, 100 ng of each pyrethroid and 10 µg of IS) were aspirated into the flow system. The results showed that 20 mL was the breakthrough volume, being the pesticides with minor affinity by the sorbent (viz. lindane,  $\alpha$ -endosulfan and dicloran) the most affected at higher volumes. Based on these results, and taking into account the high sensitivity of the method, the volume of extractant required to achieve the MRLs established was 5 mL, with it being possible to increase it up to 20 mL if required.

### *3.2. Features of the proposed automated method*

All pesticides studied exhibited good gas chromatographic properties. Analytical curves for standards of pesticides were obtained by using a sample volume of 5 mL of n-hexane containing variable concentrations (0.2-200 ng/mL) and the SPE system depicted in Figure 1. In the case of mixture of isomers, permethrin (2 isomers), fenvalerate (2 isomers),  $\beta$ -cyfluthrin (2 isomers), cyfluthrin (4 isomers) and cypermethrin (4 isomers), the global analytical signal was obtained by summing the peak areas of all isomers. The curves were constructed by plotting the analyte-to-IS peak area ratio against the analyte concentration. The detection limit, linear range, correlation coefficient ( $r^2$ ), precision (as RSD) and  $m/z$  values for GC-MS confirmation are shown in Table 1. The detection limit was defined as the minimum concentration

**Table 1.** Analytical figures of merit of the proposed method for determination of 19 pesticides.

Compound	LOD (ng/mL)	Linear range (ng/mL)	r <sup>2</sup>	RSD (%)	m/z <sup>a</sup>
Dicloran	0.1	0.2-20	0.998	4.5	<b>124</b> , 176, 206
Lindane	2.0	5-200	0.999	5.3	111, <b>181</b> , 219
Vinclozolin	0.1	0.2-20	0.998	3.0	187, <b>212</b> , 285
Dichlofuanid	0.05	0.2-20	0.992	4.0	<b>123</b> , 224, 332
Captan	2.0	8-200	0.998	6.5	<b>79</b> , 264, 299
Procymidone	0.1	0.2-20	0.998	5.2	67, <b>96</b> , 283
α-Endosulfan	0.1	0.2-20	0.996	5.4	<b>195</b> , 241, 339
β-Endosulfan	0.05	0.2-20	0.998	3.8	<b>195</b> , 241, 339
Endosulfan sulphate	0.5	1-200	0.996	4.7	<b>272</b> , 387, 420
Bifenthrin	0.1	1-200	0.998	6.0	152, 165, <b>181</b>
Fenpropathrin	0.1	1-200	0.998	5.0	<b>97</b> , 181, 349
λ-Cyhalothrin	0.1	1-200	0.996	3.5	141, <b>181</b> , 209
Permethrin	0.8	2-200	0.996	5.8	163, <b>183</b> , 390
Cyfluthrin	0.4	1-200	0.994	5.0	<b>77</b> , 163, 227
β-Cyfluthrin	0.2	1-200	0.998	4.7	<b>77</b> , 163, 227
Cypermethrin	0.4	1-200	0.996	3.6	77, 181, <b>209</b>
α-Cypermethrin	0.1	1-200	0.998	3.3	77, 181, <b>209</b>
Fenvalerate	0.2	1-200	0.996	6.1	<b>169</b> , 181, 419
Deltamethrin	0.2	1-200	0.994	5.8	<b>181</b> , 209, 253

<sup>a</sup>m/z values used for confirmation: in italics, M<sup>+</sup> ions and in bold face, base peak.

providing a chromatographic signal 3 times higher than background noise. The lowest detection limits were for dichlofuanid and β-endosulfan (0.05 ng/mL), and for the other pesticides, it ranged from 0.1 to 0.8 ng/mL (lindane and captan excepted, which has limits of 2.0 ng/mL). For 1 g of lyophilised sample, the detection limits ranged from 0.5 to 8 ng. The sensitivity of the method (as slope of the calibration graph) was adequate to determine all pesticides at concentrations lower than the MRLs established by

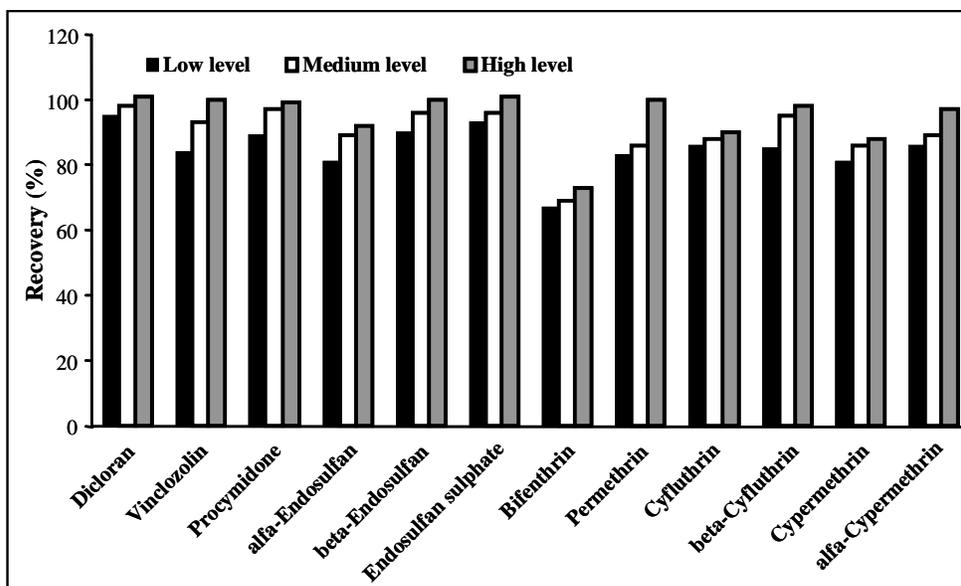
European Union. Finally, the precision of the method, expressed as relative standard deviation, was checked on 10 samples containing 9 ng/mL of each pyrethroid, and lindane, captan and  $\alpha$ -endosulfan, 3.0 ng/mL of each OCP and 2  $\mu$ g/mL of IS, and was acceptable for all analytes, ranging from 3.0 to 6.5%.

### *3.3. Recovery test*

To validate the proposed method and taking into account that there is no appropriate reference material containing both types of pesticides in fruit matrixes, a recovery test was carried out. Prior to this study, it was necessary to optimise the volume of n-hexane (extractant) and the extraction time. For this purpose, various samples of 1 g of lyophilised melon were fortified with variable amount of pesticides, and then extracted, by mechanical shaking, with 10, 15, 20, 25 and 30 mL of n-hexane (at least 3 mL of solvent was required to soak the dry material) for different times (from 5 to 20 min). The short time elapsed between spiking of the lyophilised fruit with the pesticides and its analysis, minimised analyte-matrix interactions, so the recoveries of pesticides were quantitative. The experiments were carried out by aspirating 5 mL of each extract into the SPE system, always containing the same amount of analytes (12 ng of dicloran, vinclozolin, dichlofuanid, procymidone,  $\beta$ -endosulfan and endosulfan sulphate; 36 ng of  $\alpha$ -endosulfan; 60 ng of lindane, captan and each pyrethroid and 10  $\mu$ g of IS). Aliquots of 1  $\mu$ L were injected into the GC-ECD instrument. From this experiment, it can be concluded that the recoveries were more marked by the extraction

time than by the volume of extractant. Complete extraction was accomplished above 10 min and a volume of 10 mL of extractant selected, taking into account the additional preconcentration provided by the lower volume.

Recoveries of analytes were studied in eight uncontaminated fruits (viz. apple, peach, pear, strawberry, kiwi, melon, cherry and orange). For each sample, the spiked pesticides were selected according to their use and occurrence/appearance [19,22,23]. About 10 g of each fresh fruit were pulped and then fortified at three levels of concentration, namely: 6, 12 and 24 ng/g of dicloran, vinclozolin, dichlofuanid, procymidone,  $\beta$ -endosulfan and endosulfan sulphate; 18, 36 and 72 of  $\alpha$ -endosulfan; and 30, 60 and 100 ng/g of lindane, captan and pyrethroids from standard solutions in acetone (1 mL of acetone containing from 60 ng to 1  $\mu$ g of pesticides). After the addition, the mixture was slightly shaken and left stand for air-drying (~2 h), and then lyophilised. Each sample was spiked three times at each of the levels indicated above (n=3). The pesticides were assumed to be uniformly distributed in the 10 g of fresh fruit, so, any analyte-matrix interactions were assumed to have occurred over the weathering period (~2 h). The levels of residues of pesticides were quantified by comparison with standard solutions in n-hexane, which were passed through the SPE unit, under identical conditions. Figure 2 shows the variation of the recoveries of pesticides with increased spiked amount in fruits (exemplified for peach). In all fruits assayed, the initial contaminant concentration was found to influence the desorption rate. Thus, at the higher pesticides concentration, recoveries increased, being near 100%



**Figure 2.** Recovery of pesticides added to a peach sample at three concentrations. Low, medium and high levels correspond to pesticide concentration spiked at levels of 6-30, 12-60 and 24-100 ng per g of fresh fruit. For more details, see text.

for OCPs but lower for pyrethroids, above all for bifenthrin, probably due to their higher interaction with the sample matrix.

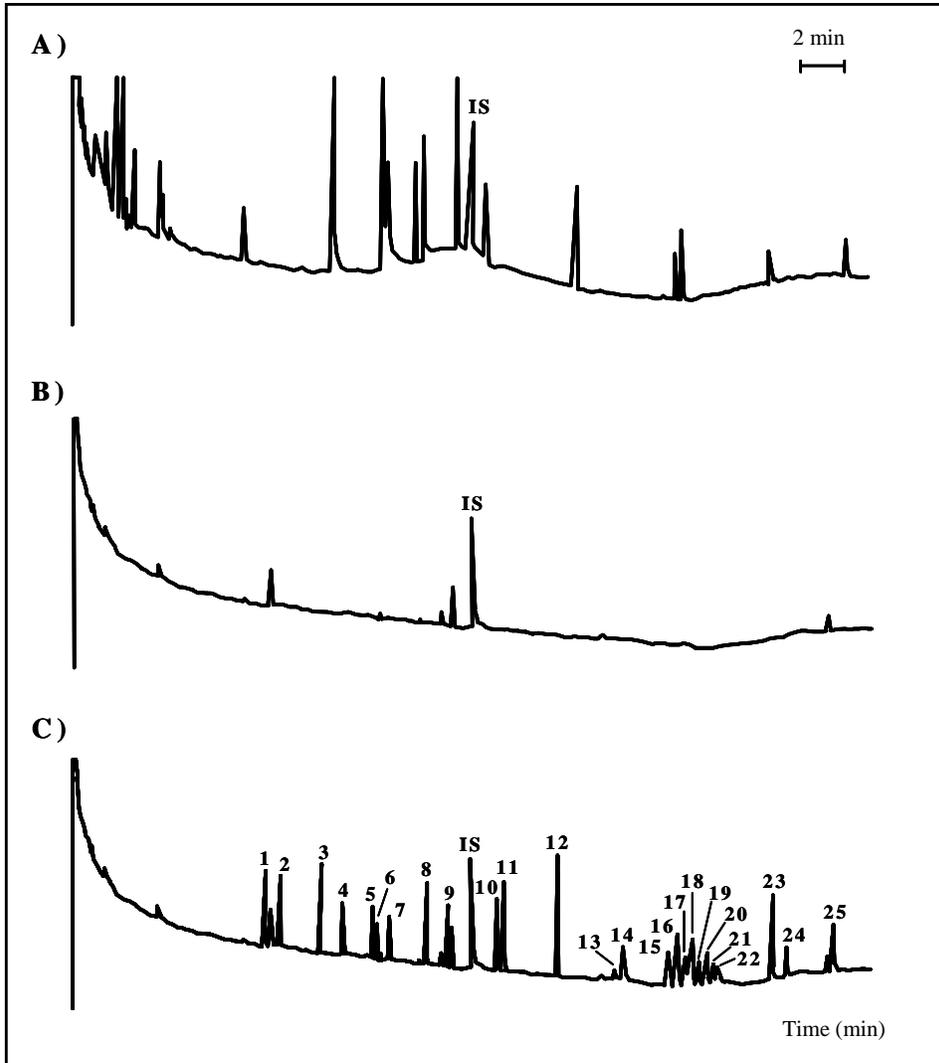
Table 2 gives the average recovery values obtained for each pesticide at the three concentrations spiked from three replicates ( $n=9$ ), for the fruits assayed. In all instances, the lowest recoveries were obtained for bifenthrin (average  $70 \pm 3\%$ ) followed by deltamethrin,  $\alpha$ -endosulfan and captan (average  $\sim 85\%$ ) as the likely result of a higher interaction with the sample matrix. For the other pesticides assayed, no significant differences were observed, with average recovery values of 90% (viz.

cifluthrin, permethrin and fenvalerate) and 95% (viz. cypermethrin, dichlofuanid, lindane, endosulfan sulphate, procymidone,  $\lambda$ -cyhalothrin and dichloran). Melon and pear are the fruits for which the recoveries are closest to the average values for each pesticide, and thus can be used as model fruits. On the other hand, there are no significant differences between the average recoveries for all pesticides in each fruit, ranging from 92% (viz. peach, kiwi, cherry and orange) to 94% for strawberry (bifenthrin excepted in these average results).

The efficiency of pesticides extraction from lyophilised fruits and the sorbent clean-up system, together with the high selectivity of the proposed method, are revealed in the chromatograms of the different fruits assayed, where only a few peaks from the matrixes are present. By way of example, Figure 3 shows the chromatograms for unfortified fresh and lyophilised melon samples (blanks) and a lyophilised melon sample fortified with all pesticides assayed at the following concentration: 12 ng/g of dicloran, vinclozolin, dichlofuanid, procymidone,  $\beta$ -endosulfan and endosulfan sulphate; 36 ng/g of  $\alpha$ -endosulfan; and 40 ng/g of lindane, captan and pyrethroids. As was mentioned before, the chromatogram for the lyophilised melon sample was cleaner than that for the fresh one. Indeed, the fresh melon fortified with all pesticides provided complex chromatograms, hindering the identification of some of the analytes.

**Table 2.** Average recoveries of pesticides added at three variable concentrations to fruit samples. For experimental details, see text.

Compound	Apple	Peach	Pear	Strawberry	Kiwi	Melon	Cherry	Orange
Dicloran	97 ± 4	98 ± 3	92 ± 4	97 ± 1		98 ± 1	99 ± 4	95 ± 2
Lindane	96 ± 7				89 ± 5	100 ± 3	94 ± 6	95 ± 7
Vinclozolin	95 ± 9	92 ± 8	94 ± 9	93 ± 7	92 ± 6	93 ± 9	94 ± 7	91 ± 6
Dichlofluanid	97 ± 2		95 ± 5	91 ± 6		95 ± 7	95 ± 5	94 ± 6
Captan	85 ± 6			84 ± 6		86 ± 7		88 ± 5
Procymidone	95 ± 2	95 ± 5	96 ± 2	97 ± 1		97 ± 3		94 ± 4
α-Endosulfan	84 ± 7	87 ± 6	83 ± 8		84 ± 8	88 ± 7	85 ± 7	
β-Endosulfan	92 ± 8	95 ± 5	93 ± 5		93 ± 7	94 ± 7	91 ± 5	
Endosulfan sulphate	95 ± 1	97 ± 4	96 ± 2		96 ± 3	93 ± 1	95 ± 3	
Bifenthrin	66 ± 2	70 ± 3	76 ± 4	68 ± 1		70 ± 2		69 ± 1
Fenpropathrin	91 ± 4		92 ± 1	93 ± 9	92 ± 8			
λ-Cyhalothrin			93 ± 8	98 ± 7		95 ± 7	97 ± 6	98 ± 8
Permethrin	88 ± 8	90 ± 7						91 ± 5
Cyfluthrin		88 ± 2					90 ± 2	
β-Cyfluthrin		93 ± 7					92 ± 6	
Cypermethrin	97 ± 2	85 ± 4	97 ± 1	98 ± 2	93 ± 5	97 ± 2		
α-Cypermethrin		91 ± 6	92 ± 3	95 ± 8	95 ± 3			
Fenvalerate					92 ± 4		90 ± 5	
Deltamethrin						84 ± 6	80 ± 4	82 ± 5



**Figure 3.** Gas chromatograms for 10 g of unfortified fresh (A) and lyophilised (B) melon sample and the lyophilised sample fortified (C) with all pesticides assayed. Peaks: 1=dicloran; 2=lindane; 3=vinclozolin; 4=dichlofuanid; 5=captan; 6=procymidone; 7= $\alpha$ -endosulfan; 8= $\beta$ -endosulfan; 9=endosulfan sulphate; 10=bifenthrin; 11=fenpropathrin; 12= $\lambda$ -cyhalothrin; 13=permethrin cis; 14=permethrin trans; 15=cyfluthrin I; 16=cyfluthrin III; 17=cyfluthrin II; 18=cyfluthrin IV; 19=cypermethrin I; 20=cypermethrin III; 21=cypermethrin II; 22=cypermethrin IV; 23=fenvalerate cis; 24=fenvalerate trans; 25=deltamethrin; and internal standard (IS).

### 3.4. Analysis of fruits

Different kinds of fruits, including those listed above, were purchased at various local markets and about 100 samples were analysed in quintuplicate (n=5). Sampling was done as described in Fruit materials and Sample preparation Sections, and laboratory samples were lyophilised as soon as received. Initially, 0.1 g of each lyophilised fruit was accurately weighed and analysed by the proposed method; when negative results were obtained, the sample amount was increased to 1 g. In all instances, quantitation was done by ECD and positive findings were confirmed by MS, using 2 g of lyophilised sample with 20 mL of n-hexane and passing 15 mL of extract through the SPE system, as the sensitivity was ~10 times lower than with ECD. Only 10 samples were found to contain chlorinated or pyrethroid residues at detectable levels. The results thus obtained, for 0.1 g of lyophilised sample, are listed in Table 3.

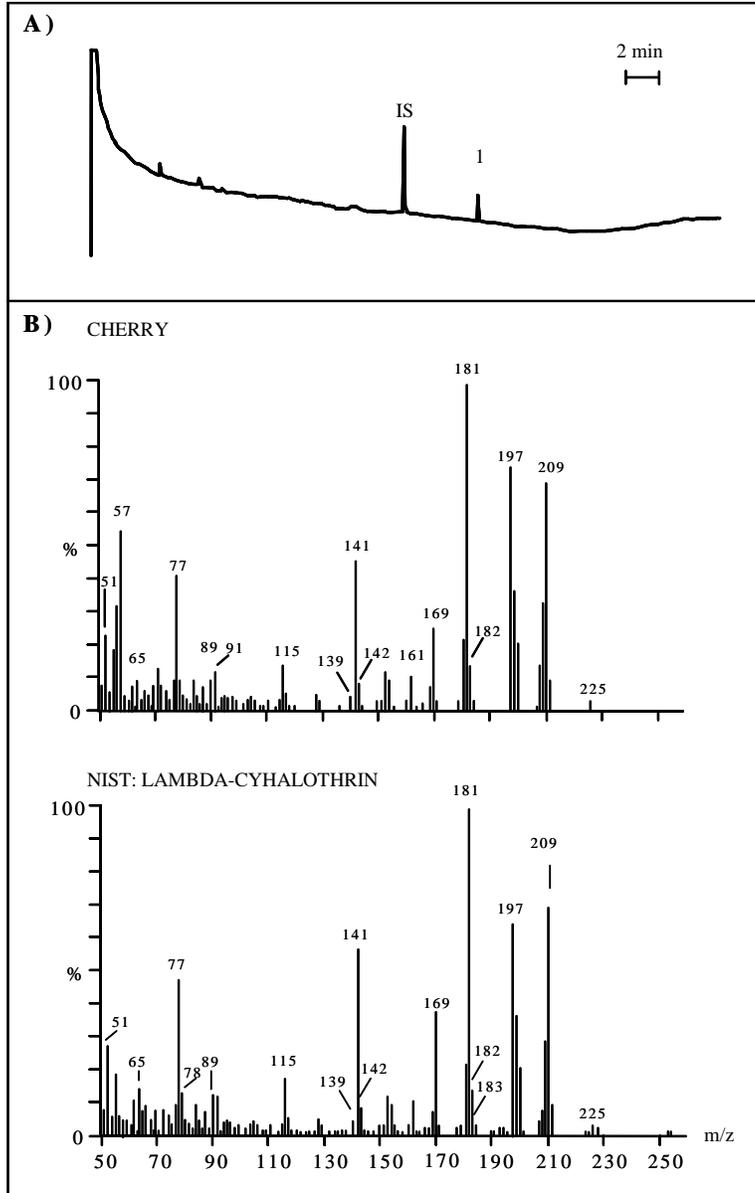
**Table 3.** Pesticides found in the 100 checked fruit samples (SD, n=5).

Sample	Water (%)	Pesticide found	Concentration <sup>a</sup> (ng/g)	MRL <sup>a,b</sup> (ng/g)
Apple	85	Procymidone	400 ± 35	— <sup>c</sup>
Peach	80	Vinclozolin	23 ± 4	2000
Pear	80	Procymidone	136 ± 9	1000
Strawberry	90	Procymidone	109 ± 8	5000
Kiwi	85	Vinclozolin	2600 ± 365	10000
Melon	85	Deltamethrin	28 ± 7	50
Cherry	70	λ-Cyhalothrin	38 ± 4	100
Strawberry	90	λ-Cyhalothrin	14 ± 4	20
Kiwi	85	Fenvalerate	34 ± 7	500
Orange	80	Captan	530 ± 25	3000

<sup>a</sup> Amount per g of fresh sample.

<sup>b</sup> Established by the European Union.

<sup>c</sup> Value not established by the European Union.



**Figure 4.** Gas chromatogram for  $\lambda$ -cyhalothrin (1) found in a cherry sample (A); IS=internal standard. Full scan EI mass spectra from the pyrethroid in the fruit sample and from pesticide library (B).

As can be seen, the concentrations found were lower than the EU maximum residue limits (see Table 3) for all compounds examined. Figure 4A shows the chromatogram for the cherry sample containing only  $\lambda$ -cyhalothrin, obtained with electron capture detection. Figure 4B illustrates the identification of this pyrethroid by comparing the mass spectrum for the corresponding peak with that in the library. Spectral comparison resulted in coincidence of ~85%.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

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

---

**REFERENCES**

- [1] Community Directive 93/58/EEC. Off. J. Eur. Commun., L 211/6, European Community, Brussels, 1993.
- [2] Z. M. Chen, Y. H. Wang, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 367.
- [3] C. Nerin, A. R. Tornés, C. Domeño, J. Cacho, *J. Fresenius J. Anal. Chem.* 352 (1995) 364.
- [4] R. Doong, C. Lee, *Analyst* 124 (1999) 1287.
- [5] A. Gelsomino, B. Petrovicova, S. Tiburtini, E. Magnani, M. Felici, *J. Chromatogr. A* 782 (1997) 105.
- [6] H. S. Dorea, F. M. Lancas, *J. Microcolumn. Sep.* 11 (1999) 367.
- [7] G. F. Pang, Y. Z. Cao, C. L. Fan, J. J. Zhang, X. M. Li, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 186.
- [8] C. Trova, *Ind. Aliment.* 38 (1999) 8.
- [9] S. M. Lee, M. L. Papathakis, H. C. Feng, G. F. Hunter, J. E. Carr, *Fresenius J. Anal. Chem.* 339 (1991) 376.
- [10] J. Fillion, R. Hindle, M. Lacroix, J. Selwing, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 1252.
- [11] A. R. Fernández-Alba, A. Valverde, A. Agüera, M. Contreras, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 263.
- [12] T. Pihlström, B. G. Österdahl, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2549.
- [13] P. Cabras, A. Angioni, V. L. Garau, F. M. Pirisi, V. Brandolini, F. Cabitza, M. Cubeddu, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3772.
- [14] L. E. Sojo, A. Brocke, J. Fillion, S. M. Price, *J. Chromatogr. A* 788 (1997) 141.

- 
- [15] E. Lacassie, M. F. Dreyfuss, J. L. Daguet, M. Vignaud, P. Marquet, G. Lachatre, *J. Chromatogr. A* 805 (1998) 319.
- [16] S. Navickiene, L. Polese, E. V. Minelli, M. L. Ribeiro, *Chromatographia* 49 (1999) 212.
- [17] A. Stensvand, A. Christiansen, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 917.
- [18] A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 83.
- [19] R. Coscolla, *Residuos de Plaguicidas en Alimentos Vegetales*, Mundi-Prensa; Madrid, Spain, 1993.
- [20] *Community Directive 79/700/EEC*. Off. J. Eur. Commun., European Community, Brussels, 1979.
- [21] A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 193.
- [22] C. Tomlin (Editor), *The Pesticide Manual*, 10<sup>th</sup> edn.; Crop Protection Publication, Cambridge, U. K., 1994.
- [23] C. de Liñán Vicente (Editor), *Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales*, 14<sup>th</sup> edn.; Ediciones Agrotécnicas S. L., Madrid (Spain), 1999.





ELSEVIER

Analytica Chimica Acta 436 (2001) 153-162

---

---

**ANALYTICA  
CHIMICA  
ACTA**

---

---

## Semiautomatic multiresidue gas chromatographic method for the screening of vegetables for 25 organochlorine and pyrethroid pesticides

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel

*Analytical Chemistry Division, Campus de Rabanales, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain*

Received 20 October 2000; received in revised form 15 January 2001; accepted 19 February 2001

### Abstract

A method for multiresidue screening of lyophilised vegetables for up to 25 pesticides (16 pyrethroids and 9 OCPs) permitted in the European Union was systematically developed on the basis of solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture detection. The residues of pesticides were extracted from the lyophilised sample with n-hexane by mechanical shaking; the organic phase containing the pesticides was aspirated into a continuous module which comprises a laboratory-made silica column for analyte preconcentration and sample matrix clean-up. The method provides excellent clean-up despite the complexity of the matrices involved thanks to the lyophilisation process which also helps to sample preservation without losses of the selected relatively non volatile analytes. Detection limits were about 1-10 ng/g, except for lindane and captan (30 ng/g) thus allowing their determination at concentrations lower than their maximum residue limits with good precision (~5%). The accuracy of the quantitative determination measured in terms of average percentage recovery of the 25 compounds in 8 different vegetables was  $93 \pm 3$ , bifenthrin and deltamethrin excepted. The proposed method was applied to the screening of about 100 vegetables for the selected pesticides, being the positive findings further confirmed by GC-MS.

## **1. INTRODUCTION**

Vegetables are essential constituents of the human diet. In order to satisfy their demand, an increase in the world production of vegetables is required, where the use of pesticides plays a necessary and essential role [1]. This practice constitutes an important aspect of modern agriculture as they help to control pests and plant diseases. In this concern, monitoring residues of pesticides in vegetables is nowadays a priority objective in pesticide research in order to get an extensive evaluation of vegetable quality to avoid possible risks to human health. Analytical methodologies developed for detecting these residues in horticultural samples, offered options to government regulators on how to improve their analytical capabilities according to the toxicity of a specific pesticide in the dietary intake. The frequent decrease in the maximum residue limits (MRLs) imposed by international organisations (European Union, Environmental Protection Agency) implies a dramatic improvement of the limits of detection provided by currently available multiresidue methods [2].

Pyrethroids and organochlorine pesticides (OCPs) are nonsystemic as they cannot penetrate into the plant. After treatment, they form a deposit on the surface of the leaf; their potential absorption depends on the formulation, lipophilicity and concentration of the active ingredients and therefore, the extraction of these pesticides is rather simple compared to the systemic organophosphorous and carbamate pesticides [3]. Many laboratories implement multiresidue screening methods using solvent extraction of the pesticides from fresh vegetables followed by gas chromatography with various detectors. Acetone, acetonitrile, dichloromethane, ethyl acetate and n-hexane

are commonly used for pesticide residues extraction, followed by filtration, evaporation to near-dryness and redissolution in few microliters of organic solvent [4-9]. Usually, additional clean-up steps such as solvent partitioning [10,11] and/or solid-phase extraction [12-18], are necessary prior to injection into the gas chromatograph to remove co-extractives that could interfere with the analytes during chromatographic separation. The most popular sorbent is Florisil [12-15], although silica gel [16], celite-charcoal [17] and polystyrene-divinylbenzene [18], have also been proposed. Pesticides are further eluted with few microliters of organic solvents. Undoubtedly, preconcentration helps to reduce limits of detection, but time-consuming clean-up procedures have to be introduced to avoid contamination of the gas chromatographic system, thus losing resolution, with matrix components, thereby increasing the cost of the analysis.

This paper describes an elegant alternative to other existing procedures, which is an improved version of a previous method to determine OCPs [19], suitable for the simultaneous determination of up to 25 residues of pesticides in vegetable samples without modifications of the procedure based on the sample matrix. The proposed method implements a sample lyophilisation step prior to automatic extraction with a single solvent and preconcentration/clean-up on a miniaturised silica column. The results obtained in positive samples were compared with those of a standard method [13] and good correlation was achieved in all instances. The limits of detection were lower than the most exigent MRL, so they can be considered enough for all the pesticide-vegetable combinations assayed.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Chemicals and standards

All pesticides were purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany): dicloran, lindane, vinclozolin, dichlofuanid, captan, procymidone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -endosulfan (3:1), endosulfan sulphate, bifenthrin,  $\lambda$ -cyhalothrin, deltamethrin, fenpropathrin, fenvalerate (cis and trans isomers), permethrin (cis and trans isomers), cyfluthrin (4 isomers),  $\beta$ -cyfluthrin (2 isomers), cypermethrin (4 isomers),  $\alpha$ -cypermethrin and piperonyl butoxide (internal standard, IS). The silica sorbent was obtained from Varian (Zug, Switzerland). All other reagents and solvents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Individual stock standard solutions were prepared in n-hexane at concentrations of 5 mg/mL, and stored in glass stoppered bottles in the dark at 4°C. Individual and cumulative working standard solutions were obtained by appropriate dilution of the stocks in n-hexane or acetone.

### 2.2. Instrumentation

A Hewlett-Packard 5890 A equipped with a  $^{63}\text{Ni}$  electron-capture detector and a fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.) coated with 5% phenyl-methylpolysiloxane (0.25  $\mu\text{m}$  film thickness), (Supelco, Madrid, Spain), connected to a Hewlett-Packard 3392 A integrator was used for pesticides separation. General operating conditions were as follows: injector port temperature, 225°C; detector

temperature, 325°C; carrier gas (N<sub>2</sub>) flow, 1 mL/min; column temperature program, initially 150°C for 2 min, increase at 8°C/min to 170°C, hold for 4 min, then increase at 8°C/min to 255°C, hold for 15 min, and increase at 5°C/min to 285°C, hold for 6 min; split injection, 1:25 ratio; injection volume, 1 µL. Confirmatory analyses were carried out on a Fisons 8000 GC instrument interfaced to a Fisons MD800 mass spectrometer and controlled by a computer running MASSLAB software (Thermo, Madrid, Spain). The chromatographic column was an HP-5MS 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness, and temperature program was the same as in GC-ECD, using helium as carrier gas (1 mL/min); split injection, 1:25 ratio; injection volume, 1 µL. MS conditions: ion source temperature, 200°C; transfer line temperature, 300°C; ionisation mode, electron impact at 70 eV; scan range, from *m/z* 70 to 500; data acquisition mode: full scan.

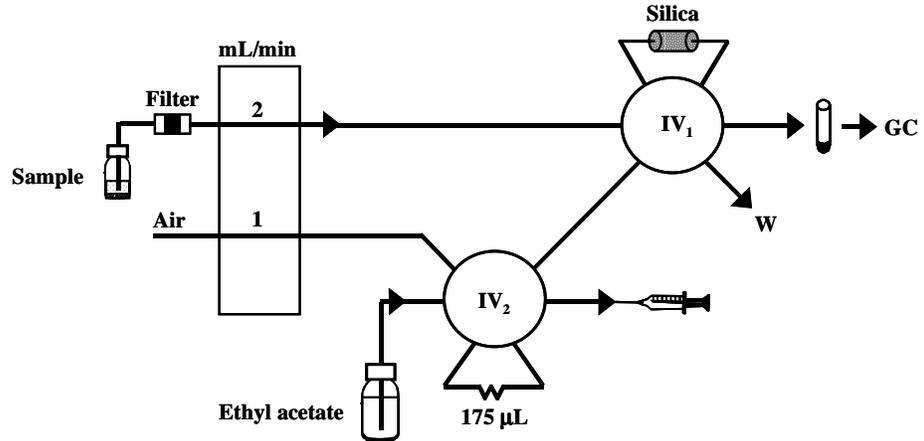
The continuous flow configuration consisted of a Gilson Minipuls-2 peristaltic pump (Villiers-le-Bel, France) furnished with Solvaflex pumping tubes, two Rheodyne 5041 injection valves, PTFE tubing (0.5 mm i.d.) and commercially available connectors. The sorbent glass column (2 cm x 4 mm i.d.) was hand-packed with 50 mg of silica and sealed at both ends with small cotton beads to prevent material losses. A glass column (3 cm x 5 mm i.d.), packed with cotton wool was used as filter. A Hetosicc laboratory freeze-dryer, type CD-53-1 (Birkerød, Denmark) was also employed.

### 2.3. Preparation of vegetable samples

Vegetables were purchased at local markets in Córdoba and analysed unwashed, in a raw state [1], according to the legislation established [20]. A raw global sample consisting of ~5 Kg of each vegetable was reduced by quartering to ~500 g (laboratory sample). In some cases (spinach, aubergine, cauliflower), the raw sample (5 Kg) was cut into slices of ~100 g and then reduced by quartering to ~500 g. Laboratory samples were pulped in a high-speed blender and fractions of ~50 g lyophilised by freeze-drying at 6 Pa for 8 h, after which they were conserved in glass containers, at -20°C in the dark, until analysis. Under these conditions, the concentration of these pesticides remained constant for at least six months. An accurately weighed amount of 0.1-1 g of lyophilised vegetable was placed into a 50 mL amber glass bottle with 10 mL of n-hexane and 0.1 mL of 200 µg/mL piperonyl butoxide (IS). Once stoppered, the mixture was mechanically shaken for 10 min and allowed to settle. Then, 5 mL of the n-hexane phase, containing the analytes and the IS, was continuously aspirated and filtered into the solid-phase extraction (SPE) system of Figure 1. Blanks and standard calibration graphs were run by using uncontaminated lyophilised sample (0.1-1 g).

### 2.4. Solid-phase extraction method

The continuous SPE system used to extract the pyrethroids and OCPs from lyophilised vegetable samples is depicted in Figure 1. A volume of 5 mL of the n-hexane phase from uncontaminated lyophilised vegetable (blank) or from the sample



**Figure 1.** Continuous flow system developed for the pre-concentration/clean-up of pesticides from lyophilised vegetables. IV=injection valve; W=waste; GC=gas chromatograph with electron capture or mass spectrometric detector.

(pesticide concentration 0.5-200 ng/mL) containing 2 μg/mL of the IS, was aspirated at 2 mL/min through a cotton filter to prevent suspended particles from reaching the continuous unit. All pesticides were adsorbed on the 50 mg silica column (2 cm × 4 mm i.d.) located inside the loop of injection valve 1 (IV<sub>1</sub>), and the sample matrix was sent to waste. Simultaneously, the loop of the second injection valve (IV<sub>2</sub>) was filled with ethyl acetate by means of a syringe. Any residual organic solvent remaining inside the column and the connectors was flushed by passing an air stream through the carrier line at 1 mL/min for 4 min. Next, IV<sub>2</sub> was switched to pass the loop contents (175 μL of ethyl acetate) at 1 mL/min through the column, in opposite direction to the sample, in order to elute pesticides. The whole organic extract was collected in a glass vial

containing anhydrous sodium sulphate and 1  $\mu$ L aliquot injected into the gas chromatograph for analysis. Between samples, the sorbent column was cleaned, without removal from the continuous SPE system, with 0.5 mL of isopropanol to remove potentially retained interferences and then conditioned with 0.5 mL of acetonitrile and 1 mL of n-hexane. Under these conditions, the sorbent column was serviceable for about three months.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### *3.1. Optimisation of the SPE method*

The majority of the multiresidue methods described in the literature are based on the extraction of the residues of pesticides from fresh samples. It is well-known that lyophilisation is especially suitable for sample preservation. In the case of agricultural commodities, the use of a freeze-drying process led to the solution of a variety of problems related to the storage of these types of sample [21]. Recently, it has also been demonstrated that lyophilised samples give better results than fresh ones for the determination of pyrethroids in terms of simplicity of the analytical process, absence of interfering peaks from the matrix in the chromatograms and recovery of the analytes from the matrices assayed [22]. In the present work, different pyrethroids and OCPs permitted by the European legislation were studied for the development of an automated configuration that allowed the determination of such compounds in lyophilised vegetable samples. For this purpose, a flow system similar to that shown in

Figure 1 was used, and lyophilised tomato was selected as model vegetable for the optimisation of chemical and flow variables.

The first variable studied was the stability of OCPs during the lyophilisation process. For this purpose, about 100 g of fresh tomato, free from residues of pesticides was pulped and spiked with 20 ng/g of each of the OCPs studied, and then divided in two fractions. One of them was processed following a standard method previously described [13], which used sequential extraction with acetonitrile and n-hexane; after filtration and evaporation, further clean-up on Florisil was carried out. The other fraction was lyophilised at 6 Pa for 8 h, directly extracted with n-hexane and cleaned – up on Florisil as in the standard method. In this case, more polar analytes were not extracted as well with n-hexane. This operation was repeated four times. The results obtained by both procedures were quite consistent, and therefore, no losses of OCPs occurred during lyophilisation process. Finally, similar experiments were carried out with a lyophilised sample that was then fortified with all pesticides assayed, being the results quite consistent with those previously obtained. In addition, chromatograms of lyophilised tomato were cleaner than those of fresh one, so lyophilised vegetables were used for further optimisation experiments.

Sample lyophilisation avoids the first extraction of the pesticides with a polar solvent such as acetone or acetonitrile and therefore, a low polarity solvent such as n-hexane can be used as sole extractant. Thus, lyophilised model vegetable was spiked with the pesticides and the internal standard and placed together with the extractant in a 50 mL glass bottled and, after manual shaking, aliquots of 5 mL of the organic phase,

---

containing 10 ng/mL of OCPs, 20 ng/mL of pyrethroids and 2 µg/mL of IS were continuously aspirated into the SPE system. The short time elapsed between spiking and analysis, minimised analyte-matrix interactions, so extraction of pesticides from the vegetable was quantitative. Taking into account the simplicity of the proposed method, the only variables potentially affecting performance would be the sorbent, eluent, sample and eluent flow-rates. In previous studies, it was established that RP-C<sub>18</sub> was the most suitable sorbent for the preconcentration of OCPs in aqueous medium [19] whereas silica was preferred for the retention of pyrethroids extracted in n-hexane [22], using the eluent ethyl acetate in both instances. The main objective of this work was the direct extraction of pesticides from vegetables with a non-polar solvent, and therefore the applicability of silica for the preconcentration of OCPs and pyrethroids from vegetables was assayed, using n-hexane as extractant and ethyl acetate as eluent. Each experiment was carried out using 5 mL of the n-hexane extract and the whole eluate was collected in glass vials, evaporated to dryness under a nitrogen stream and the residue redissolved in 200 µL of ethyl acetate. Pyrethroids were quantitatively retained on the sorbent column while for OCPs, retention varied between 40% (lindane and dicloran) and 90% (captan and endosulfan sulphate). The lower retention of OCPs is not an inconvenience to reach the MRLs established because of their higher sensitivity in the ECD detector. Different organic solvents were assayed as eluents, namely: ethyl acetate, acetonitrile, isopropanol and acetone. Ethyl acetate provided quantitative elution (~100%) of both classes of pesticides, so it was selected for further analyses.

The amount of sorbent material was optimised in the interval 15-100 mg. Peak areas increased as increasing the amount of solid up to 40 mg, above which remained virtually constant. A column packed with 50 mg of silica was selected as optimum. The influence of the eluent volume was studied by changing the loop of IV<sub>2</sub>. Obviously, as the eluent volume was increased, desorption was more efficient but also analytes were more dilute. Because of these opposing effects, the only way to correctly determine the most appropriate eluent volume was to dilute the extracts to a constant volume using the same solvent (viz. 500 µL of ethyl acetate). Desorption efficiency increased with increasing injected volume up to 175 µL, and remained constant over this value, so it was selected as optimum. A second injection with the same eluent volume revealed the absence of carry-over; complete elution of analytes was thus obtained with a single injection of ethyl acetate. Changes in the flow-rates of the sample and eluent (air stream as carrier) between 0.5-3.0 mL/min resulted in small variation of the signals, which were found to decrease at higher flow-rates, slightly for OCPs and more markedly for pyrethroids. Therefore, a sample and eluent flow-rate of 2 and 1 mL/min, respectively were selected.

Once the SPE system was optimised, the breakthrough volume was studied in order to establish the maximum sample volume that can be introduced into the SPE system and hence the maximum preconcentration factor that can be achieved. For this purpose, different volumes of n-hexane containing always the same amount of analytes (50 ng of each OCP, 100 ng of each pyrethroid and 10 µg of IS) were continuously

aspirated into the flow system and the retained analytes eluted with 175  $\mu$ L of ethyl acetate. From the results obtained it can be concluded that the pesticides having lower affinity for the sorbent were more markedly affected at higher volumes, so a maximum volume of 20 mL can be passed through the silica column. However, taking into account the high sensitivity of the method, a volume of 5 mL of n-hexane was enough to reach the MRLs established by international organisations for the selected pesticides.

Finally, two variables affecting extraction of residues of pesticides from lyophilised vegetables, namely: the volume of n-hexane (extractant) and the extraction time were studied. Thus, several samples of 1 g of lyophilised tomato were fortified with variable amount of pesticides and extracted, by mechanical shaking during different times (from 5 to 20 min), with volumes of n-hexane from 10 to 30 mL, taking into account that soaking the dry material required at least 3 mL of organic solvent. Aliquots of 5 mL of n-hexane containing the same amount of pesticides were continuously aspirated into the flow system. Satisfactory results were obtained for an extraction time of 10 min, using 10 mL of n-hexane, being the extraction time the most influential variable.

### *3.2. Calibration and statistical study*

The performance and reliability of the proposed on-line method (Figure 1) were assessed by determining the regression equation, linear range, analyte detectability and relative standard deviation for the pesticides assayed. For cyfluthrin and cypermethrin (mixture of 4 isomers), the total analytical signal was obtained by summing the peak

**Table 1.** Limits of detection, linearity, precision and  $m/z$  identification values of the 25 pesticides.

Compound	LOD (ng/g) <sup>a</sup>	Linear range (ng/g) <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup> (%)	$m/z$ <sup>c</sup>
Dicloran	2	5-200	4.8	<b>124</b> , 176, 206
Lindane	30	100-2000	5.7	111, <b>181</b> , 219
Vinclozolin	2	5-200	4.0	187, <b>212</b> , 285
Dichlofuanid	1	5-200	5.1	<b>123</b> , 224, 332
Captan	30	100-2000	6.8	<b>79</b> , 264, 299
Procymidone	2	5-200	6.0	67, <b>96</b> , 283
$\alpha$ -Endosulfan	2	5-200	5.8	<b>195</b> , 241, 339
$\beta$ -Endosulfan	1	5-200	4.9	<b>195</b> , 241, 339
Endosulfan sulphate	8	15-2000	5.1	<b>272</b> , 387, 420
Bifenthrin	1	5-2000	6.4	152, 165, <b>181</b>
Fenprothrin	1	5-2000	5.3	<b>97</b> , 181, 349
$\lambda$ -Cyhalothrin	1	5-2000	4.6	141, <b>181</b> , 209
Permethrin	10	20-2000	6.5	163, <b>183</b> , 390
Cyfluthrin <sup>d</sup>	5	10-2000	4.9	<b>77</b> , 163, 227
$\beta$ -Cyfluthrin	2	10-2000	5.3	<b>77</b> , 163, 227
Cypermethrin <sup>d</sup>	5	10-2000	4.2	77, 181, <b>209</b>
$\alpha$ -Cypermethrin	1	5-2000	4.0	77, 181, <b>209</b>
Fenvalerate	2	10-2000	6.1	<b>169</b> , 181, 419
Deltamethrin	2	10-2000	5.0	<b>181</b> , 209, 253

<sup>a</sup> ng/g values for lyophilised samples.<sup>b</sup> n=11.<sup>c</sup>  $m/z$  values in italics are  $M^+$  ions; those in bold face correspond to the base peak.<sup>d</sup> Mixture of isomers.

areas of all isomers. For this purpose, microliters of standard solutions in acetone containing all pesticides at variable concentrations were spiked to individual amounts of 1 g of lyophilised tomato, in the interval 5-2000 ng per g, and extracted as in Section 2.4. Figures of merit of the proposed method are listed in Table 1. The limits of

detection (LOD) were calculated as the minimum concentration providing chromatographic signals three times higher than the background noise. In all cases, they were satisfactory, from 10 to 5000 times lower than the MRLs admitted in the European Union for these commodities. Correlation coefficients ranged from 0.996 to 0.999. The precision (reliability) was calculated as the relative standard deviation obtained by measuring 11 samples containing the pesticides at concentrations within the lower range of the calibration graphs and ranged from 4.0 to 6.8%.

### 3.3. Applications

The proposed multiresidue method was applied to the screening of about one-hundred vegetables purchased at various local markets. Initially, 0.1 g of each lyophilised vegetable was analysed following the method described; when negative results were obtained, the sample amount was increased up to 1 g to confirm the absence of pesticide residues at detectable levels. Only ten samples were found to contain residues of pesticides although the concentrations were lower than the MRLs (cypermethrin in potato excepted). The results obtained are listed in Table 2. The samples were also analysed following the standard method [13] and the results obtained were concordant in all instances (Table 2). In addition, positive findings were confirmed by GC-MS, using 2 g of lyophilised vegetable and 20 mL of n-hexane, aspirating 15 mL of organic phase into the SPE system. Figure 2 shows the chromatograms obtained for a tomato sample, where dichlofuanid was detected (A) and the same sample fortified with all the pesticides assayed at concentrations between

**Table 2.** Analytical results of pesticides found in the one-hundred fresh vegetable samples analysed (SD, n=5).

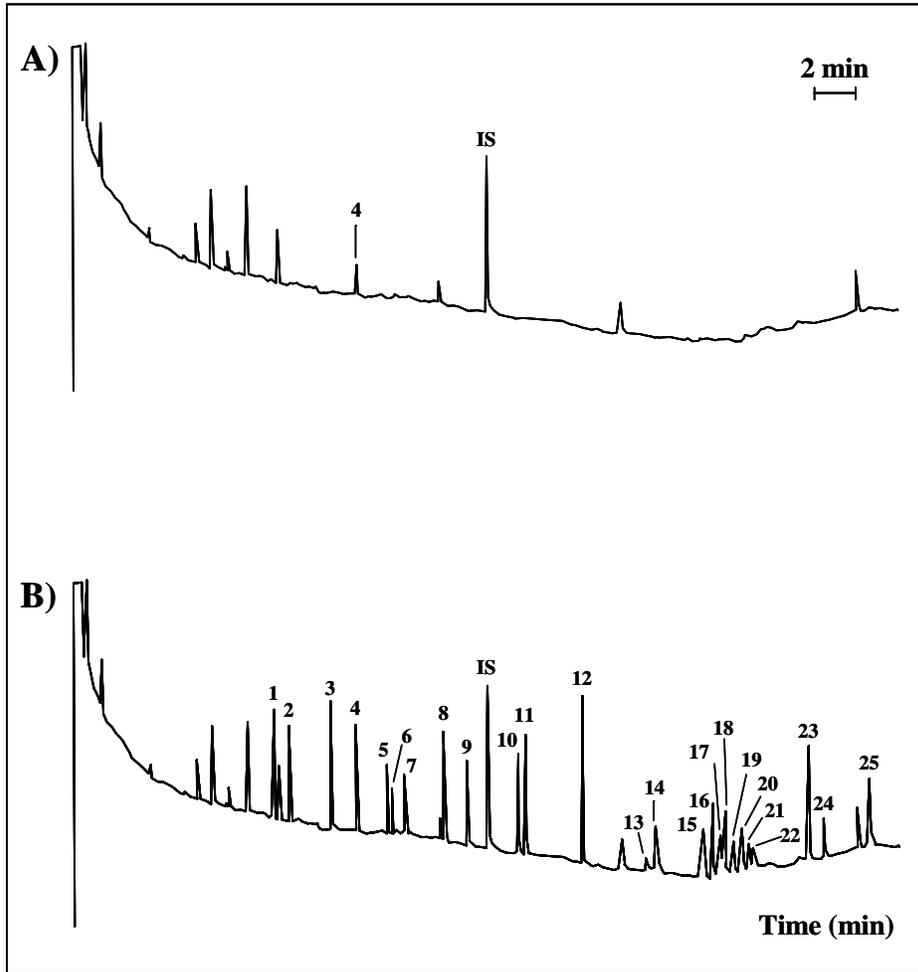
Sample	Water (%)	Pesticide found	Concentration (ng/g) <sup>a</sup> Proposed method	Concentration (ng/g) <sup>a</sup> Standard method	MRL <sup>a,b</sup> (ng/g)	MRL <sup>a,c</sup> (ng/g)
Potato	92	$\alpha$ -Endosulfan	31 $\pm$ 2	33 $\pm$ 5	50	200
Potato	92	Cypermethrin	280 $\pm$ 15	270 $\pm$ 20	50	50
Tomato	93	Dichlofluanid	14 $\pm$ 1	18 $\pm$ 3	5000	2000
Tomato	93	Procymidone	529 $\pm$ 33	550 $\pm$ 80	2000	5000
Spinach	90	Cypermethrin	385 $\pm$ 20	390 $\pm$ 30	500	2000
Cucumber	92	Deltamethrin	48 $\pm$ 3	51 $\pm$ 6	100	200
Cucumber	92	Captan	85 $\pm$ 6	80 $\pm$ 8	100	n.a. <sup>d</sup>
Green pepper	91	Dicloran	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	n.a. <sup>d</sup>	n.a. <sup>d</sup>
Green pepper	91	Dicloran	9 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2	n.a. <sup>d</sup>	n.a. <sup>d</sup>
Green pepper	91	Permethrin	215 $\pm$ 15	210 $\pm$ 20	500	1000
Aubergine	93	Bifenthrin	8 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	n.a. <sup>d</sup>	n.a. <sup>d</sup>
Cauliflower	91	Dichlofluanid	39 $\pm$ 3	40 $\pm$ 6	5000	n.a. <sup>d</sup>
Cauliflower	91	Permethrin	55 $\pm$ 4	50 $\pm$ 6	100	500
Onion	91	Bifenthrin	8 $\pm$ 1	7 $\pm$ 2	n.a. <sup>d</sup>	n.a. <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Amount per g of fresh sample.

<sup>b</sup>Established by the European Union.

<sup>c</sup>Established by FAO.

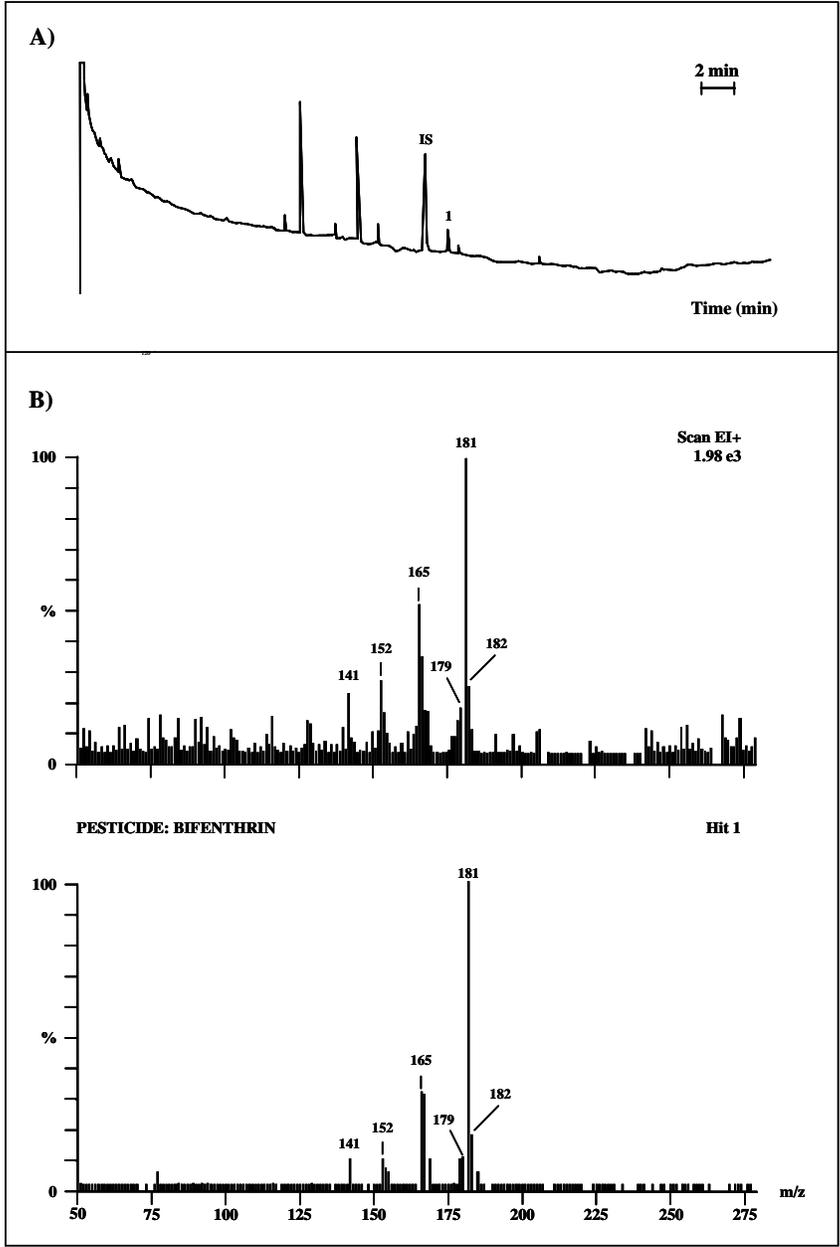
<sup>d</sup>Value not applicable by the European Union.



**Figure 2.** GC-ECD chromatograms for (A) lyophilised tomato sample where dichlofuanid was detected and (B) this sample fortified with all the pesticides studied at a medium concentration level. Peaks: 1=dicloran; 2=lindane; 3=vinclozolin; 4=dichlofuanid; 5=captan; 6=procymidone; 7= $\alpha$ -endosulfan; 8= $\beta$ -endosulfan; 9=endosulfan sulphate; 10=bifenthrin; 11=fenpropathrin; 12= $\lambda$ -cyhalothrin; 13=permethrin cis; 14=permethrin trans; 15=cyfluthrin I; 16=cyfluthrin III; 17=cyfluthrin II; 18=cyfluthrin IV; 19=cypermethrin I; 20=cypermethrin III; 21=cypermethrin II; 22=cypermethrin IV; 23=fenvalerate cis; 24=fenvalerate trans; 25=deltamethrin, and IS=internal standard.

12-60 ng per g of fresh sample (B). Figure 3A shows the chromatogram for the aubergine sample containing only bifenthrin, obtained with electron capture detection. Figure 3B illustrated the identification of this pyrethroid by comparing the mass spectrum for the corresponding peak with that in the library. Spectral comparison resulted in coincidence of ~85%.

The feasibility of the proposed multiresidue method for the screening/determination of pesticides in vegetable samples was evaluated by spiking eight uncontaminated samples with the pesticides according to their use and occurrence/appearance [1,3,23]. In order to ensure reliable simulation of the actual leaf application [23], about 10 g of pulped fresh vegetable was spiked with 1 mL of acetone containing variable concentrations of pyrethroids and OCPs (between 60 ng and 1  $\mu$ g) and after slight shaking, left stand for air-dry (~2 h) and then lyophilised. On the assumption that pesticides were uniformly distributed over the 10 g of vegetable, any analyte-matrix interaction would have occurred during the weathering process (~2 h). Table 3 gives the average recovery values obtained for each pesticide spiked to each vegetable sample at three concentrations, namely: 6, 12 and 24 ng/g of dichloran, vinclozolin, dichlofuanid, procymidone,  $\beta$ -endosulfan and endosulfan sulphate; 18, 36 and 72 ng/g of  $\alpha$ -endosulfan; and 30, 60 and 100 ng/g of lindane, captan and pyrethroids, from three replicates in each case (n = 3). As expected, recoveries of pesticides increased as increasing the amount spiked, corresponding the lower values to the amounts spiked at the low level; this effect was more marked for fenvalerate,



**Figure 3.** (A) GC-ECD chromatogram for bifenthrin (1) found in an aubergine sample. (B) Full-scan EI mass spectra from bifenthrin in the aubergine sample and from pesticide library.

**Table 3.** Average recoveries (n=3) of pesticides spiked to vegetables at low (6-30 ng), medium (12-60 ng) and high (24-100 ng) levels per gram of fresh sample.

Compound	Average recovery											
	Aubergine			Potato			Green pepper			Tomato		
	Low level	Medium level	High level	Low level	Medium level	High level	Low level	Medium level	High level	Low level	Medium level	High level
Dicloran							89 ± 4	91 ± 3	99 ± 4			
Lindane	95 ± 4	98 ± 3	99 ± 4	91 ± 5	94 ± 5	96 ± 4	90 ± 4	95 ± 3	97 ± 4	94 ± 4	96 ± 4	101 ± 3
Vinclozolin	93 ± 4	93 ± 3	99 ± 3				94 ± 5	95 ± 3	97 ± 3	90 ± 3	97 ± 3	97 ± 3
Dichlofluanid										93 ± 6	97 ± 5	100 ± 3
Captan	79 ± 4	83 ± 3	85 ± 4				81 ± 4	84 ± 4	88 ± 4	86 ± 4	88 ± 5	90 ± 4
Procymidone							93 ± 5	96 ± 5	97 ± 4	91 ± 5	96 ± 4	102 ± 3
α-Endosulfan	83 ± 4	86 ± 4	86 ± 4	82 ± 3	86 ± 3	87 ± 5	82 ± 4	83 ± 4	85 ± 3	83 ± 5	88 ± 5	89 ± 3
β-Endosulfan	92 ± 5	93 ± 4	95 ± 3	92 ± 4	93 ± 4	98 ± 4	91 ± 3	96 ± 3	99 ± 4	95 ± 4	97 ± 4	101 ± 3
Endosulfan sulphate	93 ± 3	94 ± 2	98 ± 2	93 ± 3	96 ± 2	99 ± 3	89 ± 3	95 ± 3	96 ± 3	96 ± 3	99 ± 3	100 ± 2
Bifenthrin	69 ± 3	75 ± 3	80 ± 2							69 ± 3	70 ± 3	73 ± 2
Fenprothrin	82 ± 4	91 ± 4	97 ± 3				84 ± 3	93 ± 3	102 ± 3	89 ± 4	96 ± 4	101 ± 3
λ-Cyhalothrin	93 ± 5	98 ± 5	99 ± 4				86 ± 4	88 ± 3	95 ± 4			
Permethrin	89 ± 5	98 ± 5	99 ± 4				84 ± 3	91 ± 3	101 ± 3	85 ± 4	91 ± 4	99 ± 3
Cyfluthrin				95 ± 6	97 ± 3	102 ± 3				91 ± 4	98 ± 3	100 ± 3
β-Cyfluthrin				98 ± 5	100 ± 3	102 ± 3				81 ± 5	89 ± 5	93 ± 4
Cypermethrin				86 ± 6	97 ± 3	99 ± 3	85 ± 3	90 ± 3	95 ± 3	84 ± 4	87 ± 3	95 ± 3
α-Cypermethrin				83 ± 4	92 ± 5	95 ± 3	83 ± 4	87 ± 2	96 ± 3	90 ± 5	92 ± 4	96 ± 3
Fenvalerate	77 ± 3	86 ± 3	98 ± 3				75 ± 3	86 ± 3	96 ± 2			
Deltamethrin	73 ± 4	77 ± 4	83 ± 4				74 ± 2	78 ± 3	85 ± 2			

**Table 3 (continue).**

Compound	Average recovery											
	Onion			Spinach			Cucumber			Cauliflower		
	Low level	Medium level	High level	Low level	Medium level	High level	Low level	Medium level	High level	Low level	Medium level	High level
Dicloran	89 ± 4	94 ± 4	96 ± 4				89 ± 3	93 ± 2	98 ± 2	92 ± 4	94 ± 3	95 ± 4
Lindane	88 ± 5	89 ± 5	95 ± 3	91 ± 5	93 ± 4	102 ± 4	94 ± 5	96 ± 4	99 ± 3			
Vinclozolin	93 ± 3	98 ± 4	100 ± 5	93 ± 4	97 ± 4	98 ± 3	94 ± 3	96 ± 2	98 ± 3			
Dichlofluanid	91 ± 4	93 ± 5	95 ± 3							93 ± 4	94 ± 4	97 ± 4
Captan	80 ± 4	81 ± 4	81 ± 3				81 ± 3	82 ± 3	86 ± 4	83 ± 6	84 ± 5	87 ± 4
Procymidone	91 ± 3	93 ± 3	94 ± 2				91 ± 3	96 ± 2	97 ± 3			
α-Endosulfan				85 ± 5	88 ± 3	90 ± 3	81 ± 5	85 ± 3	86 ± 3			
β-Endosulfan				93 ± 4	96 ± 4	98 ± 3	94 ± 5	96 ± 5	97 ± 3			
Endosulfan sulphate				95 ± 3	97 ± 4	99 ± 2	96 ± 4	99 ± 3	100 ± 3			
Bifenthrin	63 ± 2	64 ± 2	66 ± 2	70 ± 2	76 ± 3	81 ± 3	66 ± 3	72 ± 3	76 ± 2	63 ± 2	67 ± 3	70 ± 2
Fenpropathrin				85 ± 4	99 ± 4	102 ± 4	82 ± 3	90 ± 2	98 ± 3	86 ± 4	87 ± 3	91 ± 3
λ-Cyhalothrin				91 ± 5	99 ± 6	102 ± 5	88 ± 3	92 ± 4	95 ± 2	90 ± 4	91 ± 4	98 ± 5
Permethrin				84 ± 4	93 ± 4	101 ± 4				79 ± 3	82 ± 3	90 ± 3
Cyfluthrin	85 ± 5	89 ± 3	93 ± 5							89 ± 4	90 ± 3	95 ± 4
β-Cyfluthrin	91 ± 4	95 ± 3	96 ± 4							93 ± 5	94 ± 4	101 ± 3
Cypermethrin	85 ± 3	93 ± 3	97 ± 5	95 ± 3	96 ± 4	102 ± 3						
α-Cypermethrin	83 ± 4	92 ± 4	99 ± 5	89 ± 5	93 ± 3	94 ± 3						
Fenvalerate				86 ± 4	93 ± 4	97 ± 2				87 ± 4	99 ± 5	101 ± 4
Deltamethrin				75 ± 3	83 ± 2	84 ± 3	74 ± 3	75 ± 5	80 ± 3	70 ± 4	75 ± 4	85 ± 3

permethrin, fenprothrin and  $\alpha$ -cypermethrin. Average recovery values of the three amounts spiked, point out the correlation existing among the results obtained for each pesticide in the different matrices assayed; therefore, pesticide characteristics (viz. degradation, interaction) are less relevant than the type of matrix assayed. In this regard, average values of OCPs in the different vegetable samples tested ranged from 85-96%, being the values obtained for pyrethroids slightly lower (71-95%). Among them, those providing the lowest average recovery values were bifenthrin ( $71\pm 4\%$ ), deltamethrin ( $78\pm 2\%$ ), captan and  $\alpha$ -endosulfan ( $85\pm 2\%$ ). The results obtained testify to the applicability of the proposed method to any vegetable sample because favourable results were obtained even in very complex matrices (viz. onion). Summarising, the main advantage of the method developed is the absence of matrix effect, which can be ascribed to (i) the lyophilisation process, which minimised the extraction of concomitants from the sample; and (ii) to the efficiency of the clean-up step on the sorbent selected.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

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

---

**REFERENCES**

- [1] R. Coscolla, *Residuos de Plaguicidas en Alimentos Vegetales*, Mundi-prensa, Madrid, 1993.
- [2] *Community Directive 93/58 EEC*, Off. Eur. Commun. L 211/6, European Community, Brussels, 1993.
- [3] C. Tomlin (Ed), *The Pesticide Manual*, 10<sup>th</sup> edn., British Crop Protection, The Royal Society of Chemistry, London, 1994.
- [4] M.A. Luke, J.E. Froberg, H.T. Masumoto, *J. AOAC Int.* 58 (1975) 1020.
- [5] J.P. Hsu, H.J. Schattenberg III, M.M. Garza, *J. AOAC Int.* 74 (1991) 886.
- [6] Y. Nakamura, Y. Tonogai, Y. Sekiguchi, Y. Tsumura, N. Nishida, K. Takakura, M. Isechi, K. Yuasa, M. Nakamura, N. Kifune, K. Yamamoto, S. Teresawa, T. Oshima, M. Miyata, K. Kamakura, Y. Ito, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 2508.
- [7] S. Schachterle, C. Feigel, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 411.
- [8] G.E. Miliadis, P.T. Malatou, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 70 (1998) 29.
- [9] A. Agüera, L. Piedra, M.D. Hernando, A. Fernández-Alba, M. Contreras, *Analyst* 125 (2000) 1397.
- [10] H.M. Pylypiw, *J. AOAC Int.* 76 (1993) 1369.
- [11] K. Fytianos, J. Konstantinou, J. Kaidatzis, T. Albanis, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61 (1998) 684.
- [12] G. Pang, Y. Chao, C. Fan, J. Zhang, X. Li, T. Zhao, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 1481.

- 
- [13] G. Pang, Y. Chao, C. Fan, J. Zhang, X. Li, T. Zhao, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 1489.
- [14] R.A. Doong, C.Y. Lee, Y.C. Sun, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 677.
- [15] A. Ramesh, M. Balasubramanian, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 725.
- [16] A. Fernández-Alba, A. Valverde, A. Agüera, M. Contreras, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 266.
- [17] J. Fillion, R. Hindle, M. Lacroix, J. Selwyn, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 1252.
- [18] T. Pihlstrom, B.G. Osterdahl, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2549.
- [19] A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 235.
- [20] *Community Directive 79/700 EEC*, Off. J. Eur. Commun., European Community, Brussels, 1979.
- [21] M.D. Luque de Castro, A. Izquierdo, *J. Autom. Chem.* 12 (1990) 267.
- [22] A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 83.
- [23] C. Liñán Vicente (Ed.), *Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales*, 14<sup>th</sup> edn., Agrotécnicas S.L., Madrid, 1999.
-

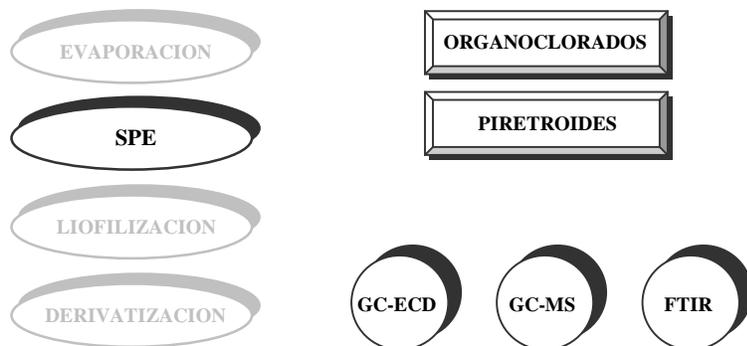


**CAPITULO IV:  
PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS  
Y PIRETROIDES EN MUESTRAS  
ACUOSAS**

**CHAPTER IV:  
ORGANOCHLORINE AND PYRETHROID  
PESTICIDES IN WATER SAMPLES**



**CAPITULO IV**





La agricultura utiliza el 70% de los recursos hídricos del planeta. Exceptuando las pérdidas por evaporación, el agua empleada en agricultura se recicla y llega de nuevo a las aguas superficiales y subterráneas, arrastrando contaminantes. De hecho, con el agua de lluvia los plaguicidas, dependiendo del tipo de suelo, se transportan por escorrentía o se infiltran en el suelo alcanzando las aguas subterráneas. La degradación de la calidad del agua por la contaminación por plaguicidas tiene dos impactos principales en la salud humana. El primero es el consumo de pescado o de otros organismos acuáticos que estén contaminados con los plaguicidas; el segundo es el consumo directo de agua contaminada con estas sustancias. En la Unión Europea se estimó que, en 1991, en el 65% de las zonas agrícolas los acuíferos excedían el LMR de

---

0.5 ng/mL establecido para la suma de plaguicidas, y que aproximadamente en el 25% de esa área, este LMR se superaba en más de 10 veces [1].

En este capítulo se aborda la determinación de residuos de plaguicidas organoclorados en diversas muestras acuosas (Cap. IV.1), empleando un sencillo sistema de flujo totalmente automatizado y cromatografía de gases. Además, se evalúa la influencia de la presencia de materia orgánica sobre la degradación/adsorción de estos plaguicidas en las muestras. De hecho, parece ser que la adsorción de plaguicidas organoclorados sobre la materia orgánica (fundamentalmente algas) presentes en un río, es una especie de mecanismo de limpieza del propio río. Es por ello que diversas organizaciones, como la Comisión conjunta FAO/OMS y US-EPA, recomienden determinar no sólo la presencia de plaguicidas en el agua, sino también en los sedimentos, de manera que se constate más exhaustivamente la presencia de plaguicidas en el medio acuático [1].

La segunda parte de este capítulo se centra en el desarrollo de un sistema de screening para determinar la presencia de plaguicidas organoclorados y/o piretroides en muestras acuosas (Cap. IV.1), utilizando FTIR sin separación previa de los analitos. El uso de la espectrometría de infrarrojo en el análisis de residuos de plaguicidas se encuentra limitado a su empleo como detector en LC [2], SFE [3] y GC [4]. La determinación cuali y cuantitativa de plaguicidas mediante FTIR, sin el uso de una técnica cromatográfica de separación, únicamente se ha llevado a cabo en formulaciones comerciales, donde la concentración de los mismos es muy alta [5,6].

**REFERENCIAS**

- [1] E. D. Ongley, *Control of Water Pollution from Agriculture*, FAO/OMS, Roma, 1996.
- [2] J. C. Jones, D. Littlejohn, P. R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 792.
- [3] D. F. Gurka, S. Pyle, R. Titus, E. Shafter, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2521.
- [4] N. K. Zhu, X. Y. Du, X. J. Xia, S. Q. Wang, F. C. An, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65 (2000) 22.
- [5] M. J. Almond, S. J. Knowles, *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 1128.
- [6] K. K. Sharma, S. Gupta, S. K. Handa, *Talanta* 44 (1997) 2075.





ELSEVIER

Talanta 54 (2001) 943-951

---

**Talanta**

---

## Evaluation of an automated solid-phase extraction system for the enrichment of organochlorine pesticides from waters

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel

*Analytical Chemistry Division, Campus de Rabanales, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain*

Received 21 November 2000; received in revised form 7 February 2001; accepted 16 February 2001

### Abstract

An automatic method for the determination of organochlorine pesticides (OCPs) in water samples was developed. The analytes are preconcentrated onto a customized RP-C<sub>18</sub> column and subsequently eluted with 80  $\mu$ L of ethyl acetate. Gas chromatography with electron capture detection is used for their separation and selective detection. Detection limits for 10 mL sample volumes range from 0.01 to 0.1 ng/mL, with standard deviations between 4 and 6%. The average recovery at a fortification level of 2 ng/mL is 92%. The method was used to screen OCPs in natural waters collected near agricultural areas and also to tap waters. Positive findings were confirmed by gas chromatography with mass spectrometric detection. Finally, the adsorption/degradation of OCPs in natural pond water containing a high level of suspended matter was examined; some OCPs were found to be degraded and irreversibly adsorbed on suspended matter present in the water.

## 1. INTRODUCTION

Pesticides are ubiquitous water and soil pollutants by virtue of their extensive use. In recent years, many studies have shown fresh surface, drinking and ground waters to frequently contain pesticides at high concentrations [1]. Pesticides are primarily moved from agricultural fields to surface waters in surface run-off. The amount lost from fields and transported to surface waters depends on several factors, including soil characteristics, topography, weather, agricultural practices, and chemical and environmental properties of individual pesticides [2]. One of the primary goals in water analyses for pesticides is to reach determination limits of about 0.1 ng/mL for individual pesticides and 0.5 ng/mL for total concentrations in order to meet the requirements of the European Union (EU) Drinking Water Directives [3] and those of the US National Pesticide Survey. These levels call for methods with very low detection limits. Thus, a recent EU report stated that such analytical methods should have detection limits of 0.02 ng/mL or less and an accuracy about 20% [4].

Organochlorine pesticides (OCPs) are usually determined by gas chromatographic (GC) techniques, using mass spectrometric (MS) [1,2,5-9] or electron capture detection (ECD) [2,5,10-15]; liquid chromatography with MS detection has also been used for his purpose, however [5]. The need to extract large volumes of water (up to 2 L) to analyse small amounts of analyte (nanogram-per-millilitre levels) in relatively unpolluted water requires using a suitable preconcentration technique. The most common choices here are solid-phase extraction (SPE) [1,2,5,6,10-13] and liquid-liquid extraction followed by concentration (by evaporation to dryness) and dissolution of the

---

residue in a low volume of organic solvent [5,7,8], which may result in serious losses of analytes. Techniques such as large-volume injection [1,7,13], microwave-assisted solvent elution [15] and solid-phase microextraction [9,14] have also been used but to a lesser extent for this purpose. At present, SPE methods are routinely used to monitor pesticides in the aquatic environment because of the wide availability of selective sorbent materials, their simplicity and reduced solvent consumption, and the high preconcentration factors they provide. This technique involves the sorption of OCPs from a large amount of water onto a suitable sorbent and their desorption by solvent elution.

The aim of this study was to develop a simple, robust method for the identification and quantitation of OCPs at the low ng/mL level in waters close to agricultural areas or used for human consumption without the need for time-consuming sample treatment (i.e. to process large sample volumes). The target compounds tested were chosen on the grounds of their intensive use in the Mediterranean agricultural region. SPE was chosen for sample clean-up/preconcentration and GC with ECD detection for quantitation, in order to take advantage of the high efficiency of the chromatographic separation and the selectivity of the detection step. The proposed extraction system was tested with various sorbents; the advantages and constraints of the ensuing method are discussed below.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Materials and reagents

All chemicals and sorbents were of analytical grade or better. Aldrin, captan, dichlofuanid, dicofol,  $\alpha$ - and  $\beta$ -endosulfan (3:1, w/w), endosulfan sulphate,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - and  $\gamma$ -HCH 1:1:1:1, w/w), lindane ( $\gamma$ -HCH), procymidone and vinclozolin were obtained from Riedel-deHaën (Seelze, Germany). 2,4-Dichlorophenol (internal standard) and RP-C<sub>18</sub> HPLC sorbent were supplied by Sigma (Madrid, Spain). All other reagents (acetone, ethyl acetate, ethanol, n-hexane and sodium sulphate) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Gas chromatographic system

Experiments were carried out by using a Hewlett-Packard 5890A gas chromatograph equipped with a <sup>63</sup>Ni electron-capture detection (ECD). Chromatographic separation was achieved by using a fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.) coated with 5% phenyl-methylpolysiloxane, film thickness 0.25  $\mu$ m (Supelco, Madrid, Spain). Peak areas were measured with a Hewlett-Packard 3392 A integrator. The injector and detector temperatures were kept at 225°C and 325°C, respectively throughout. Nitrogen (5.5. Air Liquide, Seville, Spain) was employed as carrier gas (1 mL/min). The column temperature was raised from 120°C (2 min) to 180°C (4 min) at 8°C/min, then to 255°C (10 min) at 8°C/min and, finally, to 270°C (2 min) at 10°C/min. Confirmatory analyses were carried out on a Fisons 8000 GC

interfaced to a Fisons MD800 mass spectrometer and controlled by a computer running MASSLAB software (Thermo, Madrid, Spain), using the same chromatographic column and temperature programme. Ultrapure helium (6.0 Air Liquide) at a flow-rate of 1 mL/min was employed as carrier gas, which involves a variation in the retention times obtained for the analytes assayed. The injection port and transfer line temperatures were maintained at 225°C and 300°C, respectively. The ion source temperature was 200°C for the 70 eV electron impact mode, with scanning over the  $m/z$  range of 50-500. In all analyses, 1  $\mu$ L of the organic extract was injected in the split mode (1:25 ratio).

The SPE system was constructed by using a Gilson Minipuls-2 peristaltic pump fitted with Solvaflex pumping tubes, two Rheodyne 5041 six-port injection valves, PTFE tubing and commercially available connectors. The sorbent column was prepared by packing a commercial Omnifit glass column (2 cm x 2.5 mm i.d.) with ~70 mg of RP-C<sub>18</sub>.

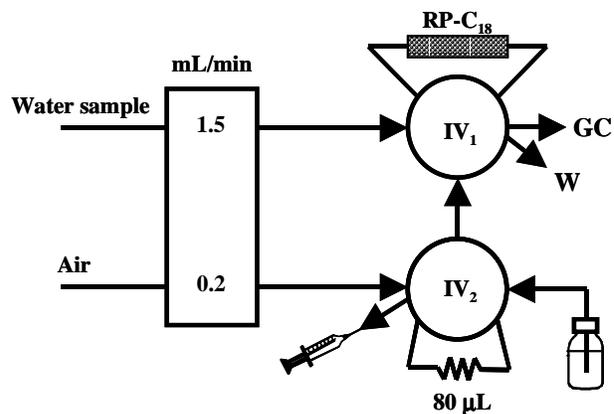
### *2.3. Standard solutions and sample conditioning*

Stock solutions (5 mg/mL) of each OCP were prepared in acetone and stored in glass stoppered bottles at 4°C in the dark. Standard and GC calibration solutions spanning the concentration range 0.05-50 ng/mL were made by appropriate dilution of the stock solutions. The internal standard, 2,4-dichlorophenol, was added to the eluent (ethyl acetate) at a concentration of 1  $\mu$ g/mL.

Water samples were collected in amber glass bottles. A volume of 1 mL of 0.1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  per litre of water sample (final concentration of  $10^{-4}$  M) was added on site to suppress the interferences of chlorine and humic and fulvic acids. All samples were filtered through a Micro Separations Inc. 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filter (Westboro, MA) to remove particulate matter. In order to avoid degradation of some of the OCPs under alkaline conditions [17], the pH of all water samples was adjusted to 5-6. Analyses were performed with the least possible delay, the water samples being kept dark at  $4^\circ\text{C}$  from collection to analysis. Any samples that could not be analysed within two days were treated as described below and their organic extracts frozen at  $-4^\circ\text{C}$  until their GC analysis.

#### 2.4. Analytical SPE method

Figure 1 depicts the flow system designed for the determination of OCPs. Initially, 10-100 mL of standard solutions or water samples, at pH 5-6, containing variable concentrations of the analytes (0.05-50 ng/mL), were continuously aspirated at a flow-rate of 1.5 mL/min and passed through the RP- $\text{C}_{18}$  column, located in the loop of one of the injection valves ( $\text{IV}_1$ ). Simultaneously, the loop of the second injection valve ( $\text{IV}_2$ ) was filled with eluent (ethyl acetate) containing the internal standard (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of 2,4-dichlorophenol) by means of a syringe. On switching both injection valves, the loop contents were carried by an air stream at a flow-rate of 0.2 mL/min. The eluent was passed through the column (in opposite direction to the sample) and eluted analytes



**Figure 1.** Scheme of the continuous preconcentration and elution steps for the determination of OCPs in waters. IV=injection valve; W=waste; GC=gas chromatograph.

were collected in a glass vial containing anhydrous sodium sulphate. A volume of 1 µL of dried solution was injected into the GC-ECD for analysis. After samples were passed, the sorbent column was washed with 1 mL of ethanol to remove potential interferences adsorbed on the column and then conditioned with 3 mL of ultrapure water. If confirmation by GC-MS was required, a volume of 100 mL of the water sample was used taking into account the lower sensitivity of the detector compared to ECD.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Clean-up/retention step

Automated SPE enables the preconcentration of large volumes of water samples onto a column packed with a suitable sorbent and elution of retained analytes in a few microliters of organic solvent. Six sorbent materials for SPE of organic

compounds (viz. silica gel, Amberlite XAD-2, LiChrolut-EN, activated carbon, Florisil and RP-C<sub>18</sub>) were initially tested for preconcentration of the OCPs. Sorption tests were carried out by using a column packed with 50 mg of the sorbent tested in each case. An aqueous solution containing ~50 ng/mL OCPs was passed through each column at 0.5 mL/min. Fractions of 1 mL of sample were collected in glass vials before (100% recovery) and after (unadsorbed) the sorbent column, and extracted by hand with 1 mL of ethyl acetate. This solvent was selected on the grounds of its extraction efficiency for the compounds studied [6]. After evaporation to near dryness, the residue was redissolved in 200 µL of ethyl acetate and a 1 µL aliquot of the extract was analysed by GC. After each sample was processed, the column was sequentially rinsed with 1 mL of ethanol to remove potentially adsorbed analytes and then conditioned with 3 mL of ultrapure water. The adsorption efficiency was dependent upon the individual sorbent assayed, being 40% for Amberlite XAD-2; 60% for Florisil and silica gel; 75% for LiChrolut-EN and 90-100% for RP-C<sub>18</sub> and activated carbon. RP-C<sub>18</sub> was finally selected, as retention of OCPs on activated carbon was irreversible. Thus, various columns packed with different amounts of RP-C<sub>18</sub> between 20 and 90 mg were prepared in order to establish the optimum amount of sorbent for adsorbing the OCPs. The amount of sorbent used was found to have considerable influence; thus, the peak areas obtained with 40 mg were about 2 times higher than those provided by 20 mg, beyond which they remained virtually constant. A working column packed with 40 mg RP-C<sub>18</sub> was selected. Subsequent experiments were carried out by aspirating 10 mL of ultrapure

water containing each OCP in concentrations of 2-6 ng/mL into a SPE unit as depicted in Figure 1 and eluting the OCPs with 200  $\mu$ L of ethyl acetate.

The influence of pH on the retention of OCPs was studied over the range 1-10, adjusted with dilute HNO<sub>3</sub> or NaOH. Aldrin was the OCP chromatographic signals of which remained almost constant throughout the widest pH range (1.0 to 9.0); for the rest of the analytes, chromatographic areas increased with increasing pH, remaining almost constant over the range 2.8-7.5 (HCH isomers, vinclozolin, procymidone); 2.8-7.0 (captan,  $\beta$ -endosulfan, dicofol, endosulfan sulphate); 3.0-7.2 (dichlofuanid) and 3.4-6.5 ( $\alpha$ -endosulfan), but decreasing at higher pH values. This can be ascribed to the OCPs being degraded or not adsorbed in the alkaline medium. Based on this general tendency, a pH value between 5 and 6 was used as obtained by preparing the standards in ultrapure water. The flow-rate of the aqueous solution (10 mL) was found to strongly influence the recovery throughout the volume flow range studied (0.3-3 mL/min). A steady state was achieved between 0.3 and 1.7 mL/min, the signal decreasing sharply above the latter value; a sample flow-rate of 1.5 mL/min was thus selected.

One important parameter to be controlled in developing an SPE method is the breakthrough volume, i.e. the sample volume where the analyte starts to be eluted from the column bottom. It depends on packing efficiency of the sorbent bed and on the strength with which the analytes are retained by each sorbent [16]. This parameter restricts the maximum sample volume that can be used and hence the maximum preconcentration factor that can be achieved. The effect of this variable was examined by using standard solutions containing 2-6 ng of each pesticide in variable volumes of

distilled water (from 5 to 100 mL) that were introduced into the SPE system. The breakthrough volume determined with this on-line SPE system was found to be at least 100 mL (at 1.5 mL/min) for all the compounds selected. Higher volumes can also be assayed depending on sample availability and operator's patience.

### 3.2. Elution step

The best eluent under the previously established optimum flow conditions was selected. Ethyl acetate [2,6,11,13], acetonitrile [5], n-hexane [10] or sequences of the three [12] are frequently used to elute OCPs preconcentrated from water onto RP-C<sub>18</sub> cartridges or disks. All three were tested, using a volume of 200  $\mu$ L delivered at a flow-rate of 0.5 mL/min by means of an air stream. Ethyl acetate was found to be the best choice (elution efficiency ~100%) as lower efficiency was obtained for the others (60% for n-hexane and 85% for acetonitrile), being hence adopted as desorbing solvent. Next, the influence of the eluent flow-rate was studied by varying the air flow-rate between 0.3 and 0.8 mL/min. The elution efficiency was found to decrease above 0.6 mL/min owing to the residence time of the eluent in the column being too short for quantitative desorption; 0.5 mL/min was thus selected. Finally, the effect of the eluent volume was studied between 50 and 200  $\mu$ L. Recoveries increased with increasing injected volume up to 80  $\mu$ L (complete elution). Therefore, a volume of 80  $\mu$ L of ethyl acetate was chosen as optimal.

### *3.3. Analytical performance*

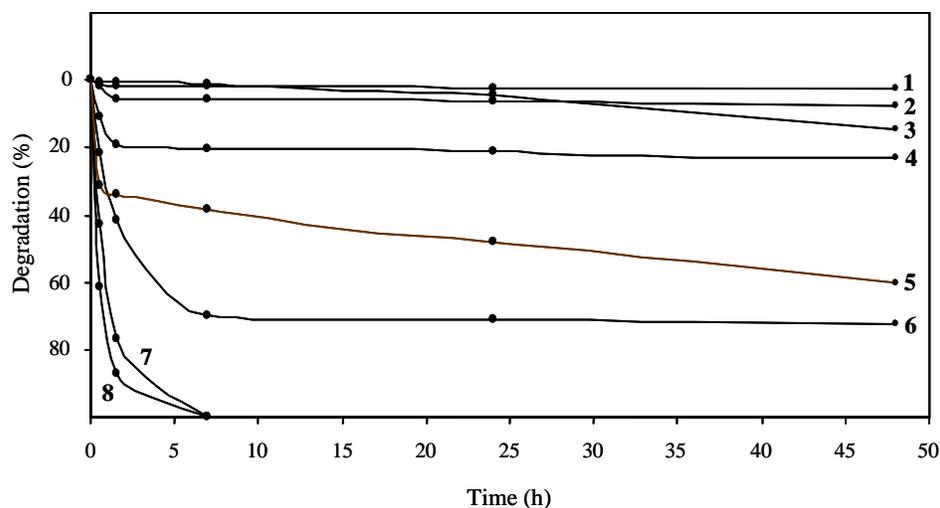
All pesticides studied exhibited good gas chromatographic properties and could be identified in a direct manner without overlap. The performance and reliability of the SPE-gas chromatographic method was assessed by determining the sensitivity (slope of the calibration graph), linear range, detection limit and relative standard deviation. Analytical curves for aqueous samples containing different amounts of OCPs, prepared following the above described-procedure, were obtained by plotting the analyte-to-internal standard peak-area ratio against the analyte concentration. The analytical figures of merit for a sample volume of 10 mL are summarised in Table 1. Detection limits of the method were established for the same sample volume, spiked with the pesticides at very low concentration, introduced into the flow system. They were calculated as the minimum concentration providing a chromatographic signal three times higher than the background noise and ranged from 0.01-0.1 ng/mL. They were all below the limit set by the European Union and, in most of the cases, several times lower. Even lower detection limits can be achieved by increasing the sample volume to 100 mL. The precision of the method was checked on 11 samples of 10 mL spiked with each OCP at a 2 ng/mL concentration. The precision of the method is quite acceptable: relative standard deviations (RSD) ranged from 4 to 6%.

**Table 1.** Analytical figures of merit for the determination of OCPs (sample volume 10 mL) using the proposed SPE method.

Analyte	Slope	Linear range (ng/mL)	LOD (ng/mL)	RSD (%)
$\alpha$ -HCH	0.40	0.1-20	0.03	4.6
$\beta$ -HCH	0.22	0.2-35	0.08	5.8
Lindane	0.41	0.1-20	0.03	4.7
$\delta$ -HCH	0.44	0.1-20	0.03	4.5
Vinclozolin	0.39	0.1-20	0.03	5.0
Dichlofuanid	0.19	0.3-40	0.08	5.1
Aldrin	0.37	0.1-20	0.03	4.1
Dicofol	0.26	0.2-30	0.05	5.9
Captan	0.16	0.5-50	0.10	4.8
Procymidone	0.19	0.2-40	0.08	4.6
$\alpha$ -Endosulfan	0.86	0.05-10	0.01	5.0
$\beta$ -Endosulfan	0.61	0.07-15	0.02	4.2
Endosulfan sulphate	0.42	0.1-20	0.03	3.5

#### 3.4. Screening of water samples

The proposed enrichment-separation system was applied to the screening of OCPs in different types of water from agricultural areas and also in 11 tap waters. In all cases, the pH of the water samples ranged from 7.5 to 8.2; thus, in order to avoid degradation of some of the OCPs, the pH of the samples was adjusted to 5-6 with dilute HNO<sub>3</sub> as soon as possible after collection. Degradation at room temperature was especially marked for captan, dichlofuanid, vinclozolin and procymidone; in some cases (e.g. with captan) it exceeded 50% after only 30 min. This behaviour is illustrated in Figure 2 for all the OCPs in alkaline ultrapure water (pH 8).



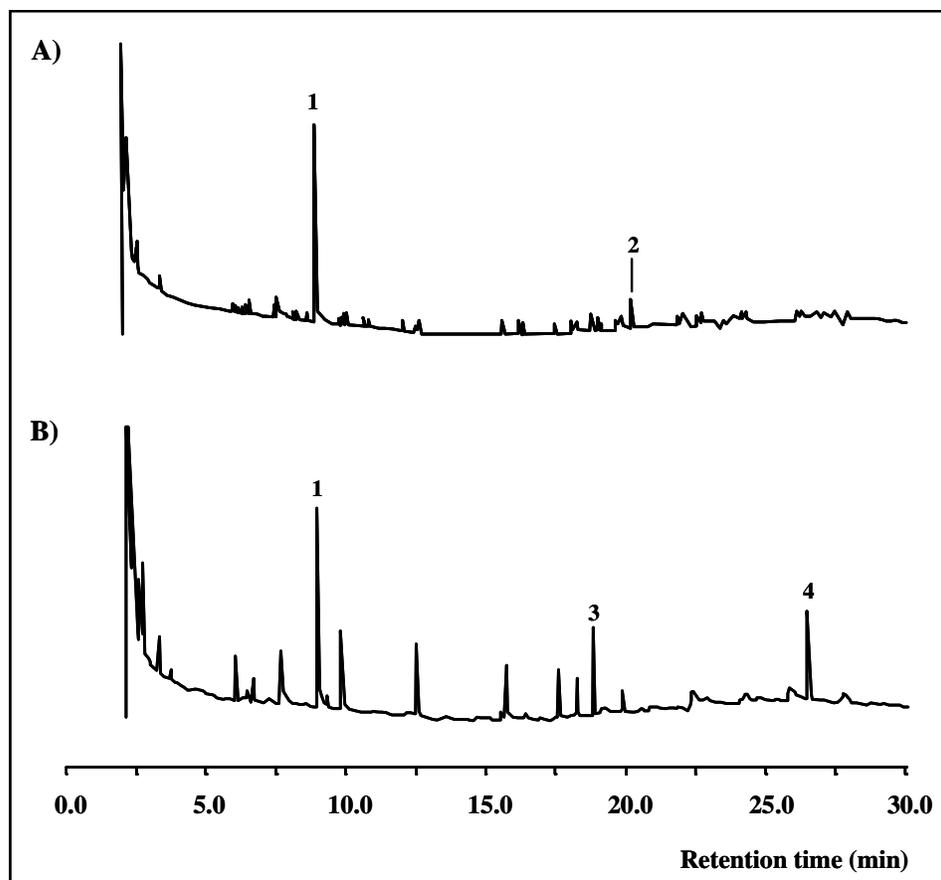
**Figure 2.** Degradation curves obtained for the 8 OCPs in ultrapure water at pH 8.1. 1=Lindane; 2=dicofol; 3= $\alpha$ -endosulfan; 4=aldrin; 5=procymidone; 6=vinclozolin; 7=dichlofuanid; 8=captan.

This sequence is in consonance with the tabulated half lives of the compounds [17] except for procymidone, for which it was shorter (~30 h) under the experimental conditions assayed. Initially, aliquots of 10 mL were passed through the sorbent column as described under Section 2; in this case, only five samples (all of waters near agricultural areas) were found to contain residual OCPs at detectable levels (positive waters). Therefore, the sample volume of positive waters was increased to 50 mL for quantitative determinations. Matrix effects were examined by using the standard-addition method with water volumes of 10 mL. The slopes of the calibration graphs obtained from standard additions to five types of water were similar to those for the

standards. The results obtained by using 50 mL of water and the standard-addition method were coincident (Table 2). As can be seen, the concentrations found were lower than or similar to the EU maximum acceptable concentration (0.1 ng/mL) for all compounds examined. Positive results were confirmed by GC-MS by comparing the mass spectra obtained with those in the Pesticide library; spectral comparison resulted in coincidence higher than 85%. As the sensitivity was ten times lower than with ECD, the sample volume must be increased to 100 mL. As example, Figure 3 shows the chromatograms obtained with electron capture detection, for a river and a natural pond water samples.

**Table 2.** OCP concentrations ( $\pm$  SD, n = 5) in the water samples as determined by using the proposed SPE method and GC-ECD.

Sample	OCPs found	Concentration (ng/mL)
Tap water (11)	Not found	-
Well-1	Lindane	0.09 $\pm$ 0.01
Well-2	Lindane	0.04 $\pm$ 0.01
Swamp	Not found	-
River	Aldrin	0.04 $\pm$ 0.01
Natural pond-1	Viclozolin	0.13 $\pm$ 0.01
	Endosulfan sulphate	0.12 $\pm$ 0.01
Natural pond-2	Procymidone	0.09 $\pm$ 0.01



**Figure 3.** Chromatograms for (A) river and (B) natural pond waters, obtained with ECD detection. Sample volume, 50 mL. Peaks: 1=2,4-Dichlorophenol (internal standard); 2=aldrin; 3=vinclozolin; 4=endosulfan sulphate.

### 3.5. Adsorption/degradation of OCPs spiked to natural pond water

Samples may occasionally contain particulates, colloids or dissolved macromolecular organic matter which results in filtration losses; therefore, the percentages of adsorption/degradation of OCPs are dependent on both, the amount of suspended matter and the concentration of the individual pesticide [18,19]. In order to estimate the influence of suspended matter (SM) present in a water sample on the recovery of OCPs using the proposed SPE technique, a natural pond water sample, free from OCPs, containing high levels of algae (SM ~0.1 g/L) was selected as sample test. It contained filamentous algae consisting largely of *Spirogyra* (green algae) and, to a lesser extent, *Oscillatoria* (blue-green algae); in addition to unicellular diatomaceous algae. The sample (10 L) was spiked (2 ng/mL) with the selected OCPs and maintained at its natural pH (8.1), in a closed 25 L PTFE bottle in the dark; the ambient temperature varied between 20 and 30°C. Volumes of 50 mL were periodically taken after homogenization of the sample, filtered, adjusted to pH 5-6 and aliquots of 10 mL being analysed using the proposed method. The container volume was not adjusted to its initial value by adding the same amount of natural pond water in order to overcome the dilution effect on the concentration of OCPs. In addition, because the initial volume was reduced to about 8 L after the experiments, the volume of air (25 L bottle) remained virtually constant. The bottle was capped to avoid volatilization or contamination. The experiment allowed the influence of the following factors to be determined: (a) degradation of OCPs by effect of the alkaline sample medium (pH 8.1); (b) adsorption onto suspended matter and (c) reversible or irreversible extraction of

OCPs adsorbed onto SM by the proposed SPE method. In order to evaluate the influence of SM on the degradation/adsorption of OCPs in alkaline water, an ultrapure water sample at the same pH (8.1), spiked with OCPs at the same concentration, was studied in parallel as model sample. By comparing the differences of the signals obtained for the model and the natural pond water samples, degradation and adsorption of the OCPs onto the SM can be discriminated. In addition, one must monitor the concentration of each OCP in the filtrate and its residue in order to determine the pesticide distribution in the liquid or solid water phase. For this purpose, an overall water volume of 50 mL was sampled at variable intervals and filtered. For analysis of the liquid phase, water aliquots of 10 mL were processed in duplicate; for that of SM in the water, the residue obtained by filtration of 50 mL of sample was extracted and analysed. This sampling operation was repeated two times for each sample. The first sample was taken 30 min after spiking.

The presence of SM does not increase degradation of OCPs in the liquid phase; in fact, the curves for the test sample were parallel to those for the model sample except where the adsorption increased with the time. In any case, the OCPs were adsorbed on SM as recoveries from the liquid phase of the natural pond water were low relative to the model water. The results for the adsorption process are listed in Table 3. Based on this data, the OCPs can be divided into two groups, namely: (i) those that are immediately adsorbed ( $t = 0.5$  h) and whose adsorption remained almost constant with time; and (ii) those whose adsorption increases with time (viz. HCH isomers and vinclozolin). Aldrin was the OCP exhibiting the highest adsorption from the beginning.

As a general tendency, adsorption was higher for compounds having higher log  $K_{ow}$  value (lower solubility in water) [12,17,20]. The exception is captan as its behaviour can be altered by its instability under the working alkaline conditions.

**Table 3.** Adsorption (%) with the time of OCPs spiked (2 ng/mL) to a natural pond water containing 0.1 g/L of suspended matter. Environmental conditions: sample pH=8.1; ambient temperature=20-30°C.

Analyte	Time (h)			
	0.5	1.5	7	48
$\alpha$ -HCH	20	40	40	40
$\beta$ -HCH	15	35	35	35
Lindane	13	32	32	32
$\delta$ -HCH	13	44	44	44
Vinclozolin	10	30	70	77
Dichlofuanid	10	10	-	-
Procymidone	10	11	11	15
Dicofol	30	30	30	30
Captan	45	45	-	-
Endosulfan sulphate	50	50	53	55
$\alpha$ -Endosulfan	58	60	60	60
$\beta$ -Endosulfan	60	60	60	63
Aldrin	80	82	85	90

Regarding reversible/irreversible adsorption of OCPs on SM (residue retained on the nylon filter), the concentration of SM in the natural pond water was calculated by filtering the water and weighing the dry residue; this provided a concentration of  $0.10 \pm 0.01$  g/L ( $n = 10$ ). Then, OCPs were extracted from SM retained on the filter by using a previously reported procedure [20]. The filter was mechanically shaken with 10 mL of n-hexane in a glass screw-on cap tube for 5 min. The organic extract was then

removed from the tube and washed with 10 mL of water. Finally, the n-hexane layer (containing the OCPs) was evaporated to near dryness, redissolved in ultrapure water and inserted into the SPE system for clean-up. The SM residue was analysed 0.5 and 24 h after the OCPs were spiked to the water sample. The OCPs also exhibited a differential behaviour in this case. As expected, recoveries were lower at 24 h than at 0.5 h for all OCPs except aldrin,  $\alpha$ - and  $\beta$ -endosulfan, and endosulfan sulphate, for which they remained virtually constant at 30% (aldrin), 25% ( $\alpha$ - and  $\beta$ -endosulfan) and 10% (endosulfan sulphate). Dichlofuanid and captan (100% degradation in the model sample after 7 h) were recovered at ~2.5% after 0.5 h and no signal for either OCP was obtained after 24 h, so, although both were adsorbed on SM, they continued to be degraded or the adsorption occurred in an irreversible manner. On the other hand, dicofol was readily extracted from suspended matter (with recoveries of 85 and 75% after 0.5 and 24 h, respectively), probably because it was reversibly adsorbed. Finally, recoveries at 0.5 h for the other OCPs, recoveries at 0.5 h were 20% for procymidone, 10% for HCH isomers and 6% for vinclozolin. This differential behaviour can be ascribed to the majority of the OCPs being irreversibly adsorbed/degraded on SM as the likely result of their trapping on the matter, which was reversible in dicofol as this OCP is probably bound via weak chemical interactions [19].

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by a grant (PB95-0977) from the Spain's CICYT. The authors also wish to acknowledge Mr. J. M. Seoane and Mrs. M.P. Llaveró for their kind supply of some of the water samples.

**REFERENCES**

- [1] R.J.C.A. Steen, I.L. Freriks, W.P. Cofino, U.A.Th. Brinkman, *Anal. Chim. Acta* 353 (1997) 153.
- [2] T.A. Albanis, D.G. Hela, T.M. Sakellarides, I.K. Konstantinou, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 59.
- [3] *Community Directive 80/778/CEE*, Off. J. Eur.Comm. L229/11. European Community. Brussels, 1980.
- [4] M. Fielding, D. Barceló, A. Helweg, S. Galassi, L. Torstensson, P. van Zoonen, R. Wolter, G. Angeletti, *Pesticides in Ground and Drinking Water* (Water Pollution Research Report, 27), Commission of the European Communities, Brussels, 1992, 1.
- [5] A.R. Fernández-Alba, A. Agüera, M. Contreras, G. Peñuela, I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 35.
- [6] E. Pocurull, C. Aguilar, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 818 (1998) 85.
- [7] A. Termonia, M. Termonia, *J. High Resolut. Chromatogr.* 20 (1997) 447.
- [8] E. Baltussen, H.G. Janssen, P. Sandra, C.A. Cramers, *J. High Resolut. Chromatogr.* 20 (1997) 395.
- [9] A.A. Boyd-Boland, S. Magdic, J.B. Pawliszyn, *Analyst* 121 (1996) 929.
- [10] I. Vassilakis, D. Tsipi, M. Scoullou, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 49.
- [11] G.E. Miliadis, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61 (1998) 255.

- 
- [12] J.J. Ridal, M.E. Fox, C.A. Sullivan, R.J. Maguire, A. Mazumder, D.R.S. Lean, *Anal. Chem.* 69 (1997) 711.
- [13] W.C. Quayle, I. Jepson, I.A. Fowles, *J. Chromatogr. A* 773 (1997) 271.
- [14] M.T. Almeida, P.M.A.R. Conceição, M.F. Alpendurada, *Analisis* 25 (1997) 51.
- [15] K.K. Chee, M.K. Wong, H.K. Lee, *Anal. Chim. Acta* 330 (1996) 217.
- [16] L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, *Chromatographia* 40 (1995) 474.
- [17] C. Tomlin (Ed.), *The Pesticide Manual*, 10<sup>th</sup> edn., British Crop Protection Council, The Royal Society of Chemistry, London, 1994.
- [18] J.H. Hermans, F. Smedes, J.W. Hofstraat, W.P. Cofino, *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 2028.
- [19] D.E. Wells, *Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 339.
- [20] S. Fingler, B. Tkalcevic, Z. Fröbe, V. Drevenkar, *Analyst* 119 (1994) 1135.

Vibrational Spectroscopy (2001) submitted for its publication

---

**Vibrational  
Spectroscopy**

---

**Assessment FTIR Spectrometry for pesticide screening of aqueous samples**A. Columé<sup>1</sup>, J. Diewok<sup>2</sup>, B. Lendl<sup>2</sup><sup>1</sup>Analytical Chemistry Division, Campus de Rabanales, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain<sup>2</sup>Institute of Analytical Chemistry, Vienna University of Technology, Getreidemarkt 9-151, A-1060 Wien, Austria**Abstract**

This paper assesses the potential of Fourier transform infrared spectrometry (FTIR) to be used in pesticide screening and rapid determination of selected pyrethroid and organochlorine pesticides in fresh water. FTIR spectra of 28 single pesticides in dry state were recorded on a horizontal diamond attenuated total reflection element. Hierarchical cluster analysis of the recorded FTIR spectra (spectral range: 4000-500 cm<sup>-1</sup>) showed that different pesticide groups could be distinguished. A representative (dichlofuanid, captan and fenpropathrin) of each main group was selected and their direct simultaneous determination in fresh water without using a chromatographic separation step investigated. The developed analysis procedure comprised a liquid-liquid extraction step with n-hexane, further automated clean-up and preconcentration by solid-phase extraction using a silica minicolumn and final elution of the analyte with ethyl acetate. The extract containing the analytes was further concentrated and dried on the ATR element for spectrum acquisition. Using a partial least square calibration it could be shown that all three analytes could be quantified in fresh water in a concentration range from 1.2 to 4.8 µg/L. Recoveries for dichlofuanid, captan and fenpropathrin from fortified tap and river waters ranged from 66.3 to 102.0 % (captan was the pesticide providing the lowest values, 66.3 and 70.3%).

## 1. INTRODUCTION

The use of pesticides, in order to prevent pests and plant diseases, is a risk to human health. Pesticide residues remain on agricultural goods and, also, are moved from agricultural fields to fresh surfaces, drinking and ground waters. Pyrethroid and organochlorine pesticides (OCPs) are a wide group of fungicides and insecticides extensively used in many agricultural applications. International organizations have established rigid limits for pesticides in drinking water, being 0.1  $\mu\text{g/L}$  for single pesticides and 0.5  $\mu\text{g/L}$  for total pesticide concentration, in the case of European Union [1], and between 1  $\mu\text{g/L}$  and 1  $\mu\text{g/mL}$  for individual pesticides, in the case of US-EPA [2].

Pyrethroid and OCPs are usually determined by gas chromatographic (GC) techniques, using different detectors, such as electron capture detectors (ECD) [3,4] or mass spectrometry [3,5-7]. However, Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrometry has gained wide acceptance on this field by virtue of its remarkable usefulness for both qualitative and quantitative analysis, but is limited by the high concentration of analyte required for detection. In this context, a literature survey of available methods for the determination of pesticides using FTIR, shows that many of them are applied to agrochemical formulations [8-11], where these analytes are present at high concentration. Recently, automatic methods using flow analysis (FA) have been developed for pesticide formulation analysis [12,13]. Direct determination of dithiocarbamate pesticides in spike soil samples by microwave assisted extraction with

chloroform and measurement in solution was investigated too [14]. On the other hand, FTIR is also employed as detector in high performance liquid chromatography [15], supercritical fluid chromatography [16] and gas chromatography [17-19]. The main advantage of chromatographic techniques is that they provide a chemical separation of a complex mixture of analytes prior to FTIR spectrometry, but this separation step is very time-consuming.

The aim of this work was to assess the potential of FTIR spectrometry for screening of water samples for pyrethroid and organochlorine pesticides by combining FTIR with a solid-phase extraction (SPE) preconcentration step and avoiding a chromatographic separation. Two main aspects were taken into account in this work:

i) The evaluation of the information content of ATR-FTIR spectra of pesticides, using hierarchical cluster analysis, in order to determine which classes of pesticides can be, in principle, recognized. Based on this evaluation, 3 analytes from different clusters were selected for the subsequent screening in water samples.

ii) The development of a technique based on a continuous solid-phase extraction system, which allows recording of high quality ATR-FTIR spectra of trace amounts of pesticides in aqueous solutions, and establishing a PLS calibration for simultaneous determination of 3 pesticides. This technique comprises a liquid-liquid extraction step of water samples with n-hexane, clean-up and preconcentration of the n-hexane extracts with a flow system based on a SPE step using a silica column, elution of the analytes with ethyl acetate and recording of FTIR spectra of the dried ethyl acetate extracts by means of a horizontal diamond ATR cell.

---

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Instruments and apparatus

A Bruker IFS 66 FTIR spectrometer, equipped with a horizontal ATR cell (Dura SamplIR, SensIR Technologies, CT, USA) and a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector, was used. The spectrometer was controlled using the software package OPUS 3.0/IR (Bruker, Germany). All spectra were recorded in the region from 4000 to 500  $\text{cm}^{-1}$ . Each spectrum was based on 128 co-added scans at a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . Hierarchical clustering was performed in OPUS 3.0 and the PLS calibrations were established with OPUS NT 3.1.

The flow system was constructed with a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump (Villiers-le-Bel, France) furnished with Solvaflex pump tubing, two Rheodyne 5041 injection valves, PTFE tubing (0.5 mm i.d.) and commercially available connectors. The sorbent glass column (2 cm x 4 mm i.d.) was hand-packed with 50 mg of silica and sealed at both ends with small cotton beads to prevent material losses. The sorbent column was sequentially conditioned with 0.5 mL of acetonitrile and 1 mL of n-hexane prior to each sample. This column can be reused for at least three months, working daily, including a washing step with 0.5 mL of isopropanol before conditioning.

### 2.2. Chemicals and standard solutions

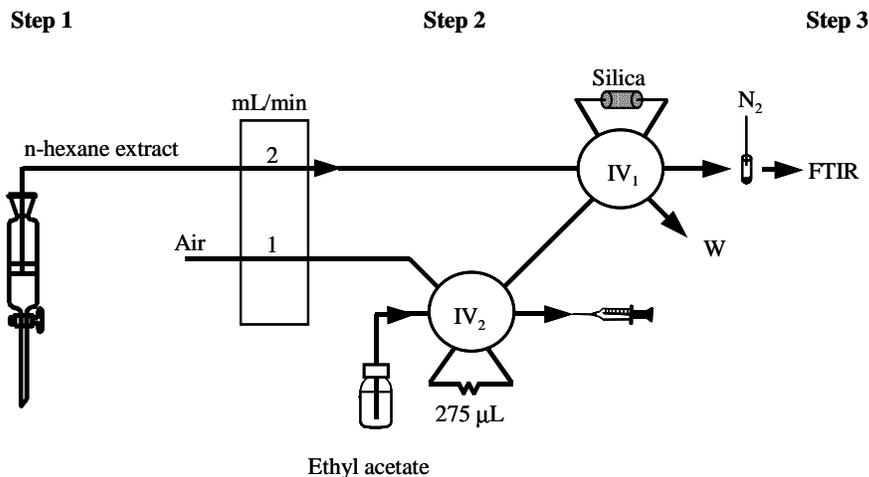
All chemicals and sorbents were of analytical grade or better. The following pesticides were studied: aldrin, captan, captafol, chlorbensid, chlordane, dichlofuanid,

dicloran, dicofol, dieldrin,  $\alpha$ ,  $\beta$ -endosulfan (3:1, w/w), endosulfan sulphate, endrin, hexachlorobenzene (HCB), heptachlor, iprodione,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ -hexachlorohexane ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - and  $\gamma$ -HCH 1:1:1:1, w/w), methoxychlor, procymidone, vinclozolin, bifenthrin,  $\lambda$ -cyhalothrin, deltamethrin, fenpropathrin, fenvalerate (cis and trans isomers), permethrin (cis and trans isomers), cyfluthrin isomers, cypermethrin isomers, and piperonyl butoxide. All were obtained from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). The silica sorbent was obtained from Varian (Zug, Switzerland). HPLC grade solvents (ethyl acetate, n-hexane, isopropanol, acetonitrile) were purchased from Sigma-Aldrich (Vienna, Austria).

Stock standard solutions of each pesticide were prepared in acetone (except HCB that was dissolved in dichloromethane) at concentrations of 5 mg/mL, and stored in glass stoppered bottles in the dark at 4 °C. Working standard solutions were obtained by appropriate dilution with n-hexane or acetone.

### *2.3. Protocol for preconcentration, clean-up and measurement by ATR-FTIR spectrometry*

The continuous clean-up system designed is shown in Figure 1. A volume of 10 mL of the n-hexane phase obtained from pesticide standards or aqueous samples after liquid-liquid extraction (see next section) was aspirated at 2 mL/min. Dichlofuanid, captan and/or fenpropathrin concentration in n-hexane phase was 0.0-0.2  $\mu$ g/mL. All pesticides were adsorbed on the 50 mg silica column located in the loop of injection



**Figure 1.** Experimental set-up for screening of pesticides in water samples. P=peristaltic pump; IV= injection valve; W=waste; FTIR=Fourier transform infrared spectrometer. (1)=Liquid-liquid extraction of water sample; (2)=Clean-up and preconcentration by continuous SPE system; (3)=Recording of ATR-FTIR.

valve 1 (IV<sub>1</sub>), and the sample matrix was sent to waste. Simultaneously, the loop of the second injection valve (IV<sub>2</sub>) was filled with ethyl acetate by means of a syringe. Any residual organic solvent remaining inside the column and the connectors was flushed by passing an air stream through the carrier line at 1 mL/min for 4 min. Next, IV<sub>2</sub> was switched to pass the loop contents (275 µL of ethyl acetate) at 1 mL/min through the column, in opposite direction to the sample, in order to elute the pesticides. The whole organic extract was collected in a glass vial, evaporated to dryness under a N<sub>2</sub> stream and redissolved in 10 µL of ethyl acetate. A 5 µL aliquot was transferred onto the ATR crystal and allowed to dry. Spectra were recorded after complete drying of the sample. Spectra of the clean and dry ATR crystal were used for the background.

Between samples, the sorbent column was cleaned, without removal from the continuous SPE system, with 0.5 mL of isopropanol and then conditioned with 0.5 mL of acetonitrile and 1 mL of n-hexane. Under these conditions, the sorbent column was useable for about three months.

#### *2.4. Water sample pretreatment and liquid-liquid extraction*

Apart from the synthetic pesticide standards in n-hexane, aqueous samples were analysed with a previous liquid-liquid extraction step. Fresh water samples from Vienna rivers and tap water were collected in amber glass bottles. A volume of 1 mL of 0.1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  per liter of water sample (final concentration of  $10^{-4}$  M) was added on site to suppress the interferences of chlorine and humic and fulvic acids. All samples were filtered through a Micro Separations Inc. 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filter (Westboro, MA, USA) to remove particulate matter. In order to avoid degradation of some of the pesticides under alkaline conditions [20], the pH of all water samples was adjusted to 5-6. Water samples were kept in the dark at 4°C from collection to analysis, being analysed within two days. A volume of 0.5 L of water sample was placed into an extraction funnel with 12 mL of n-hexane. The mixture was shaken for 10 min and allowed to settle. Then, 10 mL of the n-hexane phase were continuously aspirated into the flow system.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

Preliminary investigations were performed in order to optimise the recording of the FTIR spectra with the ATR cell (see step 3 of the complete experimental protocol

---

---

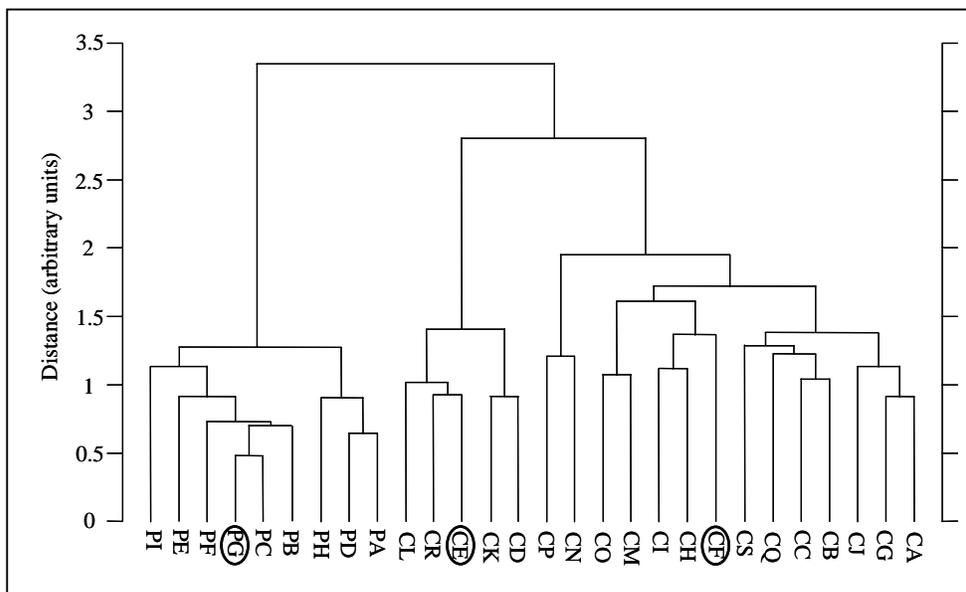
below) and to evaluate the information content and similarity of the FTIR spectra of 28 different organochlorine and pyrethroid pesticides.

### *3.1. Optimization of ATR measurements*

To remove the interfering absorbance of the solvent (ethyl acetate) [21], the samples were allowed to dry on the ATR crystal. In order to achieve the maximum sample volume which provides a homogeneous dry film on the ATR crystal, different volumes of ethyl acetate between 1 and 10  $\mu\text{L}$ , containing 1  $\mu\text{g}$  of dichlofuanid were tested. Spectra were recorded and results showed that the maximum applicable volume was 5  $\mu\text{L}$ . For higher volumes, spectra were less reproducible, as solvent evaporation forced the analyte to form a ring on the ATR crystal limits.

### *3.2. Hierarchical cluster analysis of FTIR spectra of pesticides*

In order to perform hierarchical cluster analysis FTIR spectra of 19 organochlorine pesticides (OCPs) and 9 pyrethroid pesticides were recorded after transferring 1  $\mu\text{L}$  aliquots of 1 mg/mL solutions in acetone onto the ATR crystal and allowing to dry. The FTIR spectra were vector normalized and Ward's algorithm was used for clustering and creating dendrograms. Different wavenumber regions from 4000 to 500  $\text{cm}^{-1}$  of the normalized spectra were tested, obtaining optimal results with the spectral region between 575 and 1850  $\text{cm}^{-1}$ . The clustering results are shown in Figure 2. As can be seen, using FTIR spectrometry the pyrethroid pesticides can be clearly distinguished from OCPs, whereas OCPs are divided into two subgroups.



**Figure 2.** Dendrogram calculated from the normalized MIR spectra of 19 organochlorine pesticides and 9 pyrethroid pesticides. Pesticides selected for PLS are marked with a circle. CA=aldrin; CB=dieldrin; CC=endrin; CD=captafol; CE=captan; CF=dichlofuanid; CG=chlordane; CH=endosulfan sulphate; CI= $\alpha$ -, $\beta$ -endosulfan; CJ=heptachlor; CK=procymidone; CL=vinclozolin; CM=chlorbensid; CN=dicloran; CO=dicofol; CP=HCB; CQ= $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -HCH; CR=iprodione; CS=methoxychlor; PA=bifenthrin; PB=cyfluthrin; PC=deltamethrin; PD= $\lambda$ -cyhalothrin; PE=permethrin; PF=fenvalerate; PG=fenpropathrin; PH=cypermethrin; PI=piperonyl butoxide.

### 3.3. Determination of selected pesticides in water

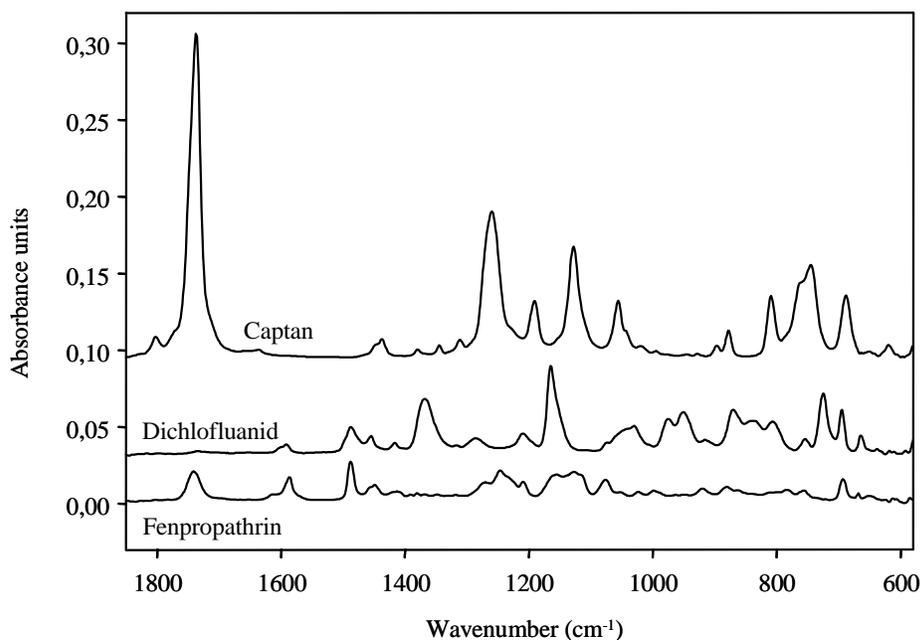
According to the clustering results, one pesticide from each cluster was selected for consequent multianalyte determination by PLS calibration: dichlofuanid, captan and fenpropathrin. The corresponding spectra are shown in Figure 3.

The proposed FTIR screening method of pesticides in waters can be divided into the following four analysis steps (see also Figure 1):

1. Liquid-liquid extraction of water sample with n-hexane.

2. Clean-up and preconcentration of the n-hexane phase using a continuous SPE system.
3. Transfer of the preconcentrated extract onto the ATR and recording of FTIR spectrum of the dried extract.
4. Quantitation based on PLS calibration (established using standards in n-hexane).

In the next sections the optimisation of the continuous SPE system, the establishing of the PLS calibration and the analysis of water samples including optimisation of the extraction step will be described in detail.



**Figure 3.** FTIR spectra of pesticides selected for PLS calibration: captan; dichlofluanid (offset: 0.03 a.u.) and fenpropathrin (offset: 0.09). 1  $\mu$ L of 1 mg/mL solutions in acetone were transferred onto the ATR and allowed to dry.

### 3.4. Continuous SPE system

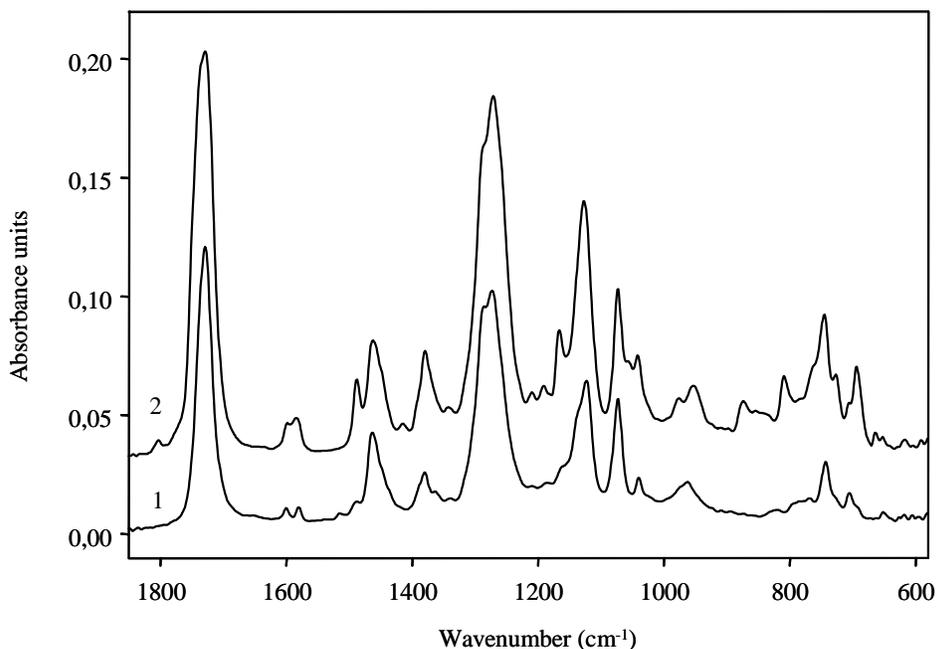
Recently, our working group has developed a method for the determination of organochlorine (OCPs) and pyrethroid pesticides in fruits and vegetables based on automated sample preparation and clean-up using a flow system and final separation and quantitation by GC-ECD [22,23]. In these investigations it was found that for sample clean-up a liquid-liquid extraction step with n-hexane followed by further SPE using a silica column and elution of the analytes with ethyl acetate was highly efficient. For the present study the experimental conditions optimised for GC-ECD detection had to be adopted to the needs of ATR-FTIR spectrometry. However, as the minimum amount of pesticide on the ATR needed to obtain satisfying FTIR spectra was between 0.1 and 0.2  $\mu\text{g}$  the flow system was modified in order to handle bigger analyte amounts.

The sorbent capacity of the 50 mg silica column was evaluated in previous works [22,23], being  $\sim 14$   $\mu\text{g}$  of pesticide, which was sufficient for the present FTIR study. Therefore only the effect of the eluent volume had to be studied. The elution volume was varied in the range of 175 to 500  $\mu\text{L}$  and the completeness of elution checked by a second elution step. Complete elution of analytes was obtained with a single injection of 275  $\mu\text{L}$  of ethyl acetate.

In order to achieve maximum preconcentration, n-hexane solutions of 5 to 20 mL (20 mL being the previously determined [22,23] breakthrough volume) containing 2  $\mu\text{g}$  of dichlofuanid, captan and fenpropathrin were passed through the flow system. Results showed that despite using HPLC grade solvents, the solvents contained some impurities that were retained on the silica column and eluted with the ethyl acetate. The

bigger the n-hexane volume, the stronger was the influence of these impurities in the final spectra. Because of this solvent purity problem, a loaded n-hexane volume of 10 mL was selected as a compromise between maximum preconcentration factor and optimal spectral quality.

Figure 4 shows the ATR-FTIR spectra of a 10 mL n-hexane blank and a 10 mL pesticide standard (0.2  $\mu\text{g/mL}$  dichlofuanid, captan and fenpropathrin) after continuous SPE treatment and drying as described in Experimental Section.



**Figure 4.** ATR-FTIR spectra of a 10 mL n-hexane blank (1) and a 10 mL pesticide standard (0.2  $\mu\text{g/mL}$  dichlofuanid, captan and fenpropathrin) (2, offset: 0.03) after continuous SPE treatment and drying as described in Experimental Section.

### 3.5. Partial least square calibration

The PLS calibration set comprised the following samples (Table 1): samples (no. 1-8) of 10 mL n-hexane solutions containing all possible ternary combinations of the three selected pesticides at two concentration levels; samples (no. 9-11) containing only one of the pesticides, samples (no. 12-17) containing binary and ternary combinations at varying concentrations and solutions (no. 18-20) without analytes (flow system blanks). All these solutions were in the range of 0.00 to 0.2  $\mu\text{g/mL}$  for the analytes (corresponding to 0.0 to 4.8  $\mu\text{g/L}$  in 0.5 L water samples). 10 mL of all calibration standards were prepared and passed through the flow system in duplicate. Calibration models were validated by cross-validation, using a leave-one-out procedure.

Because of the influence of the solvent impurities in the spectra, it was important to select the optimal wavenumber range in the calibration method. Several ranges were tested starting with the full spectra. Then, ranges were selected taking into account spectral regions where the flow system blank spectrum exhibited lower absorptions and each analyte spectrum exhibited higher absorptions. Regions where the flow system blank spectrum dominated the total spectrum were excluded from calibration. For each pesticide separately, calibration models were constructed using different wavenumber ranges and their combinations, and original, first- and second-derivative data were used.

**Table 1.** Analyte concentrations in n-hexane phase for the different mixtures of the calibration set.

Sample number	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Dichlofuanid	Captan	Fenprothrin
1	0.2	0.2	0.2
2	0.2	0.2	0.05
3	0.2	0.05	0.2
4	0.05	0.2	0.2
5	0.2	0.05	0.05
6	0.05	0.05	0.2
7	0.05	0.2	0.05
8	0.05	0.05	0.05
9	0.1	0.0	0.0
10	0.0	0.1	0.0
11	0.0	0.0	0.1
12	0.1	0.1	0.05
13	0.1	0.05	0.2
14	0.07	0.1	0.07
15	0.0	0.1	0.07
16	0.2	0.0	0.1
17	0.05	0.07	0.0
18	0.0	0.0	0.0
19	0.0	0.0	0.0
20	0.0	0.0	0.0

The results were always better using first-derivative data (Savitzky-Golay with 13 smoothing points) than original spectra, and the best model for each pesticide was constructed using a combination of different wavenumber ranges. Parameters for these optimal models are listed in Table 2. The optimal number of PLS components was four to five in all cases, which was the same as the number of analytes plus the effect of

solvent impurities. The root mean square error of cross validation (RMSECV) was acceptable, ranging between 0.015 and 0.019  $\mu\text{g/mL}$ .

**Table 2.** PLS calibration parameters for the three selected pesticides, using first-derivative preprocessing.

Pesticide	Wavelength intervals ( $\text{cm}^{-1}$ )	PLS components	$R^2$	RMSECV
Dichlofuanid	1504-1476 990-920 890-785	4	93.72	0.171
Captan	1825-1789 700-540	4	95.16	0.149
Fenprothrin	1423-1403 1355-1330 1000-990 890-785	4	92.68	0.193

### 3.6. Application to water samples

Prior to the screening of water samples, the n-hexane liquid-liquid extraction step was optimised. For this purpose 0.5 L of water samples containing 10  $\mu\text{g/L}$  of each pesticide were used. n-Hexane volumes from 10 to 50 mL and extraction times of 2 to 15 min were investigated. The minimum volume of n-hexane and minimum time required for complete extraction of the analytes were found to be 10 mL and 10 min, respectively.

The proposed system was applied to the screening of dichlofuanid, captan and fenprothrin in tap and river waters. In all cases, the pH of the water samples ranged from 6.7 to 8.3. In order to avoid degradation, they were preconditioned with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  and their pH was adjusted to the optimum range (5-6) with dilute  $\text{HNO}_3$  as soon as

possible after collection. No natural samples containing pesticide residues at detectable concentrations could be obtained, therefore a recovery test was carried out.

Recoveries of analytes were studied in tap and river water. For this purpose, volumes of 0.5 L of each water were preconditioned as described in Experimental Section, and fortified with 1.2  $\mu\text{g}$  of each selected pesticide from standard solutions in acetone. After the addition, the spiked water was slightly shaken and then analysed in triplicate, using the proposed method. Results are shown in Table 3. In both cases, the lowest recoveries were obtained for captan, which can be ascribed to its being either partially irreversibly bound to the matrices or degraded during contamination time, as shown in previous studies with water samples [3].

**Table 3.** Mean recoveries ( $\pm$  RSD) in the analysis of tap and river water spiked at 2.4  $\mu\text{g/L}$  (n=3).

Water sample	Dichlofuanid	Captan	Fenprothrin
Tap water	88 $\pm$ 4	66 $\pm$ 6	102 $\pm$ 7
River water	92 $\pm$ 3	70 $\pm$ 7	89 $\pm$ 3

#### 4. CONCLUSIONS

This study clearly showed the capability of FTIR spectrometry to group pesticides according to their chemical structure as well as their simultaneous quantitative determination in fresh water samples. For the latter purpose FTIR spectra of organic extracts obtained by a sequence of sample pretreatment steps were recorded but time consuming and expensive chromatographic separation steps avoided. A major

difficulty encountered, however, was the strong spectral influence of remaining matrix molecules and solvent impurities. Nevertheless, due to the high information content of FTIR spectrometry this technique holds promise to be used in fast screening methods which would allow fast qualitative information on the pesticide contamination of a sample and simultaneously providing information on the group of pesticides present. Development of such fast screening techniques is one of the current goals in modern analytical chemistry. These techniques are needed for fast decision making and to allow the efficient use of expensive and time consuming standard methods for pesticide analysis which mostly require a chromatographic separation step and subsequent sensitive detection of the separated analytes. Future work will therefore concentrate on improving the sample clean-up step which was identified as the key for successful screening analysis by FTIR spectrometry.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

A. Columé is grateful for a training fellowship at the Marie Curie Training Site on Advanced and Applied Vibrational Spectroscopy (ADVIS) in Vienna. Further S.D. and B.L. thank the Austrian Science Fund for further financial support within the project 13686.

---

**REFERENCES**

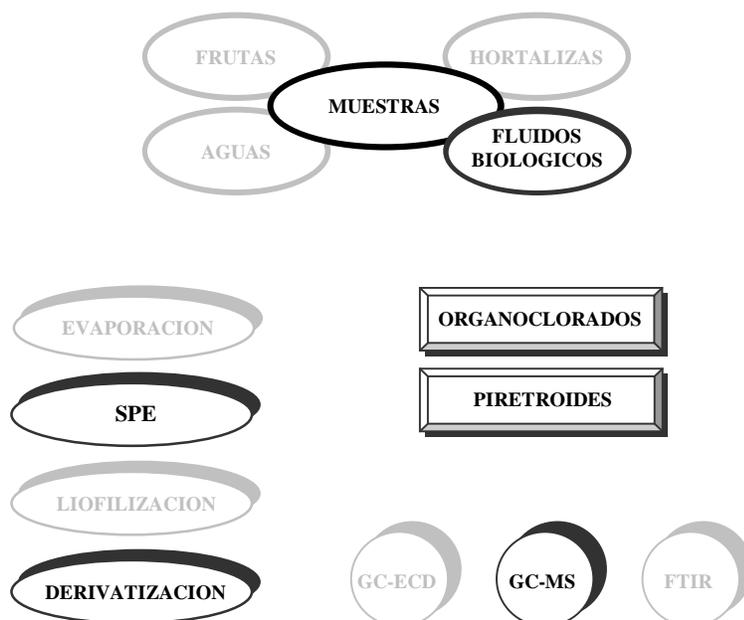
- [1] *Official Journal of the European Communities L229/11*, Community Directive 80/778/CCE (European Community, Brussels, 1980).
- [2] F. Regan, M. Meaney, J. G. Vos, B. D. MacCraith, and J. E. Walsh, *Anal. Chim. Acta* 334 (1996) 85.
- [3] A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, and M. Valcárcel, *Talanta* 54 (2001) 943.
- [4] T. A. Albanis, D. G. Hela, T. M. Sakellarides, and I. K. Konstantinou, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 59.
- [5] A. R. Fernández-Alba, A. Agüera, M. Contreras, G. Peñuela, I. Ferrer, and D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 35.
- [6] E. Pocurrull, C. Aguilar, F. Borrull, and R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 818 (1998) 85.
- [7] A. Termonia and M. Termonia, *J. High Resolut. Chromatogr.* 20 (1997) 447.
- [8] M. J. Almond and S. J. Knowles, *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 1128.
- [9] K. K. Sharma, S. Gupta, and S. K. Handa, *Talanta* 44 (1997) 2075.
- [10] M. Gallignani, S. Garrigues, A. Martinez-Vado, and M. de la Guardia, *Analyst* 118 (1993) 1043.
- [11] A. R. Cassella, R. Jorgensen-Cassella, S. Garrigues, R. E. Santelli, R. C. de Campos, and M. de la Guardia, *Analyst* 125 (2000) 1829.
- [12] A. R. Cassella, S. Garrigues, R. C. de Campos and M. de la Guardia, *Talanta* 54 (2001) 1087.

- 
- [13] R. Zanella, R. M. Dallago, E. M. M. Flores, A. F. Martins, *Analytical Letters* 32 (1999) 593 .
- [14] S. Gaguirres, M. de la Guardia, A. R. Cassella, R. C. de Campos, R. E. Santelli, R. Jorgensen, *Analyst* 125 (2000) 1829.
- [15] J. C. Jones, D. Littlejohn, and P. R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 792.
- [16] K. L. Norton and P. R. Griffiths, *J. Chromatogr. A* 703 (1995) 503.
- [17] D. F. Gurka, S. Pyle, R. Titus, and E. Shafter, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2521.
- [18] J. Knecht, *Spectrosc. Eur.* 4 (1992) 21.
- [19] T. Visser and M. J. Vredenburg, *Anal. Chim. Acta* 240 (1990) 205.
- [20] C. Tomlin (Ed.), *The Pesticide Manual, 10<sup>th</sup> Ed.*, British Crop Protection Council (The Royal Society of Chemistry, London, 1994).
- [21] A. Edelmann, J. Diewok, K. C. Schuster, and B. Lendl, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1139.
- [22] A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, and M. Valcárcel, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1109.
- [23] A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, and M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 153.



**CAPITULO V:  
PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS  
Y METABOLITOS DE PIRETROIDES  
EN FLUIDOS BIOLOGICOS**

**CHAPTER V:  
ORGANOCHLORINE PESTICIDES AND  
PYRETHROID METABOLITES  
IN BIOLOGICAL FLUIDS**





Los aplicadores y trabajadores de las plantas de fabricación y formulación de plaguicidas presentan un gran riesgo de contaminación por estas sustancias tóxicas. Los plaguicidas pueden ser absorbidos por el organismo a través de tres vías: dérmica, respiratoria y oral. La absorción a través de la piel puede deberse a contactos directos con el plaguicida, o bien como consecuencia de su vehiculación a través del aire. La vía dérmica se considera la principal en la aplicación en el campo, y también juega un papel importante en la exposición de los trabajadores en las plantas de formulación y, en cualquier situación donde pueda existir una deriva de plaguicidas en aire. En cuanto a la vía respiratoria, depende de la volatilidad del ingrediente activo en la formulación,

aunque en general todos los fumigantes pueden ser absorbidos por esta vía. Probablemente la exposición oral más importante ocurre como consecuencia de salpicaduras accidentales de plaguicida líquido dentro de la boca, y también por frotamientos de la zona bucal, o el hecho de comer o fumar, con las manos contaminadas. Además, las sustancias inhaladas pueden ser absorbidas secundariamente por vía digestiva [1].

El control biológico contempla la absorción por estas tres vías, proporcionando el mejor reflejo de la exposición laboral a plaguicidas. Este método está basado en los conocimientos sobre metabolismo (toxocinética) y mecanismos de acción (toxodinamia) de estas sustancias en el organismo humano. Los indicadores biológicos de exposición son principalmente la orina y la sangre. En el caso de los plaguicidas organoclorados, éstos pueden acumularse en el tejido adiposo. Cuando se produce una pérdida de este tejido, los plaguicidas en él acumulados pasan al torrente sanguíneo, donde pueden ser determinados sin metabolizar. A partir de aquí pueden excretarse como tales [2,3] o como metabolitos, aunque se han identificados muy pocos (ej. el DDT se excreta en orina como DDA). Sin embargo, los piretroides son metabolizados completamente, dando lugar fundamentalmente a tres metabolitos en orina: DCCA, DBCA y PBA [4-6].

En este capítulo se desarrolla una metodología automática para la evaluación por exposición a plaguicidas organoclorados y piretroides, la cual se aplicó al análisis de muestras de orina de la doctoranda para constatar la posible contaminación sufrida a lo largo de la realización de esta Memoria.

## REFERENCIAS

- [1] E. Alday et al., *Toxicología Laboral Básica*, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Sevilla, 1989.
- [2] K. Wittke, H. Hajimiragha, L. Dunemann, J. Begerow, *LaborPraxis*, 24 (2000)62.
- [3] E. E. Petty, J. J. Johnston, S. A. Volz, *J. Chromatogr. Sci.* 35 (1997) 430.
- [4] *Directiva Comunitaria 76/895/CEE*, DO L 340, Comunidad Europea, Bruselas, 1976.
- [5] F. J. Arrebola, J. L. Martínez-Vidal, A. Fernández-Gutierrez, M. H. Akhtar, *Anal. Chim. Acta* 401 (1999) 45.
- [6] G. Leng, K. H. Kuehn, A. Leng, W. Gries, J. Lewalter, H. Idel, *Chromatographia* 46 (1997) 265.



## Solid-phase extraction method for the screening and determination of pyrethroid metabolites and organochlorine pesticides in human urine

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel

*Analytical Chemistry Division, Campus de Rabanales, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain*

Received 9 July 2001; received in revised form 22 August 2001; accepted 23 August 2001

### Abstract

A screening method has been developed for the determination of 23 organochlorine pesticides (OCPs) and 3 pyrethroid metabolites [cis- and trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid, cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid and 3-phenoxybenzoic acid] from human urine. OCPs were directly detected in urine samples while pyrethroid metabolites required acid-induced hydrolysis to convert their conjugates into free acids; all compounds were then cleaned-up/preconcentrated using solid-phase extraction. Determination and quantitation was achieved by gas chromatography with a mass spectrometer detector operating in selected ion monitoring mode. Limits of detection varied between 0.1 and 0.3 ng/mL with linear ranges from 0.3 to 700 ng/mL; the precision of the method was high (4.3-7.2 %). Recoveries of all analytes from urine samples fortified at levels of 30 ng/mL for each OCP and 15 ng/mL for each pyrethroid metabolite ranged from 88 to 101 % (captan gave the lowest recovery). The results obtained from the analysis of real urine samples show the suitability of the proposed method for monitoring people exposed to organochlorine and pyrethroid pesticides.

## 1. INTRODUCTION

Pesticides have the capacity to cause adverse effects due to their biocide properties, therefore being dangerous for people exposed to them. Usually, subjects who apply pesticides in agricultural fields or work in pesticide factories, are the most likely to suffer acute and chronic intoxications. Many factors are involved in pesticide toxicity, such the physical and chemical properties of the pesticide, exposure conditions or individual human factors. The most important absorption routes for exposed people are through the skin and by inhalation [1-8]. Organochlorine pesticides (OCPs) and pyrethroids are widely used to control pests in yields and, in addition pyrethroids are employed as home insecticides. In urine samples, OCPs are mainly found as their parent forms, while pyrethroids are rapidly metabolized being then eliminated as conjugates [9-11].

Rapid analytical systems are of increased interest for biological monitoring. In this context, pesticide monitoring in urine is a good option, because it provides a simple matrix and non-invasive collection. Pyrethroid metabolites are usually determined in urine by using gas chromatographic techniques (GC) with mass spectrometric (MS) [12-15] or electron capture detection (ECD) [16]. Liquid-liquid extraction (LLE) with n-hexane is the most commonly used sample pretreatment [12-16], requiring in some cases additional solid-phase extraction (SPE) on RP-C<sub>18</sub> [12,13] or silica-gel cartridges [16]. GC is unmatched in terms of resolution and sensitivity of detectors but requires preliminary derivatization of pyrethroid metabolites to render them sufficiently volatile for separation. The most common derivatization methods involve silylation of

carboxylic acid metabolites with methanol [15] or hexafluoroisopropyl (HFIP) with diisopropylcarbodiimide (DIC) [12-14,16]. OCPs do not require derivatization for their chromatographic separation on account of their higher volatility. Only one method has been proposed for their determination in human urine, which used ECD detection [17].

Several approaches have been devised for separation of the analytes from matrix elements and preconcentration purposes, implementing liquid-liquid extraction and solid-phase extraction. LLE is used to a lesser extent however, due to its inherent disadvantages (*viz.* laborious, time-consuming manipulations, the need to use large volumes of sample and organic solvents). SPE has rapidly established itself as an alternative to the sample pretreatment as it provides many advantages, including high recoveries of analytes, effective concentration, highly purified extracts and easy automation which drastically reduces the organic solvent consumption [18]. In this context, the aim of the proposed method was to develop an automatic, fast and sensitive SPE method for the screening and determination of OCPs and pyrethroid metabolites in urine samples for human monitoring. Taking into account that pyrethroids are extensively metabolized through conjugation, hydrolysis of urine samples is required in order to obtain their respective free carboxylic acids, which are further derivatized. This previous step is not needed for determination of OCPs as they are excreted unchanged, which simplifies the analytical procedure. Hydrolyzed or non-hydrolyzed urine samples were clean-up and preconcentrated onto a RP-C<sub>18</sub> minicolumn, being the eluate injected into the GC-MS system for separation and identification of the pyrethroid metabolites or OCPs, respectively.

## 2. EXPERIMENTAL SECTION

### 2.1. Chemicals and standards

Stock standard solutions of aldrin, captan, captafol, chlorbensid, chlordane, dichlofuanid, dichloran, dicofol, dieldrin,  $\alpha$ - and  $\beta$ -endosulfan (3:1, w/w), endosulfan sulphate, endrin, hexachlorobenzene (HCB), heptachlor, iprodione,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - and  $\gamma$ -hexachlorohexane ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - and  $\gamma$ -HCH 1:1:1:1, w/w), methoxychlor, procymidone, vinclozolin and  $\lambda$ -cyhalothrin (internal standard, IS) [supplied by Riedel-de-Haën (Seelze, Germany)], were prepared in acetone (with the exception of HCB which was dissolved in dichloromethane), at concentrations of 5 mg/mL. Pyrethroid metabolites: cis- and trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid (cis- and trans-DCCA), cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid (cis-DBCA) and 3-phenoxybenzoic acid (PBA) were commercially available from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) and prepared in methanol, at concentrations of 2  $\mu$ g/mL (DCCA, DBCA) and 20  $\mu$ g/mL (PBA). RP-C<sub>18</sub> HPLC sorbent was supplied by Sigma (Madrid, Spain). Derivatization reagents: 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP) and diisopropylcarbodiimide (DIC) were supplied from Aldrich (Madrid, Spain). Solvents (ethyl acetate, n-hexane, methanol) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

All stock standard solutions were stored in glass stoppered bottles in the dark at 4°C. Individual and cumulative working standard solutions were obtained by appropriate dilution of the stocks in methanol. The mixture of eluent-derivatizing

reagents was prepared by mixing DIC, HFIP and ethyl acetate (eluent) at volume ratios of 5 + 10 + 85.

## 2.2. Equipment

Pesticide separation were carried out on a Fisons 8000 GC instrument interfaced to a Fisons MD800 mass spectrometer and controlled by a computer running MASSLAB software (ThermoQuest, Madrid, Spain) and using a fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m) coated with 5% phenyl-methylpolysiloxane (Supelco, Madrid, Spain). Ultrapure helium (6.0 Air Liquide), at a flow-rate of 1 mL/min, was employed as the carrier gas. For OCP determination, the column was maintained at 70°C for 10 min and programmed from 70°C to 285°C at 10°C/min, holding for 10 min at 270°C. In the case of pyrethroid metabolite determination, the temperature programme was as above but without holding at 270°C for 10 min. The injection port and transfer line temperatures were maintained at 225°C and 300°C, respectively. The ion source temperature was 200°C for the 70 eV electron impact ionization mode. The mass spectrometer was operated in the selected ion monitoring (SIM) mode, selecting three  $m/z$  values for each analyte which are listed in Table 1. For quantitation, the particular ion in each case was selected on the basis of sensitivity and selectivity. In all analyses, 1  $\mu$ L of the organic extract was injected in the split mode (1:25 ratio).

The flow system comprised a peristaltic pump (Gilson Minipuls-2) and two Rheodyne 5041 injection valves. Poly(vinyl chloride) and Solvaflex pumping tubes for

aqueous solutions and n-hexane/methanol solvents, respectively, PTFE tubing (0.5 mm i.d.) and commercially available connectors were also employed. A sorbent column was prepared by packing a commercial Omnifit glass column (2 cm x 2.5 mm i.d.) with ~40 mg of RP-C<sub>18</sub> sorbent material; small cotton beads were used on the ends to prevent material losses. A glass column (3 cm x 5 mm i.d., packed with cotton wool) was also constructed for filtration purposes.

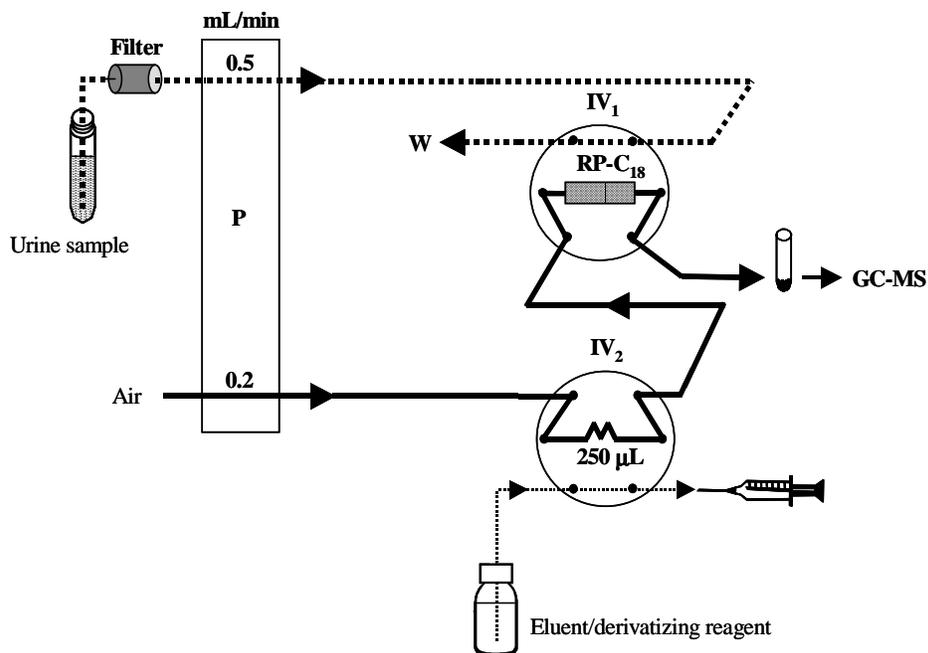
### 2.3. Sampling and hydrolysis of urine samples

Urine samples were collected in sterilized containers and frozen immediately (-20°C) until analysis. For pyrethroid metabolite determination, the conjugates were hydrolyzed by heating 3 mL of urine sample plus 0.5 mL of concentrate H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in a screw-capped glass centrifuge tube, which was immersed in an oil bath at 100°C for 1 h. After cooling at room temperature, the hydrolyzed urine sample was adjusted to pH 2 with dilute NaOH up to 5 mL. For OCP determination, 3 mL of urine sample were diluted in a glass tube to 5 mL with distilled water being adjusted to pH 3 with dilute HNO<sub>3</sub>. Then, the whole sample volume (5 mL), containing the analytes, was continuously aspirated and filtered into the solid-phase extraction system of Figure 1.

### 2.4. Solid-phase extraction method

The continuous SPE system used to extract the pyrethroid metabolites or OCPs from hydrolyzed or non-hydrolyzed urine samples, respectively, is depicted in Figure 1. A volume of 5 mL of standard solution or hydrolyzed/non-hydrolyzed sample

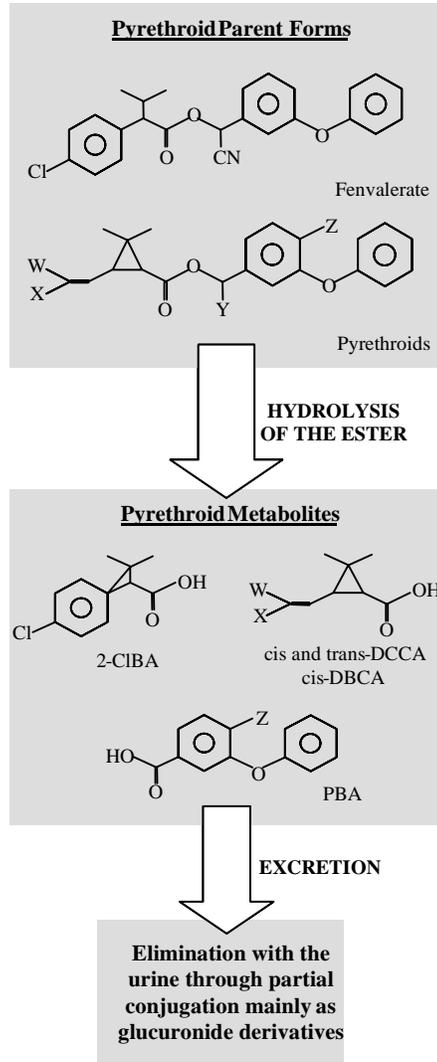
containing 0.3-700 ng/mL of analytes, was aspirated at 0.5 mL/min through a cotton filter to prevent suspended particles from reaching the continuous unit. All analytes were adsorbed on the RP-C<sub>18</sub> column located in the loop of injection valve 1 (IV<sub>1</sub>), and the sample matrix was sent to waste. Simultaneously, the loop of the second injection valve (IV<sub>2</sub>) was filled with the eluent containing the derivatizing reagent for pyrethroid metabolites (10% HFIP, 5% DIC and 1 µg/mL of IS in ethyl acetate) by means of a syringe. Traces of aqueous solution from the sample remaining inside the column and the connectors were flushed by passing an air stream through the sample line at 0.5 mL/min for 4 min. Next, IV<sub>2</sub> was switched and the loop contents (250 µL of eluent/derivatizing reagent) driven by an air stream at 0.2 mL/min through the column, in the opposite direction to the sample, in order to elute analytes. The whole organic extract was collected in a glass vial containing anhydrous sodium sulphate and a 1 µL aliquot was injected into the gas chromatograph for analysis. Between samples, the sorbent column was cleaned with 250 µL of 3 mol/L HNO<sub>3</sub> followed of 250 µL of methanol by filling the loop of IV<sub>2</sub>, to remove potentially retained interferents. Finally, the column was conditioned with 0.5 mL of ethyl acetate and 1 mL of aqueous solution at pH 2. Under these conditions, the sorbent column was serviceable for about two weeks.



**Figure 1.** Continuous flow system developed for the pre-concentration/clean-up of OCPs and pyrethroid metabolites in urine samples. P=pump; IV=injection valve; W=waste; GC-MS=gas chromatograph with mass spectrometric detector.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

In the present work, organochlorine and pyrethroid pesticides (authorized and forbidden) have been selected taking into account that they are extensively used in the control of agricultural, forestry and stored products pests, and then potential contaminants for pest control operators. In mammals, pyrethroids are rapidly metabolized into their carboxylic acids [10-12], being eliminated in urine as conjugates (Figure 2). In this way, pyrethroids, such as  $\lambda$ -cyhalothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin and deltamethrin, are metabolized by hydrolytic ester cleavage, being



**Figure 2.** General structures of pyrethroids and their main metabolites in mammals.  $\lambda$ -Cyhalothrin (W=CF<sub>3</sub>; X=Cl; Y=CN; Z=H); permethrin (W=X=Cl; Y=H; Z=H); cyfluthrin (W=X=Cl; Y=CN; Z=F); cypermethrin (W=X=Cl; Y=CN; Z=H); deltamethrin (W=X=Br; Y=CN; Z=H); 2-CIBA=2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutyric acid; cis and trans-DCCA=cis and trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid; cis-DBCA=cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid; PBA=3-phenoxybenzoic acid.

mainly their metabolites cis- and trans-DCCA, cis-DBCA and 3-phenoxybenzoic acid (PBA), while fenvalerate is converted into PBA and 2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutyric acid (2-CIBA). On the other hand, only a small fraction (lower than 10 %) of OCPs are metabolized, so that the parent forms could be found after exposition in urine and blood samples. A total of 23 OCPs was included in this study and, with respect to pyrethroid metabolites, cis- and trans-DCCA, cis-DBCA and PBA were selected. 2-CIBA was not included in this work because the standard product was not available; notwithstanding this, its identification could be achieved by using its mass spectrum, if required.

### *3.1. Optimization of the solid-phase extraction system*

In order to apply the method directly to urine samples, all experiments were carried out by preparing the analytes in aqueous medium. Preliminary experiments were aimed at selecting the best sorbent and eluent for the SPE system. For this purpose, non polar (RP-C<sub>18</sub>) and polar (silica gel) sorbents were tested. First, the adsorption efficiency was examined by using columns packed with 60 mg of each sorbent material and aliquots of 5 mL of aqueous solution (pH 5), containing 50 ng/mL of each analyte (OCPs and pyrethroid metabolites), was aspirated at 0.5 mL/min through each column. These aliquots of 5 mL of sample were collected in glass vials before (100% recovery) and after (variable adsorption recovery) the sorbent column, extracted with 5 mL of ethyl acetate and evaporated to dryness under N<sub>2</sub>, being the residue redissolved in 200 µL of ethyl acetate. In order to derivatize pyrethroid metabolites, the solvent (ethyl

acetate) was spiked with 1% and 1.5% of HFIP and DIC, respectively [12,14] A 1  $\mu$ L aliquot of the extract was analyzed by GC. After each sample had been processed, the column was rinsed with ethyl acetate for 1 min to remove potentially adsorbed analytes. RP-C<sub>18</sub> exhibited the best sorption properties (~100% adsorption) whereas silica gel only provided average recoveries of ~60%. Different eluents (ethyl acetate, n-hexane and methanol) were evaluated with the RP-C<sub>18</sub> column at a fixed volume of 300  $\mu$ L, using a configuration similar to that depicted in Figure 1. Complete elution was only achieved with ethyl acetate; the other solvents provided lower efficiency (60% for n-hexane and 80% for methanol). The amount of sorbent material was optimized between 20 and 80 mg of RP-C<sub>18</sub>. Chromatographic signals increased with increasing amount of sorbent up to 40 mg, beyond which they remained virtually constant. A working column packed with 40 mg RP-C<sub>18</sub>, and 250  $\mu$ L of ethyl acetate as eluent were adopted for further experiments.

The influence of sample pH on the retention of OCPs and pyrethroid metabolites was studied over the range 1-9, adjusted with dilute HNO<sub>3</sub> or NaOH. Aldrin was the only OCP whose chromatographic signals remained almost constant in the interval assayed; for the rest of the OCPs, chromatographic areas increased with increasing pH, remaining virtually constant over the range 3.0-6.5, but decreasing at higher pH values. Pyrethroid metabolites have the maximum adsorption at pH 2, decreasing drastically at pH 3. Based on these two tendencies and taking in account that the signals for OCPs at pH 2 were slightly lower (~5%), a pH value of 2 was initially

selected as a compromise in order to prepare the standards in aqueous medium. By using 5 mL of aqueous standard solutions at pH 2 containing 50 ng/mL of each analyte, the influence of the sample and eluent flow-rate were examined over the range 0.1-1.0 mL/min. The best results were obtained at lower flow-rates as they ensured efficient retention and elution, thus resulting in higher chromatographic peak areas; so, 0.5 and 0.2 mL/min were chosen as sample and eluent flow-rate, respectively.

For derivatization of pyrethroid metabolites, the most usual reagent recommended in manual methods [12,14], a mixture of HFIP plus DIC, was selected. For this purpose, 5 mL of aqueous standards at pH 2 containing cis and trans-DCCA, cis-DBCA and PBA at a concentration of 50 ng/mL, was aspirated into the SPE system depicted in Figure 1. The derivatizing reagent was spiked at different concentrations and ratios to the eluent. The maximum peak areas and the best chromatographic resolution were obtained for a mixture of 10% (v/v) of HFIP and 5% (v/v) of DIC in ethyl acetate. The selected derivatizing reagent, spiked to the eluent, was tested on a standard solution containing only the 23 OCPs studied (50 ng/mL of each one in aqueous medium); the absence of interactions with the OCPs confirmed that pyrethroid metabolites and OCPs could be determined jointly by using the same SPE system.

Finally, the optimized SPE unit was tested for human urine. Aliquots of 3 mL of urine blank (uncontaminated of OCPs and pyrethroids) was spiked with 250 ng of each OCP and pyrethroid metabolites, adjusted to pH 2, diluted to 5 mL and then aspirated into the SPE system. No peaks corresponding to the matrix appeared at the

$m/z$  values selected for identification and quantitation of the analytes (SIM mode), then made possible the discrimination of all pesticides in urine samples.

### 3.2. Analytical figures of merit

The performance and reliability of the proposed on-line method (Figure 1) were assessed by determining the line of regression, linear range, analyte detectability and relative standard deviation for the analytes assayed. For this purpose, microliters of standard solutions in methanol containing all pesticides at variable concentrations were spiked to individual urine blank volumes of 3 mL, in the interval 0.1-700 ng/mL, adjusted to pH 2 (final volume 5 mL) and passed through the sorbent column.  $\lambda$ -Cyhalothrin was used as IS in preference to others because it was found to be compatible with the chromatographic behavior of the analytes and because if it was present in real samples, it would be completely metabolized, and hence it would not interfere in the proposed method; it was added to the eluent at a concentration of 1  $\mu\text{g/mL}$ . The curves were constructed by plotting the analyte-to-IS peak area ratio against the analyte concentration. Figures of merit of the proposed method are listed in Table 1. The detection limits (LOD) are calculated as the minimum concentration providing chromatographic signals three times higher than the background noise. The linear range was between 0.5 and 350 ng/mL for the majority of the analytes. The precision (repeatability) was calculated as the relative standard deviation obtained by measuring 11 samples containing the analytes at concentrations within the lower

**Table 1.** Figures of merit and  $m/z$  SIM values.

Compound	LOD (ng/mL)	Linear range (ng/mL)	Sensitivity <sup>a</sup> (10 <sup>-4</sup> )	$m/z$ <sup>b</sup>	Recovery (%)
cis and trans-DCCA	0.1	0.3-350	3.83	<b>163</b> , 191, <u>323</u>	93
cis-DBCA	0.1	0.5-350	0.97	172, 253, <b>367</b>	100
PBA	0.1	0.5-350	5.87	141, <b>197</b> , <u>364</u>	101
$\alpha$ -HCH	0.2	0.5-350	24.65	111, <b>181</b> , 219	94
HCB	0.1	0.5-350	8.65	249, 282, <b>284</b>	98
Dichloran	0.1	0.5-350	6.66	<b>124</b> , 176, <u>206</u>	97
$\beta$ -HCH	0.1	0.5-350	18.33	<b>109</b> , <u>181</u> , 219	93
$\gamma$ -HCH	0.1	0.5-350	19.65	111, <b>181</b> , 219	101
$\delta$ -HCH	0.1	0.5-350	16.29	111, <b>181</b> , 219	90
Vinclozolin	0.1	0.5-350	8.36	187, <b>212</b> , <u>285</u>	99
Heptachlor	0.2	0.7-350	8.71	<b>100</b> , <u>272</u> , 370	92
Dichlofuanid	0.2	0.7-350	5.80	<b>123</b> , <u>224</u> , 332	95
Aldrin	0.1	0.5-350	11.78	<b>66</b> , <u>263</u> , 298	100
Dicofol	0.1	0.5-350	4.17	111, <b>139</b> , 250	97
Captan	0.3	1.0-350	11.49	<b>79</b> , 264, 299	88
Procymidone	0.1	0.5-350	28.02	<b>96</b> , 255, 283	96
Chlorbensid	0.1	0.5-350	36.64	<b>125</b> , 127, 268	97
Chlordane	0.1	0.5-350	3.28	202, <b>373</b> , 408	101
$\alpha$ -Endosulfan	0.1	0.5-700	1.45	<b>195</b> , <u>241</u> , 339	98
Dieldrin	0.1	0.5-350	4.76	<b>79</b> , <u>263</u> , 378	96
Endrin	0.1	0.5-350	21.32	<b>67</b> , 317, 319	93
$\beta$ -Endosulfan	0.1	0.5-700	1.72	<b>195</b> , <u>241</u> , 339	95
Endosulfan sulphate	0.2	0.7-500	3.31	<b>272</b> , 387, 420	90
Captafol	0.1	0.5-700	1.05	<b>79</b> , <u>183</u> , 347	91
Iprodione	0.3	2.0-500	5.83	<b>56</b> , <u>314</u> , 329	95
Metoxychlor	0.1	0.5-700	1.30	<b>227</b> , 228, <u>344</u>	94

<sup>a</sup>Relative area (analyte/internal standard peak area ratio)/ng/mL; urine sample volume, 3 mL.

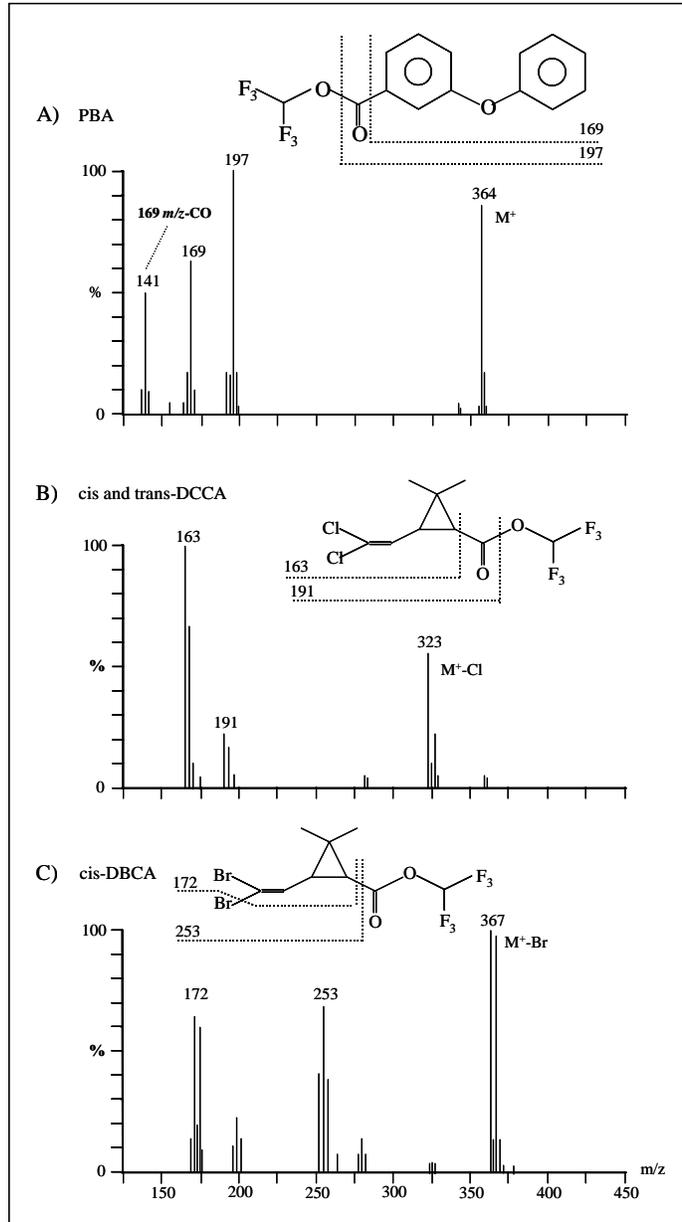
<sup>b</sup> $m/z$  values in italics are  $M^+$  ions; those in bold face correspond to the base peaks and those underlined are quantitation values.

concentration range of the calibration graphs and ranged from 4.3 to 7.2%. Figure 3 shows the full scan mass spectra corresponding to the three derivatized pyrethroid metabolites from an aqueous standard solution at pH 2. The three  $m/z$  values selected for the SIM mode acquisition are indicated in the spectra and the corresponding fragments are represented on the top of each spectrum. OCPs spectra are not included as they are more common and available in commercial libraries.

### 3.3. Applications

Since pyrethroid metabolites are mainly eliminated in urine as conjugates, an acid hydrolysis is needed to convert their conjugates into free acids. Taking into account that the standards of pyrethroids metabolites are not commercially available, the acid hydrolysis procedure recommended in manual methods [12, 13, 15] was adopted, which uses concentrate  $H_2SO_4$  and heating at  $100^\circ C$  for 1 h.

In order to perform only one analysis per sample and thus obtain one chromatogram, the influence of the hydrolysis process on OCPs was evaluated (even though they are excreted unchanged). For this purpose, urine blank samples containing 50 ng/mL of each OCP were hydrolyzed as described under "Sampling and hydrolysis of urine samples" but the results showed that OCPs were decomposed (~80%) during the hydrolysis process. From the above experiments it can be concluded that it is impossible to determine both families of compounds jointly and therefore two independent urine samples must be prepared, one hydrolyzed for pyrethroid metabolites and other non-hydrolyzed for OCPs. For this reason, each sample was adjusted to its



**Figure 3.** Full scan electron impact mass spectra for (A) PBA, (B) cis and trans-DCCA and (C) cis-DBCA, indicating the  $m/z$  fragment ions used for the selected ion monitoring acquisition mode.

optimal pH, so a sample pH of 2 and 3 was selected for pyrethroid metabolites and OCPs determination, respectively.

In order to validate the proposed SPE method for the screening/determination of OCPs and pyrethroid metabolites in urine samples a recovery study was conducted. A volume of 25 mL of an uncontaminated sample, spiked with 30 ng/mL of each OCP (sample A) and an equal volume of urine spiked with 15 ng/mL of each pyrethroid metabolite (sample B) were prepared. Aliquots of 3 mL of sample A were adjusted to pH 3 and introduced into the SPE system for OCP determination. Aliquots of sample B were hydrolyzed and adjusted to pH 2 for pyrethroid metabolite determination using the SPE method developed. Each sample was spiked three times and analyzed in duplicate (n=6). Table 1 gives the average recovery values obtained for each spiked analyte. Recoveries ranged from 88% (captan) to 101%, which testifies to the high accuracy of the proposed method.

The present work is included in a research project concerning organochlorine (23 compounds) and pyrethroid (12 compounds) pesticide determination in agricultural samples. This is why the proposed multiresidue method was applied to the screening of urine samples from a researcher who worked with all the analytes included in this study and from a non-exposed researcher. Urine samples were collected every two months during two years (12 samples from each one), being analyzed in triplicate. Five samples from the exposed researcher were found to contain residues of OCPs or pyrethroid metabolites while no residues of pesticides were found in those from the non-exposed researcher. The concentrations found and their standard deviations are listed in Table 2.

---

As can be seen, only one sample was found to contain pyrethroid metabolites at detectable levels, being impossible to determine the parent compound, whereas OCPs (mainly dicofol) were present in the five positive samples.

**Table 2.** Determination of OCPs and pyrethroid metabolites in urine samples from an exposed researcher. All concentrations are expressed in ng/mL (n=3).

Sample	Pesticide found	Concentration $\pm$ SD
1	Undetected	-
2	Endosulfan sulphate	1.6 $\pm$ 0.1
3	Undetected	-
4	Captafol	17 $\pm$ 1
5-8	Undetected	-
9	Dicofol	23 $\pm$ 2
10	Dicofol	0.6 $\pm$ 0.1
11	Undetected	-
12	PBA	2.1 $\pm$ 0.2
	cis and trans DCCA	0.8 $\pm$ 0.1
	Dicofol	19 $\pm$ 2

## ACKNOWLEDGMENTS

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

---

**REFERENCES**

- [1] *Environmental Health Criteria 82 Cypermethrin*, WHO, Geneva, 1989.
- [2] *Environmental Health Criteria 94 Permethrin*, WHO, Geneva, 1990.
- [3] *Environmental Health Criteria 99 Cyhalothrin*, WHO, Geneva, 1990.
- [4] *Environmental Health Criteria 97 Deltamethrin*, WHO, Geneva, 1990.
- [5] *Environmental Health Criteria 95 Fenvalerate*, WHO, Geneva, 1990.
- [6] *Environmental Health Criteria 142 alfa-Cypermethrin*, WHO, Geneva, 1992.
- [7] E. Alday, *Toxicología Laboral Básica*, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Sevilla, Chapter 12, 1989.
- [8] P. Curry, S. Iyengar, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 129 (1992) 79.
- [9] G. T. Brooks, *Xenobiotica* 16 (1986) 989.
- [10] D. M. Sonderlund, *Xenobiotica* 22 (1992) 1185.
- [11] K.R. Huckle, D. H. Huston, P. Millburn, *Drug Metab. Disp.* 9 (1981) 352.
- [12] F. J. Arrebola, J. L. Martínez-Vidal, A. Fernández-Gutierrez, M. H. Akhtar, *Anal. Chim. Acta* 401 (1999) 45.
- [13] J. Angerer, A. Ritter, *J. Chromatogr. B* 695 (1997) 217.
- [14] G. Leng, K. H. Kühn, A. Leng, W. Gries, J. Lewalter, H. Idel, *Chromatographia* 46 (1997) 265.
- [15] K. H. Kühn, G. Leng, K. A. Bucholski, L. Dunemann, H. Idel, *Chromatographia* 43 (1996) 285.
- [16] C. Aprea, A. Stridori, G. Sciarra, *J. Chromatogr. B* 695 (1997) 227.
- [17] E. E. Petty, J. J. Johnston, S. A. Volz, *J. Chromatogr. Sci.* 35 (1997) 430.

- [18] M. Valcárcel, M. Gallego, S. Cárdenas, *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, W. M. A. Niessen (Ed.) Marcel Dekker, New York, 2001, Chapter 9.

**CAPITULO VI:  
RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

**CHAPTER VI:  
RESULTS AND CONCLUSIONS**



### **VI.1. DISCUSION GENERAL DE LOS RESULTADOS**

A lo largo de esta Memoria se ha abordado la determinación de dos grupos de plaguicidas, organoclorados y piretroides, en diferentes matrices: frutas, hortalizas, aguas y fluidos biológicos. En todas las metodologías desarrolladas ha estado presente el uso de sistemas de flujo que permiten la automatización total o parcial de los procesos analíticos utilizados. La cromatografía de gases ha sido la técnica analítica más utilizada, aunque el uso de la espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier como técnica de detección junto con el análisis de datos mediante PLS, obviando la cromatografía, supone un nuevo enfoque en la determinación de este tipo de analitos, así como pone de manifiesto el poder de la quimiometría ante problemas analíticos. En este capítulo se abordan con detenimiento los aspectos relacionados con muestras, analitos, pretratamiento de muestras, sistemas de flujo, extracción en fase sólida, separaciones cromatográficas, sistemas de detección, tratamiento de los datos obtenidos y, por último, un análisis de dichos resultados dentro de los objetivos marcados en la realización de esta Memoria.

### VI. 1.1. MUESTRAS

En principio, las muestras seleccionadas en esta Memoria pueden dividirse en dos grupos atendiendo a su estado de agregación:

- Muestras sólidas: Hortalizas y Frutas (Cap. II y III)
- Muestras líquidas: Agua y Orina (Cap. IV y V)

Las diferencias entre ellas hacen necesario un comentario más detallado de cada tipo.

#### Frutas y Hortalizas

En el ámbito occidental, y más concretamente en los países mediterráneos, las frutas y hortalizas son constituyentes esenciales de una dieta sana y equilibrada. España consagra al cultivo de frutas y hortalizas un total de 2 millones de hectáreas, con una producción cercana a los 22 millones de toneladas, lo que la configura como el tercer productor europeo, tras Francia e Italia. El hecho de que frutas y hortalizas sean alimentos perecederos y fácilmente contaminables durante su producción y posterior manipulación y comercialización nacional e internacional sometida a una intensa presión competitiva, justifican la necesidad de una escrupulosa inspección sanitaria, que garantice la seguridad y salubridad de los mismos [1,2].

El Código Alimentario Español [3] clasifica los productos de origen vegetal en frutas, hortalizas y cereales, definiendo los que nos ocupan esta Memoria como:

- Hortalizas: cualquier planta herbácea hortícola que pueda usarse como alimento, ya sea cruda o cocinada. Dentro de las hortalizas se recogen:
  - Verduras: hortalizas cuya parte comestible está constituida por los órganos verdes de las hojas, tallos o inflorescencias.
  - Legumbres Frescas: frutos o semillas no maduros de las hortalizas leguminosas.
- Frutas: frutos, infrutescencias, semillas o parte carnosa de los órganos florales que hayan alcanzado el grado apropiado de madurez y resulten apropiadas para el consumo humano.

Las matrices de alimentos son muy complejas, concretamente las frutas y hortalizas lo son por su composición, en la que abundan azúcares, pigmentos, clorofilas, pectinas, hidratos de carbono complejos, etc., los cuales dificultan la detección de microcomponentes (contaminantes) que se encuentran a niveles de concentración mucho más bajos [4].

### Agua

El agua, tanto por su capacidad de disolución y transporte como por ser la base de múltiples reacciones biológicas o interacciones físico-químicas constituye el soporte indispensable para la supervivencia de todos los seres vivos. Por otro lado, el modelo agrícola adoptado, con una permanente expansión de las zonas irrigadas exige una alta y continua demanda hídrica. Pero estas prácticas agrícolas, con el uso excesivo de

fertilizantes y plaguicidas, pueden contaminar el agua, por su arrastre con las precipitaciones o con los canales de riego. Los niveles de contaminación de cauces, acuíferos y medio hídrico en general, requieren garantizar la calidad del agua, desde el punto de vista de su seguridad, salubridad y potabilidad [5].

En principio, el agua es una de las matrices más simples, pero la presencia de materia orgánica en la misma puede complicar la determinación de algunos compuestos, como ya se ha comentado en la introducción del Cap. IV.

#### *Fluidos Biológicos*

Los plaguicidas son compuestos tóxicos para los seres vivos en general y para el hombre en particular debido a sus propiedades biocidas. Es evidente que un grupo de riesgo, susceptible de sufrir intoxicaciones crónicas, lo constituyen aquellas personas (trabajadores agrícolas en su mayoría) que participan activamente en la formulación de plaguicidas, distribución y aplicación en las zonas de cultivo [2,5]. El control biológico constituye el mejor reflejo de la exposición total, empleando para ello los denominados indicadores biológicos de exposición, principalmente, sangre y orina [6]. De estas dos matrices, la orina presenta ciertas ventajas sobre la sangre, relacionadas con una toma de muestra no invasiva, de fácil realización y de menor limitación en cuanto a volumen. Sin embargo, aunque la matriz es más sencilla, su mayor inconveniente radica en que algunos compuestos (por ejemplo, los piretroides) se excretan mayoritariamente como metabolitos, siendo muy difícil identificar el compuesto del que provienen. Mención aparte merecen aquellos compuestos liposolubles cuya concentración en estos fluidos

biológicos se ve reducida por su tendencia a acumularse en el tejido adiposo del organismo, como son los plaguicidas organoclorados, y que aparecen conjugados con otras moléculas (ácido glucurónico principalmente) cuando son excretados por orina, para, de esta manera, convertirse en sustancias hidrosolubles.

#### *VI. 1.2. ANALITOS*

La selección de los dos grupos de plaguicidas (organoclorados y piretroides) se ha hecho por su relevancia medioambiental, su uso y sus características contaminantes.

Los plaguicidas organoclorados junto con los organofosforados, son los más utilizados históricamente. Sin embargo, los organoclorados tienen un especial interés medioambiental, ya que sus características físico-químicas los hacen muy persistentes en el medio ambiente, a la vez que su gran liposolubilidad provoca que se acumulen en el tejido adiposo de los organismos, propagándose a lo largo de la cadena alimenticia, mientras que los organofosforados son menos persistentes y no se acumulan. Es por ello que algunos organoclorados han sido prohibidos en diversos países como España y países de la UE y de ahí la importancia de controlar sus residuos en los alimentos. Los organoclorados están siendo reemplazados, en parte, por otros plaguicidas menos tóxicos y persistentes, como es el caso de los piretroides. Este nuevo grupo de plaguicidas es cada vez más usado, gracias a su efectividad y a su baja toxicidad. A pesar de ello, es necesario controlar la presencia de los mismos en los alimentos por el uso intensivo de plaguicidas en los cultivos hortofrutícolas. Los plaguicidas seleccionados en esta Memoria pertenecen a los grupos de los organoclorados y de los

piretroides y, dentro de cada grupo, se han estudiado los más usados y los que con mayor frecuencia aparecen sus residuos en productos hortofrutícolas y aguas. También ha sido incluido en uno de los capítulos (Cap. III.1) el butóxido de piperonilo, ya que habitualmente se incluye en las formulaciones de las piretrinas por su acción sinérgica para con ellas.

### *VI 1.3. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA*

El pretratamiento de la muestra depende drásticamente del estado de agregación de las mismas. Así, las muestras sólidas (hortalizas y frutas) requieren un tratamiento más complejo para hacerlas compatibles con el sistema de flujo, mientras que en las muestras líquidas (aguas y orina) la manipulación es mínima.

En relación con las frutas y verduras, se han desarrollado dos procedimientos claramente diferenciados según se trate de muestras frescas o liofilizadas. En el caso de muestras frescas (Cap. II) el proceso es más tedioso puesto que se requiere una primera extracción en un medio polar seguida de una reextracción selectiva de los plaguicidas organoclorados en un medio de polaridad más baja. Debido a la incompatibilidad de este medio con el sistema de flujo diseñado, fue preciso incluir una unidad de evaporación-redisolución que permitía transferir los analitos del medio orgánico al acuoso para su aspiración en el módulo de tratamiento automático. Para las hortalizas (Cap. II.1) la extracción se llevó a cabo con una mezcla de éter de petróleo y agua, pero para las frutas (Cap. II.2.) este procedimiento no resultó efectivo debido a la formación de una interfase provocada por los azúcares e hidratos de carbono complejos presentes

en las frutas que impedía una adecuada separación de las fases. Se recurrió entonces a una extracción con acetona seguida de una reextracción con n-hexano. En este proceso de reextracción es imprescindible la adición de una disolución reguladora de fosfato saturada con NaCl para una correcta separación de las fases y la extracción de los ácidos orgánicos endógenos (cítrico, oxálico, etc.) a la fase de agua-acetona.

La liofilización de las muestras hortofrutícolas (Cap. III), simplifica notablemente el tratamiento, puesto que sólo es necesario una extracción sólido-líquido con n-hexano, que se introduce directamente en el sistema de flujo. Previo al empleo de las muestras liofilizadas, se realizó un estudio para garantizar la ausencia de pérdidas de los plaguicidas estudiados durante el proceso de liofilización. Para ello se seleccionaron diferentes frutas y hortalizas (tomate, espinaca, melón y manzana) que se fortificaron con 20 ng/g de cada plaguicida organoclorado (Cap. III.2 y III.3) o 50 ng/g de cada piretroide (Cap. III). Cada muestra se dividió en dos porciones, una de las cuales fue extraída siguiendo un método manual descrito [7] en el cual se realiza una primera extracción con acetona, seguida de otra con n-hexano, tras lo cual el extracto orgánico es evaporado, redisolto, limpiado sobre un cartucho de Florisil, evaporado de nuevo y redisolto en n-hexano para analizar 1 µL del mismo mediante GC-ECD. La otra mitad de cada muestra se liofilizó (condiciones optimizadas para 50 g de muestra: 8h, 6 Pa), tras lo cual se extrajo directamente con n-hexano y se prosiguió con el mismo tratamiento al que fueron sometidas las muestras frescas. Este proceso se realizó cuatro veces para cada muestra. Los resultados reflejaron que no se producía ninguna pérdida de los analitos durante la liofilización de las muestras. En la Tabla VI.1.3.1 están

recogidos los valores medios de contenido en agua para cada una de las matrices hortofrutícolas estudiadas en el Cap. III.

**Tabla VI.1.3.1.** Contenido medio en agua de muestras hortofrutícolas.

Fruta	Contenido en agua (% p/p)	Hortaliza	Contenido en agua (% p/p)
Fresa	91	Espinaca	90
Pera	82	Acelga	92
Manzana	83	Pimiento	91
Naranja	80	Tomate	93
Melocotón	80	Patata	92
Kiwi	85	Coliflor	91
Melón	85	Pepino	92
Cereza	70	Berenjena	93
		Cebolla	91
		Champiñón	90

Para las muestras de agua (Cap. IV), de nuevo es necesario hacer una distinción en función de la técnica de detección empleada. Para la determinación de plaguicidas por GC-ECD/MS (Cap. IV.1), la introducción de la muestra fue directa, siendo únicamente necesario el ajuste del pH (5-6) y la adición de un agente decolorante (tiosulfato sódico). Sin embargo, el uso de FTIR (Cap. IV.2) requiere una mayor preconcentración de los analitos debido a su menor sensibilidad. La introducción directa de la muestra acuosa en el sistema utilizado en el Cap. IV.1, aún preconcentrando 100 mL de muestra (volumen de ruptura o breakthrough volume) no resultaba suficiente para la determinación de los analitos por FTIR. Por ello fue necesario una extracción líquido-líquido adicional con n-hexano previa a la introducción en un sistema de flujo, que incorpora una columna de sílica (similar al descrito en el Cap. III) que permite la retención de los analitos directamente desde la fase orgánica.

Por último, el pretratamiento requerido por la orina, depende de los analitos a determinar. De esta forma, los plaguicidas organoclorados sólo requieren un ajuste de pH, mientras que es necesaria una hidrólisis ácida de la orina para liberar los metabolitos de piretroides que se excretan conjugados. Este hecho impide la determinación conjunta de ambos tipos de compuestos ya que los resultados demostraron que la hidrólisis ácida destruía a los plaguicidas organoclorados hasta en un 80%.

En la siguiente Tabla (VI.1.3.2) se indica el medio de preparación de la muestra antes de introducirla en el sistema de flujo, correspondiente a cada uno de los capítulos que constituyen esta Memoria, así como la cantidad de muestra requerida para la determinación analítica.

**Tabla VI.1.3.2.** Medio seleccionado para la retención de los analitos en el sistema continuo de extracción en fase sólida y cantidad de muestra que se puede procesar.

Capítulo de la Memoria	Muestras sólidas (frutas y hortalizas)					Muestras líquidas (agua y orina)		
	II.1	II.2	III.1	III.2	III.3	IV.1	IV.2	V.1
Medio	Acuoso (pH 5.5)		n-hexano			Acuoso (pH 5-6)	n-hexano	Orina acidificada (pH 2-3)
Cantidad muestra	5-20 g (fresca)		0.1-1 g (lío-filizada)			10-100 mL	0.5 L	3 mL

## VI 1.4 SISTEMA DE FLUJO

Los componentes y variables hidrodinámicas de los sistemas de flujo empleados en esta Memoria se enumeran en la siguiente Tabla para poder ser comentados más fácilmente a continuación:

**Tabla VI.1.4.1.** Componentes y variables de los sistemas de flujo desarrollados en cada capítulo.

Capítulo de la Memoria	Canales	Bombas	Válvulas	Unidad de evaporación/ redisolución	Volumen preconcentrado (mL)	SPE	Caudal muestra (mL/min)	Caudal eluyente (mL/min)
II.1	3	2	2	Si	5	Si	0.2	0.5
II.2	3	2	2	Si	5	Si	0.2	0.5
III.1	2	1	2	No	5	Si	2.0	1.0
III.2	2	1	2	No	5	Si	2.0	1.0
III.3	2	1	2	No	5	Si	2.0	1.0
IV.1	2	1	2	No	10	Si	1.5	0.2
IV.2	2	1	2	No	10	Si	2.0	1.0
V.1	2	1	2	No	5	Si	0.5	0.2

Como se desprende de esta Tabla, los sistemas de flujo iniciales son más complejos (Cap. II) debido a que se emplean para frutas y hortalizas frescas; el proceso de liofilización simplifica estos sistemas que emplean menos canales y sólo una bomba peristáltica (Cap. III). El mismo sistema de flujo se puede utilizar para las muestras líquidas (Cap. IV y V). Todos los sistemas desarrollados utilizan la extracción en fase sólida (SPE), como técnica de preconcentración y limpieza del extracto, empleando aire como portador tanto para la muestra como para el eluyente. Como era de esperar, las diferencias más significativas se encuentran en los caudales de la muestra y del eluyente, puesto que éstos dependen de las características de los analitos y de la matriz,

del medio en el que vayan disueltos y del adsorbente utilizado. Los caudales más altos corresponden a los sistemas de flujo diseñados para la preconcentración de los analitos y limpieza de los extractos en una columna de sílica (Cap. III). El volumen preconcentrado es el mínimo requerido para alcanzar los LMR en cada caso, excepto en el Cap. II, en el que se indica el volumen de agua destilada en que son redisueltos los analitos; y en el Cap. IV.2, donde se utiliza FTIR en la determinación de los plaguicidas, ha de ser siempre el mismo puesto que la calibración mediante PLS está influenciada notablemente por el volumen de los disolventes orgánicos empleados, fijándose éste en 10 mL de n-hexano.

#### *VI.1.5. ADSORCION-ELUCION*

Todas las metodologías desarrolladas en esta Memoria están basadas en el empleo de columnas adsorbentes de distinta naturaleza para la retención cuantitativa de los analitos, de forma que la matriz de la muestra se elimine mayoritariamente. De esta forma, se consigue preconcentrar los analitos al eluirlos en un volumen más pequeño y evitar la interferencia de componentes procedentes de la matriz de la muestra, puesto que éstos tienen menor afinidad por los adsorbentes empleados en cada caso que los analitos. En la Tabla VI.1.5.1 se esquematizan las similitudes y diferencias entre los sistemas desarrollados.

**Tabla VI.1.5.1.** Características más relevantes concernientes a las etapas de adsorción/elución de los sistemas de flujo descritos en la Memoria.

Capítulo de la Memoria	Columna SPE	Eluyente	Volumen de ruptura	Lavado y acondicionamiento	% Retención		% Elución
					Organoclorados	Piretroides <sup>1</sup>	
II.1	RP-C <sub>18</sub> (40 mg)	Acetato etilo (150 µL)	---	3 mL Etanol + 3 mL Agua destilada	100	---	100
II.2	RP-C <sub>18</sub> (40 mg)	Acetato etilo (150 µL)	---	3 mL Etanol + 3 mL NH <sub>4</sub> OH 0.2 M + 3 mL Agua destilada	100	---	100
III.1	Sílica (50 mg)	Acetato etilo (175 µL)	25 mL	0.5 mL Isopropanol + 0.5 mL Acetonitrilo + 1 mL n-Hexano	---	100	100
III.2	Sílica (50 mg)	Acetato etilo (175 µL)	20 mL	0.5 mL Isopropanol + 0.5 mL Acetonitrilo + 1 mL n-Hexano	40-90	100	100
III.3	Sílica (50 mg)	Acetato etilo (175 µL)	20 mL	0.5 mL Isopropanol + 0.5 mL Acetonitrilo + 1 mL n-Hexano	40-90	100	100
IV.1	RP-C <sub>18</sub> (40 mg)	Acetato etilo (80 µL)	100 mL	3 mL Etanol + 3 mL Agua destilada	100	---	100
IV.2	Sílica (50 mg)	Acetato etilo (275 µL)	---	0.5 mL Isopropanol + 0.5 mL Acetonitrilo + 1 mL n-Hexano	80-90	100	100
V.1	RP-C <sub>18</sub> (40 mg)	Acetato <sup>2</sup> etilo (250 µL)	---	0.25 mL HNO <sub>3</sub> 3M + 0.25 mL Metanol + 0.5 mL Acetato etilo + 1 mL Disolución acuosa a pH 2	95	100	100

<sup>1</sup> Para metabolitos de piretroides en el Cap. V.1.

<sup>2</sup> Contiene además el reactivo derivatizador.

A lo largo de esta Memoria se han empleado dos tipos de sólidos adsorbentes: RP-C<sub>18</sub> y sílica. La inclusión de uno u otro en el sistema automático depende exclusivamente del medio en que va preparada la muestra. Así, la retención de los plaguicidas en RP-C<sub>18</sub> se encuentra favorecida en medio acuoso y es cuantitativa tanto

para plaguicidas organoclorados como para los metabolitos de piretroides, mientras que la sílica resultó ser el adsorbente más adecuado cuando se trabajó en n-hexano, a pesar de que algunos plaguicidas organoclorados (lindano y diclorán) sólo se retenían en un 40%. Este bajo porcentaje de retención (que no puede incrementarse aumentando la cantidad de sólido adsorbente empaquetado) se compensa claramente con la mayor sensibilidad que presentan estos analitos en el detector de captura de electrones y, que permite alcanzar sin dificultad los LMR más bajos establecidos para estos compuestos en las matrices estudiadas. En contraposición a esta limitación, los sistemas de extracción en fase sólida basados en el empleo de una columna de sílica son más sencillos que los de RP-C<sub>18</sub> para las matrices más complejas (frutas y hortalizas).

La cantidad de adsorbente empaquetado fue muy similar en todos los casos, y considerablemente inferior al empleado en los cartuchos comerciales recomendados para la determinación de plaguicidas en este tipo de muestras (40-50 mg vs. 500 mg), lo que permite preparar de 10 a 12 minicolumnas a partir de un cartucho comercial. Usando como detector FTIR (Cap. IV.2), con menor sensibilidad, fue necesario trabajar con una columna adsorbente que fuese capaz de adsorber una cantidad global de analitos alta, y es por ello que a pesar de diseñar el sistema de flujo para la determinación de sólo tres plaguicidas, la cantidad de sílica fue también de 50 mg.

De entre todos los eluyentes ensayados (n-hexano, éter de petróleo, acetato de etilo, isopropanol, acetonitrilo y acetona), el acetato de etilo resultó ser el mejor, consiguiendo con ambos adsorbentes, una elución cuantitativa de los plaguicidas. Los volúmenes fueron inferiores a 200 µL en todos los casos excepto cuando se empleó la

técnica de espectrometría de infrarrojo (Cap. IV.2), debido a la alta cantidad retenida de cada analito (0.5-2  $\mu\text{g}$ ) sobre la columna adsorbente, y en la determinación de los plaguicidas en muestras de orina (Cap. V.1), puesto que el eluyente contenía también el reactivo derivatizador.

Respecto al volumen de ruptura (volumen de muestra a partir del cual sólo se retiene en la columna adsorbente el 99% de la cantidad inicial de analitos en la muestra, es decir, al menos el 1% se eluye), éste se determinó en los casos en que la muestra se introducía directamente (ej. aguas, Cap. IV.1), o bien, tras la extracción de los plaguicidas con n-hexano de la muestra liofilizada (Cap. III). En el resto de los casos, el volumen que se introduce en el sistema es constante ya que corresponde al de agua destilada sobre el que se redisuelven los analitos, desde el medio orgánico empleado para la extracción de frutas y verduras (Cap. II); cuando se emplea FTIR (Cap. IV.2), el volumen de muestra ha de ser siempre el mismo, debido a la influencia de los disolventes sobre el espectro, y que corresponde con el usado en la calibración mediante PLS. Por último, la influencia de una matriz compleja como la orina hidrolizada (Cap. V.1), limita que el volumen de muestra sea el mínimo posible para alcanzar unos límites de detección aceptables.

Las columnas preparadas en el laboratorio pueden ser reusadas durante tres meses aproximadamente (suponiendo una media de trabajo de 8h al día) sin más que introducir etapas de limpieza y acondicionamiento de las mismas, que se lleva a cabo de forma secuencial en el propio sistema automático. Estas etapas dependen claramente de la matriz de la muestra (limpieza), así como del adsorbente y el medio en que se lleva a

cabo la retención (acondicionamiento). En el caso de la determinación de plaguicidas organoclorados en fruta fresca, es necesario introducir una etapa adicional de lavado con  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.2 M para eliminar una pequeña cantidad de pigmentos que quedaban retenidos en la columna; en el caso de muestras de orina hidrolizada, se requiere el empleo de un medio ácido para eliminar algunos componentes de la matriz que quedaron también retenidos sobre el adsorbente. En ningún caso afectaron a la resolución cromatográfica porque no se eluyeron con el acetato de etilo.

#### *VI.1.6. SEPARACION CROMATOGRAFICA*

Las características de los plaguicidas estudiados en esta Memoria, en términos de volatilidad y estabilidad térmica, hacen que se prefiera la cromatografía de gases como técnica de separación frente a la cromatografía líquida y, puesto que se tratan de compuestos altamente halogenados (principalmente clorados), el detector recomendado en todos los métodos descritos en la bibliografía es el de captura de electrones. En el caso de la determinación de metabolitos de piretroides fue necesario incluir una derivatización previa para aumentar su volatilidad. La separación cromatográfica se evita gracias al poder discriminatorio del tratamiento quimiométrico basado en la calibración mediante PLS, de la información contenida en los espectros obtenidos por FTIR; no obstante, en esta metodología sólo se determinaron tres plaguicidas (Cap. IV.2).

La mejor resolución cromatográfica se consiguió utilizando una columna capilar de 30 m x 0.25 mm, de fase estacionaria 5% fenilmetilpolisiloxano, con un

espesor de película de 0.25 µm. El volumen de inyección fue siempre de 1 µL, en modo split (1:25) y el gas portador fue nitrógeno (GC-ECD) o helio ultrapuro (GC-MS) a un caudal de 1 mL/min. La temperatura del inyector se fijó en 225°C, ya que valores más altos pueden provocar la degradación térmica de algunos plaguicidas, como el captán. Para la separación de los analitos se empleó en todos los casos la modalidad de gradiente de temperatura, pero incluyendo etapas isotérmicas para poder separar aquellos plaguicidas que aparecen como mezcla de isómeros. Los programas de temperatura óptimos en cada caso se resumen en la Tabla VI.1.6.1.

**Tabla VI.1.6.1.** Programas de temperatura óptimos para la separación cromatográfica en cada capítulo de la Memoria.

Capítulo de la Memoria	Detector	Programa de temperatura						
II.1	ECD	120°C 2 min	8°C/min →	180°C 4 min	8°C/min →	255°C 10 min	10°C/min →	270°C 2 min
II.2	ECD/MS	120°C 2 min	8°C/min →	180°C 4 min	8°C/min →	255°C 10 min	10°C/min →	270°C 2 min
III.1	ECD/MS	170°C 2 min	10°C/min →	255°C 15 min	8°C/min →	285°C 6 min		
III.2 y 3	ECD/MS	150°C 2 min	8°C/min →	170°C 4 min	8°C/min →	255°C 15 min	5°C/min →	285°C 6 min
IV.1	ECD/MS	120°C 2 min	8°C/min →	180°C 4 min	8°C/min →	255°C 10 min	10°C/min →	270°C 2 min
V.1	MS	70°C 10 min	10°C/min →	270°C 10 min	10°C/min →	285°C 0 min	(para organoclorados)	
		70°C 10 min	10°C/min →	285°C 0 min	(para metabolitos de piretroides)			

Puede afirmarse que hay un programa de temperatura adecuado para los organoclorados (Cap. II.1, II.2 y IV.1), otro para los piretroides (Cap. III.1) y otro para la mezcla de organoclorados y piretroides (Cap. III.2 y III.3). En todos los casos se incluye una etapa final para eliminar de la columna cromatográfica posibles compuestos procedentes de la matriz de la muestra y evitar la aparición de picos fantasma en los cromatogramas.

#### VI.1.7. DETECCION

El **detector de captura de electrones** tiene una gran sensibilidad y selectividad para moléculas con átomos de halógenos, por lo que se ha utilizado en la cuantificación de los analitos estudiados en esta Memoria (Cap. II, III y IV.1), mientras que se optó por la **espectrometría de masas** para la confirmación de los resultados positivos de las muestras analizadas mediante ECD en los Cap. II.2, III y IV.1. Únicamente para las muestras de orina (Cap. V.1) se empleó el detector MS tanto para la identificación como para la cuantificación de los analitos, puesto que las muestras de orina hidrolizadas generaban un gran número de picos que impedían la identificación de los plaguicidas. Debido a la menor sensibilidad de este detector, fue preciso trabajar con monitorización selectiva de iones (SIM), lo que también contribuyó a minimizar las señales procedentes de la matriz de la muestra. En la Tabla VI.1.7.1 se encuentran enumerados los analitos con los valores de  $m/z$  seleccionados, para identificación o, para identificación y cuantificación en modo SIM en el caso de los metabolitos de piretroides.

El uso de la **espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier** como detector (Cap. IV.2) permite registrar los espectros de los extractos procedentes del sistema de flujo. Para ello, se depositaron 5  $\mu\text{L}$  del extracto sobre el cristal de reflectancia total atenuada (ATR: Attenuated Total Reflectance), y los espectros se registraron mediante el uso de un detector de sulfato de triglicina deuterada (DTGS: Deuterated Triglycine Sulphate). Para minimizar las absorbancias interferentes debidas al disolvente orgánico en el que van disueltos los analitos en el extracto final (acetato de etilo), se dejó evaporar éste sobre el ATR antes de registrar los espectros. Además, también se estudió el volumen máximo de este extracto que, tras la evaporación del disolvente, diese lugar a una película homogénea de los analitos sobre el cristal del ATR. Así, para volúmenes superiores a 5  $\mu\text{L}$ , los espectros no fueron reproducibles. Por ello, fue necesario recurrir a la evaporación de todo el extracto procedente del sistema de flujo (puesto que se requería la máxima preconcentración posible de los analitos) para minimizar las interferencias de las impurezas de los disolventes orgánicos en los espectros finales.

**Tabla VI.1.7.1.** Relación de  $m/z$  característicos de los plaguicidas estudiados en esta Memoria.

Analito	$m/z^a$	Analito	$m/z^a$	Analito	$m/z^a$
$\alpha$ -HCH	111, <b><u>181</u></b> , 219	Procimidona	67, <b><u>96</u></b> , 283	Bifentrín	152, 165, <b>181</b>
HCB	249, 282, <b><u>284</u></b>	Clorbenside	<b><u>125</u></b> , 127, 268	Fenpropatrín	<b>97</b> , 181, 349
Diclorán	<b><u>124</u></b> , 176, <b><u>206</u></b>	Clordano	202, <b><u>373</u></b> , 408	$\lambda$ -Cihalotrín	141, <b>181</b> , 209
$\beta$ -HCH	<b>109</b> , <b><u>181</u></b> , 219	$\alpha$ -Endosulfan	<b>195</b> , <b><u>241</u></b> , 339	Permetrín	163, <b>183</b> , 390
Lindano	111, <b><u>181</u></b> , 219	Dieldrín	<b>79</b> , <b><u>263</u></b> , 378	Ciflutrín	<b>77</b> , 163, 227
$\delta$ -HCH	111, <b><u>181</u></b> , 219	Endrin	<b><u>67</u></b> , 317, 319	$\beta$ -Ciflutrín	<b>77</b> , 163, 227
Vinclozolina	187, <b><u>212</u></b> , <b><u>285</u></b>	$\beta$ -Endosulfan	<b>195</b> , 241, 339	Cipermetrín	77, 181, <b>209</b>
Heptacloro	<b>100</b> , <b><u>272</u></b> , 370	Endosulfan sulfato	<b><u>272</u></b> , 387, 420	$\alpha$ -Cipermetrín	77, 181, <b>209</b>
Diclofuanida	<b>123</b> , <b><u>224</u></b> , 332	Iprodiona	<b>56</b> , <b><u>314</u></b> , 329	Fenvalerato	<b>169</b> , 181, 419
Aldrín	<b>66</b> , <b><u>263</u></b> , 298	Captafol	<b>79</b> , <b><u>183</u></b> , 347	Deltametetrín	<b>181</b> , 209, 253
Dicofol	111, <b><u>139</u></b> , 250	Metoxicloro	<b><u>227</u></b> , 228, 344	cis y trans-DCCA	<b>163</b> , 191, <b><u>323</u></b>
Captán	<b>79</b> , 264, 299	Butóxido de piperonilo	149, <b>176</b> , 338	cis-DBCA	172, 253, <b><u>367</u></b>
				PBA	141, <b>197</b> , <b><u>364</u></b>

<sup>a</sup> Los valores de  $m/z$  en cursiva corresponden a los iones moleculares, en negrita a los picos base y los subrayados a los fragmentos seleccionados para la cuantificación.

#### VI.1.8. TRATAMIENTO DE DATOS

En las metodologías desarrolladas para la separación/determinación de los plaguicidas por cromatografía de gases se construyeron las rectas de calibrado mediante regresión lineal del área de pico cromatográfico del analito dividida por la del estándar interno frente a la concentración del analito. Los límites de detección (LOD) fueron calculados como la concentración mínima que proporcionaba señales cromatográficas tres veces mayores que el ruido de fondo; y la precisión del método, expresada como desviación estándar relativa (% RSD), se obtuvo de un mínimo de 11 muestras preparadas a partir de las disoluciones estándar, conteniendo los analitos a concentraciones situadas en la parte inferior de la recta de calibrado.

Sin embargo, en el empleo de FTIR (Cap. IV.2), dado que la etapa de separación de los plaguicidas no está incluida, la obtención de los parámetros analíticos característicos requirió el empleo de tratamientos quimiométricos más complejos. Para la selección de los tres analitos (diclofuanida, captán y fenprotrín), se llevó a cabo un análisis de agrupaciones (Cluster analysis) con todos los plaguicidas organoclorados y piretroides empleados a lo largo de la Memoria. Este análisis es un método de reconocimiento de pautas no supervisado, cuyo objetivo es formar una serie de grupos de objetos, en este caso de plaguicidas, que sean similares entre sí. De este “clustering” se desprende que los plaguicidas organoclorados y piretroides constituyen dos grupos diferenciados y, que además, los organoclorados se subdividen en dos grupos. Basándose en ello, se seleccionaron un piretroide y dos organoclorados, uno de cada subgrupo. Los espectros del grupo de calibración de dichos analitos, se evaluaron

mediante mínimos cuadrados parciales (PLS: Partial Least Square) para obtener la calibración de los mismos. Se realizaron diferentes modelos de calibración validados mediante calibración cruzada. Sin embargo, debido a la influencia en los espectros de las impurezas arrastradas, procedentes de los disolventes orgánicos utilizados en el pretratamiento de la muestra y en el sistema de flujo (a pesar de utilizarlos de grado HPLC), fue necesario seleccionar rangos óptimos de número de ondas. De esta manera, para cada analito se construyó una calibración independiente, utilizando diferentes rangos de la región espectral y, en todos los casos, la primera derivada del espectro. Queda de esta forma patente la utilidad de la quimiometría como herramienta analítica, sustituyendo la separación física implícita en la cromatografía por la capacidad discriminante del FTIR junto con el PLS.

#### *VI.1.9. GRADOS DE AUTOMATIZACION Y SIMPLIFICACION*

La automatización de cada uno de los pasos que constituyen los métodos desarrollados en los diferentes capítulos de esta Memoria, así como el grado de simplificación alcanzado en los mismos en relación a los procesos manuales, se intentan plasmar en la Gráfica VI.1.9.1. De esta forma, se puede tener una primera impresión, clara y directa, de dicho grado, evaluado en función de lo expuesto a continuación.

**Gráfica VI.1.9.1.** Grado de automatización y simplificación de los diferentes pasos de cada método presentado en esta Memoria.

Capítulo de la Memoria	GRADO DE AUTOMATIZACION Y SIMPLIFICACION			
	Pretratamiento	Sistema de flujo	Detección	Tratamiento de datos
II.1	██████████	██████████	██████████	██████████
II.2	██████████	██████████	██████████	██████████
III.1	██████████	██████████	██████████	██████████
III.2	██████████	██████████	██████████	██████████
III.3	██████████	██████████	██████████	██████████
IV.1	██████████	██████████	██████████	██████████
IV.2	██████████	██████████	██████████	██████████
V.1	██████████	██████████	██████████	██████████

El pretratamiento de la muestra es mínimo en el Cap. IV.1 dedicado al análisis de aguas, puesto que sólo se requiere el ajuste de pH y la adición del agente decolorante a las muestras y, es por ello, que su grado de simplificación y automatización es máximo. Por otro lado, en el Cap. III, referente a frutas y hortalizas liofilizadas, el pretratamiento consiste únicamente en una extracción sólido-líquido automatizada, puesto que se realiza mediante agitación magnética. Sin embargo, en el Cap. II, el pretratamiento es algo más complejo ya que al tratarse de frutas y hortalizas frescas se necesita, además de una extracción manual, un cambio de disolvente que conlleva una etapa de evaporación/redisolución que sí está automatizada. Pero el pretratamiento más complejo es, sin lugar a dudas, el realizado en el Cap. V.1 para la determinación de metabolitos de piretroides en orina, puesto que la hidrólisis ácida necesaria se realiza de forma completamente manual; este paso es inexistente para los plaguicidas organoclorados en orina puesto que únicamente necesitan el ajuste de pH de la muestra.

Por otro lado, el pretratamiento de las muestras de aguas cuando se emplea FTIR (Cap. IV.2), aunque es muy simple no está automatizado, por lo que el sistema de flujo sólo se emplea para preconcentrar los plaguicidas.

En cuanto al sistema de flujo, como ya se ha comentado, hay una gran semejanza entre ellos, siendo quizás la característica diferenciadora la secuencia de limpieza y acondicionamiento de las columnas de adsorción, que en el caso de los Cap. II.1, II.2 y IV.1 es la más sencilla. La detección, cuando está en línea con el proceso cromatográfico está completamente automatizada, mientras que en el Cap. IV.2, donde se lleva a cabo de forma discontinua, el grado de automatización y simplificación es prácticamente nulo, máxime teniendo en cuenta el paso de evaporación de disolvente orgánico necesario antes de colocar la muestra sobre el ATR.

Por último, el tratamiento de datos, en todos los casos es simple, pero hay que tener en cuenta que en el Cap. IV.2 donde el tratamiento es más complejo, los cálculos se llevan a cabo mediante paquetes informáticos que contienen programas quimiométricos, con la precisión y rapidez que ello conlleva.

Por tanto, el método más simple y automatizado es el desarrollado en el Cap. IV.1, correspondiente a muestras de aguas, aunque hay que tener en cuenta que también es la matriz más simple, seguido por los métodos desarrollados en el Cap. III, donde la liofilización, aunque suponga un mayor tiempo en el pretratamiento de la muestra, facilita enormemente la extracción sólido-líquido, así como el posterior tratamiento analítico, puesto que los extractos son mucho más limpios. Además, hay que tener en cuenta que el proceso de liofilización puede hacerse simultáneamente para un número

considerable de muestras (en función, claro está, del liofilizador utilizado) y que, además, supone un método de conservación de las muestras en el que los analitos permanecen inalterables, lo cual es una gran ventaja teniendo en cuenta el gran carácter perecedero de las muestras hortofrutícolas.

Por el contrario, el método menos simple y automatizado es claramente el desarrollado en el Cap. IV.2, determinado por el pretratamiento de la muestra y la detección discontinua. Sin embargo, hay que resaltar que ha sido posible obviar la separación cromatográfica gracias al poder discriminatorio prestado por el tratamiento quimiométrico de los espectros obtenidos mediante FTIR.

#### *VI.1.10. RESULTADOS ANALITICOS*

##### ***Frutas y Hortalizas***

###### A. CALIBRACIONES

En la Tabla VI.1.10.1 se exponen las características analíticas correspondientes a límites de detección, rangos de linealidad establecidos para la cuantificación y precisión obtenidos para cada plaguicida en cada uno de los métodos desarrollados en los diferentes capítulos de esta Memoria en los que se aborda la determinación de estos analitos en muestras hortofrutícolas.

**Tabla VI.1.10.1.** Relación de los límites de detección, rangos de linealidad y precisión para cada analito en cada uno de los métodos desarrollados.

Analitos	Capítulo	Resultados analíticos		
		LOD (ng/g) <sup>1</sup>	Rango lineal (ng/g) <sup>1</sup>	RSD (%)
$\alpha$ -HCH	II.1	1.5	5-1000	5.2
	II.2	0.7	2.5-500	5.4
HCB	II.1	2.0	10-1000	4.7
	II.2	1.0	5-500	4.9
$\beta$ -HCH	II.1	2.0	10-1000	4.3
	II.2	1.0	5-500	4.6
$\delta$ -HCH	II.1	1.0	5-1000	4.0
	II.2	0.5	2.5-500	4.0
Heptacloro	II.1	2.0	10-1000	5.4
	II.2	1.0	5-500	5.5
Aldrín	II.1	1.0	5-1000	5.6
	II.2	0.5	2.5-500	5.4
Dicofol	II.1	5.0	25-2000	4.3
	II.2	1.2	6.2-500	4.8
Clorbenside	II.1	5.0	25-200	5.1
	II.2	2.5	12.5-1000	6.0
Clordane	II.1	10.0	50-2500	5.2
	II.2	5.0	25-1250	5.1
Dieldrín	II.1	2.5	10-1000	5.7
	II.2	1.2	5-500	6.0
Endrín	II.1	2.0	10-1000	5.9
	II.2	1.0	5-500	5.9
Iprodiona	II.1	50.0	125-2500	5.7
	II.2	25.0	63-1250	5.3
Captafol	II.1	2.5	10-1000	5.3
	II.2	1.2	5-500	5.7
Metoxicloro	II.1	5.0	25-2000	5.1
	II.2	2.5	12.5-1000	5.9

**Tabla VI.1.10.1. (Continuación).**

Analitos	Capítulo	Resultados analíticos		
		LOD (ng/g) <sup>1</sup>	Rango lineal (ng/g) <sup>1</sup>	RSD (%)
Diclorán	II.1	0.2	1-500	4.7
	II.2	0.1	0.4-250	4.6
	III.2	1.0	2-200	4.5
	III.3	1.0	5-200	4.8
Lindano	II.1	1.0	5-1000	5.2
	II.2	0.5	2.5-500	5.6
	III.2	20.0	50-2000	5.3
	III.3	30.0	100-2000	5.7
Vinclozolina	II.1	1.0	5-1000	5.8
	II.2	0.5	2.5-500	5.7
	III.2	1.0	2-200	3.0
	III.3	2.0	5-200	4.0
Diclofuanida	II.1	2.5	10-1000	5.9
	II.2	1.2	5-500	5.8
	III.2	0.5	2-200	4.0
	III.3	1.0	5-200	5.1
Captán	II.1	1.5	5-1000	5.5
	II.2	0.7	2.5-500	5.0
	III.2	20.0	80-2000	6.5
	III.3	30.0	100-2000	6.8
Procimidona	II.1	2.0	10-1000	6.0
	II.2	1.0	5-500	5.9
	III.2	1.0	2-200	5.2
	III.3	2.0	5-200	6.0
$\alpha$ -Endosulfán	II.1	2.0	10-1000	5.4
	II.2	1.0	5-500	5.8
	III.2	1.0	2-200	5.4
	III.3	2.0	5-200	5.8
$\beta$ -Endosulfán	II.1	2.0	10-1000	6.0
	II.2	1.0	5-500	5.7
	III.2	0.5	2-200	3.8
	III.3	1.0	5-200	4.9
Endosulfán sulfato	II.1	2.0	10-1000	5.6
	II.2	1.0	5-500	5.4
	III.2	5.0	10-2000	4.7
	III.3	8.0	15-2000	5.1

**Tabla VI.1.10.1. (Continuación).**

Analitos	Capítulo	Resultados analíticos		
		LOD (ng/g) <sup>1</sup>	Rango lineal (ng/g) <sup>1</sup>	RSD (%)
Butóxido de piperonilo	III.1	3.75	150-22500	4.4
Bifentrín	III.1	1.5	15-3000	5.3
	III.2	1.0	10-2000	6.0
	III.3	1.0	5-2000	6.4
Fenpropatrín	III.1	1.5	15-3000	5.0
	III.2	1.0	10-2000	5.0
	III.3	1.0	5-2000	5.3
$\lambda$ -Cihalotrín	III.1	1.5	15-3000	3.3
	III.2	1.0	10-2000	3.5
	III.3	1.0	5-2000	4.6
Permetrín	III.1	12.0	30-3000	6.2
	III.2	8.0	20-2000	5.8
	III.3	10.0	20-2000	6.5
Ciflutrín	III.1	6.0	15-3000	4.7
	III.2	4.0	10-2000	5.0
	III.3	5.0	10-2000	4.9
$\beta$ -Ciflutrín	III.1	3.0	15-3000	4.9
	III.2	2.0	10-2000	4.7
	III.3	2.0	10-2000	5.3
Cipermetrín	III.1	6.0	15-3000	3.8
	III.2	4.0	10-2000	3.6
	III.3	5.0	10-2000	4.2
$\alpha$ -Cipermetrín	III.1	1.5	15-3000	3.1
	III.2	1.0	10-2000	3.3
	III.3	1.0	5-2000	4.0
Fenvalerato	III.1	3.0	15-3000	5.7
	III.2	2.0	10-2000	6.1
	III.3	2.0	10-2000	6.1
Deltametrín	III.1	3.0	15-3000	6.3
	III.2	2.0	10-2000	5.8
	III.3	2.0	10-2000	5.0

<sup>1</sup>Los límites de detección y los rangos lineales de cuantificación están expresados por gramo de muestra fresca para el Cap. II, y por gramo de muestra liofilizada en el Cap. III.

Los límites de detección obtenidos no sólo permiten alcanzar los LMR establecidos por la legislación europea y española en cada una de las matrices estudiadas, sino que, de forma general, se sitúan por debajo de los límites de detección analíticos señalados por dicha legislación hasta en los casos más restrictivos (10-20 ng/g muestra fresca) [8,9]. En cuanto a los rangos de linealidad, estos son lo suficientemente amplios (2-3 órdenes de magnitud) y permiten la cuantificación a niveles de partes por billón. La precisión es aceptable en todos los casos.

Los límites de detección y los rangos lineales correspondientes al Cap. II.1 son el doble de los del Cap. II.2, debido a que, si bien el sistema de flujo empleado es el mismo, al igual que lo es la cantidad de muestra procesada, el volumen de disolvente extractante se encuentra en relación 5:1 entre ambos capítulos (II.1 y II.2) y el volumen del mismo que es evaporado/rediseuelto en la unidad de evaporación/redisolución en relación 5:2. Así, resulta que la cantidad absoluta de cada analito rediseuelta en los 5 ml de agua destilada es doble en el Cap. II.2 que en el II.1, con su repercusión directa en los resultados analíticos. La eficacia de los procesos de extracción y limpieza se ponen claramente de manifiesto en este capítulo de la Memoria, ya que los límites de detección que se alcanzan partiendo de una fruta fresca (Cap. II.2) son comparables con los obtenidos con disolución estándar (Cap. II.1), lo que indica que la línea de base de los cromatogramas es similar en ambos casos.

También hay que señalar que en el caso de los métodos cuya muestra son productos hortofrutícolas liofilizados (Cap. III), los límites de detección y rangos de linealidad han sido calculados para 1 g de muestra liofilizada, suponiendo que dicha

muestra corresponde al caso más desfavorable, es decir, con menor proporción de agua (naranja, 80% agua), mientras que para muestras con más humedad los límites de detección serían menores, así como los valores extremos de los rangos lineales. De esta forma, y para la mayoría de los plaguicidas organoclorados estudiados en muestras frescas y liofilizadas (vinclozolina, diclofuanida, procimidona,  $\alpha,\beta$ -endosulfán y endosulfán sulfato) los límites de detección son menores cuando se utilizan muestras liofilizadas. Las excepciones, diclorán, captán y lindano, muestran límites de detección similares o algo superiores para ambos tipos de muestras.

Si se comparan los límites de detección y rangos lineales del Cap. III de esta Memoria, en el que se trabaja con frutas y hortalizas liofilizadas, se puede apreciar una ligera influencia de la matriz de la muestra en los límites de detección de plaguicidas organoclorados (tomate vs. disoluciones estándar), mientras que para piretroides no se aprecia este efecto. Una posible explicación a este hecho puede encontrarse en que la mayor parte de las señales cromatográficas correspondientes a las matrices de las muestras aparecen al principio del cromatograma y, al ser los plaguicidas organoclorados los que presentan tiempos de retención más bajos, la posible perturbación de la línea de base les afectaría más que a los compuestos que presentan tiempos de retención mayores (piretroides).

Por último, iprodiona es un plaguicida cuyos límites de detección y rangos de linealidad son algo mayores que para el resto, como lo son también sus LMR establecidos en matrices hortofrutícolas. Esto se debe a que su pico cromatográfico es anormalmente ancho, lo que dificulta su determinación. Por otro lado el compuesto

sinérgico, butóxido de piperonilo, aunque su límite de detección es del mismo orden que los demás plaguicidas, el límite de cuantificación es excepcionalmente alto (50 veces su LOD). Sin embargo, esta imposibilidad de cuantificación a niveles inferiores no es un problema a la hora de satisfacer los requerimientos legales, puesto que su LMR es de 500 ng/g en todas las matrices hortofrutícolas, según la legislación española [8] (no está establecido en la europea).

## B. RECUPERACIONES

Para evaluar la aplicabilidad de los métodos desarrollados y dada la imposibilidad de encontrar materiales de referencia certificados de estas matrices con los plaguicidas ensayados, se realizaron estudios de recuperación de los analitos en muestras fortificadas a niveles próximos a sus LMR establecidos, entre 6-200 ng/g (excepto para butóxido de piperonilo, 200-1000 ng/g), que según el método expuesto en cada capítulo, podrán ser muestras frescas o liofilizadas. La siguiente Tabla VI.1.10.2 recoge los valores medios de dichas recuperaciones junto con la desviación estándar calculada para tres muestras a cada nivel de fortificación.

**Tabla VI.1.10.2.** Recuperaciones de cada analito en cada tipo de muestra fresca (F) o liofilizada (L) fortificada.

Analitos	Muestra		Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
$\alpha$ -HCH	Lechuga	(F)	II.1	94 ± 6	97 ± 4
	Tomate	(F)	II.1	96 ± 5	
	Espinaca	(F)	II.1	95 ± 5	
	Patata	(F)	II.1	103 ± 5	
	Nectarina	(F)	II.2	87 ± 5	91 ± 3
	Melón	(F)	II.2	91 ± 6	
	Cereza	(F)	II.2	95 ± 7	
	Plátano	(F)	II.2	92 ± 5	
HCB	Zanahoria	(F)	II.1	102 ± 5	101 ± 2
	Berenjena	(F)	II.1	103 ± 6	
	Tomate	(F)	II.1	100 ± 5	
	Patata	(F)	II.1	99 ± 5	
	Nectarina	(F)	II.2	97 ± 7	92 ± 5
	Melón	(F)	II.2	92 ± 5	
	Melocotón	(F)	II.2	91 ± 4	
	Naranja	(F)	II.2	96 ± 5	
	Ciruela roja	(F)	II.2	99 ± 6	
	Cereza	(F)	II.2	84 ± 6	
	Manzana	(F)	II.2	88 ± 4	
	Fresa	(F)	II.2	87 ± 5	
	Plátano	(F)	II.2	98 ± 4	
$\beta$ -HCH	Lechuga	(F)	II.1	93 ± 4	93 ± 7
	Tomate	(F)	II.1	85 ± 4	
	Espinaca	(F)	II.1	94 ± 4	
	Patata	(F)	II.1	102 ± 4	
	Nectarina	(F)	II.2	89 ± 5	95 ± 4
	Melón	(F)	II.2	96 ± 5	
	Cereza	(F)	II.2	96 ± 7	
	Plátano	(F)	II.2	98 ± 5	
$\delta$ -HCH	Lechuga	(F)	II.1	93 ± 5	98 ± 5
	Tomate	(F)	II.1	103 ± 5	
	Espinaca	(F)	II.1	93 ± 4	
	Patata	(F)	II.1	102 ± 4	
	Nectarina	(F)	II.2	101 ± 6	101 ± 3
	Melón	(F)	II.2	103 ± 4	
	Cereza	(F)	II.2	97 ± 5	
	Plátano	(F)	II.2	102 ± 5	
Heptacloro	Cebolla	(F)	II.1	102 ± 6	99 ± 5
	Lechuga	(F)	II.1	94 ± 5	
	Zanahoria	(F)	II.1	105 ± 7	
	Espinaca	(F)	II.1	96 ± 6	
	Melón	(F)	II.2	88 ± 5	90 ± 6
	Naranja	(F)	II.2	88 ± 6	
	Ciruela roja	(F)	II.2	94 ± 6	
	Manzana	(F)	II.2	82 ± 5	
	Plátano	(F)	II.2	99 ± 5	

**Tabla VI.1.10.2. (Continuación).**

Analitos	Muestra		Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
Aldrín	Zanahoria	(F)	II.1	104 ± 6	100 ± 4
	Pimiento	(F)	II.1	97 ± 6	
	Patata	(F)	II.1	97 ± 6	
	Pepino	(F)	II.1	102 ± 7	
	Nectarina	(F)	II.2	101 ± 6	96 ± 6
	Melón	(F)	II.2	100 ± 6	
	Melocotón	(F)	II.2	95 ± 5	
	Naranja	(F)	II.2	99 ± 6	
	Ciruela roja	(F)	II.2	89 ± 5	
	Cereza	(F)	II.2	90 ± 6	
	Pera	(F)	II.2	105 ± 6	
	Manzana	(F)	II.2	90 ± 6	
	Fresa	(F)	II.2	98 ± 6	
	Plátano	(F)	II.2	90 ± 5	
Dicofol	Zanahoria	(F)	II.1	84 ± 4	91 ± 6 (F)
	Pimiento	(F)	II.1	90 ± 5	
	Berenjena	(F)	II.1	93 ± 5	
	Patata	(F)	II.1	99 ± 5	
	Melón	(F)	II.2	102 ± 4	98 ± 8 (F)
	Naranja	(F)	II.2	109 ± 4	
	Cereza	(F)	II.2	90 ± 7	
	Pera	(F)	II.2	105 ± 5	
	Manzana	(F)	II.2	90 ± 5	
	Fresa	(F)	II.2	98 ± 5	
Plátano	(F)	II.2	90 ± 4		
Clorbenside	Zanahoria	(F)	II.1	96 ± 5	89 ± 7 (F)
	Pimiento	(F)	II.1	79 ± 4	
	Berenjena	(F)	II.1	91 ± 5	
	Patata	(F)	II.1	89 ± 5	
	Nectarina	(F)	II.2	97 ± 6	97 ± 4 (F)
	Melón	(F)	II.2	98 ± 6	
	Naranja	(F)	II.2	99 ± 6	
	Ciruela roja	(F)	II.2	93 ± 6	
	Cereza	(F)	II.2	99 ± 6	
	Pera	(F)	II.2	103 ± 6	
Manzana	(F)	II.2	91 ± 6		
Fresa	(F)	II.2	95 ± 6		
Plátano	(F)	II.2	102 ± 7		
Clordano	Lechuga	(F)	II.1	92 ± 5	94 ± 10 (F)
	Tomate	(F)	II.1	91 ± 5	
	Patata	(F)	II.1	86 ± 4	
	Pepino	(F)	II.1	109 ± 6	
	Naranja	(F)	II.2	92 ± 5	88 ± 5 (F)
	Ciruela roja	(F)	II.2	91 ± 6	
	Cereza	(F)	II.2	85 ± 5	
	Manzana	(F)	II.2	93 ± 6	
Fresa	(F)	II.2	81 ± 5		

Tabla VI.1.10.2. (Continuación).

Analitos	Muestra		Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
Dieldrín	Zanahoria	(F)	II.1	88 ± 6	93 ± 4 (F)
	Pimiento	(F)	II.1	97 ± 6	
	Patata	(F)	II.1	95 ± 6	
	Pepino	(F)	II.1	92 ± 6	
	Nectarina	(F)	II.2	96 ± 5	97 ± 5 (F)
	Melón	(F)	II.2	105 ± 7	
	Melocotón	(F)	II.2	101 ± 6	
	Naranja	(F)	II.2	99 ± 7	
	Ciruela roja	(F)	II.2	100 ± 5	
	Cereza	(F)	II.2	91 ± 6	
	Pera	(F)	II.2	92 ± 5	
	Manzana	(F)	II.2	94 ± 5	
	Fresa	(F)	II.2	93 ± 6	
	Plátano	(F)	II.2	95 ± 6	
Endrín	Pimiento	(F)	II.1	91 ± 6	98 ± 5 (F)
	Patata	(F)	II.1	100 ± 6	
	Pepino	(F)	II.1	103 ± 6	
	Espinaca	(F)	II.1	98 ± 6	
	Nectarina	(F)	II.2	103 ± 5	99 ± 5 (F)
	Melón	(F)	II.2	104 ± 6	
	Melocotón	(F)	II.2	101 ± 6	
	Naranja	(F)	II.2	96 ± 4	
	Ciruela roja	(F)	II.2	108 ± 7	
	Cereza	(F)	II.2	96 ± 5	
	Pera	(F)	II.2	93 ± 5	
	Manzana	(F)	II.2	90 ± 6	
	Fresa	(F)	II.2	101 ± 5	
	Plátano	(F)	II.2	102 ± 7	
Iprodiona	Berenjena	(F)	II.1	94 ± 6	94 ± 6 (F)
	Manzana	(F)	II.2	86 ± 5	86 ± 5 (F)
Captafol	Berenjena	(F)	II.1	81 ± 6	81 ± 6 (F)
	Naranja	(F)	II.2	100 ± 5	94 ± 4 (F)
	Ciruela roja	(F)	II.2	89 ± 6	
	Pera	(F)	II.2	94 ± 4	
	Fresa	(F)	II.2	95 ± 5	
	Plátano	(F)	II.2	90 ± 6	
Metoxicloro	Zanahoria	(F)	II.1	96 ± 6	97 ± 7 (F)
	Berenjena	(F)	II.1	89 ± 5	
	Espinaca	(F)	II.1	99 ± 6	
	Patata	(F)	II.1	106 ± 6	
	Melón	(F)	II.2	102 ± 6	97 ± 5 (F)
	Melocotón	(F)	II.2	100 ± 4	
	Naranja	(F)	II.2	90 ± 5	
	Ciruela roja	(F)	II.2	92 ± 4	
	Cereza	(F)	II.2	98 ± 6	
	Pera	(F)	II.2	104 ± 6	
	Fresa	(F)	II.2	92 ± 5	

**Tabla VI.1.10.2. (Continuación).**

Analitos	Muestra		Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)							
Diclorán	Cebolla	(F)	II.1	87 ± 5								
		(L)	III.3	93 ± 4								
	Pimiento	(F)	II.1	98 ± 5		95 ± 5 (F)						
		(L)	III.3	93 ± 4								
	Pepino	(F)	II.1	98 ± 5		93 ± 1 (L)						
		(L)	III.3	93 ± 2								
	Lechuga	(F)	II.1	96 ± 5								
		(L)	III.3	94 ± 4								
	Melón	(F)	II.2	83 ± 5								
		(L)	III.2	98 ± 1								
	Melocotón	(F)	II.2	95 ± 6								
		(L)	III.2	98 ± 3								
	Naranja	(F)	II.2	88 ± 4								
		(L)	III.2	95 ± 2								
	Cereza	(F)	II.2	82 ± 6						89 ± 6 (F)		
		(L)	III.2	99 ± 4								
	Pera	(F)	II.2	95 ± 4						97 ± 2 (L)		
		(L)	III.2	92 ± 4								
	Manzana	(F)	II.2	98 ± 7								
		(L)	III.2	97 ± 4								
Fresa	(F)	II.2	91 ± 5									
	(L)	III.2	97 ± 1									
Ciruela roja	(F)	II.2	84 ± 5									
	(L)	III.2	84 ± 5									
Lindano	Pimiento	(F)	II.1								100 ± 6	
		(L)	III.3								94 ± 4	
	Tomate	(F)	II.1			101 ± 6						
		(L)	III.3			97 ± 4						
	Espinaca	(F)	II.1			99 ± 5	99 ± 2 (F)					
		(L)	III.3			95 ± 5						
	Patata	(F)	II.1			103 ± 5	95 ± 2 (L)					
		(L)	III.3			93 ± 5						
	Pepino	(F)	II.1			97 ± 6						
		(L)	III.3			96 ± 4						
	Lechuga	(F)	II.1			97 ± 6						
		(L)	III.3			91 ± 4						
	Berenjena	(F)	III.3			97 ± 4						
		(L)	III.3			97 ± 4						
	Melón	(F)	II.2			91 ± 6						
		(L)	III.2			100 ± 3						
	Naranja	(F)	II.2	103 ± 5								
		(L)	III.2	95 ± 7								
	Cereza	(F)	II.2	99 ± 5	99 ± 6 (F)							
		(L)	III.2	94 ± 6								
Manzana	(F)	II.2	93 ± 7	95 ± 4 (L)								
	(L)	III.2	96 ± 7									
Nectarina	(F)	II.2	103 ± 5									
	(L)	III.2	103 ± 5									
Plátano	(F)	II.2	106 ± 7									
	(L)	III.2	106 ± 7									
Kiwi	(F)	III.2	89 ± 5									
	(L)	III.2	89 ± 5									

**Tabla VI.1.10.2. (Continuación).**

Analitos	Muestra		Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
Vinclozolina	Cebolla	(F)	II.1	93 ± 6	
		(L)	III.3	97 ± 4	
	Pimiento	(F)	II.1	93 ± 7	
		(L)	III.3	95 ± 3	
	Tomate	(F)	II.1	93 ± 6	96 ± 4 (F)
		(L)	III.3	95 ± 3	
	Espinaca	(F)	II.1	102 ± 6	96 ± 1 (L)
		(L)	III.3	96 ± 4	
	Pepino	(F)	II.1	98 ± 6	
		(L)	III.3	96 ± 3	
	Berenjena	(L)	III.3	95 ± 3	
	Melón	(F)	II.2	81 ± 5	
		(L)	III.2	93 ± 9	
	Melocotón	(F)	II.2	80 ± 5	
		(L)	III.2	92 ± 8	
	Naranja	(F)	II.2	81 ± 4	
		(L)	III.2	91 ± 6	
	Cereza	(F)	II.2	71 ± 4	
		(L)	III.2	94 ± 7	77 ± 5 (F)
	Pera	(F)	II.2	70 ± 4	
		(L)	III.2	94 ± 9	93 ± 1 (L)
	Manzana	(F)	II.2	82 ± 6	
		(L)	III.2	95 ± 9	
Fresa	(F)	II.2	81 ± 5		
	(L)	III.2	93 ± 7		
Ciruela roja	(F)	II.2	71 ± 5		
Plátano	(F)	II.2	78 ± 5		
Kiwi	(L)	III.2	92 ± 6		
Diclofuanida	Cebolla	(F)	II.1	95 ± 6	95 ± 6 (F)
		(L)	III.3	93 ± 4	
	Coliflor	(L)	III.3	95 ± 2	97 ± 2 (L)
		(L)	III.3	97 ± 3	
	Melón	(F)	II.2	99 ± 6	
		(L)	III.2	95 ± 7	
	Naranja	(F)	II.2	102 ± 6	
		(L)	III.2	94 ± 6	
	Cereza	(F)	II.2	90 ± 6	
		(L)	III.2	95 ± 5	98 ± 7 (F)
	Pera	(F)	II.2	90 ± 5	
		(L)	III.2	95 ± 5	95 ± 2 (L)
	Manzana	(F)	II.2	102 ± 6	
		(L)	III.2	97 ± 2	
	Fresa	(F)	II.2	94 ± 6	
		(L)	III.2	91 ± 6	
Nectarina	(F)	II.2	107 ± 7		

**Tabla VI.1.10.2. (Continuación).**

Analitos	Muestra		Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)	
Captán	Berenjena	(F)	II.1	66 ± 4	69 ± 5 (F) 84 ± 2 (L)	
		(L)	III.3	85 ± 5		
	Tomate	(F)	II.1	64 ± 3		
		(L)	III.3	88 ± 4		
	Lechuga	(F)	II.1	75 ± 4		
	Zanahoria	(F)	II.1	70 ± 4		
	Cebolla	(L)	III.3	81 ± 4		
	Pepino	(L)	III.3	83 ± 3		
	Coliflor	(L)	III.3	85 ± 5		
	Pimiento	(L)	III.3	84 ± 4		
	Naranja	(F)	II.2	79 ± 4		
		(L)	III.2	88 ± 5		
	Fresa	(F)	II.2	87 ± 5		80 ± 6 (F)
		(L)	III.2	84 ± 6		
	Nectarina	(F)	II.2	75 ± 4		86 ± 2 (L)
	Manzana	(L)	III.2	85 ± 6		
Melón	(L)	III.2	86 ± 7			
Procimidona	Pimiento	(F)	II.1	99 ± 6	91 ± 8 (F) 95 ± 1 (L)	
		(L)	III.3	95 ± 5		
	Pepino	(F)	II.1	96 ± 6		
		(L)	III.3	95 ± 3		
	Cebolla	(F)	II.1	83 ± 5		
		(L)	III.3	93 ± 3		
	Lechuga	(F)	II.1	86 ± 6		
	Tomate	(L)	III.3	96 ± 4		
	Melón	(F)	II.2	72 ± 4		
		(L)	III.2	97 ± 3		
	Melocotón	(F)	II.2	78 ± 5		
		(L)	III.2	95 ± 5		
	Naranja	(F)	II.2	84 ± 5		75 ± 6 (F)
		(L)	III.2	94 ± 4		
	Pera	(F)	II.2	78 ± 6		96 ± 1 (L)
		(L)	III.2	96 ± 2		
Nectarina	(F)	II.2	83 ± 7			
Ciruela roja	(F)	II.2	70 ± 5			
Manzana	(L)	III.2	95 ± 2			
Fresa	(L)	III.2	97 ± 1			

**Tabla VI.1.10.2. (Continuación).**

Analitos	Muestra		Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
$\alpha$ -Endosulfán	Pimiento	(F)	II.1	93 ± 6	
		(L)	III.3	83 ± 4	
	Espinaca	(F)	II.1	88 ± 6	
		(L)	III.3	88 ± 3	92 ± 4 (F)
	Patata	(F)	II.1	96 ± 6	
		(L)	III.3	85 ± 3	85 ± 2 (L)
	Pepino	(L)	III.3	84 ± 4	
	Berenjena	(L)	III.3	85 ± 4	
	Tomate	(L)	III.3	87 ± 5	
	Melocotón	(F)	II.2	92 ± 6	
		(L)	III.2	87 ± 6	
	Cereza	(F)	II.2	103 ± 6	
		(L)	III.2	85 ± 7	
	Pera	(F)	II.2	93 ± 6	
		(L)	III.2	83 ± 8	97 ± 6 (F)
	Manzana	(F)	II.2	95 ± 6	
		(L)	III.2	84 ± 7	85 ± 2 (L)
	Nectarina	(F)	II.2	91 ± 5	
	Plátano	(F)	II.2	106 ± 5	
	Kiwi	(L)	III.2	84 ± 8	
Melón	(L)	III.2	88 ± 7		
$\beta$ -Endosulfán	Pimiento	(F)	II.1	104 ± 7	
		(L)	III.3	95 ± 3	
	Espinaca	(F)	II.1	92 ± 6	
		(L)	III.3	96 ± 4	99 ± 6 (F)
	Patata	(F)	II.1	102 ± 6	
		(L)	III.3	94 ± 4	95 ± 2 (L)
	Pepino	(L)	III.3	96 ± 4	
	Berenjena	(L)	III.3	93 ± 4	
	Tomate	(L)	III.3	98 ± 4	
	Melocotón	(F)	II.2	106 ± 7	
		(L)	III.2	95 ± 5	
	Cereza	(F)	II.2	101 ± 7	
		(L)	III.2	91 ± 5	
	Pera	(F)	II.2	97 ± 6	
		(L)	III.2	93 ± 5	101 ± 5 (F)
	Manzana	(F)	II.2	98 ± 6	
		(L)	III.2	92 ± 8	93 ± 1 (L)
	Nectarina	(F)	II.2	109 ± 5	
	Plátano	(F)	II.2	96 ± 6	
	Kiwi	(L)	III.2	93 ± 7	
Melón	(L)	III.2	94 ± 7		

**Tabla VI.1.10.2. (Continuación).**

Analitos	Muestra		Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
Endosulfán sulfato	Pimiento	(F)	II.1	96 ± 6	99 ± 4 (F) 96 ± 2 (L) 89 ± 4 (F) 95 ± 1 (L)
		(L)	III.3	93 ± 6	
	Espinaca	(F)	II.1	97 ± 7	
		(L)	III.3	97 ± 3	
	Patata	(F)	II.1	103 ± 7	
		(L)	III.3	96 ± 2	
	Pepino	(L)	III.3	98 ± 3	
	Berenjena	(L)	III.3	95 ± 2	
	Tomate	(L)	III.3	98 ± 3	
	Melocotón	(F)	II.2	91 ± 6	
		(L)	III.2	97 ± 4	
	Pera	(F)	II.2	92 ± 5	
		(L)	III.2	96 ± 2	
	Manzana	(F)	II.2	90 ± 5	
		(L)	III.2	95 ± 1	
	Nectarina	(F)	II.2	83 ± 6	
Kiwi	(L)	III.2	96 ± 3		
Melón	(L)	III.2	93 ± 1		
Cereza	(L)	III.2	95 ± 3		
Bifentrín	Cebolla	(L)	III.3	65 ± 2	71 ± 4 (L) 70 ± 3 (L)
		(L)	III.3	76 ± 3	
	Pepino	(L)	III.3	71 ± 3	
	Coliflor	(L)	III.3	67 ± 2	
	Berenjena	(L)	III.3	75 ± 3	
	Tomate	(L)	III.3	71 ± 3	
	Manzana	(L)	III.2	66 ± 2	
	Melocotón	(L)	III.2	70 ± 3	
	Pera	(L)	III.2	76 ± 4	
	Fresa	(L)	III.2	68 ± 1	
	Melón	(L)	III.2	70 ± 2	
	Naranja	(L)	III.2	69 ± 1	
Fenpropatrín	Espinaca	(L)	III.3	95 ± 4	92 ± 3 (L) 92 ± 1 (L)
		(L)	III.3	90 ± 3	
	Coliflor	(L)	III.3	88 ± 3	
	Berenjena	(L)	III.3	90 ± 4	
	Tomate	(L)	III.3	95 ± 4	
	Pimiento	(L)	III.3	93 ± 3	
	Manzana	(L)	III.2	91 ± 4	
	Pera	(L)	III.2	92 ± 1	
	Fresa	(L)	III.2	93 ± 9	
	Kiwi	(L)	III.2	92 ± 8	

**Tabla VI.1.10.2. (Continuación).**

Analitos	Muestra		Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
$\lambda$ -Cihalotrín	Espinaca	(L)	III.3	97 $\pm$ 5	94 $\pm$ 3 (L)
	Pepino	(L)	III.3	92 $\pm$ 3	
	Coliflor	(L)	III.3	93 $\pm$ 4	
	Berenjena	(L)	III.3	97 $\pm$ 5	
	Pimiento	(L)	III.3	90 $\pm$ 4	96 $\pm$ 2 (L)
	Pera	(L)	III.2	93 $\pm$ 8	
	Fresa	(L)	III.2	98 $\pm$ 7	
	Melón	(L)	III.2	95 $\pm$ 7	
	Cereza	(L)	III.2	97 $\pm$ 6	
Naranja	(L)	III.2	98 $\pm$ 8		
Permetrín	Espinaca	(L)	III.3	93 $\pm$ 4	91 $\pm$ 4 (L)
	Coliflor	(L)	III.3	84 $\pm$ 3	
	Berenjena	(L)	III.3	95 $\pm$ 5	
	Tomate	(L)	III.3	92 $\pm$ 4	
	Pimiento	(L)	III.3	92 $\pm$ 4	90 $\pm$ 2 (L)
	Manzana	(L)	III.2	88 $\pm$ 8	
	Melocotón	(L)	III.2	90 $\pm$ 7	
Naranja	(L)	III.2	91 $\pm$ 5		
Ciflutrín	Cebolla	(L)	III.3	89 $\pm$ 5	93 $\pm$ 4 (L)
	Coliflor	(L)	III.3	91 $\pm$ 4	
	Patata	(L)	III.3	98 $\pm$ 5	
	Tomate	(L)	III.3	96 $\pm$ 3	
	Melocotón	(L)	III.2	88 $\pm$ 2	89 $\pm$ 1 (L)
	Cereza	(L)	III.2	90 $\pm$ 2	
$\beta$ -Ciflutrín	Cebolla	(L)	III.3	94 $\pm$ 4	94 $\pm$ 4 (L)
	Coliflor	(L)	III.3	96 $\pm$ 4	
	Patata	(L)	III.3	100 $\pm$ 4	
	Tomate	(L)	III.3	88 $\pm$ 5	
	Melocotón	(L)	III.2	93 $\pm$ 7	93 $\pm$ 1 (L)
	Cereza	(L)	III.2	92 $\pm$ 6	

**Tabla VI.1.10.2. (Continuación).**

Analitos	Muestra		Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
Cipermetrín	Cebolla	(L)	III.3	92 ± 3	93 ± 4 (L)
	Espinaca	(L)	III.3	98 ± 3	
	Patata	(L)	III.3	94 ± 4	
	Tomate	(L)	III.3	89 ± 3	
	Pimiento	(L)	III.3	90 ± 3	
	Manzana	(L)	III.2	97 ± 2	94 ± 4 (L)
	Melocotón	(L)	III.2	85 ± 4	
	Pera	(L)	III.2	97 ± 1	
	Fresa	(L)	III.2	98 ± 2	
	Kiwi	(L)	III.2	93 ± 5	
Melón	(L)	III.2	97 ± 2		
α-Cipermetrín	Cebolla	(L)	III.3	91 ± 4	91 ± 1 (L)
	Espinaca	(L)	III.3	92 ± 3	
	Patata	(L)	III.3	90 ± 4	
	Tomate	(L)	III.3	93 ± 4	
	Pimiento	(L)	III.3	89 ± 3	
	Melocotón	(L)	III.2	91 ± 6	93 ± 2 (L)
	Pera	(L)	III.2	92 ± 3	
	Fresa	(L)	III.2	95 ± 8	
Kiwi	(L)	III.2	95 ± 3		
Fenvalerato	Espinaca	(L)	III.3	92 ± 3	90 ± 4 (L)
	Coliflor	(L)	III.3	96 ± 4	
	Berenjena	(L)	III.3	87 ± 3	
	Pimiento	(L)	III.3	86 ± 3	
	Kiwi	(L)	III.2	92 ± 4	91 ± 1 (L)
Cereza	(L)	III.2	90 ± 5		
Deltametrín	Espinaca	(L)	III.3	81 ± 3	78 ± 2 (L)
	Pepino	(L)	III.3	76 ± 4	
	Coliflor	(L)	III.3	77 ± 4	
	Berenjena	(L)	III.3	78 ± 4	
	Pimiento	(L)	III.3	79 ± 2	
	Melón	(L)	III.2	84 ± 6	82 ± 2 (L)
	Cereza	(L)	III.2	80 ± 4	
	Naranja	(L)	III.2	82 ± 5	

Los resultados de las recuperaciones pueden ser comentados desde diferentes perspectivas, pero desde el punto de vista general, todos los plaguicidas, en los diferentes métodos utilizados, obtienen recuperaciones de más del 90%, excepto captán (64-88%) del grupo de plaguicidas organoclorados, y bifentrín (65-76%) y deltametrín (76-84%) del grupo de los piretroides. En cuanto a las matrices, no hay diferencias significativas en la aplicación de los diferentes métodos a frutas u hortalizas (quizás ligeramente mejor para hortalizas). La nectarina es la fruta que presenta recuperaciones sensiblemente menores cuando se determinan los analitos en frutas frescas (Cap. II.2), mientras que de las frutas liofilizadas no hay ninguna destacable (la nectarina no fue utilizada en el Cap. III.2). En cuanto a las hortalizas, la berenjena es la matriz fresca que proporciona recuperaciones ligeramente menores, aunque liofilizada no presenta diferencias significativas con respecto a las demás matrices hortícolas liofilizadas. El pimiento es la única matriz cuyas recuperaciones son sensiblemente menores tanto fresca como liofilizada, debido a que es precisamente la que proporciona el extracto más sucio, independientemente de que la matriz esté o no liofilizada. Sin embargo, matrices como la cebolla reconocidas como muy sucias en la bibliografía, no presentaron problemas con las metodologías desarrolladas en esta Memoria.

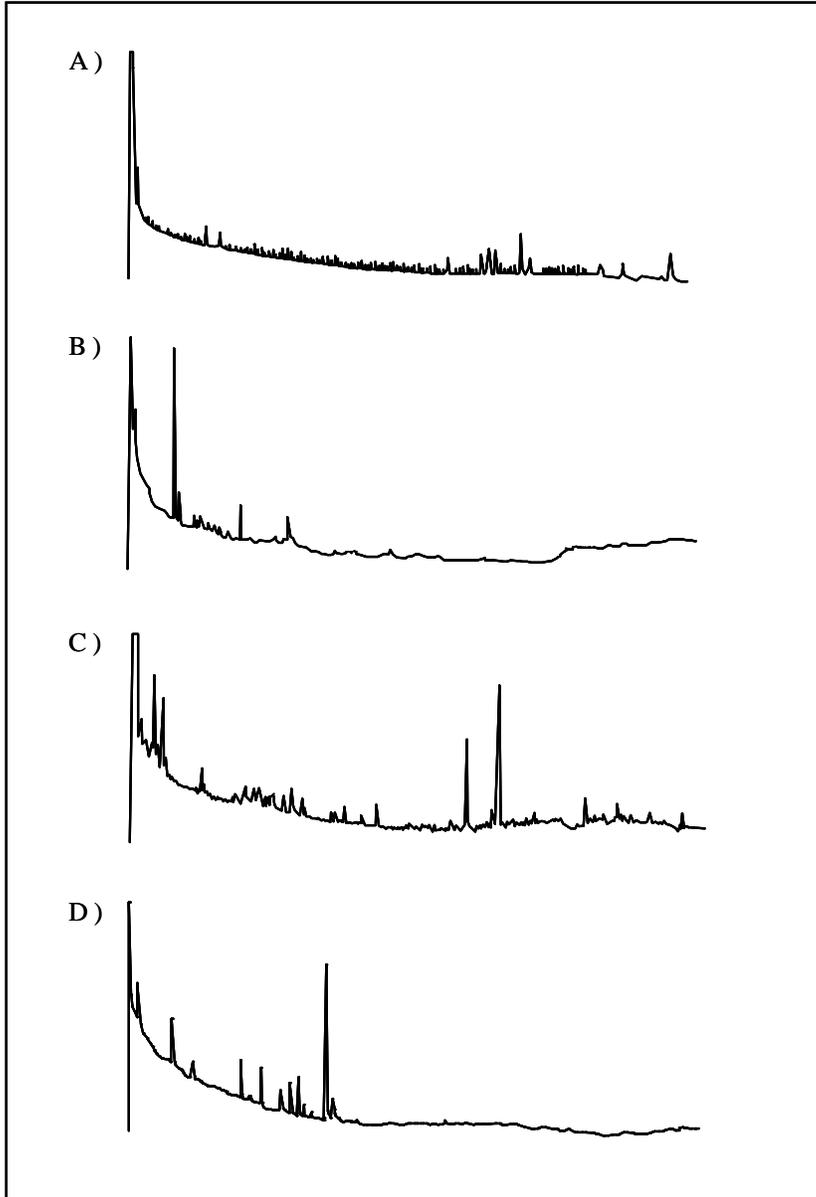
Para realizar los estudios de recuperación de muestras liofilizadas, la fortificación se realizó en la matriz fresca antes de someterse al proceso de liofilización, previo estudio del comportamiento de los analitos estudiados frente a dicho proceso de liofilización, como ya ha sido comentado en el Cap. VI.1.3 sobre pretratamiento de la muestra.

Si se comparan las recuperaciones de los plaguicidas organoclorados estudiados en muestras frescas (Cap. II) y liofilizadas (Cap. III.2 y III.3), puede observarse que son muy similares, alrededor del 95%, excepto para tres analitos (vinclozolina, captán y procimidona), para los cuales las recuperaciones desde algunas matrices frescas son menores del 80%, mientras que desde las liofilizadas son mucho mayores. Estos plaguicidas son vinclozolina (fruta fresca, 77%; fruta liofilizada, 93%), captán (hortaliza fresca, 69; hortaliza liofilizada, 84%) y procimidona (fruta fresca, 75; fruta liofilizada, 96%). Por el contrario,  $\alpha$ -endosulfán y  $\beta$ -endosulfán presentan unas recuperaciones sensiblemente mejores para las matrices frescas que para las liofilizadas (hortaliza fresca 92 y 99% frente a las liofilizadas 85 y 95%, respectivamente; fruta fresca 97 y 101% frente a las liofilizadas 85 y 93%, respectivamente). Este hecho puede ser debido a una extracción menos efectiva de estos plaguicidas con n-hexano (Cap. III.2 y III.3) que cuando la fase es menos apolar (Cap. II)

Por tanto, y puesto que los plaguicidas organoclorados con menores recuperaciones desde muestras frescas (principalmente captán) mejoran las mismas usando muestras liofilizadas, que para el resto de organoclorados son similares en ambos tipos de muestras y que únicamente  $\alpha$ -endosulfán y  $\beta$ -endosulfán disminuyen sus recuperaciones con muestras liofilizadas, pero sólo al 85% en el caso más desfavorable, podemos afirmar que el uso de muestras liofilizadas proporciona mejores resultados, además de la ventaja que supone el proceso de la liofilización en la conservación de las muestras hortofrutícolas.

A pesar de que los métodos desarrollados proporcionan extractos bastante limpios, es inevitable la presencia de algunos coextractos procedentes de las matrices. Sin embargo, los picos cromatográficos de los mismos no interfirieron en la resolución cromatográfica de los analitos. Así, en el caso de muestras liofilizadas, dichos picos cromatográficos se sitúan al principio de los cromatogramas, de manera que de ninguna forma afectan a la zona donde se sitúan los picos correspondientes a los plaguicidas. En cuanto a los cromatogramas de muestras frescas, las pocas interferencias existentes se sitúan a lo largo del cromatograma, pero en ningún caso solapan con los picos cromatográficos de los analitos. De cualquier manera, los cromatogramas de muestras liofilizadas fueron siempre más limpios que los de las muestras frescas, como se puede observar en la Figura VI.1.10.1, lo cual supone otra ventaja de la liofilización de las muestras hortofrutícolas en la determinación de estos plaguicidas.

Por último, aunque la retención de los piretroides sobre la columna de sílica es del 100% en todos los casos, tanto en su determinación individual en el Cap. III.1, como en la conjunta con los organoclorados en los Cap. III.2 y III.3, la ausencia de diferencias significativas en las recuperaciones de los mismos en dichos capítulos pone de manifiesto que su separación/determinación no se ve afectada por la presencia de los plaguicidas organoclorados.



**Figura VI.1.10.1.** Cromatogramas de muestras no contaminadas de espinaca fresca (A) y liofilizada (B), y de fresa fresca (C) y liofilizada (D), obtenidos siguiendo los métodos descritos en los capítulos II y III de esta Memoria.

### C. MUESTRAS POSITIVAS

De un total de 349 muestras hortofrutícolas estudiadas (159 hortalizas y 190 frutas), los resultados positivos por presencia de plaguicidas (Tabla VI.1.10.3) han supuesto el 12% de las mismas, sin que exista una tendencia hacia uno de los dos grupos de muestras. En cambio, sí podemos comentar que la fresa y la manzana, y el pimiento y el tomate, son las frutas y hortalizas, respectivamente, que mayor número de resultados positivos han arrojado. Por otro lado, los plaguicidas cuyos residuos han sido más veces detectados fueron vinclozolina, procimidona, cipermetrín, bifentrín y  $\lambda$ -cihalotrín. Sin embargo, tan sólo seis muestras se sitúan por encima del LMR establecido en cada caso [para tres de ellas (fenvalerato en tomate y kiwi, captán en naranja) según la legislación vigente en septiembre 2001, aunque no en el momento en que se realizó el estudio, y para otra ( $\lambda$ -cihalotrín en fresa) no sería positiva si se contempla la legislación actual, pero sí cuando se realizó su determinación]. Esto significa que sólo el 1.5% de las muestras evaluadas no cumplían con los requisitos exigidos por la Unión Europea en materia de residuos de plaguicidas, aunque el resultado positivo de la procimidona en manzana es alarmante, 20 veces mayor que la concentración permitida.

Las muestras en las que no se han encontrado residuos de plaguicidas son: ciruela roja, zanahoria, lechuga y champiñón, y los plaguicidas que no han aparecido a niveles detectables son:  $\alpha,\beta,\delta$ -HCH, HCB, heptacloro, aldrín, dieldrín, clorbenside, clordano,  $\beta$ -endosulfán, endosulfán sulfato, iprodiona, captafol, metoxicloro, butóxido de piperonilo, fenpropatrín y ciflutrín.

**Tabla VI.1.10.3.** Relación de muestras hortofrutícolas encontradas con residuos de los plaguicidas estudiados a lo largo de esta Memoria.

Muestra	Capítulo	Plaguicida	Concentración (ng/g) <sup>1</sup>	LMR (UE) <sup>2</sup> (ng/g)
Espinaca	III.1	Cipermetrín	420 ± 20	500
	III.3	Cipermetrín	385 ± 20	500
Acelga	III.1	Cipermetrín	90 ± 5	500
Pimiento	III.1	Bifentrín	96 ± 7	NE <sup>3</sup>
	III.3	Diclorán	6 ± 1	NE <sup>3</sup>
	III.3	Diclorán	9 ± 1	NE <sup>3</sup>
Tomate	III.3	Permetrín	215 ± 15	500
	III.1	Fenvalerato	650 ± 40	1000 (20)
	III.3	Diclofuanida	14 ± 1	5000
Patata	III.3	Procimidona	529 ± 33	2000
	III.3	α-Endosulfán	31 ± 2	50
Pepino	III.3	Cipermetrín	280 ± 15	50
	III.3	Deltametrín	48 ± 3	100
Berenjena	III.3	Captán	85 ± 6	100
	III.3	Bifentrín	8 ± 1	NE <sup>3</sup>
Coliflor	III.3	Diclofuanida	39 ± 3	5000
	III.3	Permetrín	55 ± 4	100
Cebolla	III.3	Bifentrín	8 ± 1	NE <sup>3</sup>
Melocotón	II.2	Vinclozolina	6.0 ± 0.3	2000 (50)
	III.2	Vinclozolina	23 ± 4	2000 (50)
Nectarina	II.2	Captán	5.0 ± 0.2	2000
Plátano	II.2	Dicofol	7.3 ± 0.4	2000 (20)
Fresa	II.2	Diclofuanida	6.4 ± 0.4	10000
	II.2	Vinclozolina	4.8 ± 0.3	5000
	III.1	λ-Cihalotrín	24 ± 2	20 (500)
	III.2	Procimidona	109 ± 8	5000
	III.2	λ-Cihalotrín	14 ± 4	20 (500)
Manzana	II.2	Lindano	4.5 ± 0.3	1000
	III.1	Permetrín	170 ± 12	1000
	III.2	Procimidona	400 ± 35	20
Pera	III.1	λ-Cihalotrín	55 ± 3	100
	III.2	Procimidona	136 ± 9	1000
Naranja	III.1	Bifentrín	85 ± 5	NE <sup>3</sup>
	III.2	Captán	530 ± 25	3000 (100)
Kiwi	III.2	Vinclozolina	2600 ± 365	10000
	III.2	Fenvalerato	34 ± 7	50 (20)
Melón	III.2	Deltametrín	28 ± 7	50
Cereza	III.2	λ-Cihalotrín	38 ± 4	100

<sup>1</sup>Concentración expresada por gramo de muestra fresca.

<sup>2</sup>LMR establecido en el momento de la realización de cada trabajo. Entre paréntesis los LMR actualizados a septiembre de 2001.

<sup>3</sup>No establecido por la UE.

**Muestras Acuosas****A. CALIBRACIONES**

Las calibraciones efectuadas en el Cap. IV.1 se realizaron siguiendo los métodos quimiométricos más simples, mientras que en el Cap. IV.2 se utilizaron métodos quimiométricos más complejos, como ya ha sido comentado en la Sección 1.8 de este capítulo. Los resultados de ambas calibraciones están recogidos en la Tabla VI.1.10.4.

**Tabla VI.1.10.4.** Relación de los límites de detección, rangos de linealidad y precisión para cada analito en cada uno de los dos métodos desarrollados.

Analito	Capítulo	LOD (ng/mL)	Rango lineal (ng/mL)	RSD (%) / RMSECV <sup>1</sup>
$\alpha$ -HCH	IV.1	0.03	0.1-20	4.6
$\beta$ -HCH	IV.1	0.08	0.2-35	5.8
Lindano	IV.1	0.03	0.1-20	4.7
$\delta$ -HCH	IV.1	0.03	0.1-20	4.5
Vinclozolina	IV.1	0.03	0.1-20	5.0
Diclofuanida	IV.1	0.08	0.3-40	5.1
	IV.2	1.2	1.2-4.8	0.171
Aldrín	IV.1	0.03	0.1-20	4.1
Dicofol	IV.1	0.05	0.2-30	5.9
Captán	IV.1	0.10	0.5-50	4.8
	IV.2	1.2	1.2-4.8	0.149
Procimidona	IV.1	0.08	0.2-40	4.6
$\alpha$ -Endosulfán	IV.1	0.01	0.05-10	5.0
$\beta$ -Endosulfán	IV.1	0.02	0.07-15	4.2
Endosulfán-sulfato	IV.1	0.03	0.1-20	3.5
Fenpropatrín	IV.2	1.2	1.2-4.8	0.193

<sup>1</sup>La precisión está expresada como RSD en el Cap. IV.1 y como RMSECV en el Cap. IV.2.

A pesar de los esfuerzos realizados en la calibración mediante PLS de los plaguicidas diclofuanida, captan y fenpropatrín (Cap. IV.2), para eliminar la influencia

en los espectros finales de las impurezas provenientes de los disolventes utilizados a lo largo del proceso analítico, no fue posible alcanzar los LMRs establecidos (0.1 ng/mL para plaguicidas individualmente y 0.5 ng/mL para la suma de plaguicidas) por la UE y España. Sin embargo, el límite de detección alcanzado, ligeramente diez veces superior al menor LMR, da una idea del potencial que el FTIR junto con el tratamiento de los espectros mediante PLS tiene en la determinación de plaguicidas sin el uso de la cromatografía.

#### B. ESTUDIO DE ADSORCION / DEGRADACION DE PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS EN MUESTRAS ACUOSAS CON MATERIA ORGANICA

Con este estudio, realizado en el Cap. IV.1, se pretendió determinar:

- La degradación de los plaguicidas organoclorados en medio acuoso alcalino con presencia de materia orgánica.
- La adsorción de los mismos sobre la materia orgánica presente en la muestra acuosa.
- La reversibilidad o no de dicha adsorción.

La muestra acuosa con la que se trabajó tenía un pH ligeramente alcalino (8.1), con lo cual, la degradación parcial de algunos de los plaguicidas organoclorados estudiados en este medio fue inevitable. Los resultados demostraron que el porcentaje de degradación a este valor de pH era independiente de la presencia de materia orgánica

en suspensión en la muestra acuosa. Además, hay que señalar que captán y diclofuanida presentan una degradación del 100% tras 7 h, debido a ese medio alcalino. Por otro lado, la adsorción sobre dicha materia orgánica (algas verdes del género *Spirogyra* en su mayor parte y en menor cantidad algas azul-verdes del género *Oscillatoria* y algas unicelulares diatomeas) en el tiempo presentaba dos tipos de comportamiento por parte de los analitos: un grupo de ellos (diclofuanida, procimidona, dicofol, captán, endosulfán sulfato,  $\alpha,\beta$ -endosulfán y aldrín) eran adsorbidos rápidamente y el porcentaje de adsorción permanecía ya estable con el tiempo, que se correspondían con aquellos que presentaban un mayor valor de  $K_{ow}$  (menor solubilidad en agua); y otro grupo ( $\alpha,\beta,\delta$ -HCH, lindano y vinclozolina) en los que la adsorción aumentaba con el tiempo. Con respecto a la irreversibilidad de dicha adsorción, queda patente que aumenta también con el tiempo, puesto que, en general, es mucho mayor tras 24 horas después de la fortificación, que a la media hora y, que para la mayoría de los organoclorados, es irreversible esta adsorción. La excepción es dicofol, el cual presentó porcentajes de recuperación entre 85 y 75%. El hecho de que fue uno de los plaguicidas estudiados con menor degradación en medio alcalino, unido a que quizás su unión a la materia orgánica se realice mediante débiles interacciones químicas explique que su adsorción fuese prácticamente reversible.

### C. RECUPERACIONES

El método propuesto en el Cap. IV.2 es más complejo que el del Cap. IV.1 y, al tratarse de un nuevo enfoque en la metodología, resultó más apropiado reflejar su

fiabilidad mediante el estudio de recuperación de los tres plaguicidas seleccionados en dos muestras de agua. La Tabla VI.1.10.5 recoge los resultados de dicho estudio.

**Tabla VI.1.10.5.** Recuperaciones obtenidas de dos tipos de muestras acuosas analizadas mediante el método descrito en Cap. IV.2.

Muestra	Diclofuanida	Captán	Fenpropatrín
Agua de grifo	88 ± 4	66 ± 6	102 ± 7
Agua de río	92 ± 3	70 ± 7	89 ± 3

En un principio, puede parecer extraño que las recuperaciones obtenidas para los plaguicidas organoclorados sea mayor en la muestra de agua de río que en la de grifo. Sin embargo, y aunque las diferencias entre dichos valores no son demasiado significativas, podría justificarse por el hecho de que dicha agua de río, cuya toma de muestra se realizó en su nacimiento, carece de las sustancias que se añaden al agua de la red de abastecimiento público para su potabilización, y que podrían interferir en las regiones del espectro seleccionadas para la calibración de dichos organoclorados, aunque no en la del piretroide.

En cualquier caso, los valores de recuperación son aceptables en ambas muestras y para los tres plaguicidas y, como en el caso de las muestras hortofrutícolas, captán es el plaguicida que ostenta los menores valores de recuperación.

#### D. MUESTRAS POSITIVAS

De las 17 muestras acuosas (aguas de río, laguna, pozo, pantano y grifo) analizadas mediante el procedimiento descrito en el Cap. IV.1, únicamente 5 resultaron

contener plaguicidas a los niveles detectables por dicho método. De dichas muestras, únicamente una (Laguna 1) contiene residuos de plaguicidas a niveles similares al LMR establecido para plaguicidas individualmente, aunque no para la cantidad global; en el resto de los casos positivos, siempre fueron inferiores a 0.1 ng/mL. Ningunas de las muestras de agua de la red de abastecimiento público de diferentes pueblos de la Provincia de Córdoba y de su capital, así como de la ciudad de Viena, resultaron contener residuos de alguno de los plaguicidas estudiados. Los valores de los resultados positivos se encuentran recogidos en la Tabla VI.1.10.6.

**Tabla VI.1.10.6.** Relación de muestras acuosas en las que se detectaron residuos de los plaguicidas estudiados en el Cap. IV.1.

Muestra	Plaguicida	Concentración (ng/mL)
Pozo 1	Lindano	0.09 ± 0.01
Pozo 2	Lindano	0.04 ± 0.01
Río	Aldrín	0.04 ± 0.01
Laguna 1	Vinclozolina	0.13 ± 0.01
	Endosulfán sulfato	0.12 ± 0.01
Laguna 2	Procimidona	0.09 ± 0.01

En cuanto a las dos muestras analizadas en el Cap. IV.2, no se encontraron ninguno de los tres plaguicidas estudiados a concentraciones iguales o superiores a 1.2 ng/mL, aunque esta información carece de valor para establecer si se encuentran los compuestos a concentraciones mayores o menores que el LMR establecido.

**Fluidos Biológicos****A. CALIBRACIONES**

La calibración en este Cap. V.1 se realizó mediante la monitorización selectiva de iones (SIM), con los valores de  $m/z$  especificados en la Tabla VI.1.10.7.1. Tanto los límites de detección como los rangos de linealidad (Tabla VI.1.10.7.1) son equiparables o mejores que los recogidos en la bibliografía recopilada (0.03-500 ng/mL) [9,10,11], así como adecuados para la monitorización de personas en contacto con los plaguicidas organoclorados incluidos en este estudio y los piretroides que, en su transformación en el organismo humano, den lugar a los metabolitos *cis* y *trans*-DCCA, *cis*-DBCA y PBA.

El estudio de recuperación (Tabla VI.1.10.7) pone de manifiesto que, de nuevo, captán es el plaguicida con un menor porcentaje de recuperación.

**Tabla VI.1.10.7.** Relación de los límites de detección, rangos lineales y recuperaciones para cada analito en muestras de orina.

Analito	LOD (ng/mL)	Rango lineal (ng/mL)	Recuperación (%)
cis y trans-DCCA	0.1	0.3-350	93
cis-DBCA	0.1	0.5-350	100
PBA	0.1	0.5-350	101
$\alpha$ -HCH	0.2	0.5-350	94
HCB	0.1	0.5-350	98
Diclorán	0.1	0.5-350	97
$\beta$ -HCH	0.1	0.5-350	93
$\gamma$ -HCH	0.1	0.5-350	101
$\delta$ -HCH	0.1	0.5-350	90
Vinclozolina	0.1	0.5-350	99
Heptacloro	0.2	0.7-350	92
Diclofuanida	0.2	0.7-350	95
Aldrín	0.1	0.5-350	100
Dicofol	0.1	0.5-350	97
Captán	0.3	1.0-350	88
Procimidona	0.1	0.5-350	96
Clorbenside	0.1	0.5-350	97
Clordano	0.1	0.5-350	101
$\alpha$ -Endosulfán	0.1	0.5-700	98
Dieldrín	0.1	0.5-350	96
Endrín	0.1	0.5-350	93
$\beta$ -Endosulfán	0.1	0.5-700	95
Endosulfán sulfato	0.2	0.7-500	90
Captafol	0.1	0.5-700	91
Iprodiona	0.3	2.0-500	95
Metoxicloro	0.1	0.5-700	94

## B. MUESTRAS POSITIVAS

Las muestras de orina analizadas en este Cap. V.1, fueron recogidas de la doctoranda durante los dos últimos años (1 muestra cada 2 meses; total 12 muestras) del periodo experimental de la presente Memoria. De esta forma, se pretendió conocer el posible grado de contaminación de la misma durante el tiempo (4 años) que estuvo en contacto con los plaguicidas contemplados a lo largo de este trabajo.

**Tabla VI.1.10.8.** Determinación de plaguicidas organoclorados y metabolitos de piretroides en muestras de orina de un investigador expuesto. Todas las concentraciones están expresadas en ng/mL (n=3).

Muestra	Plaguicida encontrado	Concentración
1	No detectados	-
2	Endosulfán sulfato	1.6 ± 0.1
3	No detectados	-
4	Captafol	17 ± 1
5-8	No detectados	-
9	Dicofol	23 ± 2
10	Dicofol	0.6 ± 0.1
11	No detectados	-
12	PBA	2.1 ± 0.2
	cis y trans DCCA	0.8 ± 0.1
	Dicofol	19 ± 2

Podemos observar en la Tabla VI.1.10.8, que los niveles de contaminación son, en todos los casos, muy bajos y, seguramente se produjeron debido a la manipulación de los patrones de los analitos (sólidos en su mayoría) para preparar las disoluciones madre de los mismos (en general a concentraciones de 5 mg/mL). Ello pone de manifiesto que todas las medidas de protección que sean posibles adoptar son pocas,

puesto que en esta Memoria se trabajó siguiendo escrupulosas medidas para evitar la contaminación (ej. pesada y manipulación de los estándares en campanas extractoras, uso de guantes y mascarilla).

De todas formas, no se puede establecer un patrón de comportamiento en la contaminación detectada, puesto que a lo largo del primer año (en que se tomaron las muestras de orina) todos los organoclorados fueron manejados con la misma asiduidad y, tan sólo dos de ellos aparecen en dos muestras (nº 2 y 4). Sin embargo, durante el segundo año de muestreo, sólo un grupo de organoclorados, más los piretroides, fueron utilizados, donde dicofol, que aparece en tres muestras, no estaba incluido. Esto podría ser debido a que quizás este plaguicida entrase en el organismo y quedase acumulado en él, por una contaminación producida en los últimos meses del primer año (correspondientes al periodo de las muestras 5 y 6), para más tarde, debido a alguna razón (pérdida de tejido adiposo, por ejemplo), quedar de nuevo libre en el organismo para ser excretado.

Con respecto a los piretroides, sus metabolitos sólo aparecen en la última muestra tomada, la cual se realizó a las 18 horas de haber preparado unas disoluciones madre de estándares de los mismos. Esto ratifica lo recogido en la bibliografía [11], donde se expone que poseen un rápido metabolismo en el organismo humano y que, por ello, son totalmente metabolizados y excretados en las 24 horas posteriores a su contaminación.

**REFERENCIAS**

- [1] Comisión de las Comunidades Europeas, *Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria*, Bruselas, 2000.
- [2] R. Coscolla, *Residuos de Plaguicidas en Alimentos Vegetales*, Mundi-Prensa, Madrid, 1993.
- [3] *Decreto 2484/1967*, BOE del 17 de Octubre de 1967, Madrid, 1967.
- [4] H. D. Belitz, W. Grosch, *Química de los Alimentos*, Acribia S.A., Zaragoza, 1997.
- [5] E. D. Ongley, *Control of Water Pollution from Agriculture*, FAO/OMS, Roma, 1996.
- [6] E. Alday et al., *Toxicología Laboral Básica*, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Sevilla, 1989.
- [7] G.F. Pang, Y.Z. Chao, C.L. Fan, J.J. Zhang, X.M. Li, Y.M. Liu, T.S. Zhao, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 1489.
- [8] *Real Decreto 280/1994*, BOE nº 58, Ministerio de la Presidencia, Madrid, 1994.
- [9] *Directiva Comunitaria 76/895/CEE*, DO L 340, Comunidad Europea, Bruselas, 1976.
- [10] F. J. Arrebola, J. L. Martínez-Vidal, A. Fernández-Gutierrez, M. H. Akhtar, *Anal. Chim. Acta* 401 (1999) 45.
- [11] G. Leng, K. H. Kuehn, A. Leng, W. Gries, J. Lewalter, H. Idel, *Chromatographia* 46 (1997) 265.
- [12] K. H. Kühn, G. Leng, K. A. Bucholski, L. Dunemann, H. Idel, *Chromatographia* 43 (1996) 285.

**VI.2. CONCLUSIONES MAS RELEVANTES**

A la vista de la investigación desarrollada a lo largo de la Memoria y los resultados alcanzados en la misma, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- a) Se ha contribuido a la automatización del tratamiento de matrices complejas como son las frutas y hortalizas, simplificando notablemente los procedimientos convencionales establecidos hasta la fecha. Así, se ha reemplazado de forma progresiva la etapa previa de extracción manual de los residuos de plaguicidas en estas muestras por el tratamiento completamente automático de las mismas.
- b) Se ha demostrado la aplicabilidad de la liofilización en este ámbito que permite un análisis directo de las muestras de frutas y vegetales, sin pérdida de los analitos de interés. De esta forma se obtienen cromatogramas libres de interferencias en virtud de una extracción más selectiva de los analitos desde las muestras liofilizadas y a la inclusión de etapas de limpieza simples y eficaces, que se llevan a cabo de forma continua.
- c) Se ha abordado el empleo de la espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier y tratamientos quimiométricos para el screening de muestras de agua con el objeto de obtener información rápida sobre la presencia/ausencia de estos analitos en muestras de interés medioambiental.
- d) De las 350 muestras (hortalizas y frutas) analizadas a lo largo de la realización de esta Memoria, se han encontrado los plaguicidas ensayados a concentraciones significativas en aproximadamente el 10% de las mismas.

- e) En el último capítulo de esta Memoria se abordan los aspectos concernientes a la seguridad de la doctoranda mediante una toma de muestra programada durante los dos últimos años de la investigación, contemplando en cada caso los compuestos que se estaban manipulando en ese momento. Como resultado de este seguimiento se detectaron en las muestras de orina plaguicidas a niveles de concentración muy bajos, pero que ponen de manifiesto que, a pesar de las precauciones tomadas a la hora de manipular tanto los patrones como las disoluciones de los analitos, no se ha podido evitar una mínima contaminación.

---

Cuando se evalúan críticamente los resultados obtenidos a lo largo de una Tesis Doctoral parece evidente que, además de subrayar los inconvenientes que se han ido superando de forma satisfactoria, deben ponerse de manifiesto aquellos **aspectos complementarios** de la investigación que, al disponer ahora de una visión global y una comparación sistemática de los resultados, podrían haber completado esta Memoria.

Así, respecto a los *analitos*, algunos LMRs están establecidos como suma de varios plaguicidas. En este sentido, el LMR para captán y folpet está fijado como la suma de ambos expresada como captán; de la misma forma, para heptacloro, su LMR corresponde a la suma de él y su epóxido, expresado como heptacloro. En los estudios cromatográficos preliminares se incluyó el folpet, aunque no se obtuvo una señal

cromatográfica para el mismo, probablemente debido a que tenía lugar una degradación térmica del mismo en el inyector a la temperatura seleccionada para una correcta separación y resolución de los plaguicidas organoclorados (para captar este parámetro es crítico). En relación al epóxido de heptacloro, no fue posible conseguir un patrón de este plaguicida.

Por otro lado, los piretroides no se han estudiado en frutas y verduras frescas por lo que no se ha podido evaluar su comportamiento en estas matrices aunque los buenos resultados alcanzados en las matrices liofilizadas permiten suponer que este tratamiento es también más adecuado para ellos.

En relación con las *muestras*, se pueden comentar dos aspectos:

- a) Ocasionalmente no ha sido similar el tipo de frutas y hortalizas estudiadas como muestras frescas y liofilizadas por problemas ajenos a nuestra voluntad (ej. temporada de producción).
- b) La monitorización de residuos de plaguicidas en fluidos biológicos se ha centrado en el estudio de muestras de orina, puesto que la toma de muestra periódica pudo llevarse a cabo fácilmente por la propia doctoranda. Sin embargo, esta matriz no es la más adecuada para el seguimiento de plaguicidas organoclorados dado su bajo porcentaje de excreción en orina. Sangre total o plasma hubiesen resultado más apropiadas aunque esta opción se desestimó debido a la mayor complejidad que se planteó en la toma de muestra.

### **VI.3. FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACION**

Al profundizar en la investigación han surgido nuevas líneas de trabajo, tales como:

- a) Dada la tendencia actual a la sustitución de los plaguicidas “convencionales” más tóxicos por piretroides, abordar la determinación de éstos en aguas potables.
- b) Estudio de la estabilidad de los plaguicidas seleccionados en esta Memoria sobre columnas adsorbentes con vistas a llevar a cabo el tratamiento “in situ” de las muestras y simplificar el traslado al laboratorio así como su almacenamiento y conservación.
- c) Demostrada la utilidad de la liofilización en la conservación de las muestras y la ausencia de pérdidas de los analitos, extender su estudio a otras matrices (carne, pescado, leche y productos lácteos, etc.) con los mismos plaguicidas así como la determinación de otros contaminantes (PCBs, PAHs, dioxinas, y otros compuestos orgánicos volátiles) en muestras hortofrutícolas.

**VI.2. SUMMARY OF THE MOST SALIENT CONCLUSIONS**

Based on the work performed and its results, the following major conclusions can be drawn:

- a) The treatment of complex matrices such as those of fruits and vegetables was substantially simplified in relation to existing conventional procedures. Thus, the preliminary manual extraction of pesticide residues from these samples was gradually replaced with their fully automatic treatment.
- b) The applicability of freeze-drying in this field, where it enables direct analysis of fruits and vegetables with no loss of the target analytes, was demonstrated. Use of this technique provides interference-free chromatograms by virtue of more selective extraction of the analytes from freeze-dried samples and the introduction of simple, efficient clean-up steps that are conducted in a continuous manner.
- c) Fourier transform infrared (FTIR) spectrometry was used in combination with chemometric procedures to screen water samples with a view to the rapid acquisition of information about the presence or absence of the analytes in environmentally significant samples.
- d) Of the 350 fruit and vegetables samples studied, pesticides were encountered at significant concentrations in roughly 10% of them.
- e) The last chapter of this Thesis analyses the doctorand's safety during the conduct of this work. To this end, samples were collected on a regular basis over the last two years of work and analysed for the compounds being

handled at the time. These monitoring analyses revealed the presence of some pesticides at very low concentrations in urine, so, despite the cautions exercised in handling both standards and analyte solutions, some (minimal) contamination could not be avoided.

---

In assessing the results of doctoral work, one must state not only the drawbacks that were successfully overcome but also certain **complementary aspects** of the research that became apparent from the global view provided by the results.

Thus, regarding the analytes, some MRLs are given as the combined amounts of several pesticides. In fact, the MRL for captan and folpet is reported as the combination of both, expressed in terms of captan; similarly, the MRL for heptachlor corresponds to the combination of this pesticide and its epoxide, expressed as heptachlor. Preliminary chromatographic tests included folpet, even though it yielded no chromatographic signal—probably because it was thermally degraded at the injector temperature used to ensure correct separation and resolution of organochlorine pesticides—; such a temperature was critical for captan. Also, no heptachlor epoxide standard was available.

On the other hand, pyrethroids had not been assayed in fresh fruits or vegetables, so their behaviour in these types of matrix could not be established. In any case, the

good results obtained with freeze-dried matrices suggest that this treatment should also be the most suitable for them.

The *samples* warrant two major comments, namely:

- a) For reasons beyond control (off-seasonality), fresh and freeze-dried samples of the fruits and vegetables studied were occasionally dissimilar.
- b) Residual pesticide levels in biological fluids were monitored in urine samples, which were readily obtained on a regular basis by the doctor and herself. However, this type of matrix is not the most appropriate for monitoring organochlorine pesticides owing to the low proportions in which they are released through urine. Whole blood or plasma would have been more appropriate but extractions were ruled out owing to their complexity.

### VI.3. FUTURE RESEARCH LINES

As research progressed, the following three lines for potential expansion arose:

- a) The current trend to replacing conventional pesticides (more toxic) with pyrethroid pesticides makes it advisable to address their determination in drinking water.
- b) The stability of the studied pesticides could be assessed by using sorbent columns with a view to the *in situ* treatment of samples and simplifying transfer to the laboratory, storage and preservation.
- c) Once freeze-drying has been shown to effectively allow the preservation of samples with no analyte losses, its use could be extended to other matrices (*e.g.* meat, fish, milk, dairy products) containing the same pesticides, as well as to other pollutants (*e.g.* PCBs, PAHs, dioxins and other volatile organic compounds) in fruits and vegetables.

ANEXOS

ANNEXES

ANEXOS



**ANEXO A. ACRONIMOS**

<b>AED</b>	Detector de emisión atómica ( <i>Atomic emission detector</i> )
<b>ATR</b>	Reflectancia total atenuada ( <i>Attenuated total reflectance</i> )
<b>CAS</b>	<i>Chemical Abstracts Service</i>
<b>DBCA</b>	Ácido carboxílico cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetil-(1-ciclopropano)
<b>DCCA</b>	Ácido carboxílico cis y trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil-(1-ciclopropano)
<b>DDA</b>	Diclorodifenilacético
<b>DDT</b>	Diclorodifeniltricloroetano
<b>DEC</b>	Detector de conductividad electrónica ( <i>Detector of electronical conductivity</i> )
<b>DIC</b>	Diisopropilcarbodiimida
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal de un tóxico que produce la muerte en el 50% de los animales ensayados
<b>DTGS</b>	Sulfato de triglicina deuterada ( <i>Deuterated triglycine sulphate</i> )
<b>ECD</b>	Detector de captura de electrones ( <i>Electron capture detector</i> )
<b>EI</b>	Impacto electrónico ( <i>Electron impact</i> )
<b>FA (FI)</b>	Análisis / Inyección en flujo ( <i>Flow analysis / injection</i> )
<b>FAO</b>	Organización para la agricultura y alimentos ( <i>Food Agricultural Organization</i> )
<b>FID</b>	Detector de ionización de llama ( <i>Flame ionization detector</i> )

<b>FTIR</b>	Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier ( <i>Fourier transform infrared</i> )
<b>GC</b>	Cromatografía de gases ( <i>Gas chromatography</i> )
<b>GPC</b>	Cromatografía en gel ( <i>Gel permeation chromatography</i> )
<b>HCB</b>	Hexaclorobenceno
<b>HCH</b>	Hexaclorociclohexano
<b>HFIP</b>	1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol
<b>LC</b>	Cromatografía líquida ( <i>Liquid chromatography</i> )
<b>IDA</b>	Ingesta diaria admisible
<b>ISO</b>	<i>International Standardization Organization</i>
<b>IUPA</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>K<sub>ow</sub></b>	Coefficiente de partición en agua-octanol
<b>LLE</b>	Extracción líquido-líquido ( <i>Liquid-liquid extraction</i> )
<b>LMR (MRL)</b>	Límite Máximo de Residuo ( <i>Maximum Residue Limit</i> )
<b>LOD</b>	Límite de detección ( <i>Limit of detection</i> )
<b>MAE</b>	Extracción asistida por microondas ( <i>Microwave assisted extraction</i> )
<b>MRM</b>	Método multiresiduo ( <i>Multiresidue method</i> )
<b>MS</b>	Espectrometría de masas ( <i>Mass spectrometry</i> )
<b>MTA</b>	Módulo de tratamiento automático
<b>NEL</b>	Nivel sin efecto ( <i>Non effect level</i> )

<b>NIST</b>	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
<b>NMC</b>	Nivel mínimo cuantificable
<b>NOAEL</b>	Nivel sin efecto adverso observable ( <i>Non observed adverse effect level</i> )
<b>NOEL</b>	Nivel sin efecto observable ( <i>Non observed effect level</i> )
<b>NPMB</b>	Nivel práctico más bajo
<b>OCP</b>	Plaguicida organoclorado ( <i>Organochlorine pesticide</i> )
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBA</b>	Ácido 3-fenoxibenzoico
<b>PLS</b>	Mínimos cuadrados parciales ( <i>Partial least square</i> )
<b>RMSECV</b>	Raíz cuadrática media del error de la validación cruzada ( <i>Root mean square error of cross validation</i> )
<b>RSD</b>	Desviación estándar relativa ( <i>Relative standard deviation</i> )
<b>SFE</b>	Extracción con fluidos supercríticos ( <i>Supercritical fluid extraction</i> )
<b>Si-2OH</b>	Sílica con grupos dioles
<b>Si-CN</b>	Sílica con grupos cianopropil
<b>SIM</b>	Monitorización selectiva de iones ( <i>Selected ion monitoring</i> )
<b>SM</b>	Materia en suspensión ( <i>Suspended matter</i> )
<b>SME</b>	Microextracción con disolventes ( <i>Solvent microextraction</i> )
<b>SPME</b>	Microextracción en fase sólida ( <i>Solid-phase microextraction</i> )
<b>SPE</b>	Extracción en fase sólida ( <i>Solid-phase extraction</i> )
<b>US-EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency of United States of America</i>
<b>US-FDA</b>	<i>Food and Drug Administration of United State of America</i>



## **ANEXO B. PRODUCCION CIENTIFICA FRUTO DE ESTA MEMORIA**

### PUBLICACIONES CIENTIFICAS

- ***“Semiautomatic method for the screening and determination of 23 organochlorine pesticides in horticultural samples by gas chromatography with electron-capture detection”.***  
A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Journal of Chromatography A, 849 (1999) 235-243.
- ***“Simplified method for chlorinated fungicides and insecticides determination in fruits by gas chromatography”.***  
A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Journal of Chromatography A, 882 (2000) 193-203.
- ***“Selective enrichment of 17 pyrethroids from lyophilized agricultural samples”.***  
A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Journal of Chromatography A, 912 (2001) 83-90.
- ***“Multiresidue screening of pesticides in fruits using an automatic solid-phase extraction system”.***  
A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49 (2001) 1109-1116.
- ***“Semiautomatic multiresidue gas chromatographic method for the screening of vegetables for 25 organochlorine and pyrethroid pesticides”.***  
A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Analytica Chimica Acta, 436 (2001) 153-162.

- ***“Evaluation of an automated solid-phase extraction system for the enrichment of organochlorine pesticides from waters”***.  
A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Talanta, 54 (2001) 943-951.
- ***“Solid-phase extraction method for the screening and determination of pyrethroid metabolites and organochlorine pesticides in human urine”***.  
A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 15 (2001) 2007-2013.
- ***“Assessment of FTIR spectrometry for pesticide screening of aqueous samples”***.  
A. Columé, J. Diewok, B. Lendl.  
Enviado para su publicación en Vibrational Spectroscopy, Octubre 2001

#### COMUNICACIONES A CONGRESOS

*IX SYMPOSIUM ON HANDLING OF ENVIRONMENTAL AND BIOLOGICAL SAMPLES IN CHROMATOGRAPHY. Oporto, Octubre de 1999.*

- Comunicación oral titulada: ***“Semiautomatic method for the screening and determination of 23 organochlorine pesticides in horticultural samples by gas chromatography with electron-capture detection”***.  
A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.
- Comunicación oral titulada: ***“Evaluation of an automated solid-phase extraction system for the enrichment of organochlorine pesticides from waters”***.

S. Cárdenas, A. Columé, M. Gallego, M. Valcárcel.

- Poster titulado: ***“Simplified method for chlorinated fungicides and insecticides determination in fruits by gas chromatography”***.

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.

*VII JORNADAS ANDALUZAS SOBRE AVANCES EN ANALISIS QUIMICO. Almería, Mayo de 2000.*

- Poster titulado: ***“Selective enrichment of seventeen pyrethroids from agricultural samples”***.

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.

*XII REUNION DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUIMICA ANALITICA. Huelva, Septiembre de 2001*

- Poster titulado: ***“Multiresidue screening of pesticides in fruits and vegetables using an automatic solid phase extraction system”***.

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.



***CURRICULUM***

***VITAE***

---

## **DATOS PERSONALES**

**APELLIDOS: COLUME DIAZ**

**NOMBRE: ALMUDENA**

**D.N.I.: 29.054.013-E**

**FECHA NACIMIENTO: 10-03-71**

**LUGAR DE NACIMIENTO: HUELVA**

**TITULACION:**

**LICENCIADA EN FARMACIA (Univ. Sevilla)**

**LICENCIADA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS  
(Univ.Córdoba)**

**DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS, CON MENCIÓN DE DOCTORADO  
EUROPEO (Univ. Córdoba) “Automatización y miniaturización de sistemas de  
screening y determinación de residuos de plaguicidas en muestras  
agroalimentarias”**

## **EXPERIENCIA PROFESIONAL**

Cuatro años de investigación en laboratorio de Química Analítica (Universidad de Córdoba) en temas agroalimentarios, principalmente en determinación de plaguicidas en productos hortofrutícolas, muestras acuosas y fluidos biológicos (1997-2001).

Amplia experiencia en técnicas cromatográficas con detector de espectrometría de masas, captura de electrones y de llama, espectrometría de infrarrojos con transformada de Fourier, técnicas de extracción en fase sólida, técnicas de miniaturización y automatización, así como metodología de liofilización.

Amplia experiencia en tratamiento quimiométricos de datos, mediante análisis de grupos (cluster analysis) y análisis por mínimos cuadrados parciales (PLS).

Colaboradora honoraria del Departamento de Química Analítica y Ecología desde 1998, realizando labores docencia e investigación como miembro del grupo de trabajo PB-95-0977 de la Unión Europea.

Estancia de tres meses (marzo-junio 2001) en la Universidad Técnica de Viena (Austria), realizando labores de investigación, en cooperación con el equipo de investigación europeo dirigido por el Dr. B. Lendl, gracias a la concesión de una beca europea Marie Curie.

---

Prácticas en Tioxide España S.A, en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo. Huelva.

Prácticas en Industrias Alimentarias en el Laboratorio de Salud Pública, perteneciente a la Consejería de Salud, Delegación Provincial de Córdoba.

Prácticas en Farmacia en la Oficina de Farmacia perteneciente a la Licenciada Magdalena Pascual Martínez, sita en C/ Elena Montagut, 1, Huelva.

Miembro del comité organizador de las “Jornadas de Técnicas Generales de Análisis de Alimentos” y otros cursos en al Facultad de Farmacia de Sevilla, siendo vocal de la Asociación Hispalense de Estudiantes de Farmacia durante cuatro años.

Miembro del comité organizador del “First Joint Meeting of Education in Analytical Chemistry”, celebrado en Córdoba, Septiembre 2001.

#### **CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO PROFESIONAL RECIBIDOS**

***GARANTIA DE CALIDAD EN LABORATORIOS ANALÍTICOS.*** Córdoba, Marzo – Abril de 1997.

***JORNADA SOBRE ASPECTOS LEGALES Y NORMATIVOS DE LA CALIDAD,*** impartido por la Fundación para el Fomento de la Innovación Industrial. Iniciativa ATYCA. Ministerio de Industria y Energía y Fondo Social Europeo. Huelva, Noviembre de 1997.

***ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD. LOS REQUISITOS DE LA NORMA UNE – EN – ISO 9001,*** impartido por la Fundación para el Fomento de la Innovación Industrial. Iniciativa ATYCA. Ministerio de Industria y Energía y Fondo Social Europeo. Huelva, Noviembre de 1997.

***GESTION MEDIOAMBIENTAL EN LA INDUSTRIA, NORMA UNE – EN – ISO 14001,*** impartido por la Fundación para el Fomento de la Innovación Industrial. Iniciativa ATYCA. Ministerio de Industria y Energía y Fondo Social Europeo. Córdoba, Marzo de 2000.

---

**SEGURIDAD E HIGIENE INDUSTRIAL**, impartido por la Fundación para el Fomento de la Innovación Industrial. Ministerio de Industria y Energía y Fondo Social Europeo. Córdoba, Marzo de 2000.

**EVALUACIÓN DEL RIESGO POR EXPOSICIÓN A PRODUCTOS FITOSANITARIOS**, impartido por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Sevilla, Mayo de 2000.

**IV SEMINARIO INTERNACIONAL DE PRODUCTORES Y DISTRIBUIDORES DE FRESA “FRAGARIAE”**. Sevilla. Febrero 1998.

**PRACTICAL TRAINING COURSE: ADVANCES ANALYTICAL TECHNIQUES IN PESTICIDE RESIDUE ANALYSIS**. Organizado por European Environmental Research Institute. Ioannina. Grecia. Mayo 1999.

**PRACTICAL TRAINING COURSE: ADVANCED ANALYTICAL TECHNIQUES IN ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY**. Organizado por European Environmental Research Institute. Ioannina. Grecia. Julio 2000.

**INTRODUCCION A LA ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO (NIRS): EQUIPOS, PROGRAMAS Y APLICACIONES A PRODUCTOS AGROINDUSTRIALES**. Córdoba, Noviembre 2000.

**CONTROL ANALÍTICO-SANITARIO DE LAS AGUAS POTABLES DE CONSUMO PUBLICO**. Sevilla, Abril de 1993

**JORNADAS DE TÉCNICAS GENERALES DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS**. Sevilla, Abril de 1994.

**TÉCNICAS LUMINISCENTES AVANZADAS**. Córdoba, 1997.

**AUTOMATIZACIÓN DE PROCESOS DE LABORATORIO**. Córdoba, 1998.

**MODOS DE ACCION DE LOS HERBICIDAS**. Córdoba, 1998.

**MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A LOS HERBICIDAS**. Córdoba, 1998.

**CROMATOGRAFÍA**. Córdoba, 1999.

**CONTROL ANALITICO DE LA CALIDAD ALIMENTARIA**. Córdoba, 1999.

---

**CONTROL ANALITICO DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL.** Córdoba, 1999.

**I JORNADA ANDALUZA SOBRE EL PROFESIONAL EN CIENCIAS Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS.** Córdoba. Junio 1996.

**NUEVAS PERSPECTIVAS EN QUÍMICA DE LA COORDINACIÓN.** Sevilla. Abril y Mayo de 1991.

**COSMÉTICA PRACTICA.** Sevilla, Septiembre de 1994.

**HOMEOPATÍA EN FARMACIA.** Sevilla, 25 a 28 de Octubre de 1994.

**AVANCES Y ACTUALIDADES EN FARMACIA CLÍNICA.** Sevilla, Marzo 1995.

**ENVEJECIMIENTO CUTÁNEO .** Sevilla, Noviembre 1995.

**CERTIFICADO DE APTITUD PEDAGÓGICA (CAP),** Córdoba 1995-96.

## **PUBLICACIONES CIENTIFICAS**

**“Semiautomatic method for the screening and determination of 23 organochlorine pesticides in horticultural samples by gas chromatography with electron-capture detection”.**

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Journal of Chromatography A, 849 (1999) 235-243.

**“Simplified method for chlorinated fungicides and insecticides determination in fruits by gas chromatography”.**

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Journal of Chromatography A, 882 (2000) 193-203.

**“Selective enrichment of 17 pyrethroids from lyophilized agricultural samples”.**

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Journal of Chromatography A, 912 (2001) 83-90.

---

***“Multiresidue screening of pesticides in fruits using an automatic solid-phase extraction system”.***

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Journal Agricultural and Food Chemistry, 49 (2001) 1109-1116.

***“Semiautomatic multiresidue gas chromatographic method for the screening of vegetables for 25 organochlorine and pyrethroid pesticides”.***

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Analytica Chimica Acta, 436 (2001) 153-162.

***“Evaluation of an automated solid-phase extraction system for the enrichment of organochlorine pesticides from waters”.***

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Talanta, 54 (2001) 943-951.

***“Solid-phase extraction method for the screening and determination of pyrethroid metabolites and organochlorine pesticides in human urine”.***

A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel.  
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 15 (2001) 2007-2013.

***“FTIR spectrometry for pesticide screening of aqueous samples”.***

A. Columé, J. Diewok, B. Lendl.  
Enviado para su publicación en Applied Spectroscopy, Septiembre 2001.

## **PARTICIPACIONES EN CONGRESOS**

*IX SYMPOSIUM ON HANDLING OF ENVIROMENTAL AND BIOLOGICAL SAMPLES IN CHROMATOGRAPHY. Oporto, Octubre de 1999.*

Comunicación oral titulada: ***“Semiautomatic method for the screening and determination of 23 organochlorine pesticides in horticultural samples by gas chromatography with electron-capture detection”.***

Comunicación oral titulada: ***“Evaluation of an automated solid-phase extraction system for teh enrichment of organochlorine pesticides from waters”.***

Poster titulado: ***“Simplified method for chlorinated fungicides and insecticides determination in fruits by gas chromatography”.***

---

*VII JORNADAS ANDALUZAS SOBRE AVANCES EN ANÁLISIS QUÍMICO. Almería, Mayo de 2000.*

Poster titulado: *"Selective enrichment of seventeen pyrethroids from agricultural samples"*.

*SECA 2001. XII REUNION DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUIMICA ANALITICA. Huelva, Septiembre de 2001*

Poster titulado: *"Multiresidue screening of pesticides in fruits and vegetables using an automatic solid phase extraction system"*.

#### **OTROS DATOS**

Manejo asiduo de WINDOWS 95/98/XP y del paquete integrado MICROSOFT OFFICE 2000, así como de INTERNET y bases de datos internacionales.

Alto nivel de inglés, tanto escrito como hablado.

#### **DIRECCIONES Y TELEFONOS DE CONTACTO**

##### **ALMUDENA COLUME DIAZ**

C/ ACACIAS 11, 2º-D  
14.006 – CORDOBA  
Tfno.: 957 – 40 29 20  
Tfno.: 616 – 41 02 13

Avda. ALCALDE FEDERICO MOLINA, 32, 1º D  
21007 – HUELVA  
Tfno.: 959 – 225021

---



**AUTOMATIZACION Y MINIATURIZACION DE  
SISTEMAS DE SCREENING Y DETERMINACION  
DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS  
EN MUESTRAS AGROALIMENTARIAS**

**AUTOMATION AND MINIATURIZATION  
OF SYSTEMS FOR THE SCREENING AND  
DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES  
IN AGRICULTURAL SAMPLES**

**Tesis Doctoral**



**Universidad de Córdoba**



**Dpto. Química Analítica y Ecología**

**ALMUDENA COLUME DIAZ**