

FACULTAD DE BIOLOGÍA, CIENCIAS AMBIENTALES Y
QUÍMICA

Departamento de Química Analítica,
Química Física e Ingeniería Química

Área de Química Analítica



Universidad
de Alcalá

**SEPARACIÓN ENANTIOMÉRICA Y/O
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS
MEDIOAMBIENTAL POR METODOLOGÍAS
ANALÍTICAS ELECTROFORÉTICAS Y
CROMATOGRÁFICAS INNOVADORAS**

VIRGINIA PÉREZ FERNÁNDEZ

ABRIL 2013

Antes de todo decir que este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la concesión de una ayuda de iniciación a la investigación de la Universidad de Alcalá y de la ayuda para la formación de personal investigador del Gobierno Vasco. Asimismo, el trabajo desarrollado durante esta tesis doctoral ha podido realizarse gracias a la financiación obtenida del Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto CTQ2006-03849/BQU), del Ministerio de Ciencia e Innovación (CTQ2009-09022) y de la Comunidad Autónoma de Madrid (proyectos S-0505/AGR-0312 y S-2009/AGR-1464).

Parece mentira que hayan pasado más de cuatro años desde que comencé esta tesis doctoral. En todo este tiempo ha habido de todo, desde los momentos de nervios en los que las cosas no salían bien, hasta la alegría de ver “un pico” en la pantalla. Sin embargo, lo más importante de todo este tiempo son las personas que me han acompañado en el camino. Sin todos ellos esto hubiese sido imposible. Su apoyo y los buenos momentos vividos juntos han hecho que este tiempo se haya pasado en un abrir y cerrar de ojos.

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras de tesis, las Dras. M^a Luisa Marina y M^a Ángeles García, por darme la oportunidad de formar parte de este gran grupo de investigación. Gracias por todo lo que me habéis enseñado, por el apoyo, las palabras de ánimo en los momentos más difíciles y la dedicación prestada a este trabajo en todo momento y sobre todo por confiar en mí desde el principio.

A la Dra. M^a José González por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en su grupo de investigación. Quiero agradecer especialmente a la Dra. Belén Gómara todo el apoyo y la dedicación durante los cuatro meses que pasé en el IQOG. Sin ella no hubiese sido posible llevar a cabo el trabajo. Gracias también a todos los demás miembros del grupo por hacerme sentir como en casa desde el primer día y tratarme como una más del grupo desde el primer momento.

A los Dres. Isabel Sierra, Sonia Morante y Damián Pérez-Quintanilla, con los que realicé una estancia de cuatro meses en la Universidad Rey Juan Carlos. Gracias por ponerme las cosas fáciles en todo momento y ayudarme en todo lo posible.

Vorrei anche ringraziare la professoressa Alessandra Gentili dell'Università di Roma "Sapienza". Grazie per avermi fatto sentire parte del gruppo di ricerca dal primo giorno e per avermi insegnato tante cose. Un grazie anche a Stefano Marchese e Fulvia Caretti per avermi aiutato con il lavoro sperimentale e alle altre persone che ho conosciuto in questo periodo trascorso a Roma: Daniela, Gerardo e Salvatore, che mi hanno fatto sentire a mio agio fin dal inizio. Quando sono arrivata in laboratorio pensavo che quattro mesi fossero troppi, ma grazie a loro alla fine non volevo più andarmene. È stato davvero un piacere.

A mis amigas por estar siempre ahí, aunque hayan pasado más de cinco años desde que me fui de Portu cada vez que vuelvo siento que nada ha cambiado.

No puedo olvidarme de las personas más importantes en todo este proceso. Con ellos es con quien he pasado la mayor parte de estos últimos cuatro años y no puedo imaginar mejores personas para ello. Gracias por todas las risas, las cenas, los viajes, las comidas de cada día y los postres. Vosotros hacéis que venir cada día al laboratorio sea más un placer que un trabajo. Gracias especialmente a Cris, Clari, Miri, Miguel, Lauri, Ana, Jelen y Paty, porque es con los que más ratos he compartido y porque sabéis hacerme reír y pasar buenísimos momentos. Gracias también a todos los demás que se han ido incorporando poco a poco: Miguel, Pilar, Adrián, Aida, Diana, Jorge, Charlie, María Ángeles, María, Matías, Lucía, André, Estefanía, Elena, Romy. Os habéis convertido en algo más que simples compañeros de trabajo y vaya donde vaya a partir de ahora estaréis siempre conmigo.

Por último quiero dar las gracias a mi familia, a mis padres y a mi hermana por estar siempre a mi lado y apoyarme en todas mis decisiones, aguantarme en los malos momentos y hacer que avance cada día. No quiero terminar esta parte sin acordarme de mi tía, aunque no está sé que hubiese disfrutado especialmente de este momento.

SUMMARY

A diverse array of synthetic organic compounds are used in vast quantities for a range of purposes including the production and preservation of foods, industrial manufacturing processes, as well as for human and animal healthcare. All these compounds are able to reach the environment disturbing the natural composition of water, soil, air and also food and thus, becoming environmental pollutants.

Environmental chemical pollutants can be classified according to different criteria. Originally the attention has been focused on those chemical pollutants that have been produced and released to the environment in huge quantities. This is for example the case of pesticides. However, in the last decades, the attention has also been directed to other type of pollutants described by the term “emerging pollutants” defined as compounds that are not currently covered by existing regulations, have not been studied before, and are thought to be potential threats to environmental ecosystems and human health safety. They encompass a diverse group of compounds including drugs, personal-care products (PCPs), steroids and hormones, surfactants, perfluorinated compounds (PFCs), flame retardants, plastic additives, etc.

The way all these organic compounds enter the environment depends on their pattern of usage and mode of application and once in the environment they can be widely distributed at some time between their production and their use. Once released into the environment, chemical pollutants are subject of processes that contribute to their elimination and/or transformation. However, many of the cited pollutants are highly hydrophobic and they easily bioaccumulate in the tissues and the organs of animals.

On the other hand, one of the most important challenges nowadays is food safety. Chemical pollution is really close to this problem and the control of risks associated with mixtures of contaminants in food is one of the main aims of science. Among the principal groups of food contaminants, pesticides are one of the most important because of their direct implication into food production, but the concern about other groups (i.e. PFCs,

plasticizers employed in the food packaging, polychlorinated biphenyls (PCBs)) is increasing every day.

Another fact that has to be considered when talking about chemical pollutants is chirality. The phenomenon of molecular chirality was first observed in the middle of the nineteenth century but until few decades ago this property has not been considered in analytical chemistry although it has important implications in the toxicity, degradation, and metabolism of the compounds. Although pure enantiomers of chiral compounds have identical physical-chemical properties, their behavior in biochemical processes might be strikingly different due to the existence of enantioselective interactions in these processes. Different situations can occur:

- a) The stereoisomers of chiral pollutants may have similar modes of action but may differ in their affinity to a receptor, resulting in different reaction rates.
- b) The inactive stereoisomer may act as a competitive antagonist in the case of chiral drugs.
- c) Enantiomers may have opposite or different effects.
- d) The toxicity of enantiomers may be different.
- e) The persistence of enantiomers in the environment or in living organisms may be different.

Due to all these reasons the role of chirality in environmental chemical pollution cannot be underestimated making necessary to develop new analytical methodologies able to distinguish between the enantiomers of a compound and to determine them individually.

In this work, new analytical methodologies have been developed employing the main separative techniques such as gas chromatography (GC), high performance liquid chromatography (HPLC), and capillary electrophoresis (CE). The research work performed can be divided in two main groups. In the first one, several innovative methodologies enabling the enantiomeric separation and determination of pesticides (including insecticides, fungicides and herbicides) and PCBs and their methyl sulfone

metabolites have been developed employing different CE modes and nano-liquid chromatography (nano-LC) in the first case, and GC in the second one. CE is gaining special attention in the field of enantiomeric analysis because of its high efficiency and resolution, short analysis times, and low solvent and reagent consumption being an attractive alternative to decrease economical and environmental costs. In the second part of this work, nonchiral analytical methodologies have been developed for the separation and determination of phthalates, thyreostatic drugs and steroid hormones by CE and HPLC.

The first CE method enabling the enantiomeric separation of the synthetic pyrethroid insecticide *cis*-bifenthrin has been developed in this research work. After the study of the influence of different chiral selectors and other experimental variables such as temperature, voltage, and concentration of the pseudostationary phases on the enantiomeric resolution, a separation methodology has been developed by electrokinetic chromatography (EKC). The optimized conditions consisted of the use of two pseudostationary phases, a chiral surfactant and a neutral cyclodextrin, and enabled the separation of the enantiomers of *cis*-bifenthrin in less than 10 min and with a chiral resolution of 2.8. The analytical characteristics of the developed methodology were evaluated allowing its application to the quantitation of *cis*-bifenthrin in a polyvalent commercial insecticide formulation.

An analytical methodology has also been developed by CE enabling the enantiomeric separation of two amide fungicides (metalaxyl and benalaxyl). EKC mode with cyclodextrins as chiral selectors was employed. The use of succinyl- γ -cyclodextrin for metalaxyl and succinyl- β -cyclodextrin for benalaxyl dissolved in 2-morpholinoethanesulfonic acid buffer, enabled the separation of the enantiomers of metalaxyl in 11.5 min with a resolution of 3.1 and of benalaxyl in 7.5 min with a resolution close to 15. In addition, under the optimized conditions selected, the two enantiomers of each of these compounds were also separated from folpet, very commonly present in fungicide formulations containing metalaxyl or benalaxyl. The analytical characteristics of the two developed methods were evaluated in terms of precision, linearity, selectivity,

limits of detection and limits of quantitation showing their suitability for the determination of these compounds in commercial agrochemical formulations. Finally, the development of an in-capillary preconcentration strategy by “sample stacking” allowed the detection of enantiomeric impurities up to 1.2% in commercial product labeled as enantiomerically pure in metalaxyl-M.

Capillary electrochromatography (CEC) and nano-LC with packed capillary columns have been considered very promising techniques for chiral separations. However, the main drawback of these techniques is the low availability of chiral stationary phases packed in capillary columns. In this work, two novel polysaccharide-based chiral stationary phases, known as Sepapak-2 (cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)) and Sepapak-4 (cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate)), have been evaluated for the first time for the chiral separation of a group of 16 pesticides including herbicides, insecticides and fungicides. The optimization of the mobile phase employed in nano-LC allowed the chiral separation of seven pesticides on Sepapak-2 and of nine pesticides on Sepapak-4. Due to the fact that Sepapak-4 gave better results, this column was selected to compare nano-LC and CEC under the same experimental conditions. As expected, both the efficiency and the chiral resolution obtained in CEC experiments were higher than those observed in nano-LC for all the analyzed compounds. The CEC developed method was employed to carry out the quantitation of metalaxyl and its enantiomeric impurity in a commercial fungicide product marketed as enantiomerically pure and in soil and tap water samples spiked with the commercial formulation. For this compound the analysis time was less than 15 min and enantiomeric impurities of metalaxyl-M up to 0.6 % were detected. Both in commercial formulations and in real environmental samples an enantiomeric impurity close to 3.6% was determined.

The potential of three capillary columns based on β -cyclodextrin has been evaluated for the simultaneous enantiomeric separation of PCBs and their methyl sulfone metabolites employing a *heart-cut* multidimensional GC system. Among the columns investigated, the BGB-176SE capillary column provided the best results, allowing the

simultaneous estereoselective resolution of six methyl sulfone metabolites and six chiral polychlorinated biphenyls. This work constitutes the first methodology reporting the simultaneous chiral separation of PCBs and their methyl sulfone metabolites. The developed method was successfully applied to the determination of the enantiomeric fractions of the twelve analytes in two fish oils and one cow liver sample commercially available. The differences observed in the enantiomeric fractions of some of the compounds showed the different metabolism and degradation behavior of polychlorinated biphenyls and their metabolites in the analyzed samples.

A new CE method has been developed for the simultaneous separation of a group of ten parent phthalates. The addition of different pseudostationary phases to the separation media (bile salts and neutral cyclodextrins) enabled the total resolution of eight compounds (R_s above 3.1) and the partial resolution of two of them (R_s 0.8), di-n-octyl phthalate and diethyl hexyl phthalate, in only 12 min under the optimized cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography (CD-MEKC) conditions. The analytical characteristics of the developed method were evaluated demonstrating its suitability for the determination of these compounds in commercial perfumes and showing the presence of these additives in eleven of the fifteen analyzed samples.

A new methodology for the determination of thyreostatic drugs have been developed employing HPLC coupled to mass spectrometry with electrospray ionization source (HPLC-ESI-QqQ). This methodology enabled the simultaneous determination of five thyreostatic drugs (methyl thiouracil, propyl thiouracil, phenyl thiouracil, tapazole and mercaptobenzimidazole) in very short analysis times (less than 6 min). Moreover, the previous optimization of all the parameters of the triple quadrupole and the experiments MS^2 acquired in multiple reaction monitoring mode, permitted the sensitive and selective determination of the selected thyreostatics. The developed method was applied to the analysis of different natural water samples collected in the Lazio region (Italy). This is the first time that an aqueous matrix has been analyzed for determining thyreostatic compounds. The attempts to extract the analytes from the water samples by solid phase extraction did not gave satisfactory results due to their highly hydrophilic character. For

this reason, evaporating the water samples before injecting them into the chromatographic system was considered. The recoveries achieved by this pretreatment were satisfactory and reproducible allowing the application of the methodology to the quantification of the five thyreostatics in the selected waters. The results obtained showed a clear anthropogenic effect because the drugs were only found in areas where there was human activity or animal farms.

Finally, two mesoporous silica materials have been synthesized for their evaluation as stationary phases in the extraction and preconcentration of steroid hormones in milk samples and a new HPLC-UV method has been developed for monitoring the extraction recoveries. The mesoporous materials have good properties to be employed as stationary phases for sample treatment. Their controlled geometry, pore distribution and size, and their high superficial area make them adequate materials for solid phase extraction (SPE) procedures. The silicas known as SBA15 and SM, both of them functionalized with C18 groups have been synthesized in this work. After the characterization of the materials employing elemental analysis, thermogravimetry, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and adsorption-desorption isotherms, the two new materials were evaluated as stationary phases in SPE experiments for the extraction of the steroid hormones estrona, estradiol, estriol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, testosterone and progesterone from cow milk samples. The extracts were analyzed by HPLC-UV using the first methodology enabling the baseline separation of these seven hormones developed in this work. Moreover, the results obtained were compared with those obtained with some commercial SPE cartridges (HLB, HLB+NH₂, C18, C18+NH₂). From both mesoporous silicas, SBA15-C18 showed a big potential in the extraction of the selected hormones enabling under the optimized conditions for this stationary phase recoveries from 88 to 108 % except for estriol for which a recovery of 62 % was achieved. These results constitute a significant improvement compared with those obtained with the commercial cartridges.

In conclusion, this research work presents new chiral and nonchiral innovative analytical methodologies enabling the separation and determination of a variety of

chemical organic pollutants employing the main separative techniques. Different samples have been analyzed including commercial agrochemical formulations, the most typical environmental samples such as soil or water, foods and cosmetic products. All the developed methodologies constitute a significant improvement compared with those previously developed from the point of view of analysis times, chiral resolution and/or number of compounds simultaneously analyzed. Moreover, some of the proposed methodologies constitute the first approach enabling the determination of some of the compounds investigated. Finally, the evaluation of two new different stationary phases in CEC and nano-LC and two new mesoporous materials as stationary phases in SPE for the extraction of organic pollutants was also carried out in this work with promising results in both cases.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrilo
Ac-β-CD	Acetil-β-ciclodextrina
Ac-γ-CD	Acetil-γ-ciclodextrina
APCI	Ionización química a presión atmosférica (<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
ASE	Extracción acelerada con disolventes (<i>Accelerated Solvent Extraction</i>)
BBP	Butil bencil ftalato (<i>Butyl Benzyl Phthalate</i>)
BGE	Disolución electrolítica (<i>Background Electrolite</i>)
CD	Ciclodextrina
CD-EKC	Cromatografía electrocinética en presencia de ciclodextrinas (<i>Cyclodextrin Electrokinetic Chromatography</i>)
CD-MEKC	Cromatografía electrocinética micelar en presencia de ciclodextrinas (<i>Cyclodextrin Micellar Electrokinetic Chromatography</i>)
CE	Electroforesis capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
Ce	<i>Collision Energy</i>
CEC	Electrocromatografía capilar (<i>Capillary Electrochromatography</i>)
CE-β-CD	Carboxietil-β-ciclodextrina
CE-γ-CD	Carboxietil-γ-ciclodextrina
CGE	Electroforesis capilar en gel (<i>Capillary Gel Electrophoresis</i>)
CHES	Ácido 2-[N-ciclohexilamino]-etano sulfónico
CIEF	Isoelectroenfoque capilar (<i>Capillary Isoelectrofocusing</i>)
CITP	Isotacoforesis capilar (<i>Capillary Isotacophoresis</i>)
CMC	Concentración micelar crítica
CM-β-CD	Carboximetil-β-ciclodextrina
CM-γ-CD	Carboximetil-γ-ciclodextrina
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio (<i>Cetyl Trimethylammonium Bromide</i>)

CXP	<i>Cell Exit Potential</i>
CZE	Electroforesis capilar de zona (<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>)
DAD	Detector de diodos en serie (<i>Diode Array Detector</i>)
DAP	Dialil ftalato (<i>Diallyl Phthalate</i>)
DBP	Dibutil ftalato (<i>Dibutyl Phthalate</i>)
DES	Dietilestilbestrol
DCM	Diclorometanol
DCP	Diciclohexil ftalato (<i>Dicyclohexyl Phthalate</i>)
DDT	para-Diclorodifeniltricloroetano
DEHP	Dietil hexil ftalato (<i>Diethyl Hexyl Phthalate</i>)
DEP	Dietil ftalato (<i>Diethyl Phthalate</i>)
DMP	Dimetil ftalato (<i>Dimethyl Phthalate</i>)
DMSO	Dimetil sulfoxido
DM-β-CD	(2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina
DNOP	Dioctil ftalato (<i>Dioctyl Phthalate</i>)
DNPP	Dipentil ftalato (<i>Dipentyl Phthalate</i>)
DP	<i>Declustering Potential</i>
DPP	Dipropil ftalato (<i>Dipropyl Phthalate</i>)
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
EE2	Etinil estradiol
e.e.	Exceso enantiomérico (<i>Enantiomeric Excess</i>)
ECD	Detector de captura electrónica (<i>Electron Capture Detector</i>)
EF	Fracción enantiomérica (<i>Enantiomeric Fraction</i>)

EKC	Cromatografía electrocinética (<i>Electrokinetic Chromatography</i>)
EOF	Flujo electroosmótico (<i>Electroosmotic Flow</i>)
EP	<i>Entrance Potential</i>
EPA	Agencia de Protección del Medioambiente (<i>Environmental Protection Agency</i>)
ER	Relación enantiomérica (<i>Enantiomeric Relation</i>)
ESI	Ionización por electrospray (<i>Electrospray Ionization</i>)
FAAS	Acumulación de muestra por amplificación de campo (<i>Field-Amplified Sample Stacking</i>)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FID	Detector de ionización de llama (<i>Flame Ionization Detector</i>)
FT	Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform</i>)
GC	Cromatografía de gases (<i>Gas Chromatography</i>)
GC x GC	Cromatografía de gases en dos dimensiones
Heart-cut MDGC	Cromatografía de gases multidimensional en su modo <i>heart-cut</i>
HP-β-CD	2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina
HP-γ-CD	2-Hidroxipropil-γ-ciclodextrina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HS-β-CD	β-Ciclodextrina sulfatada
HS-γ-CD	γ-Ciclodextrina sulfatada
ICP	Plasma de acoplamiento inductivo (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)
IS	Estandar interno (<i>Internal Standard</i>)
IT	Trampa iónica (<i>Ion Trap</i>)
LC	Cromatografía de líquidos (<i>Liquid Chromatography</i>)
LC₅₀	Concentración letal (<i>Lethal Concentration</i>)
LD₅₀	Dosis letal (<i>Lethal Dose</i>)

LIF	Detector de fluorescencia inducida por láser (<i>Laser Induced Fluorescence Detector</i>)
LLOQ	Mínimo límite de cuantificación (<i>Lower Limit of Quantitation</i>)
LOD	Límite de detección (<i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Límite de cuantificación (<i>Limit of Quantitation</i>)
LVSS	Inyección por acumulación de un gran volumen de muestra (<i>Large-Volume Sample Stacking</i>)
MASE	Extracción asistida por microondas (<i>Microwave Assisted Solvent Extraction</i>)
MALDI	Ionización y desorción láser asistida por una matriz (<i>Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization</i>)
MBI	Mercaptobencimidazol
MDGC	Cromatografía de gases multidimensional (<i>Multidimensional Gas Chromatography</i>)
MEEKC	Cromatografía electrocinética con microemulsiones (<i>Microemulsion EKC</i>)
MEKC	Cromatografía electrocinética micelar (<i>Micellar EKC</i>)
MeOH	Metanol
MES	Ácido 2-morfolino etano sulfónico
MeSO₂-PCB	Metabolitos metilsulfonados de los PCBs
Me-β-CD	Metil-β-ciclodextrina
Me-γ-CD	Metil-γ-ciclodextrina
MRM	Monitorización de múltiples reacciones (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSPD	Dispersión de la matriz en fase sólida (<i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>)
MeTU	Metil tiuracilo
NACE	Electroforesis capilar en medio no acuoso (<i>Non Aqueous Capillary Electrophoresis</i>)

Nano-LC	Nano-cromatografía líquida
NSS	Inyección con acumulación normal de muestra (<i>Normal Sample Stacking</i>)
OH-PCB	Bifenilos policlorados hidroxilados
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Progesterona
P123	Poli(etilenglicol)-poli(propilenglicol)-poli(etilenglicol)
PAH	Hidrocarburos policíclicos aromáticos (<i>Polycyclic Aromatic Compounds</i>)
PBB	Bifenilos polibromados (<i>Polybrominated Biphenyls</i>)
PBDE	Éteres difenílicos polibromados (<i>Polybrominated Diphenyl Ethers</i>)
PCB	Bifenilos policlorados (<i>Polychlorinated Biphenyls</i>)
PCDD	Policlorodibenzo-p-dioxinas
PCDF	Policlorodibenzofuranos
PCP	Productos de cuidado personal (<i>Personal Care Products</i>)
PFC	Compuestos perfluorados (<i>Perfluorinated Compounds</i>)
PFCA	Ácido perfluorocarboxílico (<i>Perfluorocarboxylic Acid</i>)
PFOA	Ácido perfluorooctánico (<i>Perfluorooctanic Acid</i>)
PFOS	Ácido perfluorooctano sulfónico (<i>Perfluorooctano Sulfonic Acid</i>)
PhTU	Fenil tiuracilo
PIS	Barrido de iones producto (<i>Product Ion Scan</i>)
POP	Contaminante orgánico persistente (<i>Persistent Organic Pollutant</i>)
PTU	Propil tiuracilo
PVC	Cloruro de polivinilo (<i>Polyvinyl Chloride</i>)
Q	Cuadrupolo (<i>Quadrupole</i>)
QqQ	Triple cuadrupolo
RLOD	Límite de detección relativo (<i>Relative Limit of Detection</i>)

RSD	Desviación estándar relativa (<i>Relative Standard Deviation</i>)
SC	Colato sódico (<i>Sodium Cholate</i>)
SCN	Tiocianato
SDC	Deoxicolato sódico (<i>Sodium Deoxycholate</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos (<i>Supercritical Fluid Chromatography</i>)
SFE	Extracción con fluidos supercríticos (<i>Supercritical Fluid Extraction</i>)
SIM	Monitorización de un ion seleccionado (<i>Selected Ion Monitoring</i>)
SPE	Extracción en fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextracción en fase sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
SRM	Monitorización de una reacción selectiva (<i>Selected Reaction Monitoring</i>)
STC	Taurocolato sódico (<i>Sodium Taurocholate</i>)
STDC	Taurodeoxicolato sódico (<i>Sodium Taurodeoxycholate</i>)
Succ-β-CD	Succinil-β-ciclodextrina
Succ-γ-CD	Succinil-γ-ciclodextrina
T	Testosterona
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TAP	Tapazol
TBACl	Cloruro de tetrabutil amonio (<i>Tetrabutyl Ammonium Chloride</i>)
TBBPA	Tetrabromobisfenol-A
TCD	Detector de conductividad térmica (<i>Thermal Conductivity Detector</i>)
TEOS	Tetraetilortosilano
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>

TM-β-CD	(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina
TOF	Tiempo de vuelo (<i>Time of Flight</i>)
USEPA	Agencia de Protección del Medioambiente de los Estados Unidos (<i>Environmental Protection Agency of United States</i>)
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VOC	Compuestos orgánicos volátiles (<i>Volatile Organic Compounds</i>)

SÍMBOLOS

Ac	Área corregida
b	Pendiente de la recta de calibrado
lc	Longitud de la columna cromatográfica
N	Número de platos teóricos
Rs	Resolución
Sa	Error estándar de la ordenada en el origen
Sb	Error estándar de la pendiente
W_{1/2}	Anchura de pico a mitad de altura

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 LA CONTAMINACIÓN DEL MEDIOAMBIENTE	3
I.1.1 La contaminación del aire	4
I.1.2 La contaminación del suelo	5
I.1.3 La contaminación del agua	7
I.1.4 La contaminación alimentaria	8
I.2 IMPORTANCIA DE LA QUIRALIDAD EN EL MEDIOAMBIENTE	10
I.2.1 La quiralidad	10
I.2.2 Interés de la determinación enantiomérica de contaminantes ambientales	13
I.3 CONTAMINANTES QUÍMICOS	16
I.3.1 Contaminantes químicos más destacados	17
I.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES QUÍMICOS	38
I.4.1 Cromatografía de gases	39
<i>I.4.1.1 La cromatografía de gases multidimensional</i>	40
<i>I.4.1.2 El detector de captura electrónica</i>	43
I.4.2 Cromatografía de líquidos de alta eficacia	44
<i>I.4.2.1 Acoplamiento de la HPLC a la espectrometría de masas</i>	46
I.4.3 Electroforesis capilar	54
<i>I.4.3.1 Modos de separación en electroforesis capilar</i>	56
I.5 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN	68
I.5.1 Extracción en fase sólida	69
I.5.2 Dispersión de la matriz en fase sólida	72
I.5.3 Técnicas de preconcentración en el capilar basadas en principios electroforéticos	73
I.6 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE LA SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE INSECTICIDAS PIRETROIDES Y FUNGICIDAS, PCBs Y SUS METABOLITOS METILSULFONADOS, FTALATOS, FÁRMACOS TIREOSTÁTICOS Y HORMONAS ESTEROIDEAS	79

<i>ARTÍCULO 1: Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids. V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina; J. Chromatogr. A 1217 (2010) 968-989</i>	105
<i>ARTÍCULO 2: Chiral separation of agricultural fungicides. V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina; J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6561-6582</i>	129
<u>CAPÍTULO II. OBJETIVOS</u>	153
<u>CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL</u>	157
III.1 REACTIVOS, PATRONES, MUESTRAS Y FASES ESTACIONARIAS	159
III.1.1 Reactivos	
<i>III.1.1.1 Reactivos empleados para la preparación de tampones de separación en CE y CEC</i>	159
<i>III.1.1.2 Aditivos añadidos al medio de separación en CE</i>	159
<i>III.1.1.3 Reactivos empleados en la preparación de las fases móviles para HPLC y nano-LC</i>	161
<i>III.1.1.4 Reactivos empleados en la preparación de patrones y en la extracción y disolución de las muestras</i>	161
<i>III.1.1.5 Reactivos empleados en la preparación de las sílices mesoporosas</i>	161
III.1.2 Patrones	162
III.1.3 Muestras	169
III.1.4 Cartuchos de extracción en fase sólida, rellenos para preparar columnas multicapa y sílices mesoporosas	169
III.1.5 Fases estacionarias para nano-LC y CEC	170
III.2 INSTRUMENTACIÓN	170
III.2.1 Equipo de cromatografía de gases multidimensional	170
III.2.2 Equipo de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas y de cromatografía de líquidos con detección UV	171

III.2.3 Equipo de electroforesis capilar	172
III.2.4 Instrumentación adicional	172
III.3 PRODECIMIENTOS	173
III.3.1 Cromatografía de gases multidimensional	173
<i>III.3.1.1 Preparación de las disoluciones patrón y muestras</i>	173
III.3.2 Cromatografía de líquidos	175
<i>III.3.2.1 Preparación de las fases móviles</i>	175
<i>III.3.2.2 Preparación de las disoluciones patrón y muestras</i>	175
III.3.3 Electroforesis capilar	177
<i>III.3.3.1 Acondicionamiento de los capilares</i>	177
<i>III.3.3.2 Preparación de tampones y medios de separación electroforéticos</i>	177
<i>III.3.3.3 Preparación de las disoluciones patrón y muestras</i>	178
III.3.4 Electro cromatografía capilar y nano-LC	179
<i>III.3.4.1 Preparación de las columnas</i>	179
<i>III.3.4.2 Acondicionamiento de las columnas</i>	180
<i>III.3.4.3 Preparación de tampones y fases móviles</i>	181
<i>III.3.4.4 Preparación de las disoluciones patrón y muestras</i>	181
III.3.5 Sílices mesoporosas	182
<i>III.3.5.1 Síntesis de la sílice mesoestructurada SM</i>	182
<i>III.3.5.2 Síntesis de la sílice mesoestructurada SBA15</i>	184
III.4. TRATAMIENTO DE DATOS	185
III.4.1 Programas empleados	187
<u>CAPÍTULO IV. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN</u>	189
ENANTIOMÉRICA DE INSECTICIDAS Y FUNGICIDAS POR	
CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA	
IV.1 INTRODUCCIÓN	191

IV.2 OBJETIVOS	197
IV.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	198
<i>ARTÍCULO 3: Enantiomeric separation of cis-bifenthrin by CD-MEKC: Quantitative analysis in a comercial insecticide formulation.</i> V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina; Electrophoresis 31 (2010) 1533-1539	205
<i>ARTÍCULO 4: Chiral separation of metalaxyl and benalaxyl fungicides by electrokinetic chromatography and determination of enantiomeric impurities.</i> V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina; J. Chromatogr. A 1218 (2011) 4877-4885	215
<u>CAPÍTULO V. EVALUACIÓN DE NUEVAS FASES ESTACIONARIAS QURALES PARA LA SEPARACIÓN ENANTIOMÉRICA DE PESTICIDAS POR NANO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA Y ELECTROCROMATOGRAFÍA CAPILAR</u>	227
V.1 INTRODUCCIÓN	229
V.2 OBJETIVOS	230
V.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	232
<i>ARTÍCULO 5: Evaluation of new cellulose-based chiral stationary phases Sepapak-2 and Sepapak-4 for the enantiomeric separation of pesticides by nano liquid chromatography and capillary electrochromatography.</i> V. Pérez-Fernández, E. Domínguez-Vega, B. Chankvetadze, A.L. Crego, M.A. García, M.L. Marina; J. Chromatogr. A 1234 (2012) 22-31	235
<u>CAPÍTULO VI. SEPARACIÓN ENANTIOMÉRICA SIMULTÁNEA DE PCBs Y SUS METABOLITOS METILSULFONADOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES MULTIDIMENSIONAL PARA LA DETERMINACIÓN DE FRACCIONES ENANTIOMÉRICAS</u>	247
VI.1 INTRODUCCIÓN	249

VI.2 OBJETIVOS	250
VI.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	251
<i>ARTÍCULO 6: Simultaneous enantioselective separation of polychlorinated biphenyls and their methyl sulfone metabolites by heart-cut MDGC: Determination of enantiomeric fractions in fish oils and cow liver samples. V. Pérez-Fernández, M. Castro-Puyana, M.J. González, M.L. Marina, M.A. García, B. Gómara; Chirality 24 (2012) 577-583</i>	255
<u>CAPÍTULO VII. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE FTALATOS PARENTALES POR CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA</u>	265
VII.1 INTRODUCCIÓN	267
VII.2 OBJETIVOS	268
VII.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	269
<i>ARTÍCULO 7: Separation of phthalates by cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography. Quantitation in perfumes. V. Pérez-Fernández, M.J. González, M.A. García, M.L. Marina; Anal. Chim. Acta (en prensa)</i>	275
<u>CAPÍTULO VIII. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS TIREOSTÁTICOS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS</u>	303
VIII.1 INTRODUCCIÓN	305
VIII.2 OBJETIVOS	306
VIII.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	306
VIII.3.1 Optimización de los potenciales eléctricos del espectrómetro de masas para cada uno de los fármacos tireostáticos estudiados	306
VIII.3.2 Separación de los fármacos tireostáticos estudiados por HPLC	310
VIII.3.3 Preparación de la muestra para la preconcentración de los fármacos tireostáticos en muestras de agua	311

VIII.3.4 Determinación de la abundancia relativa entre las dos transiciones MS/MS seleccionadas para cada analito	316
VIII.3.5 Características analíticas del método HPLC-ESI-QqQ desarrollado para el análisis de aguas naturales	317
VIII.3.6 Determinación de los fármacos tireostáticos estudiados en muestras de agua de la provincia de Lazio	321
VIII.4 CONCLUSIONES	324
<u>CAPÍTULO IX. EVALUACIÓN DE SÍLICES MESOPOROSAS FUNCIONALIZADAS CON GRUPOS C18 COMO FASES ESTACIONARIAS PARA LA EXTRACCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS MEDIANTE SPE</u>	325
IX.1 INTRODUCCIÓN	327
IX.2 OBJETIVOS	330
IX.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	331
IX.3.1 Síntesis y caracterización de sílices mesoestructuradas	331
IX.3.2 Separación de las hormonas esteroideas estudiadas por HPLC	340
IX.3.3 Extracción de las hormonas esteroideas en leche mediante el empleo de cartuchos comerciales de SPE	342
IX.3.4 Empleo de las sílices mesoporosas funcionalizadas con C18 para la extracción de hormonas esteroideas en leche. Ensayos en discontinuo	344
IX.3.5 Empleo de las sílices mesoporosas funcionalizadas con C18 para la extracción de hormonas esteroideas en leche. Comparación con partículas de sílice C18 comerciales en estudios de SPE	346
IX.4 CONCLUSIONES	351
<u>CAPÍTULO X. CONCLUSIONES</u>	353
<u>CAPÍTULO XI. BIBLIOGRAFÍA</u>	361

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.1 LA CONTAMINACIÓN DEL MEDIOAMBIENTE

El crecimiento urbano e industrial de las últimas décadas ha generado riqueza y bienestar para las personas pero también se ha traducido en un aumento de la contaminación química. Así, hoy en día el agua y el suelo se han contaminado, la calidad del aire se ha deteriorado, los residuos se han dispersado, los recursos de la tierra se están agotando y la salud de la humanidad se está viendo afectada, y todo esto debido a los efectos antropogénicos del hombre [1].

La contaminación química empezó a convertirse en un asunto preocupante para la opinión pública tras la Segunda Guerra Mundial, después de que se hiciesen evidentes las repercusiones de la lluvia radioactiva ocasionada por las guerras y ensayos nucleares. A partir de este momento, la conciencia social en relación a la contaminación química aumentó, se crearon agencias de protección medioambiental en distintos países y se aprobaron las primeras leyes para su control y además, tuvieron lugar algunos sucesos que ayudaron a despertar esa conciencia social. Por ejemplo, en la década de los 50 se produjo la Gran Niebla de 1952, que se llevó la vida de unas 4.000 personas en Londres, lo que motivó la creación de una de las leyes modernas más importantes sobre el medioambiente: la Ley del Aire Limpio de 1956. Por otro lado en Estados Unidos en los años 1970, se aprobaron leyes como la Ley del Agua Limpia o la Ley de Política Ambiental de los Estados Unidos después de que tuvieran lugar sucesos como el vertido de bifenilos policlorados (PCBs) en el río Hudson o el de dioxinas en el barrio de *Love Canal*, cerca de las Cataratas del Niágara.

En general, todos los contaminantes químicos pueden provocar un daño de forma inmediata o a corto plazo (intoxicación aguda), o generar un daño por una exposición prolongada (intoxicación crónica). El mayor problema de los efectos de los contaminantes químicos es que, a veces, se sabe muy poco de sus consecuencias potenciales a largo plazo. Además, hay que considerar que la mayoría de contaminantes químicos producen efectos perjudiciales en función de su concentración, por lo que es importante no solo

detectar su presencia sino también controlar el nivel de concentración al que cada uno de estos elementos y/o compuestos potencialmente peligrosos se encuentra en una muestra medioambiental.

La ciencia en general y la química en particular desempeñan un importante papel en la consecución de este objetivo. En concreto, la Química Analítica como “ciencia metrológica” desarrolla herramientas que hacen posible conocer la naturaleza y la concentración de los contaminantes en muestras ambientales siendo las técnicas modernas de análisis químico esenciales para la química ambiental. En este sentido, la Química Analítica se encuentra en un periodo de continua evolución caracterizado por el desarrollo de nuevas y mejores técnicas de análisis que permiten la detección de niveles de contaminantes cada vez más bajos, el análisis de muestras cada vez más variadas, diferentes y complejas y por tanto, un incremento notable del número de datos que es posible obtener. En lo que se refiere a las distintas matrices medioambientales, no solo es importante desarrollar métodos analíticos que faciliten el análisis de agua, aire y suelo, sino también, métodos que nos permitan el análisis de alimentos con el fin de garantizar la seguridad de los mismos, de los productos pesticidas comerciales empleados para su tratamiento con el fin de reducir el impacto negativo de éstos en el medioambiente o de productos de uso cotidiano como son los cosméticos. A continuación, se dará una breve visión general de la problemática de la contaminación ambiental en cada una de las matrices medioambientales mencionadas.

I.1.1 La contaminación del aire

La contaminación del aire es un problema antiguo y muy extendido en el planeta. Esta contaminación varía en una escala muy amplia, pudiendo considerarse desde la contaminación del aire en interiores hasta la contaminación atmosférica global.

Algunos de los contaminantes más comunes del aire a nivel global consisten en gases inorgánicos como óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre y óxidos de carbono, vapores orgánicos como los responsables del *smog* fotoquímico, o bien partículas atmosféricas.

Ciertos problemas resultantes de la contaminación atmosférica son tan grandes que pueden considerarse amenazas a la atmósfera global y en los casos más extremos, a la vida en la Tierra tal como la conocemos. Las consecuencias más importantes son el calentamiento global, la lluvia ácida o la destrucción de la capa de ozono [1].

En lo que se refiere a la contaminación del aire a menor escala, es decir, la contaminación del aire en interiores o áreas industriales pequeñas, los contaminantes más importantes son aquellos que se producen en la industria y en las actividades cotidianas, como por ejemplo, los compuestos orgánicos volátiles (VOCs), los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), los PCBs, etc. [2, 3].

Por otro lado, la relación que existe entre la exposición a la contaminación del aire y la enfermedad no es sencilla de establecer ya que a veces no se conoce con exactitud. No obstante, existen pruebas evidentes de que en general, la exposición a elevadas concentraciones de contaminantes del aire es peligrosa para los seres humanos y/o los animales, especialmente porque a través del aire la toxicidad es directa y difícil de evitar. Entre los efectos adversos más comunes que causan los contaminantes que se encuentran en el aire están la bronquitis crónica, la irritación de garganta, la tos, el asma o las alergias y es por ello que la contaminación que existe en el aire no puede ser subestimada, siendo necesario controlar sus niveles.

I.1.2 La contaminación del suelo

El suelo y las prácticas agrícolas están estrechamente unidos a la calidad del medioambiente. La agricultura, a pesar de ser necesaria para mantener las más básicas necesidades humanas, supone también uno de los mayores impactos sobre el mismo. En este sentido, los plaguicidas o pesticidas son una parte esencial de este tipo de

contaminación. En los Estados Unidos, todos estos productos agrícolas se regulan por la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FIFRA) que fue aprobada por primera vez en 1947 [4]. En el año 1972 esta ley sufrió una reforma que estableció que todos los plaguicidas anteriores a ese año pasaran un nuevo registro y desde entonces son muchos los productos que se han retirado del mercado estadounidense [5]. En España también existe una amplia legislación que regula el uso de los productos fitosanitarios. Así por ejemplo, se ha llevado a cabo una revisión exhaustiva de las cerca de 1000 sustancias que formaban parte de los plaguicidas existentes antes de 1983 y solamente 250 de ellos han pasado satisfactoriamente la evaluación de riesgo realizada [6]. Sin embargo, en países con economías emergentes y que no poseen legislación tan exigente, estos productos siguen en uso y este hecho ha dado lugar también a un tráfico ilegal de estas sustancias entre países. A este hecho se une el uso de nuevos productos químicos que se han utilizado muchas veces sin las precauciones necesarias y que llegan al suelo en concentraciones excesivas, pudiendo ser tóxicos para las plantas.

Sin embargo, ésta no es la única causa de contaminación de los suelos. La cría de animales puede tener también efectos ambientales negativos. Los fármacos que se agregan a los piensos, así como, el uso fraudulento de hormonas para el engorde rápido del animal llegan mediante los excrementos al suelo [7].

A todo esto hay que sumar la contaminación por metales pesados que se considera una de las problemáticas más importantes en lo que a contaminación del suelo se refiere [8]. Los elementos traza en los suelos pueden ser de origen geogénico o antropogénico. Los elementos de origen geogénico proceden de la roca madre, de la actividad volcánica, o de la lixiviación de los minerales. Los metales pesados antropogénicos provienen de residuos peligrosos, que proceden de la actividad industrial, la minería, la agricultura y de los residuos sólidos urbanos [9].

La preocupación por la contaminación del suelo se debe principalmente a los riesgos que puede tener esta sobre la salud, bien por contacto directo con el suelo contaminado, con los vapores de los contaminantes, por la contaminación secundaria en los suministros

de agua dentro y bajo el suelo o a través de la ingesta de alimentos cultivados en estas condiciones. Además, existen otro tipo de efectos también de gran importancia que son los que afectan a la fertilidad del suelo, a la pérdida de nutrientes en el mismo o a la contaminación de las aguas subterráneas por lo que la adecuada conservación del suelo y el control de los contaminantes presentes en él es un tema de considerable relevancia.

I.1.3 La contaminación del agua

El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medioambiente, que como consecuencia del rápido desarrollo humano y económico y del vertido masivo de sustancias químicas al que se ha visto sometida, ha sufrido un alarmante deterioro. Durante décadas, toneladas de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la agricultura, la industria, la medicina, etc., han sido vertidas al medioambiente acuoso sin reparar en las posibles consecuencias posteriores [10]. Estos compuestos incluyen aceites y grasas, hidrocarburos derivados del petróleo, jabones y detergentes, pesticidas, metales pesados, así como, diversos microorganismos [11].

Las medidas legislativas que se han ido adoptando progresivamente para evitar la contaminación química del agua y los riesgos que se derivan de ella, han contribuido a paliar parcialmente esta situación. Desde la publicación de la Ley de Aguas de 1985 son muchas las normativas que se han desarrollado con el fin de proteger este medio [12]. Una de las más importantes es la Directiva 2000/60/CE también denominada Directiva Marco del Agua [13], donde se especifican las medidas a tomar para conseguir la protección del agua y la calidad química y ecológica de ésta, tanto mediante la reducción de la contaminación ya existente como mediante el cese de vertidos y emisiones. Sin embargo, la creciente demanda de agua y el descubrimiento continuo de nuevos contaminantes potencialmente peligrosos en la misma dejan clara la necesidad de seguir investigando en todas aquellas áreas que puedan contribuir a proteger la salud humana y la del medioambiente, conseguir un uso sostenible del agua y atenuar los efectos de las sequías.

La aparición de elementos no deseables o tóxicos y la variación en las concentraciones de los constituyentes comunes, tiene su origen en el denominado "ciclo del agua". En alguna parte de este ciclo, en el cual confluyen distintas matrices ambientales y actividades humanas, es donde se produce la contaminación del agua, o mejor dicho, la alteración de su calidad. De acuerdo con este ciclo, las principales vías de entrada de contaminantes en el medioambiente acuático son las aguas residuales, entre las que se incluyen las urbanas, las industriales y las de origen agrícola o ganadero.

Los efectos que la contaminación química del agua produce son múltiples; entre los más importantes cabe destacar:

1. Acción tóxica y cancerígena
2. Incidencia sobre la producción de alimentos
3. Limitación del uso del agua con fines recreativos
4. Reducción de las posibilidades de su uso industrial y agropecuario.

Todos estos riesgos originados por la contaminación del agua son difíciles de evaluar, ya que muchas veces las dosis tóxicas sobre las cuales se trabaja son muy pequeñas y en la mayoría de los casos se observa la presencia simultánea de diversos contaminantes [14].

I.1.4 La contaminación alimentaria

A comienzos del siglo XXI, la seguridad de los alimentos que consumimos se ha convertido en una prioridad fundamental tanto para los consumidores como para los organismos públicos. Las recientes crisis (enfermedad de las vacas locas, la contaminación de carne de ave con dioxinas en Bélgica, el elevado contenido de benzopireno en aceites de orujo de oliva españoles, etc.), han acrecentado la sensibilidad del público a las cuestiones alimentarias, que nunca ha sido tan importante en Europa como ahora.

Todas estas situaciones actuales, en las que se ve comprometida la salud de los consumidores, exigen un mayor control de los alimentos, pero también han dado lugar a nuevos sistemas de producción, nuevas tecnologías y nuevos hábitos alimentarios, por lo

que hemos pasado de los riesgos clásicos en la alimentación como por ejemplo, la contaminación por microorganismos comunes que ya cuentan con un historial riesgo-control específico, a las actualmente denominadas enfermedades emergentes dentro del ámbito alimentario. Además, las citadas crisis han hecho aflorar algunas lagunas de la legislación alimentaria y han hecho tomar conciencia de la necesidad de reorientar dicha legislación hacia una política más dirigida a la vigilancia [15].

La *Food and Agriculture Organization* (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen el concepto de “seguridad alimentaria” como “el acceso físico y económico de todas las personas y en todo momento a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a alimentación para llevar una vida activa y sana”[16]. En los países industrializados donde el acceso a una cantidad suficiente de alimentos parece garantizado, es el aspecto relativo a la inocuidad de los alimentos el que más preocupa, es decir, debe garantizarse que los alimentos una vez ingeridos no produzcan daño alguno a quien los consume.

Para garantizar la seguridad alimentaria las medidas deben basarse en un planteamiento integrado de la cadena alimentaria, es decir, un control que abarque todas las etapas del proceso productivo y procesado de los alimentos, desde la fase primaria hasta el momento en que llegan a la mesa del consumidor, puesto que todas ellas son determinantes de la calidad del producto alimenticio final.

La contaminación de los alimentos puede ser de dos tipos: contaminación biótica (producida por bacterias) y contaminación abiótica (derivada de la presencia de sustancias químicas y/o sus metabolitos) dentro de la cual se encuentran contaminantes como compuestos perfluorados (PFCs), bifenilos polibromados (PBBs), aditivos alimentarios, pesticidas, residuos farmacéuticos y nanomateriales [17].

Una fuente importante de residuos y contaminantes químicos en los alimentos es la contaminación ambiental. En efecto, el precio pagado por la explotación intensiva del suelo y por la producción industrial es la contaminación del medioambiente que contribuye de forma importante a la presencia de contaminantes químicos en los

alimentos, desde su lugar de producción hasta la mesa del consumidor. En este grupo de residuos se incluyen los pesticidas organoclorados, los PCBs, los metales pesados y las dioxinas, entre otros.

Finalmente, la transformación industrial de los alimentos (obtención, procesado y conservación) debe ser controlada de forma estricta de manera que se asegure la inocuidad de los productos procesados. Las principales fuentes de contaminación en este sentido son los efluentes y las aguas; los equipos, utensilios y superficies de trabajo; los ingredientes y aditivos; los procesos tecnológicos y los envases y embalajes.

Por todo ello, es necesario controlar esta contaminación química y reducirla hasta obtener concentraciones de residuos lo más bajas posibles. De hecho, actualmente el control de dicha contaminación es uno de los problemas principales que se le presenta a la humanidad, junto con una producción agroalimentaria suficiente y la búsqueda de nuevas fuentes energéticas.

I.2 IMPORTANCIA DE LA QUIRALIDAD EN EL MEDIOAMBIENTE

I.2.1 La quiralidad

Dos compuestos son estereoisómeros cuando tienen la misma composición atómica y la misma conectividad entre sus átomos pero se diferencian en la forma en que sus átomos o grupos de átomos se disponen en el espacio, es decir, poseen diferente estructura tridimensional. Dentro de los estereoisómeros se incluyen los enantiómeros y los diastereoisómeros.

Los compuestos para los que las distancias interatómicas coinciden, pero cuyos elementos están colocados en una secuencia diferente respecto a un elemento central, se denominan enantiómeros. Los enantiómeros constituyen imágenes especulares no superponibles (**Figura I.1**), como ocurre con las manos, y a esa propiedad de un compuesto de ser no superponible a su imagen en el espejo se le denomina quiralidad

(que proviene de la palabra griega “*quiros*” que significa mano). Para que se dé este tipo de quiralidad tiene que haber en la molécula centros estereogénicos o centros quirales, es decir, átomos que presentan cada uno de sus enlaces dirigidos hacia un grupo diferente. Es lo que ocurre con los carbonos asimétricos, que están unidos a cuatro grupos diferentes.

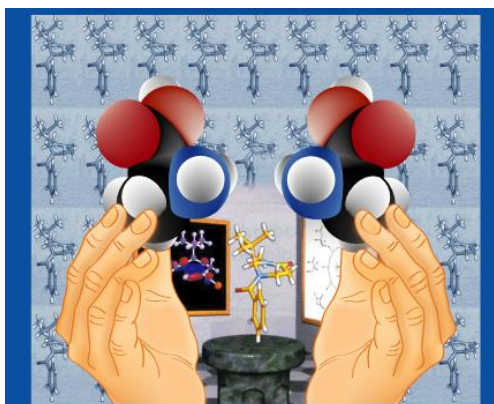


Figura I.1. Comparación entre una molécula que presenta quiralidad y las manos.

Los enantiómeros que se caracterizan por poder interconvertirse, es decir, modificar su orientación espacial para convertirse en otro isómero de la misma molécula por rotación en torno a enlaces simples, se llaman atropoisómeros o isómeros conformacionales. La isomería conformacional es otro tipo de quiralidad ya que por impedimentos en la rotación se generan dos conformaciones diferentes que son imágenes especulares no superponibles.

El número de enantiómeros de un compuesto puede calcularse utilizando la regla 2^n , donde n es el número de centros quirales de la molécula [18]. Conocer la configuración absoluta de los enantiómeros implica conocer exactamente la disposición de los grupos

alrededor de un centro estereogénico. Esa configuración, se designa como *R* o *S* según el método de Cahn-Ingold-Prelog [19].

Los estereoisómeros que puedan distinguirse entre sí por la diferente distancia entre alguno de los átomos o grupos de átomos, reciben el nombre de diastereoisómeros. Pertenecen a este grupo compuestos con más de un centro estereogénico, de los cuales algunos presentan la misma configuración y otros la opuesta. Este es el caso por ejemplo de ciertos alquenos y compuestos cíclicos llamados isómeros *cis-trans*. Ningún compuesto incluido en un grupo de diastereoisómeros es la imagen especular de otro de dicho grupo [20].

La diferencia entre un enantiómero y un diastereoisómero tiene implicaciones cruciales desde el punto de vista químico. Los diastereoisómeros tienen propiedades físico-químicas diferentes (punto de fusión, momento dipolar, espectro de resonancia magnética nuclear, comportamiento cromatográfico y de cristalización) y diferente reactividad química. Sin embargo, los enantiómeros presentan las mismas propiedades físico-químicas y sólo se comportan de manera diferente en un entorno quiral. La luz polarizada puede considerarse un entorno quiral, por lo que puede emplearse para diferenciar dos enantiómeros entre sí, ya que ambos desvían el plano de la luz polarizada en sentido opuesto. El signo de la rotación del plano de luz polarizada se describe mediante los términos *dextrorrotatorio* (*d,+*) y *levorrotatorio* (*l,-*), dependiendo de si la desviación ocurre en el sentido de las agujas del reloj o en sentido contrario, respectivamente. Hay que destacar que no existe relación entre el signo de la rotación y la secuencia de los sustituyentes, por lo que existen compuestos (*R,+*), (*R,-*), (*S,+*) y (*S,-*).

Finalmente, indicar que se denomina mezcla racémica o racemato a la mezcla de dos enantiómeros en proporciones equimoleculares, y que por lo tanto es ópticamente inactiva.

I.2.2 Interés de la determinación enantiomérica de contaminantes ambientales

El impacto de la quiralidad de los contaminantes ambientales es un área de investigación en crecimiento en el campo de la Química Analítica. La principal razón es que muchos de los contaminantes químicos de interés medioambiental son quirales, este es el caso por ejemplo de los productos agroquímicos, para los cuales el 25 % de los principios activos empleados poseen al menos un centro quiral [21]. Sin embargo, hasta ahora la estereoisomería de los contaminantes químicos no ha recibido demasiada atención a pesar de la diferencia toxicológica que pueden presentar los enantiómeros, asumiendo que ambos isómeros tienen idéntico comportamiento medioambiental.

Como se ha expuesto anteriormente, los enantiómeros de un compuesto quiral a pesar de tener propiedades físico-químicas idénticas, se comportan de forma completamente diferente en un entorno quiral. Así, mientras que los procesos medioambientales abióticos afectan exactamente de la misma manera a los enantiómeros, en los sistemas vivos todos los receptores de la maquinaria celular poseen una configuración definida [22], de manera que las interacciones biológicas que se producen en el organismo, la forma de metabolizar y excretar estos compuestos e incluso la toxicidad son diferentes para cada uno de los enantiómeros de un mismo compuesto [23]. Del mismo modo, la presencia de microorganismos en el medioambiente es la responsable de la degradación enantioselectiva que se observa para muchos de estos compuestos. De esta manera, mediante la determinación de cada uno de los enantiómeros de forma individual se pueden trazar patrones de actividad bioquímica de estos contaminantes. Por todo ello, la quiralidad tiene una fuerte repercusión en campos de interés científico y social tales como el medioambiente.

En general, la importancia del análisis quiral de los contaminantes químicos se debe principalmente a los siguientes motivos:

- Aproximadamente el 25 % de los productos agroquímicos son quirales y para muchos de ellos solamente uno de los enantiómeros es activo. Además,

muchas veces el enantiómero no activo resulta ser tóxico para los organismos no-diana.

- El uso de racematos en los que solamente uno de los enantiómeros es activo, supone la emisión al medioambiente de una mayor cantidad del mismo para obtener los mismos resultados.
- La mayoría de los procesos bioquímicos en la naturaleza son estereoespecíficos.
- Los enantiómeros de los contaminantes químicos poseen frecuentemente diferentes actividades toxicológicas y biológicas y por ello, el metabolismo y excreción de los mismos es diverso. La evaluación de la toxicidad real de las muestras ambientales implica conocer el contenido de cada enantiómero.

Hasta hace relativamente poco tiempo el análisis de contaminantes ambientales no tenía en cuenta la quiralidad de los mismos. Como resultado de esta falta de información las medidas de ecotoxicidad, biodisponibilidad y acumulación realizadas serían inadecuadas. En efecto, supongamos que un compuesto dado posee dos enantiómeros y que aquel que es más tóxico se degrada mucho más rápido que el menos tóxico. Si no se tiene en cuenta su quiralidad y se realizan las medidas para el conjunto de los dos enantiómeros sin ningún tipo de distinción, se estaría sobreestimando la ecotoxicidad del compuesto [24].

El movimiento en la biosfera de los contaminantes quirales y sus residuos puede ser tratado a través de determinaciones de excesos enantioméricos (e.e). Los fenómenos de transporte habituales (volatilización, lixiviación, deposición atmosférica) no alteran el e.e.; sin embargo, como se ha comentado, el metabolismo de los pesticidas por parte de microorganismos y enzimas en animales superiores sí lo altera. Por tanto, la determinación del e.e indica la degradación biológica de estos productos y puede

informar sobre el origen de los pesticidas. También se pueden emplear con este fin los parámetros de relación enantiomérica (ER) y fracción enantiomérica (EF), que en general son los más utilizados para expresar degradaciones enantioselectivas o enantiomerizaciones en el medioambiente [25].

$$\begin{array}{lcl}
 ee(\%) = \frac{[R]-[S]}{[R]+[S]} \times 100 & \text{o} & ee(\%) = \frac{[S]-[R]}{[R]+[S]} \times 100 \\
 ER = \frac{R}{S} & \text{o} & ER = \frac{S}{R} \\
 EF = \frac{R}{(R+S)} & \text{o} & EF = \frac{S}{(R+S)}
 \end{array}$$

Siendo [R] y [S] las concentraciones de cada enantiómero en la mezcla y R y S las señales instrumentales (áreas en el caso de la cromatografía y de la electroforesis) obtenidas para cada enantiómero.

Dentro de los contaminantes químicos que se conocen hoy en día existen muchos grupos que presentan quiralidad. Como ejemplo representativo cabe destacar, los ya mencionados pesticidas o agroquímicos en los que para muchos de ellos la actividad pesticida reside generalmente en uno solo de los enantiómeros, por lo que el empleo de la mezcla racémica supondría la emisión al medioambiente de más producto del necesario para obtener el mismo resultado [26]. Otro grupo de contaminantes químicos que presentan quiralidad son los PCBs. En este caso, se han encontrado para muchos de ellos evidencias de diferente interacción enzimática y acumulación según el enantiómero [27].

Por todo lo expuesto, la importancia de la quiralidad en el medioambiente no puede ser subestimada. Además, a la necesidad de sintetizar compuestos enantioméricamente puros, se une la de desarrollar técnicas analíticas de separación y determinación quirales que permitan controlar los procesos de producción de dichos compuestos. Este hecho, está

reconocido por las agencias regulatorias que cada vez son más conscientes de la importancia de la quiralidad y por ejemplo, piden más información sobre la composición quiral de los nuevos productos y exigen la síntesis de compuestos agroquímicos enantioméricamente puros [28, 29]. En efecto, la OMS recomienda que se fomente el uso de enantiómeros puros activos y que se tolere el uso de compuestos racémicos solamente cuando los estudios farmacocinéticos, toxicológicos y ambientales indiquen que el ingrediente activo no contiene impureza isomérica y no causa más efectos secundarios adversos que el enantiómero puro. Asimismo, exige que los estudios toxicológicos de los principios activos se realicen con los enantiómeros individuales.

I.3 CONTAMINANTES QUÍMICOS

Los avances científicos y tecnológicos han hecho que hoy en día existan productos que hacen que nuestra vida sea más sencilla y confortable. Sin embargo, este hecho, también ha propiciado el desarrollo de compuestos químicos que a pesar de que ofrecen beneficios en distintos ámbitos, también podrían ser potencialmente tóxicos. Todos estos compuestos considerados contaminantes químicos llegan al medioambiente de distintas formas, según sea su modo de aplicación o uso, y una vez allí se distribuyen y llegan a los seres vivos. Además su persistencia, bioacumulación y transformación van a ser factores a tener muy en cuenta, ya que muchos de ellos son resistentes a la degradación fotoquímica y biológica y tienen tendencia a acumularse en los tejidos animales [30].

En cuanto a sus efectos sobre la salud, se ha observado que la exposición a estos contaminantes ambientales influye de manera significativa, en muchos casos incluso en mayor medida que la genética [31]. Así, mientras que la genética define el genotipo de un individuo, es decir, la información genética de los organismos, el ambiente químico al que se ve expuesto éste, define y moldea las características del organismo, es decir, su fenotipo. De este modo, al igual que existen nutrientes esenciales para el desarrollo y maduración de los organismos, también influyen de manera sustancial en dicho

desarrollo todos aquellos contaminantes, tanto naturales como sintéticos, que están presentes en el medioambiente [32].

Tradicionalmente, la atención prestada a la contaminación química se ha centrado en los contaminantes más convencionales, es decir, aquellos que se encuentran más regulados debido al gran volumen en el que son emitidos. Sin embargo, hay que destacar que existe otro gran grupo de contaminantes químicos, que a pesar de no estar presentes en el medioambiente en concentraciones elevadas, tienen efectos dañinos sobre el mismo y sobre la salud de los seres vivos. Estos contaminantes se engloban dentro de los denominados “contaminantes emergentes”, término que hace referencia a todos aquellos contaminantes que no están actualmente regulados por la legislación en su totalidad, ya que aún no han sido especialmente estudiados, pero que pueden ser candidatos a una regulación futura ya que se cree o se intuye que puedan ser potencialmente dañinos desde el punto de vista medioambiental o de la salud [14].

De este modo, dentro de los contaminantes ambientales podemos encontrar diversos grupos entre los que cabe destacar los fármacos, los productos de cuidado personal, las drogas de abuso, los esteroides y las hormonas en general, los tensioactivos, los compuestos perfluorados, los retardantes de llama bromados, los compuestos organoclorados, los plastificantes y aditivos, los hidrocarburos policíclicos aromáticos y los pesticidas y sus metabolitos [14].

A continuación, se presentará una breve descripción de cada uno de los grupos de contaminantes químicos mencionados.

I.3.1 Contaminantes químicos más destacados

Aunque como se acaba de comentar, existen infinidad de contaminantes químicos, tradicionalmente se ha prestado mayor atención a aquellos compuestos más empleados por el hombre o a aquellos que se producen a través de procesos industriales, como es el caso de los compuestos organoclorados o de los pesticidas. Sin embargo, existe otro gran

grupo de contaminantes químicos que han despertado un reciente interés, dentro de los cuales están por ejemplo las drogas de abuso, los productos de cuidado personal o los esteroides. En este apartado se pretende dar una breve visión general de aquellos contaminantes químicos que hoy en día presentan un mayor interés, así como, de las razones por las que se consideran contaminantes químicos.

➤ *Fármacos de uso humano y veterinario*

En la actualidad existen multitud de fármacos de uso humano y animal. Según el código ATC o Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica y Química, que es el sistema de clasificación para los fármacos que sigue la OMS y el aceptado en Europa, los fármacos se clasifican en base a cinco niveles: 1) nivel anatómico, 2) subgrupo terapéutico principal, 3) subgrupo terapéutico farmacológico, 4) subgrupo químico y 5) principio activo. Cada uno de estos niveles proporciona a un fármaco concreto una cifra o una letra de tal forma que se crea un código para cada fármaco [33]. Según el grupo terapéutico, la clasificación de los fármacos es muy amplia; sin embargo, destacan los más consumidos a nivel mundial, como por ejemplo los analgésicos/antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenaco, los antiepilépticos como la carbamacepina, los antibióticos como la amoxicilina y los β -bloqueantes como el metoprolol [34]. A éstos, hay que añadir los utilizados en veterinaria, la acuicultura, la ganadería o la avicultura.

Los fármacos han sido desarrollados para producir algún tipo de efecto biológico y por ello sus residuos en el medioambiente pueden causar diferentes efectos ecotóxicos. Estos compuestos llegan muy fácilmente a las aguas una vez excretados, por lo que suponen un grupo de contaminantes ambientales muy importante [35]. Han sido encontrados en todo tipo de aguas naturales en concentraciones que van desde el nivel de trazas hasta los ppb, pero su elevada persistencia ha hecho que sea uno de los grupos de contaminantes químicos más estudiados en los últimos años en todo tipo de muestras medioambientales [36-38]. Los fármacos que se han detectado en mayor medida en el medioambiente, incluyen analgésicos/antiinflamatorios, antibióticos, antiepilépticos, β -bloqueantes,

reguladores del colesterol, medios de contraste, broncodilatadores, tranquilizantes y anticonceptivos hormonales [39]. La **Figura I.2** muestra a modo de ejemplo la estructura de algunos fármacos pertenecientes a estos grupos.

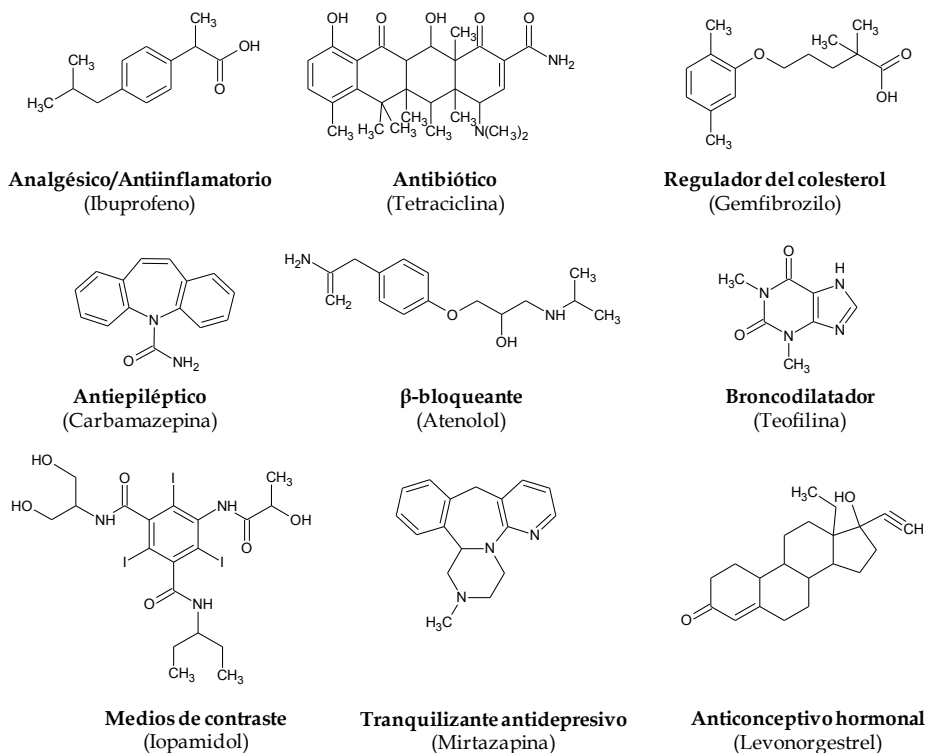


Figura I.2. Estructura de los fármacos más comunes en las muestras medioambientales.

Las concentraciones a las que se han encontrado estos compuestos en aguas superficiales y/o subterráneas se sitúan en el rango de los ng/L o µg/L, mientras que en suelos y sedimentos se alcanzan concentraciones de hasta el g/Kg [39, 40].

Por otro lado, los fármacos empleados para el ganado, además de ser muy utilizados con fines terapéuticos, son a veces administrados al mismo de forma ilícita y con una

finalidad muy diferente. Este es por ejemplo el caso de los fármacos tireostáticos, que se han estudiado en este trabajo, o de las hormonas esteroideas derivadas del cortisol, cuyas estructuras se muestran en la **Figura I.3**. En general, estos compuestos se añaden a los piensos o a los pastos disueltos en agua por lo que contaminan el suelo y las aguas subterráneas de forma directa. Con fines no terapéuticos se emplean para el engorde del ganado, lo que supone un fraude para el consumidor y un peligro para la salud. En este sentido por ejemplo, la Unión Europea regula el uso de fármacos de uso veterinario mediante la normativa 2377/90/CE [41]. Por todos estos motivos es necesario desarrollar nuevos métodos que permitan la determinación de estos contaminantes químicos.

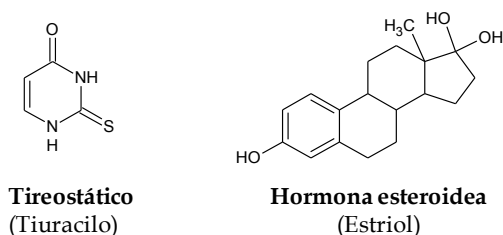


Figura I.3. Estructura del tiuracilo (fármaco tireostático) y el estriol (hormona esteroidea) empleadas en la cría del ganado.

Decir que en la actualidad, los grupos de fármacos que se consideran más peligrosos y demandan investigación son:

- 1) Los antibióticos, para los que cabe la posibilidad de que se desarrollen cepas resistentes que hagan que pierdan su eficacia.
- 2) Los medios de contraste, especialmente de rayos X, que son muy persistentes y no son eliminados fácilmente de las muestras medioambientales.
- 3) Los fármacos empleados en el tratamiento del cáncer, como por ejemplo los citostáticos.

- 4) Los estrógenos empleados como anticonceptivos (véase el apartado de las hormonas).

➤ *Productos de cuidado personal*

Dentro de los productos de cuidado personal (PCPs) se engloban todos aquellos productos que se usan para el tratamiento interno (p.e. suplementos alimenticios) y externo del cuerpo humano, animales domésticos o plantas de uso no terapéutico [32] y que pueden incluir una gran variedad de productos tales como fragancias, cremas solares, etc. La mayoría de estos productos contienen compuestos altamente bioactivos, polares, ópticamente activos y que se encuentran en las muestras medioambientales en muy bajas concentraciones [32]. La **Figura I.4** muestra a modo de ejemplo, la estructura de algunos de los compuestos que se encuentran con mayor frecuencia en este tipo de productos comerciales, como agentes limpiadores, cosméticos, solubilizantes, colorantes, espumantes, etc. Muchos de ellos pueden provocar alergias, migrañas e irritaciones neurológicas [42].

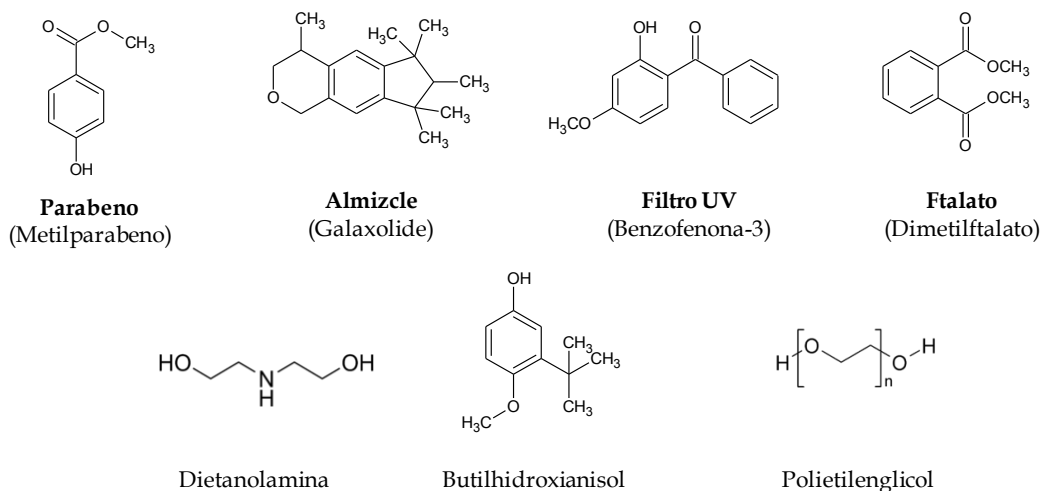


Figura I.4. Estructura de algunos de los aditivos más empleados en productos de cuidado personal.

De ellos, unos de los que han suscitado mayor polémica en cuanto a su seguridad son los almizcles sintéticos. Los almizcles son una familia de compuestos empleados como fijadores de fragancias en productos cosméticos y de uso doméstico. A pesar de que originariamente se empleaban almizcles naturales con este fin, éstos fueron reemplazados por almizcles sintéticos conocidos como almizcles policíclicos [33, 43]. En este sentido y debido a que se ha demostrado que los almizcles sintéticos son bioacumulativos, se consideran contaminantes emergentes y de hecho se ha establecido una concentración máxima permitida en productos cosméticos para algunos de estos compuestos [44].

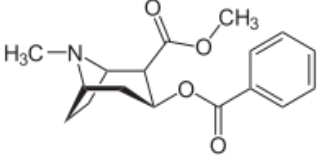
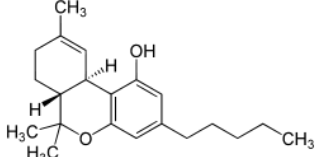
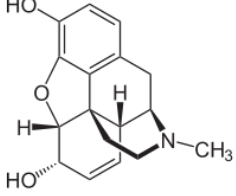

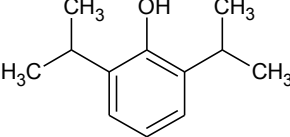
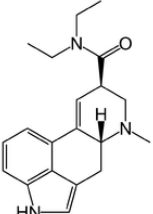
Otros compuestos como los filtros ultravioleta han despertado el interés de los científicos debido a su comportamiento como disruptores endocrinos, sus efectos estrogénicos [45] y su toxicidad hacia diversos organismos y especies animales [46, 47].

Al igual que los almizcles sintéticos y los filtros ultravioleta existen otros compuestos como los parabenos o los ftalatos (estos últimos han sido estudiados en este trabajo) que se emplean en productos cosméticos a pesar de que su seguridad no se ha establecido [48]. En efecto, no todos los compuestos de este tipo están contemplados en la legislación porque aún no hay evidencias suficientes de su toxicidad o nocividad hacia los seres vivos y el medioambiente; sin embargo, es necesario desarrollar métodos de análisis que permitan su determinación en diversas matrices debido a los riesgos potenciales que puedan presentar y a la necesidad de establecer los niveles en los que se encuentran presentes.

➤ *Drogas de abuso*

Muchas de las sustancias que producen adicciones en el ser humano, como el alcohol, ciertos hongos alucinógenos, resinas de plantas, etc., han sido empleadas desde hace miles de años por la humanidad con diversos fines. En la actualidad se encuentran disponibles en el mercado una enorme variedad de drogas de abuso, puesto que a las ya mencionadas se les unen otras muchas de origen sintético. La **Tabla I.1** muestra los principales grupos de drogas de abuso y ejemplos representativos de cada uno.

Tabla I.1. Principales grupos de drogas de abuso y ejemplos representativos.

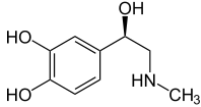
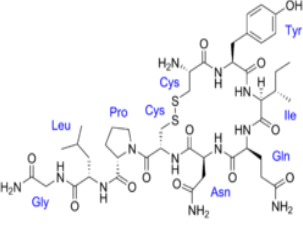
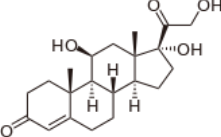
Grupo	Ejemplos	Origen	Ejemplo estructural
Psicoestimulantes	Cocaína	Natural	 <p>Cocaína</p>
	Anfetaminas	Sintético	
	Cafeína	Natural	
	Nicotina	Natural	
	Extasis	Sintético	
Cannabinoides	Fitocannabinoides	Natural	 <p>Tetrahidrocannabinol</p>
	Endocannabinoides	Natural	
Opioides	Opio	Natural	 <p>Morfina</p>
	Morfina	Natural	
	Heroína	Semisintético	
	Codeína	Natural	
	Metadona	Sintético	
Alcohol	Etanol	Natural	 <p>Etanol</p>
Barbitúricos	Derivados del ácido barbitúrico	Sintético	 <p>Propofol</p>
Alucinógenos	LSD	Semisintético	 <p>LSD</p>
	Mescalina	Natural	

La presencia de drogas de uso ilícito en el medioambiente constituye un problema importante en la actualidad. En efecto, hoy en día el consumo de drogas de abuso como anfetaminas, metanfetaminas o cocaína, se puede casi comparar al de los fármacos de uso terapéutico y por tanto, no es de extrañar que al igual que sucede con estos últimos, la presencia de drogas ilícitas en el medioambiente sea cada vez más notable. Estas drogas son excretadas en la orina, por lo que la matriz en la que es más fácil encontrarlas es en las aguas naturales y como consecuencia, afectan a los árboles circundantes y a los peces que habitan en ellas. Existen en la bibliografía diversos trabajos en los que se describe la presencia de este tipo de sustancias en aguas naturales, incluso en aquellas aguas que han sido previamente tratadas en plantas de tratamiento [49-51]. Además, muchas de estas drogas ilícitas no sufren degradación y permanecen en las aguas, lo que supone un riesgo para la salud humana [52]. Estudios realizados en España han demostrado la presencia de dichos compuestos en aguas subterráneas, especialmente para metadona y cocaína para las que se llegaron a detectar niveles entre 68 y 60 ng/L, respectivamente [53].

➤ *Hormonas*

Las hormonas son sustancias secretadas por las células localizadas en glándulas de secreción interna o glándulas endocrinas y también por células epiteliales e intersticiales cuyo fin principal es el de afectar a la función de otras células. Son vitales en los seres vivos ya que controlan la mayoría de las funciones corporales. Existen multitud de hormonas, tanto de origen natural como sintético y en general se clasifican según su estructura química en tres grupos diferentes: 1) derivadas de aminoácidos, 2) peptídicas y 3) lipídicas y dentro de esta clasificación inicial se incluyen varios subgrupos. La **Tabla I.2** muestra algunos ejemplos representativos de cada uno de los grupos de hormonas mencionado.

Tabla I.2. Clasificación de las hormonas según su estructura química y ejemplos representativos.

Tipo	Grupos	Ejemplos concretos	Ejemplo estructural
Derivadas de aminoácidos o aminoácidos modificados	Catecolaminas Triptaminas Histaminas	Adrenalina Noradrenalina Dopamina	 <p>Dopamina</p>
Peptídicas	Polipeptidos	Hormona antidiurética Oxitocina Somatostatina Encefalina	 <p>Oxitocina</p>
Lipídicas	Esteroides Eicosanoides	Estriol Dietilestilbestrol Cortisol Testosterona	 <p>Cortisol</p>

Las hormonas naturales y sus análogos sintéticos, como por ejemplo aquellas empleadas con fines anticonceptivos, se han encontrado con frecuencia en el medio acuático como resultado de un ineficiente proceso de eliminación en las plantas de tratamiento de aguas. Aunque sus concentraciones se encuentran a nivel de los ng/L, esas concentraciones son suficientes para inducir efectos estrogénicos y alterar los procesos de reproducción de los seres vivos [54]

De todo este grupo de compuestos, las hormonas esteroideas son las que mayor interés han suscitado. Son moléculas derivadas del colesterol o algún otro tipo de esteroles y son las encargadas de controlar la reproducción y el desarrollo de los seres vivos [55]. Las

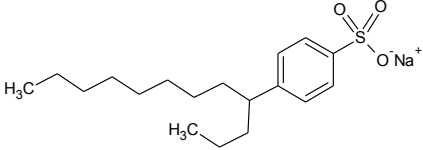
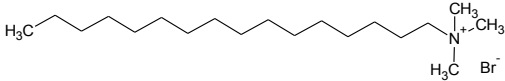
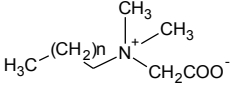
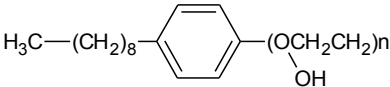
hormonas esteroideas pueden pertenecer a distintos grupos, siendo los más importantes los andrógenos, estrógenos, progestógenos, glucocorticoides, mineralcorticoides y derivados de la vitamina D. A pesar de que muchas hormonas esteroideas se encuentran de forma natural en los distintos organismos, otras muchas son consideradas contaminantes exógenos y se ha demostrado su comportamiento como disruptores endocrinos [56, 57]. Además, al igual que los fármacos tireostáticos, estas hormonas se emplean de forma fraudulenta como promotores del crecimiento en la cría de ganado obteniéndose un aumento rápido del peso del animal como resultado de la retención hídrica [58]. De este modo, se vende agua a precio de carne lo que supone un fraude además de un riesgo para la salud del consumidor por la posible ingesta de hormonas a través de la carne.

➤ *Tensioactivos*

Los tensioactivos o surfactantes son un grupo de sustancias que se encuentran en los productos de limpieza debido fundamentalmente a sus propiedades solubilizantes. Son empleados masivamente en productos para la limpieza del hogar, productos de higiene personal, industria textil, industria papelera, etc. Por ello, su presencia en el medioambiente es más que evidente ya que después de su uso llegan a las aguas fácilmente.

Los tensioactivos están constituidos por un grupo polar y una cadena hidrocarbonada de carácter no polar altamente hidrofóbica, de modo que en su molécula se combinan propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas. Según la naturaleza del grupo polar se pueden clasificar en tensioactivos aniónicos, catiónicos, neutros y zwitteriónicos. La **Tabla I.3** muestra a modo de ejemplo, algunos tensioactivos empleados en productos de limpieza.

Tabla I.3. Ejemplos de tensioactivos habitualmente empleados en productos de limpieza y por tanto comúnmente encontrados en muestras medioambientales.

Naturaleza del tensioactivo	Ejemplo	Estructura
Aniónico	Dodecil benceno sulfonato de sodio	
Catiónico	Bromuro de hexadecil trimetilamonio	
Zwitteriónico	Alquil dimetil betaina	
No iónico	Nonil fenoles etoxilados	

Cuando se encuentran en un medio acuoso por encima de una concentración dada (concentración micelar crítica, CMC), las moléculas de tensioactivo se agrupan de tal modo que la parte hidrofóbica queda dentro del núcleo y la parte hidrofílica queda en contacto con el disolvente formando un agregado submicroscópico denominado micela [59]. En el medioambiente, estas micelas afectan a la movilidad y la degradación de los compuestos orgánicos y al transporte de oxígeno y su presencia en las aguas disminuye la tensión superficial volviendo este medio mucho más vulnerable a la presencia de otros contaminantes químicos [60].

Diversos estudios han demostrado que la eliminación de los tensioactivos durante los procesos de tratamiento de las aguas suele ser incompleto y poco satisfactorio [61] ya que sus propiedades físico-químicas permiten que dichos compuestos penetren a través de las membranas empleadas en la filtración. Este hecho representa un riesgo potencial cuando se trata de aguas de consumo humano, por lo que muchas investigaciones se centran en el desarrollo de nuevos mecanismos de eliminación de tensioactivos en las aguas naturales [62].

➤ *Compuestos perfluorados*

Los PFCs son un grupo de compuestos constituidos por un alcano lineal sustituido completamente por átomos de flúor. Se trata de compuestos altamente hidrofóbicos y persistentes, son ampliamente empleados como repelentes en el tratamiento de superficies, en electrónica y en la fabricación de plásticos para el envasado de alimentos [63]. Algunos de los PFCs más empleados en todos estos procesos son compuestos como el ácido perfluorooctano sulfónico (PFOS), el ácido perfluorooctánico (PFOA) y los ácidos perfluorocarboxílicos (PFCAs), cuya estructura se muestra en la **Figura I.5**, así como, diversos metabolitos que son igualmente persistentes en el medioambiente [64]. El PFOS se ha empleado como refrigerante, detergente, y polímero en todo tipo de fármacos, cosméticos, insecticidas y adhesivos, mientras que el PFOA se utiliza en la fabricación de fluoropolímeros y fluoroelastómeros en la fabricación de tejidos, alfombras o coches. Todos ellos son tóxicos y bioacumulativos [14] y han sido catalogados como disruptores endocrinos [65].

Diversos estudios han demostrado su presencia tanto en aguas como en alimentos. El análisis de diversas muestras de la red hídrica Europea ha puesto de manifiesto que la sustancias perfluoroalquílicas estaban presentes en todas las aguas estudiadas [66]. En el caso de los alimentos se han llegado a determinar niveles apreciables de PFOS y PFOA en alimentos de origen animal como pescado, productos lácteos y carnes, estimando una

Otro retardante de llama bromado que goza de gran popularidad es el tetrabromobisfenol-A (TBBPA). Cuando este compuesto se añade como aditivo a los plásticos, no se introduce en la estructura del polímero y por lo tanto puede ser emitido al medioambiente más fácilmente. Se ha demostrado que el TBBPA es neurotóxico [71], inmunotóxico [72] y disruptor endocrino [73].

La **Figura I.6** muestra la estructura general de los PBBs y los PBDEs, así como, la estructural del TBBPA.

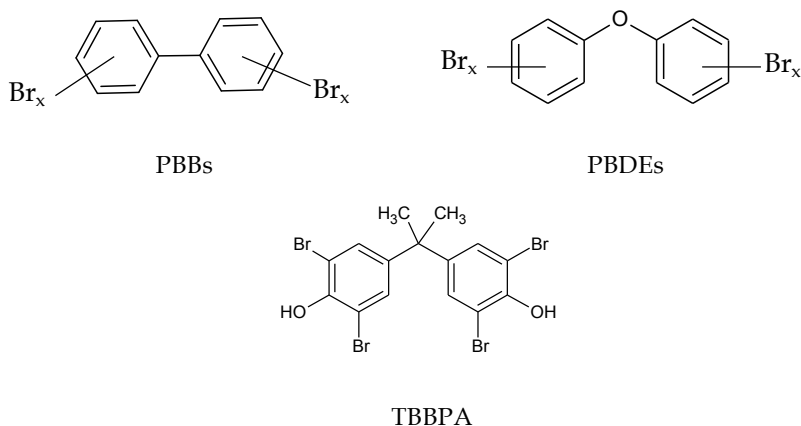


Figura I.6. Estructura de los retardantes de llama bromados más comúnmente encontrados en muestras medioambientales por a su gran uso.

➤ *Compuestos organoclorados*

Los compuestos organoclorados son considerados contaminantes orgánicos persistentes (POPs) ya que son químicamente estables, hidrófobos, de volatilidad media y altamente tóxicos. Dentro de los contaminantes organoclorados persistentes existen cuatro familias prioritarias que son: los PCBs, las policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDDs), los policlorodibenzofuranos (PCDFs) y los insecticidas organoclorados como por ejemplo el

para-diclorodifeniltricloroetano (DDT) y sus derivados. La **Figura I.7** muestra la estructura general de los tres primeros grupos, así como, del insecticida organoclorado DDT.

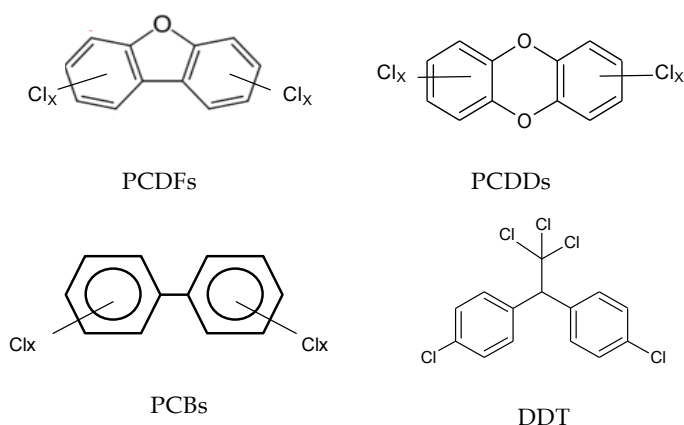


Figura I.7. Estructura de los grupos de compuestos organoclorados más comunes.

Todos estos compuestos han sido ampliamente utilizados en el pasado y además se generan en muchos procesos industriales por lo que tienden a estar presentes en todo tipo de muestras medioambientales [74, 75]. Cabe destacar su implicación en ciertos accidentes como el de Seveso (Italia) en 1976 o el de Binghampton (Estados Unidos) en 1981, donde se produjo la liberación al medioambiente de una gran cantidad de dioxinas causando diversos efectos en la población, como por ejemplo enfermedades cutáneas, malformaciones y enfermedades hepáticas. Por ello, los compuestos organoclorados son desde entonces objeto de gran preocupación social.

Los efectos tóxicos de estos compuestos sobre la salud humana son muy variables dependiendo de la dosis, la edad, el sexo, etc. Sin embargo, se han observado frecuentemente efectos como pérdida de peso, alteraciones de parámetros hematológicos, alteraciones hepáticas, alteraciones dermatológicas, inmunotoxicidad, disminución de la fertilidad, teratogenia, etc. [76].

Otro factor importante a considerar en esta clase de compuestos es su posible quiralidad. Este es el caso de los PCBs, probablemente los compuestos organoclorados más estudiados debido a su gran presencia en el medioambiente. Los PCBs son compuestos quirales que presentan atropoisomerismo a partir de la rotación del enlace simple que une los dos anillos aromáticos que componen su estructura (**Figura I.7**). Como la gran mayoría de los compuestos quirales son producidos comercialmente de forma racémica y por tanto llegan al medioambiente en forma de racemato. Sin embargo, los múltiples procesos biológicos a los que se ven sometidos hacen que esta composición quiral se pueda ver alterada, hecho que sucede especialmente cuando el contaminante entra en contacto con algún tipo de organismo vivo, porque entran en juego procesos metabólicos enantioselectivos [23]. Cuando los PCBs son metabolizados se forman principalmente dos tipos de metabolitos, los hidroxilados (OH-PCBs) y los metilsulfonados (MeSO₂-PCBs). A pesar de que en principio estos metabolitos son mucho más hidrosolubles que los propios PCBs y por tanto deberían ser más fácilmente excretados, su persistencia en los seres vivos es comparable a la de los PCBs originarios y causan efectos biológicos importantes en los mismos. Además, los metabolitos de los PCBs también presentan quiralidad, observándose diversos efectos biológicos y toxicológicos para los distintos atropoisómeros existentes.

➤ *Plastificantes y aditivos*

Los aditivos añadidos a los plásticos como por ejemplo antioxidantes, estabilizadores y plastificantes, a pesar de encontrarse en los mismos en proporciones mínimas, son los responsables de las propiedades de estos materiales. Así, existen aditivos espumantes, plastificantes, que absorben la luz UV, antiestáticos, etc. La incorporación de estos aditivos a los plásticos impide en gran medida el deterioro del material y una mayor facilidad para su uso en diversos ámbitos como son el alimentario, fabricación de juguetes, electrónica, etc. [77]. La **Figura I.8** muestra la estructura general de los aditivos más empleados en la fabricación de plásticos que son los ftalatos (derivados del ácido ftálico), los plastificantes adípicos y los trimelitados.

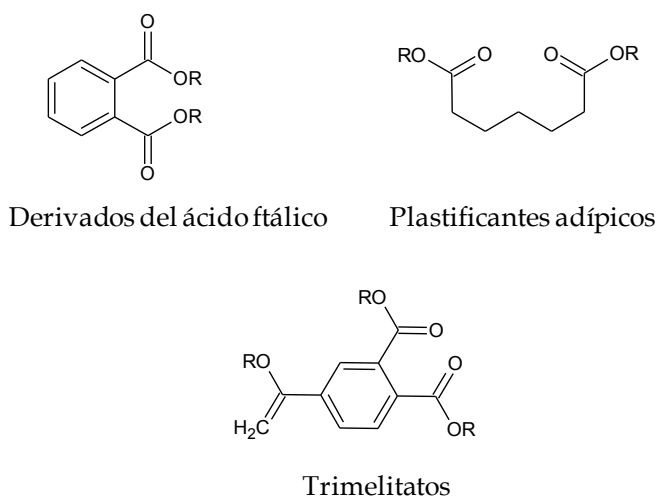


Figura I.8. Estructura general de algunos de los grupos de plastificantes más empleados.

Muchos de estos aditivos no permanecen en el plástico indefinidamente y migran muy fácilmente al medioambiente o a los productos envasados en ellos, por lo que su adición por ejemplo en plásticos destinados al envasado de alimentos, en la fabricación de juguetes, en cosmética etc., está regulado por diversas normativas para controlar su presencia. En este sentido, la Comisión Europea ha establecido los límites de migración para los aditivos empleados en embalajes de alimentos mediante la directiva 2002/72/CE [78] con el fin de garantizar la seguridad de los mismos.

De todos los plastificantes empleados en el mundo, los ftalatos suponen aproximadamente un 93 % del volumen total, aun habiéndose demostrado que muchos de ellos son tóxicos y estrogénicos, por lo que su uso se ha limitado en los últimos años a través de normativas que regulan su empleo [79, 80]. Por ejemplo, la normativa 2005/84/CE [81] prohíbe su uso en juguetes infantiles por el riesgo que conlleva para la salud infantil y la normativa 2004/93/CE [82] establece aquellos ftalatos que no pueden ser empleados en productos cosméticos.

➤ *Hidrocarburos policíclicos aromáticos*

Los PAHs son compuestos orgánicos constituidos por dos o más anillos aromáticos que se forman a partir de la combustión incompleta de material orgánico (erupciones volcánicas, incendios, combustión de la gasolina en automóviles, etc.) [83]. Se conocen aproximadamente 500 PAHs distintos. Estos compuestos han recibido una gran atención debido a la demostrada acción carcinogénica y mutagénica que muestran algunos de ellos [84] por lo que la *Environmental Protection Agency* (EPA) ha catalogado 16 de ellos como contaminantes químicos prioritarios. La **Figura I.9** muestra la estructura de estos 16 PAHs ya que son además los que se encuentran de forma habitual en las muestras medioambientales.

Las mayores concentraciones de PAHs se encuentran en los núcleos urbanos, donde la actividad industrial y el número de vehículos son mayores. Una vez emitidos al medioambiente, los PAHs se acumulan en las partículas atmosféricas y de ahí pasan a depositarse en los suelos [85] y en las aguas [86]. Destacar que los alimentos son la fuente más importante de ingesta de PAHs, no solo por la ingesta de alimentos cultivados, sino también de carnes en las que los PAHs se generan durante su cocinado [87]. Debido a que se trata de compuestos altamente hidrofóbicos se acumulan fácilmente en alimentos como pescados [88] o semillas oleaginosas [89] aunque también es posible encontrarlos en frutas, azúcar, cereales u hortalizas [90]. Cabe destacar que la Unión Europea a través de la directiva 835/2011 [91] establece los niveles máximos de PAHs que se pueden encontrar en alimentos. Por otra parte, la normativa a seguir en la producción de aceites industriales y neumáticos, que son los proceso industriales que producen una mayor cantidad de PAHs en su fabricación, se rige mediante la directiva 76/769/CEE [92].

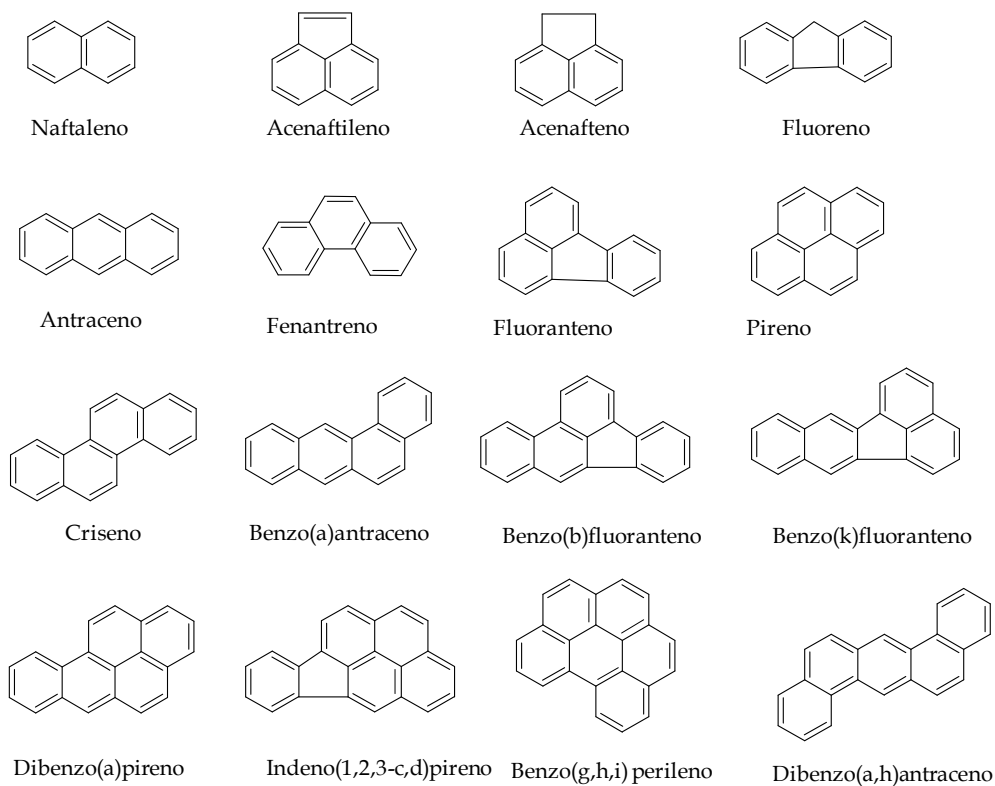


Figura I.9. Estructura de los hidrocarburos policíclicos aromáticos catalogados por la EPA como contaminantes químicos prioritarios.

➤ *Pesticidas*

Aunque los pesticidas son cruciales a la hora de luchar contra el hambre y las enfermedades no se puede obviar su toxicidad para los seres vivos que pueden sufrir sus efectos nocivos a través del medioambiente o los alimentos tratados con estos compuestos.

Los pesticidas se pueden clasificar en base a diferentes criterios. La **Tabla I.4** muestra la clasificación de los mismos en función de su toxicidad en cuatro grupos diferentes, que

se establecen según el valor de dosis letal (LD_{50}). La **Tabla I.5** muestra la clasificación de los mismos en función de la familia a la que pertenecen según su empleo.

Tabla I.4. Clasificación de los pesticidas según su toxicidad [93].

Clase	Toxicidad	Ejemplos
Clase IA	Extremadamente peligrosos	Paratión, dieldrin
Clase IB	Altamente peligrosos	Eldrin, diclorvos
Clase II	Moderadamente peligrosos	DDT, clordano
Clase III	Ligeramente peligrosos	Malatión

Tabla I.5. Clasificación de los pesticidas según su campo de acción [94].

Clase	Empleo	Ejemplos
Insecticidas	Insectos	Piretroides, Carbamatos, Organoclorados
Acaricidas	Ácaros	Piretroides, Propargita
Fungicidas	Hongos	Quininas, Anilidas, Imidazoles
Nematocidas	Gusanos	Limonoides, Bromometano
Herbicidas	Plantas indeseadas	Triazinas, Glifosato, Oximas, tipo amida
Fitoreguladores	Crecimiento de las plantas	Auxinas, Citocininas, Giberelinas, Etileno
Rodenticidas	Roedores	Inhibidores de vitamina K, Talio
Molusquicidas	Moluscos	Metaldehido
Protectores de madera	Específico para plagas en la madera	Insecticidas, Fungicidas etc. (específicos para madera)

Los efectos tóxicos producidos por los pesticidas dependen de la dosis, ruta de exposición y tiempo de exposición [94]. Si bien es verdad que los pesticidas son concebidos para ofrecer una alta especificidad, es inevitable que su uso genere una gran cantidad de efectos indeseados en el medioambiente. Entre estos efectos, el más destacado es la contaminación de los recursos hídricos y como consecuencia la degradación de la

flora y la fauna acuática. En general, la toxicidad de la mayoría de los pesticidas es mucho mayor para los organismos acuáticos que para los seres humanos y no son pocos los casos en los que un vertido de pesticidas a las aguas ha provocado la muerte masiva de numerosas especies de peces. Por otro lado, su uso prolongado da lugar a la generación de organismos persistentes y por tanto a la necesidad de emplear pesticidas cada vez más agresivos.

Otro hecho que no se puede subestimar es que la mayoría de los pesticidas presenta quiralidad. En efecto, como ya se ha comentado, aproximadamente el 25% de los pesticidas que se emplean a nivel mundial son quirales, existiendo así distintos enantiómeros de un mismo producto [26]. Es conocido que los enantiómeros de un compuesto quiral se comportan de forma idéntica en un entorno no quiral, sin embargo en el medioambiente y en los seres vivos se dan procesos biológicos enantioselectivos que no afectan de la misma forma a los distintos enantiómeros de un compuesto. De este modo, los procesos de degradación y metabolización, así como los efectos tóxicos de los mismos son diversos para cada uno de los enantiómeros. Por todo ello, la quiralidad tiene una fuerte repercusión en todos los efectos indeseados que se han mencionado anteriormente y gran interés en diferentes campos científicos y sociales como son el agroquímico y el medioambiental. Este es el caso de los herbicidas fenoxiácidos, los insecticidas piretroides y organofosforados o los fungicidas triazol para los cuales la quiralidad juega un papel fundamental en su actividad pesticida y/o su toxicidad [95]. En efecto, en la mayoría de los casos solamente uno de los enantiómeros es activo como pesticida mientras que los demás enantiómeros son inactivos o incluso tóxicos para los organismos no-diana. A modo de ejemplo se puede mencionar el caso de los herbicidas fenoxiácidos para los cuales toda la actividad pesticida reside en el enantiómero *R* [96] o el de muchos fungicidas tipo amida en los que la actividad biológica de cada uno de los enantiómeros puede ser distinta siendo uno de ellos el que posee mayor actividad fungicida y el otro posee propiedades reguladoras del crecimiento [97]. Así, el empleo de la mezcla racémica en lugar del enantiómero activo puro, supone la emisión al medioambiente de una mayor cantidad de producto para obtener el mismo resultado o

incluso para producir aún más efectos indeseados. En este contexto, cuando se emplea una mezcla racémica se puede llegar a emitir al medioambiente entre un 50 y 75% de producto innecesario [98]. Por otra parte, la persistencia de los distintos enantiómeros suele ser diferente y aquellos más persistentes aumentan el grado de contaminación medioambiental. Otro factor a tener en cuenta es que por norma general cuando se emplea un pesticida racémico se suele observar una degradación enantioselectiva que deriva en el enriquecimiento de uno de los enantiómeros o incluso, en la enantiomerización del pesticida para dar lugar a un isómero con una mayor toxicidad que el compuesto de partida [95].

A pesar de todo lo expuesto, muchos pesticidas se emplean comercialmente como racematos, principalmente por la dificultad que conlleva realizar una síntesis enantioselectiva para poder comercializarlos como productos enantioméricamente puros. De hecho, sólo una pequeña proporción de todos los pesticidas empleados en el mundo son formulados como productos enantioméricamente puros o enantioméricamente enriquecidos.

Cabe destacar, que todo lo concerniente a la quiralidad de los pesticidas está cada día más regulado por las agencias estatales, como por ejemplo la USEPA (*Environmental Protection Agency of United States*) que exige información sobre la composición enantiomérica de los nuevos productos antes de su registro como sustancia activa pesticida [28, 29].

I.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES QUÍMICOS

Tal y como se ha expuesto hasta el momento, existen en la actualidad multitud de compuestos considerados contaminantes químicos. A la necesidad de identificar estos nuevos contaminantes y de estudiar sus efectos toxicológicos, se une la de desarrollar nuevas metodologías analíticas que sirvan como herramienta para su determinación y cuantificación en los diferentes tipos de muestras medioambientales, alimentarias,

biológicas, etc. Dentro de las técnicas analíticas empleadas hoy en día para la determinación de contaminantes químicos, las técnicas cromatográficas son las que gozan de una mayor popularidad: la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). Dado su enorme potencial en el campo de las separaciones quirales, así como, su eficacia, versatilidad y bajo consumo de reactivos y muestras, la electroforesis capilar (CE) se ha convertido asimismo en una herramienta muy valiosa para llevar a cabo el análisis de diversas muestras de interés en el campo del medioambiente. Además, todas estas técnicas separativas pueden emplearse en combinación con una gran variedad de tipos de detección, siendo los utilizados en este trabajo de investigación el detector de captura electrónica (ECD) para GC, el detector ultravioleta-visible (UV-Vis) para CE y el detector UV-Vis o la espectrometría de masas (MS) para HPLC. Precisamente, este último sistema de detección se ha convertido en los últimos años en el sistema de detección por excelencia ya que permite la identificación inequívoca de los compuestos, así como, la elucidación de la estructura molecular de los mismos. Además, su elevada sensibilidad permite la detección de contaminantes químicos a niveles de concentración extremadamente bajos por lo que se trata de una valiosa herramienta en el campo del análisis de contaminantes ambientales.

A continuación, se realizará una breve descripción de los aspectos más importantes de cada una de las técnicas de separación y sistemas de detección utilizados en este trabajo y que presentan un mayor interés en el contexto de la investigación realizada.

I.4.1 Cromatografía de gases

La GC es una técnica de separación que se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte. La muestra se volatiliza, se inyecta en una columna cromatográfica que contiene la fase estacionaria y los analitos se eluyen por el flujo de la fase móvil que es un gas inerte que no interacciona con los mismos y que los arrastra hacia el detector,

separándose entre sí en base a las distintas afinidades de los mismos hacia la fase estacionaria [99].

1.4.1.1 La cromatografía de gases multidimensional

A pesar de las conocidas elevadas eficacias que se obtienen por GC para la separación de analitos volátiles, a menudo esta técnica no es capaz de resolver muestras complejas formadas por mezclas de compuestos con una gran similitud química. En estos casos la alternativa es el empleo de la cromatografía de gases multidimensional. Este término se utiliza para hacer referencia a una separación en la que se aplican dos mecanismos de separación ortogonales para aumentar la selectividad y en la que se combinan varias etapas de separación. En este caso, se emplean dos o más columnas acopladas para conseguir separaciones no alcanzables con solo una de ellas [100].

Dependiendo del modo de transferir los analitos de la primera a la segunda columna de separación se puede distinguir entre GC en dos dimensiones (GC x GC) y GC multidimensional en su modo *heart-cut* (*heart-cut* MDGC). La **Figura I.10** muestra la comparación entre la forma de trabajo en las dos modalidades. La diferencia entre estos dos modos de operación reside en la fracción de muestra que se transfiere a la segunda columna. Así, mientras que en GC x GC se transfiere la totalidad de la muestra, en el modo *heart-cut* MDGC se transfiere solamente una pequeña fracción de la misma a la segunda dimensión. En GC x GC la muestra se somete a una primera separación cromatográfica y se transfiere en su totalidad a una segunda columna cromatográfica donde se lleva a cabo una segunda separación de todos los analitos. En el modo *heart-cut* MDGC la muestra se somete a una primera separación cromatográfica y solamente son transferidas a la segunda columna algunas fracciones, por lo general, aquellas donde se encuentran los analitos de interés o bien donde los analitos están peor resueltos.

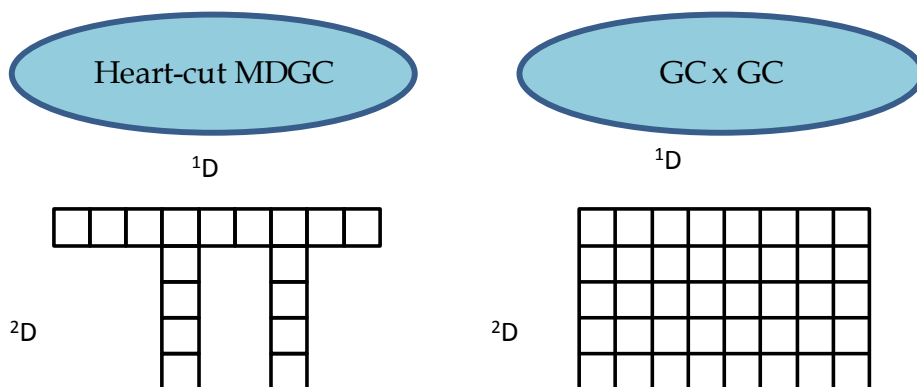


Figura I.10. Comparación entre las separaciones en dos dimensiones por *heart-cut* MDGC y por GC x GC.

Las columnas cromatográficas empleadas en una y otra modalidad también son diferentes. En GC x GC las columnas que se utilizan en la segunda dimensión en general son más cortas (1 ó 2 m) que las empleadas en el modo *heart-cut* MDGC, con el fin de llevar a cabo separaciones muy rápidas en esta segunda columna. De este modo, los tiempos de análisis que se obtienen en GC x GC son muy similares a los obtenidos en una separación unidimensional, pero con la ventaja añadida de que tanto la resolución obtenida como la capacidad de pico es significativamente mayor.

En este trabajo de investigación, el modo de operación de GC multidimensional que se ha utilizado ha sido *heart-cut* MDGC. Este modo ha sido empleado desde mediados de los años 50 y consiste, como se ha comentado, en transferir una o más fracciones no resueltas en la primera columna de separación a una segunda columna normalmente de polaridad diferente. El esquema básico de un sistema *heart-cut* MDGC se muestra en la **Figura I.11**. El sistema consta de dos columnas termostatizadas, dos detectores, un sistema de transferencia de la primera dimensión a la segunda y un capilar hueco que se utiliza para compensar presiones entre las dos dimensiones. Existen sistemas más sencillos que

disponen de un único horno, sin embargo, en estos casos se presenta el inconveniente de producir una gran pérdida en la capacidad de pico debido a que el programa de temperatura empleado en ambas columnas es el mismo. Para la transferencia de los analitos de la primera columna a la segunda, el sistema más empleado se conoce con el nombre de DEANS. Este sistema consiste en una válvula en forma de "T" que funciona por cambios de presión [101] y que dirige el flujo hacia la segunda dimensión o hacia el detector de la primera dimensión y además es el que hay que controlar a la perfección para hacer las transferencias de una a otra dimensión de forma adecuada. Por tanto, el primer paso a la hora de trabajar en *heart-cut* MDGC es el ajuste del dispositivo DEANS. La presión que se debe aplicar en el sistema DEANS depende básicamente de tres parámetros: 1) la presión en cabeza de columna, 2) las dimensiones de las dos columnas y 3) las dimensiones del capilar hueco, y por ello la presión aplicada se debe optimizar siempre que se cambie alguno de los parámetros indicados.

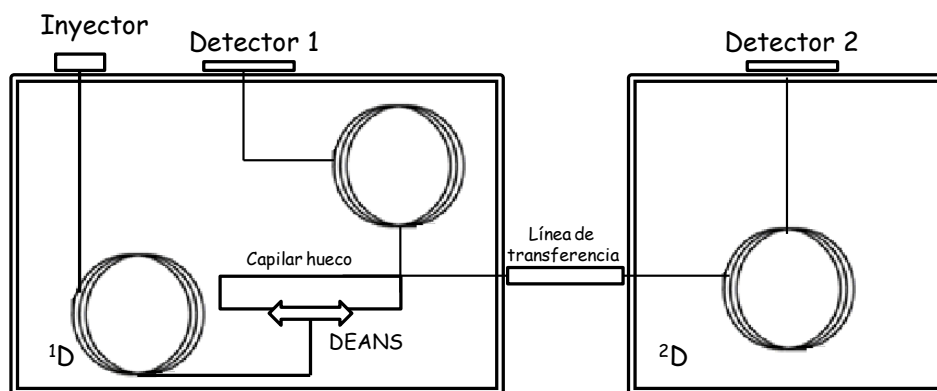


Figura I.11. Esquema de los componentes básicos de un sistema *heart-cut* MDGC.

Decir que en general, en el modo de trabajo *heart-cut* MDGC, la primera columna suele tener carácter apolar y longitudes superiores a las empleadas en la segunda columna, que suele poseer un carácter más polar que la primera. Además, la segunda columna puede

ser también una columna quiral, de modo que en la primera columna se separan todos los analitos entre sí y a la segunda columna se transfieren solamente aquellos que se quieren separar enantioméricamente.

Con respecto a los sistemas de detección en esta modalidad de trabajo, se pueden emplear todos los detectores clásicamente utilizados en GC convencional, como son la espectrometría de masas (MS), el detector de ionización de llama (FID), la resonancia magnética nuclear (NMR), la espectrometría de infrarrojos (IR) o el detector de captura electrónica (ECD). Es este último sistema de detección el que se describirá a continuación brevemente por ser el que se ha empleado en este trabajo de investigación.

1.4.1.2 El detector de captura electrónica

En la modalidad de GC multidimensional empleada en este trabajo (*heart-cut* MDGC) se han utilizado dos detectores ECD con el fin de detectar los analitos que eluyen de las dos columnas. La **Figura I.12** muestra el esquema básico de un detector ECD. En este caso el efluente que sale de la columna pasa por un emisor β , como níquel-63 o tritio (adsorbido sobre una lámina de platino o de titanio). Un electrón del emisor provoca la ionización del gas portador y la producción de una ráfaga de electrones. De este proceso de ionización y en ausencia de especies orgánicas, se produce una corriente constante entre el par de electrodos, mientras que en presencia de moléculas orgánicas la corriente disminuye ya que van a tender a capturar dichos electrones. [102].

El detector de captura de electrones es de respuesta selectiva, siendo muy sensible a las moléculas que contienen grupos funcionales electronegativos tales como halógenos, peróxidos, quinonas, y grupos nitro; en cambio, no es sensible a grupos funcionales como aminas, alcoholes o a los hidrocarburos. Por este motivo, es un detector muy adecuado para la detección de PCBs y sus metabolitos metilsulfonados que poseen grupos cloro en su estructura.

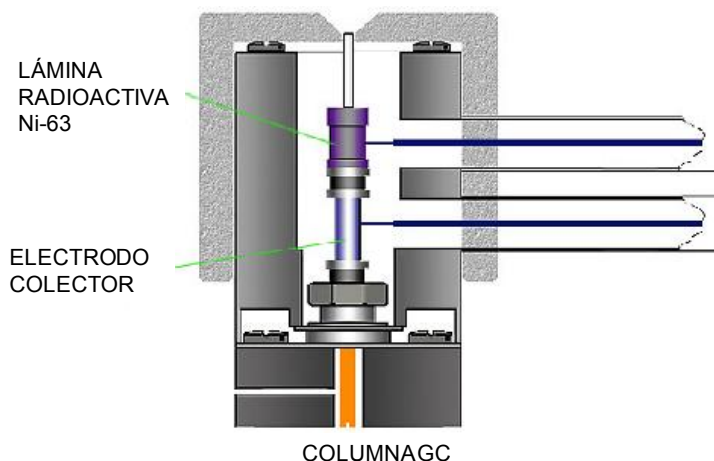


Figura I.12. Esquema básico de un detector ECD.

Los detectores de captura de electrones son altamente sensibles y tienen la ventaja de no alterar la muestra de manera significativa (a diferencia del detector de llama). Por otra parte, su intervalo lineal de respuesta normalmente se limita a unos dos órdenes de magnitud.

I.4.2 Cromatografía de líquidos de alta eficacia

La HPLC es probablemente la técnica de separación más empleada tanto en los laboratorios analíticos de investigación como en los de rutina. Se utiliza para la separación y determinación de un gran número de compuestos y en muy diferentes áreas de la ciencia como son el campo farmacéutico, medioambiental, alimentario, biotecnológico, proteómica, etc.

El principio de separación en HPLC es la diferente afinidad de un compuesto hacia dos fases, una móvil y otra estacionaria que se encuentra en el interior de una columna de separación. Los compuestos se desplazan a través de la columna cromatográfica y son arrastrados hacia el detector por una fase móvil. De este modo, cada compuesto

experimenta un reparto entre la fase estacionaria y la fase móvil dando lugar a su separación en su camino hasta el detector. Dependiendo del fenómeno de interacción que tenga lugar con la fase estacionaria, es posible diferenciar diversos tipos de cromatografía de líquidos: de reparto, de intercambio iónico, de adsorción, de exclusión molecular, de afinidad o quiral [103].

Entre los principales inconvenientes de la cromatografía de líquidos convencional, a pesar de su elevada popularidad, se encuentran el elevado consumo de disolventes y muestra necesarios para llevar a cabo la separación cromatográfica y la baja sensibilidad obtenida con algunos sistemas de detección debido a la dilución de la muestra en la fase móvil. Estos inconvenientes pueden ser en gran medida resueltos mediante la disminución del tamaño de la columna cromatográfica empleada, lo que ha dado lugar a la aparición de sistemas cromatográficos miniaturizados que emplean columnas cromatográficas de reducido diámetro interno. Dentro de los sistemas cromatográficos miniaturizados destacan la micro cromatografía líquida (micro-LC) y la nano cromatografía líquida (nano-LC) que utilizan columnas cromatográficas con un reducido diámetro interno entre 0.5-2 mm y 0.05-0.1 mm, respectivamente.

Entre las ventajas que ofrece la miniaturización de los sistemas de HPLC podemos destacar:

- Menor consumo de muestra, fase móvil y fase estacionaria: necesitan menor cantidad de fase estacionaria para su fabricación, un menor consumo de fase móvil y requieren menores volúmenes de muestra para el análisis.
- Mayor capacidad de termostatación: permiten una mejor termostatación de la columna debido a su reducido diámetro, manteniendo constante una determinada temperatura en toda la columna.
- Aumento de la sensibilidad: los menores volúmenes de fase móvil empleados hacen que la dilución de la muestra durante el análisis sea mucho menor y de

esta forma la muestra llega más concentrada al detector y aumenta la sensibilidad.

- Aumento de la eficacia: ofrecen la posibilidad de alcanzar un mayor número de platos teóricos ya que presentan una mayor permeabilidad y por lo tanto facilitan que la longitud de la columna sea mayor y que el tamaño de partícula empleado sea menor.
- Mayor respuesta en MS: los menores flujos de fase móvil empleados benefician el acoplamiento con estos sistemas de detección

Con respecto a los sistemas de detección y dependiendo de las propiedades de los analitos o de la fase móvil utilizada se pueden emplear el detector de absorción UV-Vis, de fluorescencia, electroquímico, de conductividad, de radioactividad, de quimioluminiscencia, de dispersión de luz, de índice de refracción, de infrarrojo, de resonancia magnética nuclear y MS. Es este último sistema de detección el que se describirá a continuación brevemente por ser el que se ha utilizado acoplado a HPLC en este trabajo de investigación.

1.4.2.1 Acoplamiento de la HPLC a la espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica instrumental universal y específica, altamente sensible y que permite la identificación inequívoca de sustancias. Por lo tanto, su empleo como detector ofrece claras ventajas con respecto a los clásicos detectores de diodos en serie empleados en HPLC. En el caso de la determinación de contaminantes ambientales todas estas ventajas son realmente valiosas ya que estos compuestos suelen encontrarse en las muestras en concentraciones muy bajas. Además, esta técnica permite la determinación de la masa exacta de los analitos, lo que unido a la información estructural que proporciona, permite a menudo la identificación inequívoca de los compuestos de interés.

De forma resumida la espectrometría de masas consiste en la separación de partículas moleculares o atómicas que han sido previamente ionizadas, según su relación masa/carga (m/z). El proceso que tiene lugar en un espectrómetro de masas comprende básicamente cuatro etapas:

- Ionización de la muestra
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico
- Dispersión de los iones según su relación m/z
- Detección de los iones y producción de una señal eléctrica

La **Figura I.13** muestra el esquema básico para el acoplamiento HPLC-MS. Los componentes básicos de un espectrómetro de masas son la fuente de ionización, el analizador y el detector. Existen multitud de fuentes de ionización disponibles actualmente siendo la ionización y desorción láser asistida por una matriz (MALDI) [104], la ionización química a presión atmosférica (APCI) [105], el plasma de acoplamiento inductivo (ICP) [106] o la ionización por electrospray (ESI) [107] de los más empleados. En lo que respecta a los analizadores de masas existe también una gran variedad de ellos, y en este caso son la trampa de iones (IT), el cuadrupolo (Q), el tiempo de vuelo (TOF), la transformada de Fourier (FT) y el Orbitrap los más comúnmente empleados en el análisis de contaminantes ambientales [108-110]. También se ha descrito el empleo de analizadores de masas en tándem, es decir, combinar varios analizadores bien del mismo o de distinto tipo en el campo del análisis medioambiental [111].

En el acoplamiento HPLC-MS se produce en primer lugar la separación de los analitos en el sistema de HPLC y en segundo lugar su detección en el espectrómetro de masas. Cuando los analitos llegan a la fuente de ionización se producen los iones gaseosos que a continuación son separados en el analizador según su relación m/z y finalmente son detectados [99].

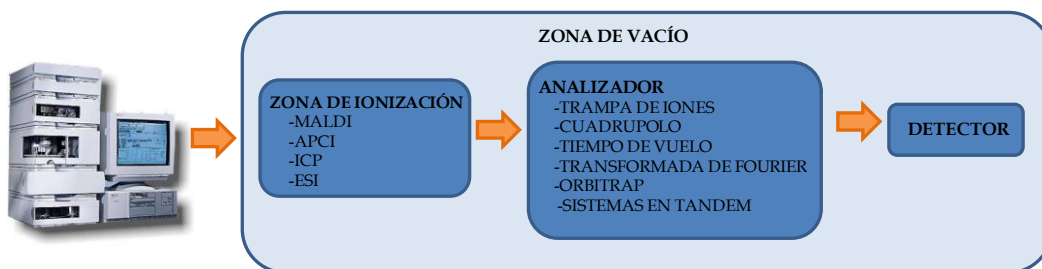


Figura I.13. Esquema básico para el acoplamiento HPLC-MS.

En este trabajo de investigación se ha empleado ESI como fuente de ionización y un analizador de cuadrupolo por lo que a continuación se describirán éstos brevemente.

➤ *Fuentes de ionización. Ionización por electrospray*

A pesar de las numerosas fuentes de ionización disponibles en la actualidad, la ionización por ESI es la más empleada debido al amplio espectro de moléculas que es capaz de ionizar.

La **Figura I.14** muestra de forma esquemática el proceso de ionización ESI. Se basa en la formación de una nube de finas gotas cargadas. En este caso, la disolución que proviene del HPLC pasa a través de un capilar al que se le está aplicando un potencial comprendido entre 3 y 7 kV aproximadamente. En este punto se forman gotas de elevada carga que pasan a través de un gradiente de potencial y presión hasta el analizador. En este proceso, las gotas van reduciendo su tamaño mediante la evaporación del disolvente hasta llegar a un punto en el que la densidad de carga de cada gota es tan elevada que se produce lo que se conoce como “Explosión de Coulomb” y se forma una nube de finas gotas o nebulizado. La “Explosión de Coulomb” se produce en el punto conocido como “Límite de Rayleigh” y que se refiere al punto en el que la magnitud de carga de cada gota es suficiente para romper la tensión superficial. La evaporación del disolvente se facilita mediante un gas nebulizador (N_2) que hace que las gotas vayan disminuyendo su tamaño

hasta que sean tan pequeñas que las fuerzas de repulsión entre las cargas en el interior de cada una de ellas sean tan fuertes que éstas se rompan y se formen diminutas gotas. Estas gotas diminutas son las que a continuación pasarán a estado gaseoso, fenómeno que se conoce como evaporación iónica. Finalmente, estas moléculas en estado gaseoso pasarán al analizador de masas.

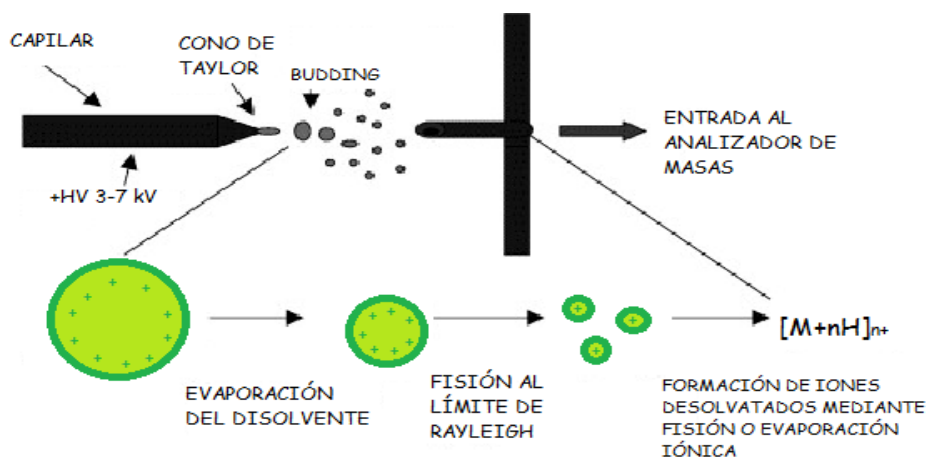


Figura I.14. Proceso de ionización por ESI.

Al tratarse de una fuente de ionización blanda, los iones gaseosos que se forman son generalmente iones moleculares que están protonados o desprotonados dependiendo de si se ioniza en modo positivo o negativo y se les denomina “iones cuasimoleculares” pudiendo tener una o más cargas [112].

La ionización ESI es un tipo de ionización en fase líquida, es decir, la ionización se lleva a cabo en la propia disolución y una vez ionizada la muestra se pasa a fase gaseosa. Esta es precisamente una de las principales ventajas que presenta este modo de ionización ya que la mayoría de los analitos son poco volátiles o térmicamente inestables y no

pueden ser volatilizados fácilmente, sin embargo, si estos compuestos son ionizados previamente, como ocurre en ESI, su volatilización resulta mucho más sencilla [113].

➤ *Analizadores de masas. El cuadrupolo*

Una vez ionizados los compuestos, éstos pasan al analizador de masas, donde se lleva a cabo la separación de los iones formados en base a su relación m/z .

El cuadrupolo es el analizador más sencillo y económico, además de compacto y robusto. La **Figura I.15** muestra un diagrama simplificado de un cuadrupolo. Consiste en un conjunto de cuatro barras cilíndricas de metal que sirven de electrodos de filtro de masas. A estas barras se les aplica una corriente continua, y además se aplica a cada par de barras, potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia. De este modo, cuando un ion que proviene de la fuente de ionización llega al cuadrupolo, solamente pasará a través de las barras y llegará al detector si tiene una trayectoria estable entre los dos planos formados por cada par de electrodos. Ajustando los potenciales de corriente continua y corriente alterna se selecciona el rango de m/z que se transmite a través del mismo.

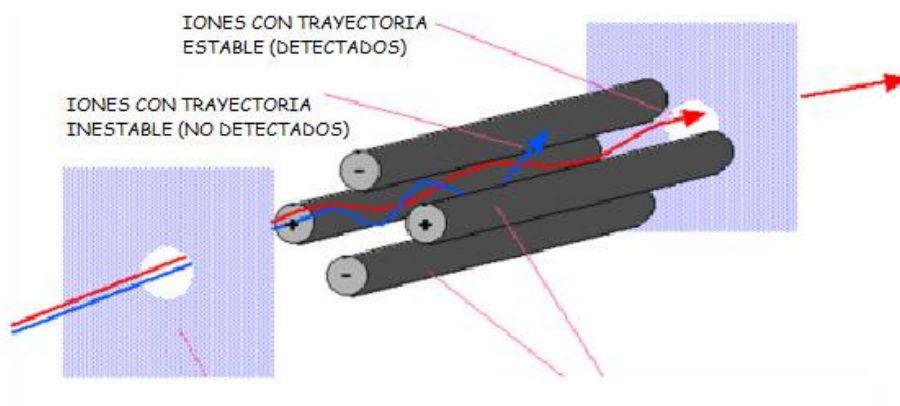


Figura I.15. Esquema de un cuadrupolo.

Un cuadrupolo solo es capaz de distinguir iones que difieren en 1 unidad de masa, por lo que su sensibilidad a la hora de obtener un espectro es bastante reducida, sin embargo, es muy sensible cuando su objetivo es monitorizar un único ion o un número limitado de ellos. En este sentido, el empleo de sistemas en tándem puede solucionar en gran medida el problema de la sensibilidad. En este trabajo de investigación se ha empleado la espectrometría de masas en tándem utilizando dos cuadrupolos en serie por lo que a continuación se explicará este sistema con más detalle.

➤ *Espectrometría de masas en tándem*

Los sistemas de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) consisten en una configuración donde se combina más de un analizador de masas, bien del mismo o de distinto tipo. De este modo se pueden llevar a cabo experimentos MS/MS, es decir, en un primer analizador se aísla un ion determinado al que se conoce como “ion precursor” o “ion padre” y se dejan sin detectar todos los demás iones. A continuación, el ion precursor pasa a una celda de colisión que contiene moléculas de un gas inerte (He, N₂ o Ar), donde se fracciona y se forman los conocidos como “iones producto” o “iones hijo”. Estos iones producto se separan en el segundo analizador y a continuación se detectan, generando un espectro MS². Este tipo de experimentos mejora la sensibilidad y además son muy útiles a la hora de determinar la estructura de un compuesto desconocido. Por otro lado, ofrecen una gran selectividad ya que permiten aislar un solo ion o un solo fragmento eliminando todos los demás interferentes.

En el caso de este trabajo de investigación se ha empleado un sistema en tándem denominado triple cuadrupolo (QqQ) que presenta las cualidades inherentes de un Q, como son su fácil manejo y control, sus reducidas dimensiones y su bajo coste. La **Figura I.16** muestra el esquema general de un sistema QqQ. Consta de dos cuadrupolos como analizadores y un tercer cuadrupolo en medio, como celda de colisión, donde se induce la fragmentación.

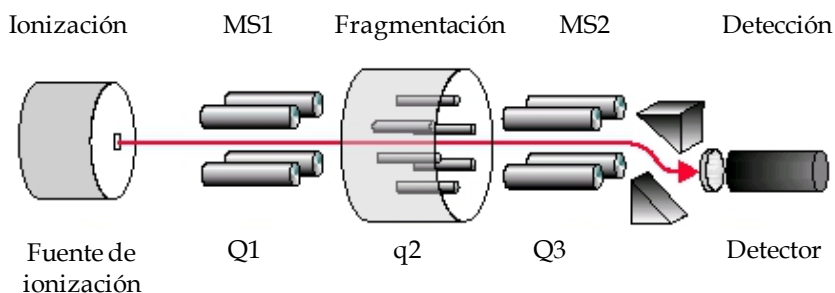


Figura I.16. Esquema del analizador triple cuadrupolo [114].

Si se emplea una fuente de ionización blanda, como es ESI, se obtiene en primer lugar iones moleculares o cuasimoleculares que pasan al primer cuadrupolo y allí se selecciona uno o más iones precursores. A continuación, los iones seleccionados pasan a la celda de colisión y allí se forman los correspondientes fragmentos. Estos fragmentos en su totalidad, o algunos de ellos, pasan finalmente al tercer cuadrupolo donde serán separados y finalmente detectados.

El proceso descrito ofrece una gran versatilidad de modos de adquisición. Todos estos modos se han agrupado en la **Figura I.17** y son los siguientes:

- Barrido de todos los iones en modo MS (*Full Scan*)
- Monitorización de un ion seleccionado en modo MS (*Single Ion Monitoring, SIM*)
- Monitorización de una reacción selectiva (*Selected Reaction Monitoring, SRM*) o de múltiples reacciones en modo MS/MS (*Multiple Reaction Monitoring, MRM*)
- Barrido de iones producto en modo MS/MS (*Product Ion Scan, PIS*)
- Barrido de iones precursor en modo MS/MS (*Precursor Ion Scan*)
- Barrido de pérdidas neutras en modo MS/MS (*Neutral Loss Scan*)

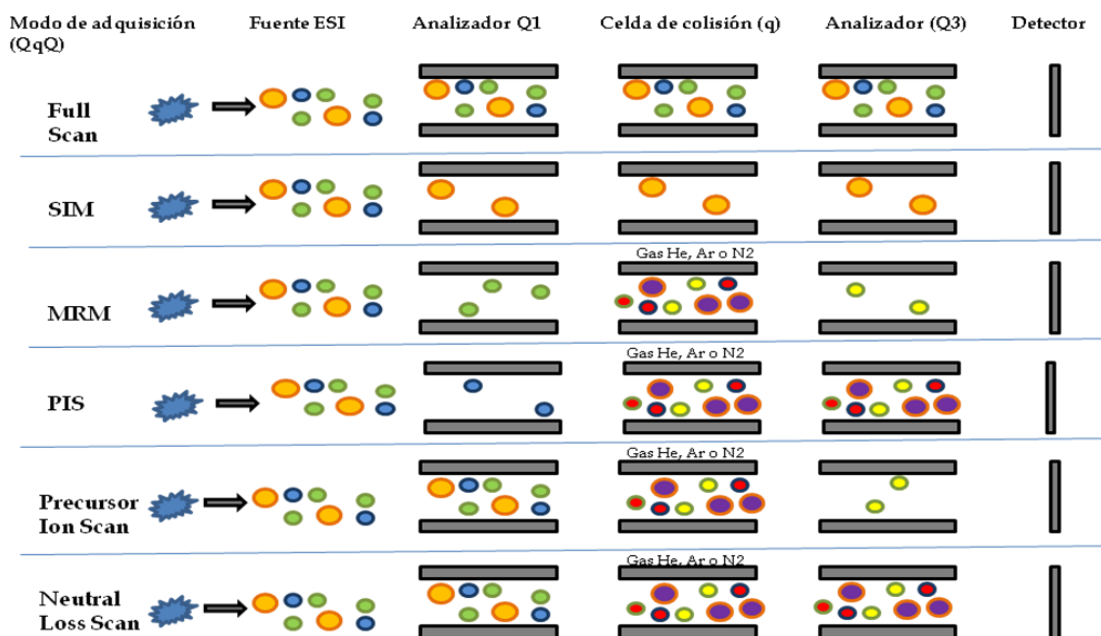


Figura I.17. Modos de adquisición en un QqQ.

Cada uno de estos modos de adquisición presenta unas características que lo hacen idóneo para un objetivo concreto. Ahora bien, de todos ellos la adquisición MRM es la más empleada en los análisis cuantitativos, permite determinar un gran número de compuestos simultáneamente minimizando la presencia de interferentes y es la empleada en este trabajo. En el modo de adquisición MRM, se selecciona en el primer analizador un ion determinado, a continuación se fragmenta en diversos iones hijo de los cuales solamente uno o unos pocos serán analizados en el tercer cuadrupolo y finalmente detectados. Si se analizan simultáneamente varios compuestos, éste es el modo de adquisición más selectivo y sensible ya que minimiza al máximo la presencia de otros interferentes.

I.4.3 Electroforesis capilar

La CE es una técnica de separación basada en la diferente velocidad de migración de las sustancias a analizar en el interior de un tubo capilar bajo la acción de un campo eléctrico. La separación se fundamenta en dos fenómenos físico-químicos: la electroforesis y la electroósmosis.

La electroforesis es la responsable de la diferente migración de los iones de la muestra en el seno de una disolución conductora cuando se les somete a la acción de un campo eléctrico determinado. Esta migración, denominada “movilidad electroforética”, discrimina entre las diferentes sustancias en función de la relación carga/tamaño de las mismas y hace que las sustancias cargadas tiendan a moverse hacia el polo de signo contrario al de su carga, con mayor velocidad cuanto más carga efectiva tengan y menor tamaño posean. El otro fenómeno que interviene en la separación en CE, el cual es independiente de las especies analizadas es la “electroósmosis”. Este fenómeno tiene lugar en el interior de los capilares de sílice y se origina como consecuencia de la ionización de los grupos silanoles de la sílice (Si-OH) por encima de pH 2, formándose grupos Si-O⁻ con cargas negativas. Este exceso de cargas negativas en la pared del capilar se neutraliza parcialmente con los iones positivos de la disolución electrolítica (BGE), que se organizan en el interior del capilar formando una doble capa (capa Stern, fija, y capa difusa, móvil). Como consecuencia de ello, al aplicar el campo eléctrico, esta organización de cargas positivas hace que el conjunto de la disolución electrolítica se desplace hacia el polo negativo (cátodo) arrastrando las moléculas y especies que estén en su interior, generando el denominado “flujo electroosmótico” (EOF). Por tanto, la movilidad de un determinado analito se deberá a la resultante de la movilidad electroforética y del EOF, cada uno de ellos con su signo (ver **Figura I.18**).

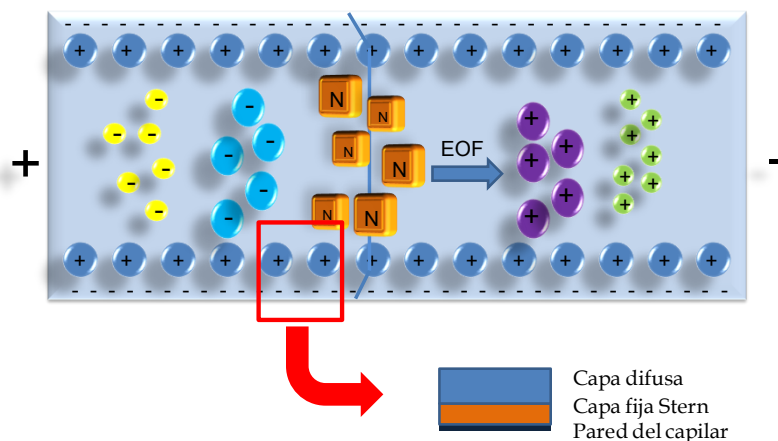


Figura I.18. Representación de la movilidad electroforética y electroosmótica en la separación de analitos aniónicos, catiónicos y neutros.

La instrumentación básica empleada en CE consta de una fuente de alto voltaje que aplica una diferencia de potencial entre dos electrodos de platino, un amperímetro, un capilar, recipientes para el medio de separación (tampón) y la muestra y un detector. Los sistemas comerciales incorporan además un sistema para el control de temperatura en muestras y capilar, un muestreador automático que permite la automatización de los análisis, así como, el software necesario para el tratamiento de datos.

Los capilares, en cuyo interior se lleva a cabo la separación, son normalmente de sílice fundida y están recubiertos de poliimida para aportar flexibilidad y resistencia al capilar. El diámetro interno de capilar se encuentra entre 25 y 100 μm y con una longitud a partir de los 25 cm. Para llevar a cabo el análisis, el capilar se llena con un BGE, que consta al menos de un tampón que constituye el medio conductor de la corriente eléctrica y al cual se pueden añadir otro tipo de sustancias dependiendo del modo de separación en el que se trabaje. A continuación, se inyecta una pequeña cantidad de muestra, empleando una de las formas de inyección (hidrodinámica o electrocinética), simplemente cambiando uno de los viales de BGE por el vial que contiene la muestra. Una vez inyectada la muestra, los

dos extremos del capilar se sumergen en la disolución de BGE contenida en dos recipientes, en los cuales además están sumergidos los electrodos entre los que se aplica la diferencia de potencial mediante la fuente de alto voltaje.

Una vez que se lleva a cabo la separación, los analitos se detectan en continuo directamente en el capilar (detección *on column*) o al final del mismo (detección *end column*). La detección *on column* se emplea para los detectores UV-Vis, fluorescencia y resonancia magnética nuclear, mientras que la detección *end column* se utiliza con detectores de MS, electroquímicos y Raman. Los detectores UV-Vis son los que más se utilizan por su simplicidad, versatilidad, bajo coste relativo y características no destructivas. Además, el empleo de detectores de diodos en serie permite obtener información adicional como son la pureza de pico e información estructural [20].

1.4.3.1 Modos de separación en electroforesis capilar

Una de las características más importantes de la electroforesis capilar es su aplicación a la separación de una gran variedad de compuestos y a la resolución de diversos problemas analíticos y esto se debe en gran medida a los diversos modos de separación que la técnica ofrece.

Los distintos modos de separación empleados en CE se pueden clasificar en dos grandes grupos: modos que se basan únicamente en principios de separación electroforéticos, en el que se incluyen la electroforesis capilar de zona (CZE), la electroforesis capilar en gel (CGE), el isoelectroenfoque capilar (CIEF), la isotacoforesis capilar (CITP) y la electroforesis capilar en medio no acuoso (NACE), y modos que combinan principios de separación electroforéticos y cromatográficos, en el que se incluyen la cromatografía electrocinética (EKC) y la electrocromatografía capilar (CEC). La **Tabla I.6** agrupa los distintos modos de separación en CE así como el principio de separación específico de cada uno de ellos.

Tabla I.6. Modos de separación en CE.

Modo de CE	Mecanismo de separación
Electroforesis capilar de zona (CZE)	Movilidad electroforética
Electroforesis capilar en gel (CGE)	Tamaño y carga
Isoelectroenfoque capilar (CIEF)	Punto isoeléctrico
Isotacoforesis capilar (CITP)	Movilidad electroforética entre zonas
Electroforesis capilar en medio no acuoso (NACE)	Movilidad electroforética en medios no-acuosos
Cromatografía electrocinética (EKC)	Reparto en una pseudofase
Electrocromatografía capilar (CEC)	Reparto en una fase estacionaria

A continuación se explicará brevemente cada uno de los modos de separación, aunque EKC y CEC se explicarán más detalladamente por ser los dos modos empleados en este trabajo de investigación.

➤ *Electroforesis capilar de zona (CZE)*

Es el modo de separación más empleado debido a su versatilidad, sencillez y poder de separación. Sin embargo, en principio tiene la limitación de ser útil sólo para especies cargadas, no permitiendo separar especies neutras [115]. En CZE el capilar contiene sólo un medio tamponado, de manera que la movilidad electroforética de los analitos depende fundamentalmente de la relación carga/masa. En estas condiciones, la separación de los distintos analitos se basa en las diferencias existentes en las velocidades electroforéticas de éstos y es posible separar simultáneamente cationes y aniones, siempre que el EOF sea suficientemente elevado para arrastrar ambos tipos de sustancias hacia el detector.

➤ *Electroforesis capilar en gel (CGE)*

La electroforesis capilar en gel combina la buena resolución de la electroforesis en gel tradicional con la sencilla instrumentación empleada en CZE.

En CGE el capilar de separación se rellena con un gel con un tamaño de poro conocido que actúa como un tamiz molecular. El principio de separación se basa en las diferentes movilidades de los componentes de la muestra a través de los poros del gel en función de su tamaño molecular [116], de manera que los analitos de menor tamaño atravesarán más fácilmente el gel y presentarán tiempos de migración más pequeños y los analitos con un mayor tamaño atravesarán el gel más lentamente llegando al detector en último lugar.

Este modo de separación se aplica principalmente a sustancias que poseen una relación carga/masa similar pero diferentes masas moleculares, como biopolímeros (DNA), proteínas (complejos SDS-proteína) y carbohidratos.

➤ *Isoelectroenfoque capilar (CIEF)*

Se diferencia de los demás modos de CE en que la separación no se basa en las diferencias de movilidades electroforéticas, sino en las diferencias en los puntos isoeléctricos (pI) de los solutos. Se utiliza para la separación de péptidos, proteínas, aminoácidos y otras sustancias de carácter anfótero.

La separación por CIEF se basa en la migración electroforética de sustancias anfóteras en un gradiente de pH que se obtiene mediante una disolución de anfólitos (sustancias de carácter zwitteriónico de diferentes valores de pK_a). Al aplicar el campo eléctrico, se establece un gradiente de pH en el interior del capilar que va desde el ánodo con un pH bajo, hasta el cátodo con un pH alto y los distintos componentes de la muestra se desplazan hasta encontrar un pH igual a su pI, punto en el cual al tener carga nula dejan de moverse y a éste fenómeno se le denomina enfoque. Los analitos de la muestra una vez enfocados ocupan zonas del capilar muy estrechas lo que confiere al procedimiento una

gran eficacia al oponerse el enfoque a la difusión molecular de las zonas. Una vez separados hay que moverlos, para lo cual se pueden emplear diferentes procedimientos y llevarlos al detector, donde son detectados y cuantificados.

Se puede realizar de dos formas dependiendo del capilar empleado. Si se elimina totalmente el EOF, el proceso requiere un protocolo en dos pasos, un paso de enfoque seguido de una movilización que se lleva a cabo cuando el enfoque ha finalizado para forzar a las bandas enfocadas y quietas a pasar por el detector. Si se emplea un capilar con un recubrimiento dinámico que permite eliminar parcialmente el EOF, la focalización tiene lugar mientras todo el gradiente de pH y el tren de bandas se está moviendo hasta el punto de detección, es decir, se realiza en un solo paso.

➤ *Isotacoforesis capilar (CITP)*

La CITP se lleva a cabo en un tampón discontinuo y sin EOF. Se basa en el empleo de dos electrolitos con distinta conductividad eléctrica, un electrolito frontal (con una movilidad electroforética mayor a la del analito más rápido de la muestra) y un electrolito terminal (con una movilidad electroforética menor a la del analito más lento de la muestra). La muestra se inyecta entre estos dos electrolitos en lo que se conoce como formato "sandwich". Al aplicar el campo eléctrico, se crea un gradiente de potencial a lo largo del capilar y los analitos se distribuyen en zonas o bandas contiguas en función de sus movilidades electroforéticas y se desplazan entre ambos tampones de diferente conductividad eléctrica a la misma velocidad [117]. Hoy en día la CITP se emplea más como técnica de preconcentración que como técnica de separación. En este modo de CE no se pueden separar de forma simultánea cationes y aniones.

➤ *Electroforesis capilar en medio no acuoso (NACE)*

En este modo de CE se emplean disolventes no acuosos como disoluciones electrolíticas. La separación en NACE se puede llevar a cabo solamente si los analitos

están cargados o pueden adquirir carga por interacción con un aditivo cargado. La elección del medio no acuoso depende de las características fisicoquímicas de las sustancias a separar y de su interacción con los posibles aditivos. Este modo de separación es especialmente útil para separar compuestos que presentan una baja solubilidad en agua o bien, grupos de analitos que poseen movilidades electroforéticas muy similares en medios acuosos.

➤ *Cromatografía electrocinética (EKC)*

La EKC constituye una modalidad de trabajo de la CE que fue definida por Terabe en 1989 como: *un método de separación analítico que emplea la técnica experimental de la CZE en combinación con los principios de separación básicos de la cromatografía* [118]. Así, en EKC además del tampón de separación empleado en CZE (fase acuosa), se añade un componente denominado “pseudofase” que origina la existencia de un fenómeno cromatográfico al existir dos fases, la fase acuosa y la pseudofase. El fenómeno electrocinético, que incluye tanto la electroforesis como la electroósmosis, provoca el transporte de la pseudofase y de los analitos dentro del capilar. En EKC los solutos pueden interaccionar en mayor o menor medida con la pseudofase, dando lugar a un fenómeno cromatográfico e incluso habrá solutos que no interaccionen con la misma, en cuyo caso su movilidad se deberá al fenómeno electrocinético.

Los modos de separación en EKC pueden clasificarse según la naturaleza de la pseudofase empleada y se nombran de manera general añadiendo el nombre de la pseudofase al término EKC. Entre las pseudofases más empleadas se encuentran las pseudofases micelares (MEKC) [119], las ciclodextrinas (CD-EKC) [120] y las microemulsiones (MEEKC) [121], aunque también se han empleado otras pseudofases como proteínas [122], polisacáridos [123], dendrimeros [124], antibióticos macrocíclicos [125], vesículas [5], iones poliméricos, etc. Además y para algunas separaciones especiales se pueden emplear mezclas de las mismas, como es por ejemplo el caso de la separación de compuestos de muy elevada hidrofobicidad, muy relacionados estructuralmente y/o

quirales donde es muy habitual emplear de manera conjunta CDs y micelas (CD-MEKC) [126].

Decir, que aunque inicialmente la EKC se desarrolló para ampliar el campo de aplicación de la CE a la separación de compuestos neutros, hoy en día también se emplea para la separación de compuestos cargados obteniéndose algunas separaciones que en ocasiones, no es posible conseguir utilizando CZE y para la separación de compuestos quirales, siempre que al menos una de las pseudofases empleadas sea quiral [127].

En este trabajo de investigación se han empleado los modos de separación de CD-EKC y CD-MEKC para la separación quiral y no quiral de los compuestos de interés por lo que estos dos modos se describen a continuación.

CD-EKC

Las CDs son los selectores quirales más habitualmente utilizadas en EKC. Hasta Enero de 2004 su uso suponía el 84% de todos los trabajos publicados referentes a separaciones quirales por esta técnica [20]. Son oligosacáridos cíclicos constituidos por varias unidades de *D*(+)-glucopiranosas. Tienen forma de cono anular truncado de extremos abiertos, con una cavidad interna relativamente hidrófoba, determinada por el número de unidades de glucopiranosas (**Figura I.19 a**) y un exterior o superficie hidrofílica (incluso iónica en el caso de algunos derivados de las CDs nativas) debido a la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 2, 3, y 6 del anillo de la glucopiranosas. Aunque hoy en día existen en el mercado una gran variedad de CDs aniónicas, neutras y catiónicas disponibles para su uso en CE, las tres CDs nativas neutras son la α , β y γ CDs que tienen 6, 7 y 8 unidades de glucopiranosas, respectivamente y que se caracterizan por tener la misma profundidad y diferente diámetro interno, siendo la β -CD la más empleada. El mecanismo más aceptado para la enantioseparación de un analito quiral con las CDs, se basa en la formación de complejos de inclusión en los que el analito quiral (molécula "guest") es incluido en el interior de la CD (molécula "host"), se establecen enlaces con los grupos hidroxilo

secundarios y se forma el denominado complejo de inclusión “host-guest”, el cual está representado en la **Figura I.19 b** [128]. Sin embargo, la formación de esos complejos de inclusión no es siempre un requisito para la enantioseparación, ya que una inclusión parcial o interacciones intermoleculares externas pueden ser suficientes para la resolución enantiomérica de un analito quiral [128].

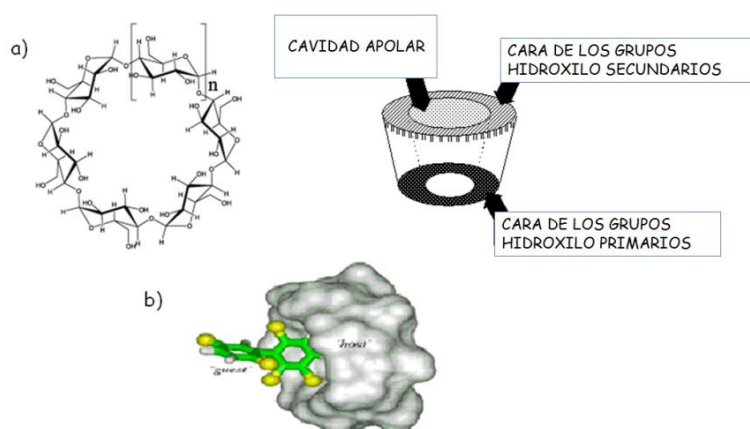


Figura I.19. a) Estructura general de una CD. b) Complejo de inclusión de la CD (“host”) y la molécula (“guest”).

La **Figura I.20.a** muestra a modo de ejemplo, el principio de separación en CD-EKC para un compuesto quiral neutro, en presencia de una CD aniónica empleando un voltaje de separación positivo. En esta situación, la CD aniónica migrará hacia el ánodo y se podrá detectar en el cátodo siempre que el EOF sea mayor que su movilidad electroforética en sentido contrario. Los solutos neutros que no interaccionen con la CD migrarán a la misma velocidad que el EOF y originarán un pico a un tiempo de migración t_0 . Los solutos que interaccionen parcialmente con la CD se desplazarán hacia el detector a una velocidad inferior a la del EOF, pero podrán ser detectados siempre y cuando la movilidad de la CD en sentido anódico sea inferior al EOF en sentido catódico.

Finalmente, los solutos que se incorporen totalmente a la CD migrarán en último lugar. De este modo, un analito quiral neutro, que tenga dos enantiómeros N_1 y N_2 , que interaccionen con las CDs de forma enantioselectiva, experimentará un reparto diferencial entre las fases acuosa y la CD y originará dos picos a distintos tiempos de migración, t_{N1} y t_{N2} , obteniéndose un electroforegrama similar al que se muestra en la **Figura I.20.b**. Indicar que este es un caso particular de separación en CD-EKC de manera que dependiendo de la naturaleza del analito quiral, de la CD y de las condiciones experimentales se podrían tener muy diferentes situaciones.

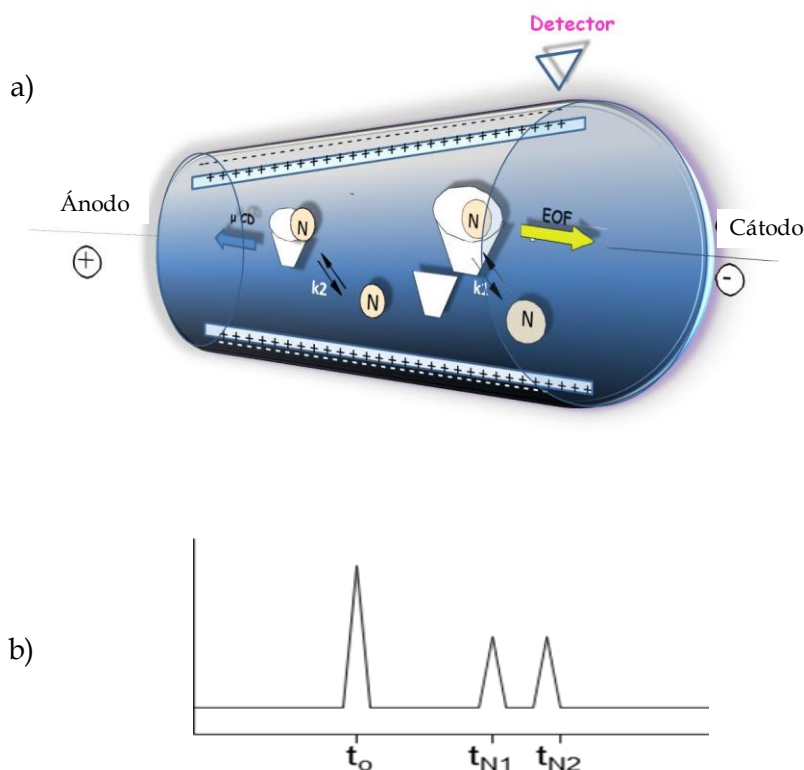


Figura I.20. a) Representación del principio de separación en el modo CD-EKC para un analito quiral neutro en presencia de una CD aniónica empleando un voltaje de separación positivo. b) Electroforegrama teórico que se obtendría para un analito quiral con un centro estereogénico en las condiciones citadas en a).

CD-MEKC

En el caso de la separación de compuestos quirales o no quirales muy hidrófobos, que tienden a incorporarse totalmente en la pseudofase, no existiendo selectividad de separación y/o relacionados estructuralmente, que interaccionan de forma similar con la pseudofase eluyendo a un mismo tiempo de migración, puede ser necesario añadir al tampón de separación una segunda pseudofase. El modo de trabajo de CE más empleado en estos casos es CD-MEKC que implica el empleo de CDs y micelas (quirales o no quirales).

Como ya se ha mencionado, las micelas son agregados que se forman por la adición de tensioactivos al tampón de separación cuando éstos se encuentran por encima de su CMC. Estas micelas en disolución acuosa adoptan una estructura esférica, con una parte externa hidrofílica y otra parte interna hidrofóbica (**Figura I.21**).

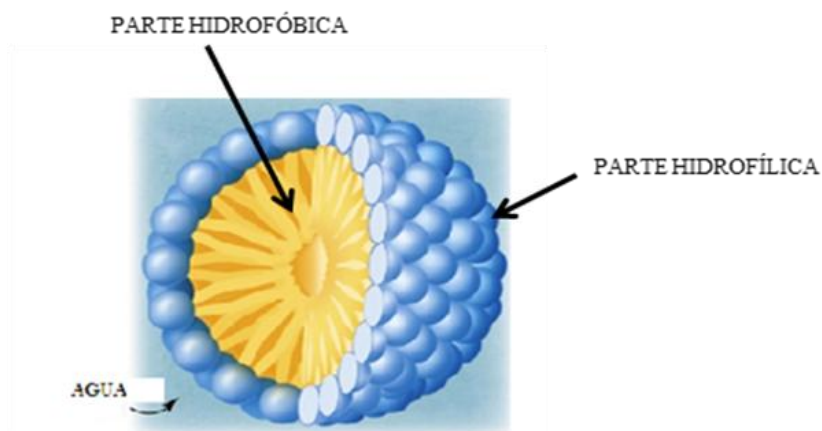


Figura I.21. Esquema de una micela.

Existen una gran variedad de tensioactivos que forman micelas en disolución acuosa y que pueden ser empleados en EKC, siendo el dodecil sulfato sódico (SDS) uno de los que goza de mayor popularidad, debido fundamentalmente a su elevado poder de solubilización. También se han empleado mucho las sales biliares, que son tensioactivos biológicos quirales que presentan la ventaja adicional de poder ser utilizadas como selectores quirales, bien solas o en combinación con CDs [129].

La **Figura I.22.a** muestra a modo de ejemplo, el principio de separación en CD-MEKC para un compuesto quiral neutro, en presencia de una micela quiral aniónica y una CD neutra. La CD neutra migra hacia el detector a la misma velocidad que el EOF. La micela aniónica migra hacia el ánodo y podrá ser detectada en el cátodo siempre que el EOF sea mayor que su movilidad electroforética en sentido contrario. Los solutos que no interaccionen ni con la micela, ni con la CD migrarán a la misma velocidad que el EOF y originarán un pico a un tiempo de migración t_0 . Los solutos que se incorporen totalmente al sistema micelar y que no interaccionen con las CDs darán lugar a un pico a un tiempo de migración t_m . Un soluto quiral neutro que tiene dos enantiómeros N_1 y N_2 , que interaccionen con la CD y/o con la micela quiral de forma enantioselectiva experimentarán un reparto diferencial entre las fases acuosa, micelar y las CDs, dando lugar a dos picos a distinto tiempo de migración (t_{N1} y t_{N2}) entre t_0 y t_m y obteniéndose un electroforegrama similar al que aparece en la **Figura I.22.b**. En el caso particular de que el compuesto no sea quiral, éste interaccionará con la CD y con la micela pero de forma no estereoselectiva y experimentará un reparto diferencial entre las tres fases, originando un único pico a un tiempo de migración determinado. La selectividad de separación en estos sistemas se modificará cambiando el tipo y concentración de CD y/o tensioactivo. Hay que indicar que este es un caso particular de separación en CD-MEKC, de manera que dependiendo de la naturaleza del analito, la CD y la micela se podrán tener muy diferentes situaciones.

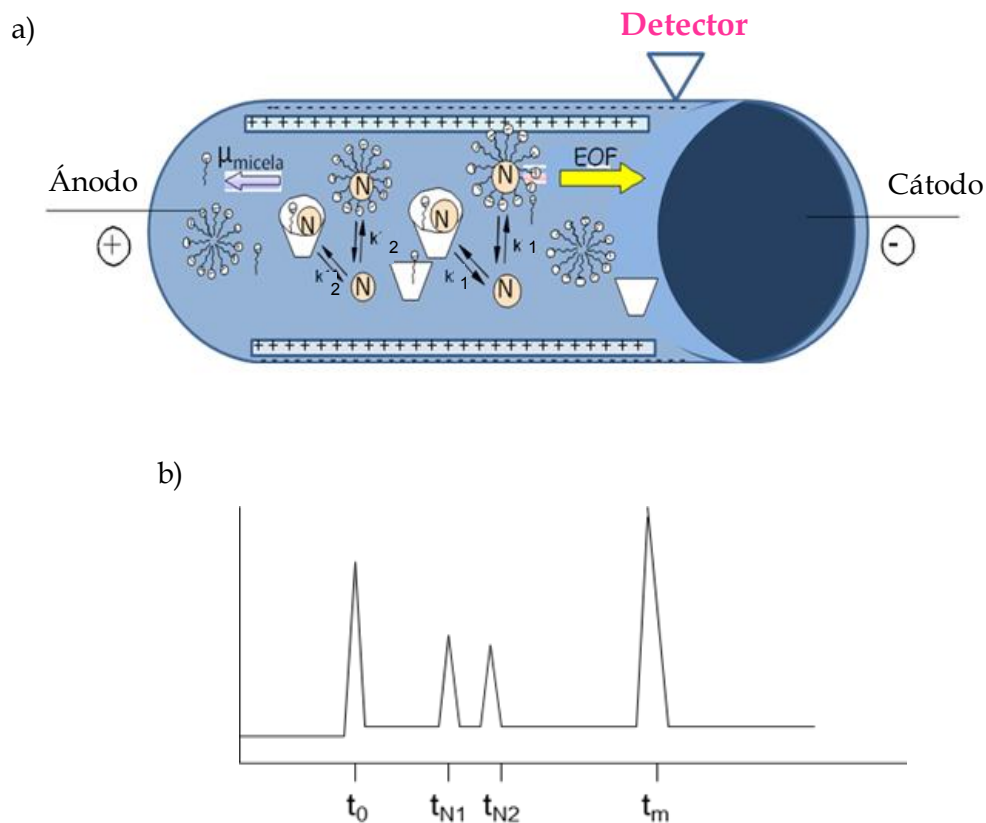


Figura I.22. a) Representación del principio de separación en el modo CD-MEKC con un analito quiral neutro, un tensioactivo aniónico y una CD neutra. b) Electroforeograma teórico que se obtendría para la separación quiral de un analito con un solo centro estereogénico.

➤ *Electrocromatografía capilar (CEC)*

La CEC es una técnica de separación híbrida entre HPLC y CE que presenta algunas de las mejores características de cada una de estas dos técnicas, como son la alta selectividad

de HPLC y la elevada eficacia de CE. Se lleva a cabo en columnas capilares rellenas con una fase estacionaria, con la que los distintos analitos interaccionan de forma selectiva y una fase móvil, que se mueve debido a la existencia de un EOF generado por la acción de un campo eléctrico y que en combinación con la movilidad electroforética de los analitos hace que éstos se desplacen hacia el detector. Por tanto, los solutos se separan por la combinación de la distribución que experimentan entre la fase móvil y la estacionaria y si tienen carga, además, por la diferencia en sus movilidades electroforéticas y son transportados a través de la columna por el EOF y/o por sus movilidades electroforéticas.

Las columnas empleadas en CEC pueden ser de tres tipos: empaquetadas, tubulares abiertas o monolíticas aunque la mayoría de las aplicaciones se basan en el empleo de columnas empaquetadas [130].

Aunque la CEC es un modo de separación que fue concebido para la separación de especies neutras, como en el caso de EKC, hoy en día se emplea también para compuestos cargados, así como para compuestos quirales. En este último caso, la separación quiral se puede llevar a cabo de cuatro formas distintas: (i) utilizando un capilar relleno con una fase estacionaria quiral, (ii) empleando un capilar que es una columna tubular abierta con una fase estacionaria quiral, (iii) usando una fase estacionaria no-quiral y un BGE que contiene un aditivo quiral o (iv) con columnas monolíticas [128]. La **Tabla I.7** agrupa los tipos de columnas y los selectores quirales más empleados como fases estacionarias o como aditivos añadidos al BGE utilizados en CEC [131]. El continuo desarrollo de nuevas fases estacionarias quirales o la adaptación de las ya empleadas con éxito en HPLC, hace que el campo de aplicación de la CEC sea cada vez más amplio.

Tabla I.7. Tipos de columnas y selectores quirales empleados en CEC quiral [131].

Tipo de columna	Selector quiral
Capilares rellenos	Ciclodextrinas Pequeñas moléculas quirales Proteínas Poliacrilamidas quirales Polimetacrilatos quirales Polisacáridos
Columna tubular abierta	Ciclodextrinas Albúmina de suero bovino Polisacáridos Lactonas quirales α -Naftil etilamina
Capilares rellenos con fases estacionarias no quirales	BGE con ciclodextrinas BGE con agentes quirales para la formación de pares iónicos
Columnas monolíticas	Fases estacionarias tipo Pirkle Ciclodextrinas Albúmina de suero bovino Vancomicina

I.5 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN

Uno de los mayores inconvenientes en la determinación de contaminantes ambientales es sin duda las bajas concentraciones a los que estos compuestos se encuentran presentes en las muestras reales. Así, es necesario desarrollar métodos de preparación de muestra que permitan la extracción selectiva, la preconcentración y la purificación de los compuestos de interés con el fin de poder llevar a cabo su posterior determinación. En efecto, una de las etapas más importantes en todo el proceso analítico es la etapa de

preparación de muestra, que es por lo general el paso más crítico y el que necesita un mayor tiempo.

Con el fin de seleccionar el método de preparación de muestra más adecuado, lo más común es clasificar las muestras según su estado físico en sólidas, líquidas, semisólidas y gaseosas. En el caso de muestras sólidas y semisólidas los métodos más empleados son la extracción sólido-líquido, la extracción soxhlet, la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), la extracción asistida por microondas (MASE), la extracción con fluidos supercríticos (SFE), la extracción acelerada con disolventes (ASE), la disolución directa o la homogeneización. Para las muestras gaseosas se emplean la purga y trampa, el espacio de cabeza y la microextracción en fase sólida (SPME) y para las muestras líquidas las técnicas más comúnmente empleadas son la extracción en fase sólida (SPE), la extracción líquido-líquido, la evaporación, la destilación, la diálisis, la liofilización, la sedimentación y la filtración [103].

A continuación se describirán de manera resumida las técnicas de extracción y/o preconcentración empleadas en este trabajo. Dado que una de las técnicas utilizadas (*sample stacking*) está basada en principios electroforéticos, se ha decidido incluir este apartado después de explicar dichos principios.

I.5.1 Extracción en fase sólida

La SPE es una de las técnicas de preparación de muestra más empleadas para la preconcentración y/o purificación de muestras líquidas. Permite eliminar los posibles interferentes y los residuos sólidos, se minimiza el volumen final de muestra y se preconcentran los analitos de interés, pudiéndose recuperar los mismos en un disolvente compatible con la técnica de medida empleada posteriormente [103].

El funcionamiento de la SPE es muy similar al de la cromatografía de líquidos, es decir, los compuestos se retienen en una fase estacionaria porosa y se eluyen por una fase móvil. Las fases estacionarias empleadas consisten en un lecho de un adsorbente formado por

partículas gruesas y de elevada área superficial (sílices, resinas poliméricas, anticuerpos inmovilizados, polímeros de impronta molecular, etc.), retenido entre dos discos porosos dentro de una columna de reducido tamaño.

La **Figura I.23** muestra el procedimiento básico para llevar a cabo la preconcentración por SPE, que consta de cinco etapas:

1. **Activación** de la fase estacionaria con un disolvente orgánico que se emplea para “humidificar” la misma.
2. **Acondicionamiento** de la fase estacionaria con el mismo disolvente que contiene la matriz o la muestra.
3. **Retención** de los compuestos de interés por interacción con la fase estacionaria.
4. **Eliminación de interferentes** retenidos en la fase estacionaria mediante el empleo de un disolvente o una serie de disolventes de fuerza de elución creciente.
5. **Elución de los analitos** con un disolvente adecuado. El adsorbente SPE y las interacciones del mismo con los analitos determinan el eluyente que debe ser utilizado.

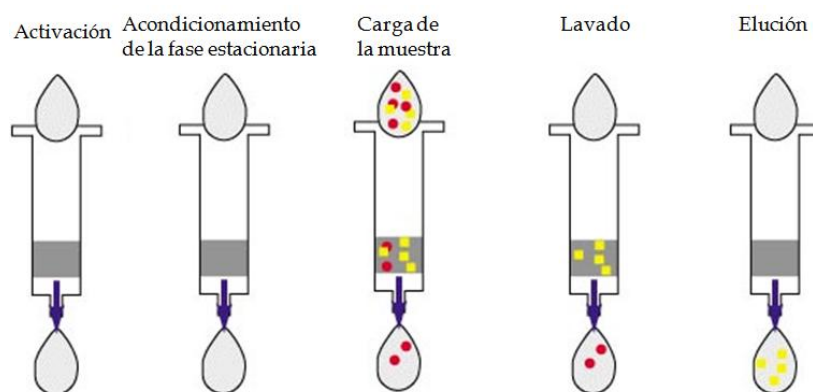


Figura I.23. Procedimiento básico de un sistema SPE.

En los casos en los que la SPE se emplee únicamente como sistema de purificación o limpieza de la muestra, se selecciona un adsorbente que retenga las interferencias y que permita que los analitos de interés pasen a través de la columna con la matriz de la muestra. De esta forma, se eliminan los posibles interferentes e impurezas de una forma rápida y sencilla.

Las principales ventajas de la SPE son:

- Existencia de un gran número de diferentes fases estacionarias que posibilitan la correcta elección de las mismas de acuerdo con la selectividad que se desee, permitiendo la extracción de compuestos tanto de matrices acuosas como orgánicas.
- Disponibilidad de sistemas manuales y automáticos, en discos, cartuchos y microfibras, con la posibilidad de automatización y acoplamiento directo al sistema de separación.
- Se puede emplear tanto para pequeñas como para grandes cantidades de muestra. Esto es sobre todo ventajoso para muestras medioambientales, como agua de río o que provienen de plantas de tratamiento de efluentes que contienen analitos contaminantes en muy bajas concentraciones.
- Posibilidad de tratar muestras de diferentes matrices, sin que aparezcan problemas de formación de emulsiones y burbujas, como sucede en extracción líquido-líquido.
- Empleo de cartuchos o discos desechables que evitan el contacto físico del analista con la muestra, hecho que es especialmente ventajoso sobre todo cuando se trabaja con fluidos corporales como sangre u orina, ya que se minimizan los riesgos sobre la salud humana.

La principal desventaja de la SPE es que en determinadas ocasiones, el extracto final obtenido no es compatible con el sistema analítico y por ello en ocasiones el disolvente debe evaporarse y el residuo redisolverse en un disolvente o disolución adecuada. Esto limita su empleo a la extracción de analitos no volátiles, por lo que es conveniente que el

disolvente de elución sea compatible con la técnica de medida que se va a emplear a continuación.

I.5.2 Dispersión de la matriz en fase sólida

Desde su introducción en 1989, la MSPD, que consiste en el aislamiento de los analitos mediante la dispersión de la muestra en un soporte sólido, se ha aplicado a la extracción de una gran cantidad de sustancias orgánicas, tanto exógenas (fármacos, contaminantes, pesticidas) como endógenas (componentes de alimentos y bacterias, etc.), siendo particularmente interesante para la preparación, extracción y fraccionamiento de muestras sólidas, semisólidas o viscosas [132].

La **Figura I.24** muestra el esquema básico de un proceso MSPD. En este caso, una pequeña cantidad de muestra (hígado, fruta, etc.) se pone en un mortero que contiene una cantidad apropiada de adsorbente u otro material sólido que sirve de soporte. Éstos se mezclan mecánicamente hasta obtener una mezcla homogénea y lo más fina posible (fase ligada). A continuación, la mezcla se transfiere y se compacta en una columna de vidrio o en un cartucho de extracción para llevar a cabo la posterior elución, generalmente de manera secuencial con disolventes apropiados. El proceso es por tanto un equilibrio de reparto y adsorción, que es el responsable de la distribución del analito entre la fase dispersa y el disolvente de elución.

La MSPD presenta como principales ventajas [133]:

- La pequeña cantidad de muestra que es necesaria para llevar a cabo el proceso y el empleo de pequeños volúmenes de disolvente.
- La posibilidad de purificar la muestra mediante la elución de los interferentes con un disolvente adecuado.
- La opción de poder utilizar la técnica para realizar el fraccionamiento de los componentes de la muestra y obtener de esta manera la fracción en la que los

analitos tienden a acumularse (por ejemplo en la fracción lipídica para compuestos hidrófobos).

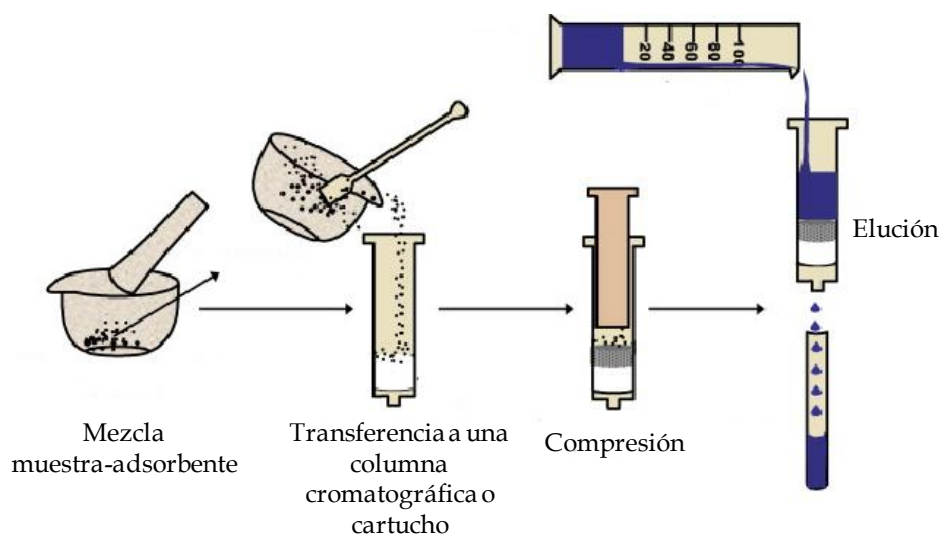


Figura I.24. Esquema básico de un proceso MSPD [134].

I.5.3 Técnicas de preconcentración en el capilar basadas en principios electroforéticos

Aunque la CE ha demostrado ser una técnica de separación con un gran potencial y una serie de propiedades realmente ventajosas, tiene una limitación importante que es la baja sensibilidad que presenta cuando se emplea detección óptica. Con el fin de paliar esta limitación, una alternativa es el empleo de técnicas de preconcentración dentro del propio capilar de separación (*in-capillary*). Estas estrategias se basan en las diferencias entre las propiedades físico-químicas de la muestra y el BGE que permiten la preconcentración de los analitos dentro del capilar debido a la posibilidad de poder inyectar una mayor cantidad de muestra sin perder eficacia en la separación obtenida. La **Tabla I.8** agrupa los

diferentes métodos de preconcentración *in-capillary* que pueden emplearse en CE junto con el tipo de inyección que puede utilizarse en cada caso, el tipo de analito al que se puede aplicar cada una de ellas, las características que debe reunir la muestra y el aumento de sensibilidad obtenido.

Tabla I.8. Métodos de preconcentración *in-capillary* empleados en CE.

Método	Tipo de Inyección	Tipo de analito	Características de la muestra	Aumento de sensibilidad*
Isotacoforesis (ITP)	Hidrodinámica	Cargados	Movilidad intermedia a la de los BGEs	100
Enfoque de pH (IEF)	Hidrodinámica	Ionizables	pH diferente al del BGE	50
Preconcentración por acumulación de muestra (<i>Sample Stacking</i>)	Hidrodinámica (NSS y LVSS)	Cargados o neutros (EKC)	Menor conductividad que el BGE	10-100
	Electrocinética (FAAS)	Cargados o neutros (EKC)		1000
Preconcentración por barrido de muestra (<i>Sample Sweeping</i>)	Hidrodinámica	Cargados y afines a la pseudofase	Igual o menor conductividad que el BGE y sin pseudofase	1000
Acumulación + Barrido (<i>FAAS-Sweeping</i>)	Electrocinética	Cargados y afines a la pseudofase	Menor conductividad que el BGE	10^3 - 10^6

*Disminución del límite de detección

➤ *Isotacoforesis (ITP)*

Como ya se ha comentado, la CITP se emplea más como técnica de preconcentración que como técnica de separación. Si tenemos en cuenta el principio de separación en CITP explicado en el apartado I.4.3.1 de esta memoria y también, que el sistema cumple la ley

de Ohm de manera que la intensidad de corriente, I , va a ser la misma a lo largo de las bandas de las sustancias separadas y su valor es proporcional al producto del campo eléctrico, E , por su respectiva conductividad eléctrica, κ_i , en cada una de las zonas:

$$I\alpha\kappa_i E_i = \kappa_j E_j = \kappa_k E_k = \dots = \kappa_T E_T$$

donde los subíndices i, j, k representan las distintas zonas, se puede explicar la aplicación de la isotacoforesis a la preconcentración de muestras. En efecto, cuando se inyecta un soluto muy diluido, al aplicar un E alto la banda se concentra en la interfase con el tampón frontal y este efecto puede originar un enorme enriquecimiento de trazas.

Las concentraciones de los analitos en cada una de las bandas se ajustan a la concentración del ion de tampón frontal de acuerdo con la función reguladora de Kohlraugh [20]:

$$C_i = C_L \frac{\mu_{epi} (\mu_{epL} + \mu_{epc})}{\mu_{epL} (\mu_{epi} + \mu_{epc})}$$

donde C_i es la concentración de la especie i en la banda del ión, C_L es la concentración del tampón frontal, y μ_{epi} , μ_{epL} y μ_{epc} , son las movilidades de la especie i , del ion del tampón frontal y del contraión en el estado estacionario, respectivamente. La concentración final C_i que se obtiene para cada analito, depende de sus propias características y de las del tampón frontal y es independiente de la concentración original del analito, i .

➤ *Enfoque de pH*

En este método de preconcentración los compuestos, que deben ser ionizables, se disuelven en un medio de pH adecuado de forma que los analitos de interés se encuentren en su forma neutra en la región de la muestra. Por otro lado, el BGE tiene que ser un medio con un pH elevado. En esta situación, se crea una interfase entre las dos

regiones que al aplicar el voltaje de separación se va extendiendo a medida que los analitos se mueven hacia el detector y de este modo, los analitos que eran neutros adquieren carga a medida que se desplazan a través del capilar y se focalizan en una banda estrecha [20].

➤ *Preconcentración por barrido de muestra (sweeping)*

Al contrario que las técnicas de preconcentración descritas hasta el momento, que solamente son útiles para analitos cargados, la preconcentración por barrido de muestra o *sweeping* se puede emplear para la preconcentración de analitos neutros. Se utiliza en el modo EKC, con el fin de separar y preconcentrar analitos neutros empleando una pseudofase estacionaria (micelas, CDs, antibióticos, dendrímeros, etc.) que interacciona en distinta medida con cada uno de los analitos provocando de esta manera la separación de los mismos. La preconcentración por barrido de muestra se produce por la acumulación de los analitos en la fase pseudoestacionaria, que entra en la zona de la muestra cuando se aplica el voltaje de separación [135]. Para ello, es importante que los analitos estén disueltos en un medio electroforético libre de fase pseudoestacionaria ya que es ésta la que produce la preconcentración del analito por barrido de la muestra.

➤ *Preconcentración por acumulación de muestra (sample stacking)*

Finalmente y debido a que en este trabajo de investigación se ha empleado la preconcentración por acumulación de muestra (*sample stacking*), este método de preconcentración se describirá con más detalle.

Fue descrito por primera vez por Tiselius *y col.* [136] y consiste en la preconcentración de la muestra dentro del capilar debido a las diferencias entre la velocidad electroforética que poseen los analitos dentro de la región de la muestra y la velocidad electroforética que poseen dentro del BGE a causa de las distintas conductividades que presentan ambas zonas. La **Figura I.25** muestra el fenómeno de preconcentración por acumulación de la

muestra (*stacking*) que se produce cuando se lleva a cabo la inyección hidrodinámica de una muestra disuelta en una matriz de menor conductividad que el BGE. En este caso y en un primer momento los analitos se encuentran disueltos en la región de la muestra, que es una zona de baja conductividad. Al aplicar un voltaje de separación, los analitos se desplazan según su movilidad electroforética y el EOF y llegan a la zona de la interfase entre la muestra y el BGE. Debido a que el BGE posee una baja conductividad, los analitos experimentan una disminución de su velocidad y se acumulan en esta región. Finalmente, se desplazan hasta el detector en bandas estrechas perfectamente delimitadas.

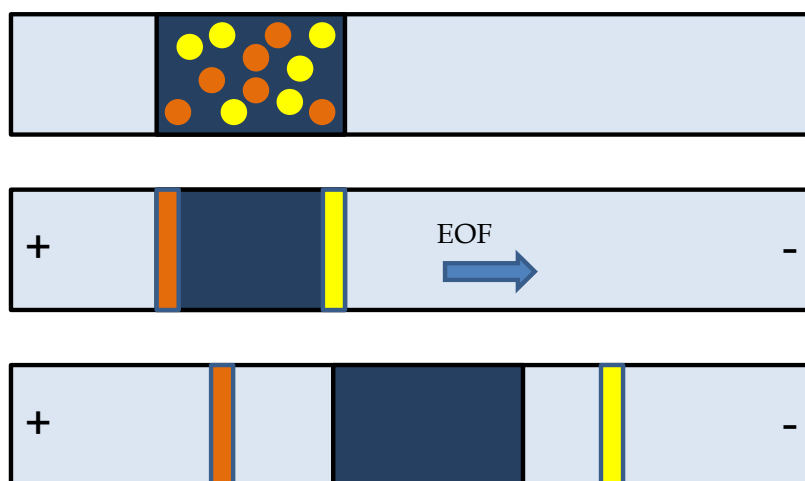


Figura I.25. Diagrama esquemático de la preconcentración por acumulación de muestra (*stacking*) en CE.

En este modo de preconcentración *in-capillary*, los disolventes empleados para la muestra suelen ser agua, un tampón de menor concentración que el BGE o bien acetonitrilo, cuya resistividad favorece el efecto de acumulación. Este método de preconcentración se conoce en su modo más sencillo como inyección con acumulación normal de muestra (*Normal Sample Stacking, NSS*) y permite aumentar el volumen de

muestra introducido en el capilar hasta llenar entre el 10 y el 20 % del volumen total del capilar sin perder eficacia, mientras que en una inyección hidrodinámica convencional no se debe sobrepasar el 1-2 % de la longitud total del capilar.

Una variación del método anterior es la denominada inyección por acumulación de un gran volumen de muestra (*Large-Volume Sample Stacking, LVSS*). En este caso, es posible llenar el capilar prácticamente en su totalidad con la muestra disuelta en un tampón de baja conductividad, a continuación se lleva a cabo una etapa de eliminación de la matriz aplicando una diferencia de potencial negativa (polaridad inversa) y finalmente se aplica la polaridad normal para llevar a cabo la separación.

El fenómeno de *stacking* descrito también puede producirse cuando la introducción de la muestra se realiza mediante inyección electrocinética, método de preconcentración que se conoce como acumulación de muestra por amplificación de campo (*Field-Amplified Sample Stacking, FASS*). En este caso, se inyecta la muestra también disuelta en un medio de baja conductividad, en modo electrocinético. En este tipo de inyección la introducción de los analitos en el capilar depende del EOF, y principalmente, de la carga y movilidad electroforética de la misma. Así, es posible aumentar la cantidad de iones introducida, evitando el llenado de un gran volumen de muestra dentro del capilar, lo que se traduce en un aumento de la concentración de los analitos en una banda estrecha al comienzo del capilar. Frecuentemente, antes de la inyección de la muestra se introduce en el capilar una pequeña cantidad de un disolvente de alta resistividad (agua o acetonitrilo), lo que permite asegurar una adecuada amplificación del campo eléctrico, y así aumentar aún más la sensibilidad.

I.6 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE LA SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE INSECTICIDAS PIRETROIDES Y FUNGICIDAS, PCBs Y SUS METABOLITOS METILSULFONADOS, FTALATOS, FÁRMACOS TIREOSTÁTICOS Y HORMONAS ESTEROIDEAS.

De todos los contaminantes químicos que se han mencionado a lo largo de este capítulo, este trabajo de investigación se ha centrado en la separación y determinación de insecticidas piretroides y fungicidas, PCBs y sus metabolitos metilsulfonados, ftalatos, fármacos tireostáticos y hormonas esteroideas. A continuación, se describirán los antecedentes bibliográficos correspondientes a cada uno de los grupos de compuestos mencionados.

Como ya se ha puesto de manifiesto, los pesticidas se consideran contaminantes químicos prioritarios debido fundamentalmente a su uso masivo en todo el mundo. Además, muchos de ellos presentan quiralidad, propiedad que juega un papel fundamental en sus características y toxicidad. Por tanto, es de especial importancia su determinación enantiomérica con el fin de estudiar los procesos de degradación enantioselectivos que se dan en el medioambiente, la metabolización enantioespecífica que se da en los seres vivos, así como, controlar la pureza de las formulaciones comerciales disponibles en la actualidad.

Los insecticidas piretroides, son derivados sintéticos de las piretrinas naturales y fueron sintetizados por primera vez en el año 1949 con el fin de mejorar la actividad insecticida y la estabilidad de éstas [137]. Si se comparan con otros pesticidas como por ejemplo los organofosforados o carbamatos, poseen una menor toxicidad para los mamíferos [138], sin embargo, hacia los organismos acuáticos presentan una toxicidad muy alta llegando a obtenerse valores de concentración letal (LC_{50}) por debajo de 1 ppb [139].

Prácticamente todos los insecticidas piretroides presentan quiralidad. El número de centros quirales para la mayoría de ellos varía entre uno y tres y por tanto, nos podemos

encontrar con dos, cuatro u ocho enantiómeros de un mismo compuesto [140], por lo que se les considera el grupo de pesticidas con mayor grado de quiralidad [141]. Además, se ha comprobado que para estos insecticidas existe una estrecha relación entre la configuración de la molécula y su actividad, toxicidad hacia organismos acuáticos o persistencia en el medioambiente [140]. Sin embargo, la selectividad enantiomérica de los piretroides ha sido generalmente ignorada en el análisis medioambiental debido fundamentalmente a la gran dificultad de separación de los enantiómeros y a la falta de estándares.

En términos generales se puede decir que la toxicidad y la actividad insecticida de los piretroides depende de la configuración molecular, siendo los enantiómeros *R* aproximadamente unas 25 veces más efectivos como insecticidas que los enantiómeros *S* [142]. Para aquellos piretroides que además poseen un carbono bencílico sustituido con un grupo ciano (por ejemplo fenvalerato y cipermetrina), la configuración *S* de este centro estereogénico es más efectiva como insecticida y a la vez más tóxica para los organismos acuáticos en un factor de 20-100 veces si se compara con el enantiómero *R* [143]. Por otro lado, los isómeros *cis* son por norma general más tóxicos hacia los invertebrados acuáticos que los isómeros *trans* [143].

La separación enantiomérica de insecticidas piretroides se ha llevado a cabo por CE, HPLC, GC y cromatografía de fluidos supercríticos (SFC). La GC ha sido ampliamente empleada para la separación quiral de pesticidas en general debido fundamentalmente a los buenos límites de detección que ofrece en comparación con otras técnicas cromatográficas. Sin embargo, presenta la limitación de que las elevadas temperaturas que se tienen que utilizar pueden afectar de manera significativa a las relaciones enantioméricas determinadas, dando lugar a resultados incorrectos. A pesar de ello, existen en la bibliografía diferentes trabajos que utilizan la GC para la separación enantiomérica de insecticidas piretroides, en los que por lo general, se emplean columnas capilares quirales con rellenos basados en CDs. Por otro lado, la HPLC además de ser una técnica rápida y no destructiva, no produce la epimerización de los analitos en el inyector. Estas dos características unidas al hecho de que existen una gran variedad de columnas

quirales disponibles comercialmente para ello, hace que el número de insecticidas piretroides que han sido separados enantioméricamente mediante esta técnica sea bastante elevado. Por SFC, solamente existe en la bibliografía un trabajo que describe la separación quiral de dos insecticidas piretroides y se han publicado seis artículos relacionados con la separación quiral de estos compuestos por CE. En este último caso, los modos de trabajo más empleados han sido MEKC en presencia de tensioactivos quirales [144, 145] y CD-MEKC con tensioactivos quirales y no quirales y CDs neutras [146, 147], debido muy posiblemente a la elevada hidrofobicidad que presentan la mayoría de los insecticidas piretroides. Sólo en uno de estos trabajos se emplea el modo CD-EKC con una CD catiónica aunque en este caso los compuestos objeto de estudio no fueron los piretroides neutros sino sus ácidos [148]. También se ha empleado como modo de trabajo la CEC con una columna quiral rellena de Me- β -CD [137]. La detección empleada en todos los casos ha sido la detección UV-Vis o bien la fluorescencia inducida por láser (LIF) previa derivatización de los piretroides.

Las características de los insecticidas piretroides junto con las metodologías desarrolladas para su separación y determinación enantiomérica se han agrupado en el artículo de revisión publicado durante la realización de esta Tesis Doctoral y que se incluye al final de este capítulo (**artículo 1**). Este artículo agrupa los trabajos que se habían publicado hasta la fecha en relación a este tema.

Indicar que el piretroide estudiado en este trabajo, *cis*-bifentrina, no había sido separado enantioméricamente nunca por CE. Sin embargo, sí existían en la bibliografía métodos desarrollados para la separación quiral de este compuesto por HPLC [149-153], alcanzándose resoluciones enantioméricas de 3 en tiempos de análisis que variaban entre los 12 y 18 min, y por GC [140, 154-156] con columnas de β -CDs obteniéndose tiempos de análisis siempre superiores a 55 min. Algunos de los métodos desarrollados para la separación quiral de *cis*-bifentrina, tanto por GC como por HPLC, habían sido aplicados a la determinación de los enantiómeros de este compuesto en muestras medioambientales (suelo, sedimentos y aguas) y biológicas.

Otro grupo de pesticidas con gran importancia no solo por su ubicuidad, sino también debido a que la quiralidad que presentan juega un papel fundamental en sus propiedades pesticidas y toxicológicas, son los fungicidas. En general, HPLC es la técnica que se ha empleado en mayor medida con esta finalidad con fases estacionarias derivadas de polisacáridos, en particular aquellas derivadas de celulosa y amilosa. Con respecto a la GC y SFC existen muy pocos trabajos y además, el número de fungicidas separado quiralmemente es mucho más limitado. Finalmente, la CE que goza de gran popularidad en este campo, se ha empleado siempre en el modo de separación EKC con CDs como selectores quirales. A pesar de que la detección óptica no proporciona una sensibilidad adecuada para el análisis de muestras medioambientales, el empleo de los métodos de preconcentración *in-capillary* soluciona en parte este inconveniente, aumentando la sensibilidad y permitiendo el análisis de muestras que contienen los analitos de interés a bajas concentraciones. Indicar, que a pesar de la multitud de trabajos publicados en relación a la separación quiral de fungicidas, especialmente por HPLC y CE, la mayoría de ellos se centran en la separación quiral de fungicidas tipo conazol y/o amida, siendo los demás grupos muy poco estudiados. Además, incluso dentro de estos dos grupos de compuestos el número de ellos separados es muy limitado por lo que el desarrollo de nuevas metodologías quirales se hace necesaria.

Los antecedentes bibliográficos correspondientes a la separación enantiomérica de fungicidas por CE, HPLC, GC y SFC se agrupan en el artículo de revisión (**artículo 2**) publicado durante la realización de esta Tesis Doctoral y que se incluye al final de este capítulo.

Para los dos fungicidas objeto de estudio en este trabajo de investigación, metalaxil y benalaxil, solamente existían en la bibliografía dos trabajos previos por CE para la separación quiral de metalaxil [157, 158] y ninguno para benalaxil. En el caso del metalaxil en ambos trabajos se utilizó detección UV-Vis y se emplearon CDs como selectores quirales, bien solas (55 mM succinil- β -ciclodextrina (succ- β -CD)) en el modo de trabajo CD-EKC [158], o en combinación con tensioactivos (40 mM γ -CD - 100 mM SDS) en el modo de trabajo CD-MEKC [157]. En el mejor de los casos se obtenía una resolución de los

enantiómeros de metalaxil de 1.68 en aproximadamente 19 min [158]. Además, cabe destacar la elevada concentración de CD que se empleó, siempre igual o superior a 40 mM. Con respecto al empleo de otras técnicas de separación, la GC se ha utilizado poco para la separación quiral de este compuesto, mayoritariamente acoplada con la detección por MS y a excepción de un trabajo, que emplea una columna fenilo [159], con columnas capilares derivadas de la β -CD. En cualquier caso, las resoluciones obtenidas no fueron nunca muy superiores a línea base en tiempos que oscilaron entre los 12 y los 29 min. Por el contrario, los enantiómeros de metalaxil habían sido separados quiralmente por HPLC en numerosos trabajos empleando mayoritariamente columnas empaquetadas derivadas de celulosa, o bien, derivadas de amilosa [160, 161] e incluso de amilopectina [162] y obteniéndose resoluciones enantioméricas comprendidas entre 1.13 y 9.43 en tiempos de análisis que variaban entre 10 y 40 min.

Benalaxil únicamente se había separado enantioméricamente por HPLC con columnas derivadas de celulosa a excepción de un trabajo en el que se emplea una fase estacionaria quiral derivada de amilopectina [162]. Las resoluciones obtenidas estaban comprendidas entre 1.01 y 7.84 y los tiempos de análisis variaban entre 10.5 y 50 min.

Destacar que a pesar del gran potencial que ha mostrado la CE en el campo de las separaciones quirales, en el caso de los insecticidas piretroides y fungicidas esta técnica de separación ha sido muy escasamente empleada previamente y el número de compuestos a los que se ha aplicado es bastante limitado, tal y como ya se ha puesto de manifiesto. Sin embargo, la CE es una técnica idónea en el campo de las separaciones quirales, debido fundamentalmente a la gran versatilidad que ofrece y al amplio abanico de selectores quirales que pueden ser empleados lo que permite separar un gran número de compuestos de muy diversa naturaleza.

Los PCBs son compuestos organoclorados sintéticos ampliamente utilizados en procesos industriales desde el año 1929 [163]. Presentan una alta estabilidad química y una baja inflamabilidad, características que los hacen muy apropiados para ser empleados en diferentes campos como en la síntesis de los fluidos dieléctricos que usan los

condensadores y transformadores, como lubricantes, como aditivos en tintas y pinturas, como aditivos en plásticos, etc.

Poseen propiedades lipofílicas, y por tanto es muy común que tiendan a bioacumularse en los seres vivos a través de la cadena trófica [164]. Así, y a pesar de haber sido prohibidos en Estados Unidos y Europa en los años 70, todavía hoy en día se pueden encontrar en el medioambiente y en los seres vivos [165]. En este sentido, el Convenio de Estocolmo que entró en vigor en el año 2004, es uno de los más ambiciosos proyectos que existen internacionalmente para poner freno al avance de los POPs, entre los que se incluyen los PCBs. El Reglamento 850/2004/CE sobre contaminantes orgánicos persistentes se elaboró con vistas a eliminar la emisión de las sustancias sujetas al Convenio de Estocolmo, y para establecer disposiciones relativas a los residuos procedentes de estos compuestos o de materiales que los contengan o estén contaminados por ellos [166].

Los PCBs están formados por dos anillos aromáticos unidos por un enlace C-C y sustituidos total o parcialmente por sustituyentes cloro en las diez posiciones libres de su molécula. Aunque existen 209 congéneres diferentes, solamente 135 de ellos se encuentran en las mezclas comerciales más habituales como son Aroclor, Clophen, etc. Algunos PCBs presentan quiralidad axial en su conformación no planar, concretamente aquellos que tienen tres o cuatro átomos de cloro en las posiciones orto [167]. De esta manera, existen 78 congéneres que presentan quiralidad, aunque solamente 19 de ellos son estables a temperatura ambiente y únicamente 12 (PCB 84, 88, 91, 95, 131, 132, 136, 149, 171, 174, 183 y 196) están presentes en las mezclas comerciales indicadas.

Los PCBs se producen a nivel industrial de forma racémica y llegan al medioambiente en forma de racemato. Sin embargo, los múltiples procesos biológicos a los que se ven sometidos hacen que esta composición quiral se pueda alterar, especialmente cuando entran en contacto con algún tipo de organismo vivo puesto que se ponen en juego procesos metabólicos enantioselectivos [23]. En este sentido y en el campo del medioambiente, su determinación individual implica la evaluación de la toxicidad real de

cada uno de los enantiómeros, así como, el estudio de los mecanismos de degradación de cada uno de ellos.

Cuando los PCBs son metabolizados por los seres vivos se forman principalmente dos tipos de metabolitos: los OH-PCBs y los MeSO₂-PCBs. En teoría, estos metabolitos son más solubles y por lo tanto se podrán excretar más fácilmente. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que pueden ser igual o incluso más persistentes que los PCBs originales, especialmente en el caso de los MeSO₂-PCBs [168]. Al igual que sucede con los PCBs, los MeSO₂-PCBs también presentan quiralidad, de manera que es de gran interés la determinación enantioselectiva y simultánea de ambas familias de compuestos con el fin de entender el metabolismo de los mismos.

Con respecto a la separación quiral de PCBs y sus correspondientes metabolitos MeSO₂-PCBs, las **Tablas I.9** y **I.10** agrupan todos los trabajos correspondientes a la separación enantiomérica de estos dos grupos de compuestos por GC. Como se puede observar en la **Tabla I.9**, para la separación quiral de PCBs por GC, se han empleado una gran variedad de columnas quirales, todas ellas derivadas de CDs. Algunas de las mismas, como por ejemplo la G-TA Chiraldex, han permitido la separación simultánea de hasta 16 PCBs [169]. La mayoría de las muestras en las que se han determinado estos compuestos de forma enantioselectiva, son alimentos [170-172], muestras medioambientales [169, 173-175] y muestras biológicas [176], siendo diversos los sistemas de detección empleados como el ECD, μ -EDC, FID y MS.

Por otro lado y en relación a la separación quiral de los MeSO₂-PCBs (**Tabla I.10**), todos los trabajos que aparecen en la bibliografía están enfocados a la determinación de los atropisómeros de los mismos en muestras biológicas [168, 177-180] y huevos [181] y en todos ellos se emplean columnas modificadas con CDs.

Tabla I.9. Métodos analíticos para la separación y determinación enantiomérica de PCBs por GC.

PCBs	Muestra	Tipo de GC	Columna Quiral	Detección	Referencia
PCB 45, 84, 88, 89, 91, 95, 131, 132, 135, 136, 139, 144, 149, 171, 174, 175, 176, 183, 196, 197	Sedimentos acuáticos	GC	Chirasil-Dex (PCB 84, 88, 91, 132, 135, 136, 149, 174, 176) Cyclosil-B (PCB 45, 91, 95, 136, 149, 176) B-PA Chiraldex (PCB 84, 131, 132, 135, 136, 144, 174, 175, 176) B-DM Chiraldex (PCB 45, 91, 95, 131, 136, 149, 176) G-TA Chiraldex (PCB 45, 84, 88, 89, 91, 95, 131, 132, 135, 139, 149, 171, 174, 175, 183, 196) B-PH Chiraldex (PCB 132, 136, 175, 183, 196) G-PT Chiraldex (PCB 131, 136, 176, 197)	ECD y EI-MS (Q)	[169]
PCB 45, 84, 91, 95, 131, 132, 135, 136, 144, 149, 171, 174, 175, 176, 183	Leche, queso y salmón	GC x GC	Chirasil-Dex (PCB 84, 91, 95, 132, 135, 136, 149, 174, 176) BGB-176SE (PCB 45, 91, 95, 131, 136, 149, 176) BGB-172 (PCB 45, 84, 91, 131, 132, 135, 144, 149, 171, 174, 175, 183)	μ -ECD	[170]
PCB 84, 91, 95, 132, 135, 136, 149, 174, 176	Leche y queso	Heart-cut MDGC GC x GC	Chirasil-Dex (PCB 84, 91, 95, 132, 135, 136, 149, 174, 176) BGB-176SE (PCB 45, 91, 95, 131, 136, 149, 176) BGB-172 (PCB 45, 84, 91, 131, 132, 135, 144, 149, 171, 174, 175, 183)	ECD μ -ECD	[171]
PCB 84, 91, 95, 132, 136, 149, 171, 174, 176, 183	Leche y productos lácteos	Heart-cut MDGC	Chirasil-Dex (PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176) BGB-172 (PCB 84, 135, 171, 183)	ECD	[172]
PCB 95, 136, 149	Aire y suelo	GC	Chirasil-Dex	EI-MS (Q)	[174]

Tabla I.9. Continuación.

PCBs	Muestra	Tipo de GC	Columna Quiral	Detección	Referencia
PCB 95, 132, 149, 174	Suelo, aire, peces, compost y leche materna	GC x GC	Chirasil-Dex	EI-MS (QqQ)	[175]
PCB 91, 95, 132, 149, 174	Tejidos de foca	GC x GC	Chirasil-Dex	μ -ECD y CI-MS (TOF)	[176]
PCB 84, 132, 144, 149, 171, 174, 183	--	GC	β -BSCD	MS (Q)	[182]
PCB 45, 91, 95, 136, 149, 174, 175, 176, 183	--	GC	2,3-di-o-metil-6-O-tert-butildimetilsililo- β -CD -en SE-30 (PCB 45, 91, 95, 136, 149, 174, 175, 176, 183) -en SE-54 (PCB 45, 91, 95, 136, 149, 174, 175, 176, 183) -en OV-1701 (PCB 45, 91, 95, 136, 149, 174, 175, 176)	FID y ECD	[183]
PCB 84, 91, 132, 135, 136, 149, 174, 176	--	GC x GC	Chirasil-Dex CB	μ -ECD	[184]
PCB 91, 95, 132, 136, 149, 174, 176, 183	Sedimentos acuáticos	GC	Chirasil-Dex (PCB 91, 136, 149, 174, 176) Cyclosil-B (PCB 91, 95, 136) B-PA Chiraldex (PCB 132, 174) B-PH Chiraldex (PCB 183)	EI-MS (Q)	[185]
PCB 91, 95, 136, 149, 174, 176, 183	Materiales de referencia certificados	GC	Cyclosil-B (PCB 91, 95, 136) Chirasil-Dex (PCB 91, 136, 149, 174, 176) BGB-172 (PCB 183)	CI-MS (Q)	[186]

Tabla I.10. Métodos analíticos para la separación y determinación enantiomérica de MeSO₂-PCBs por GC.

MeSO ₂ -PCBs	Muestra	Columna Quiral	Detección	Referencia
5-MeSO ₂ -CB91, 4-MeSO ₂ -CB91, 5'-MeSO ₂ -CB132, 4'-MeSO ₂ -CB132, 5-MeSO ₂ -CB149, 4-MeSO ₂ -CB149	Tejidos de rata	Heptakis(2,3-di-O-metil-6-O-tert-hexil)β-CD en SE-52	EI-MS (QqQ)	[168]
3-MeSO ₂ -CB91, 4-MeSO ₂ -CB91, 4-MeSO ₂ -CB95, 3-MeSO ₂ -CB132, 4-MeSO ₂ -CB132, 3-MeSO ₂ -CB149, 4-MeSO ₂ -CB149, 3-MeSO ₂ -CB174, 4-MeSO ₂ -CB174	Tejidos adiposos de mamíferos marinos	BGB-172 (3-MeSO ₂ -CB91, 4-MeSO ₂ -CB91, 3-MeSO ₂ -CB132, 4-MeSO ₂ -CB132, 3-MeSO ₂ -CB149, 3-MeSO ₂ -CB174, 4-MeSO ₂ -CB174) β-DEX 325 (3-MeSO ₂ -CB174, 4-MeSO ₂ -CB174)	EI-MS (IT)	[177]
3-MeSO ₂ -CB132, 3-MeSO ₂ -CB149, 4-MeSO ₂ -CB174	Hígado de marsopa	Chirasil-Dex	EI-MS (Q)	[178]
4-MeSO ₂ -CB91, 5-MeSO ₂ -CB149, 4-MeSO ₂ -CB149, 5'-MeSO ₂ -CB132, 4'-MeSO ₂ -CB132, 5-MeSO ₂ -CB174, 4'-MeSO ₂ -CB174	Tejidos de foca	Heptakis(2,3-di-O-metil-6-O-tert-hexil)β-CD en OV-1701	EI-MS (QqQ)	[179]
4-MeSO ₂ -CB91, 3-MeSO ₂ -CB149, 4-MeSO ₂ -CB149, 3-MeSO ₂ -CB132, 4-MeSO ₂ -CB132	Tejidos humanos y músculo de foca y pelicano	Heptakis(2,3-di-O-metil-6-O-tertbutildimetilsilil)β-CD en SE-52	ECD	[180]
4-MeSO ₂ -CB91, 5-MeSO ₂ -CB149, 4-MeSO ₂ -CB149, 5'-MeSO ₂ -CB132, 4'-MeSO ₂ -CB132, 5-MeSO ₂ -CB174, 4'-MeSO ₂ -CB174	Huevos	Heptakis(2,3-di-O-metil-6-O-tert-hexil)β-CD en OV-1701	EI-MS (QqQ)	[181]

Teniendo en cuenta que los MeSO₂-PCBs se forman a partir de los PCBs, la determinación simultánea de los dos grupos de congéneres podría dar una información muy valiosa acerca de los procesos metabólicos de los PCBs [178]. Además mediante su determinación enantioselectiva, la información correspondiente al metabolismo de los PCBs en los distintos organismos sería aún más completa, ya que como se ha puesto de manifiesto en el apartado I.2 de este trabajo, los mecanismos de la maquinaria celular son enantioselectivos. Sin embargo, en el momento de la realización de este trabajo de investigación nunca se había llevado a cabo la separación enantioselectiva simultánea de ambos tipos de compuestos lo que ha constituido uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral.

En los últimos años se ha prestado especial atención a los ftalatos, en gran parte por los indicios que demuestran la toxicidad de los mismos [79, 187]. En efecto, estudios en animales han demostrado su comportamiento como disruptores endocrinos [188] y como compuestos carcinogénicos [189], teratogénicos y mutagénicos [190]. Además, con el fin de evaluar la exposición del ser humano a estos compuestos, desde el año 1990 se lleva a cabo la determinación de ftalatos y sus metabolitos en orina como parte de estudios y programas de monitorización [191, 192], habiéndose encontrado límites de exposición que evidencian los potenciales riesgos que presentan para la salud [187].

Los ftalatos son dialquil o alquil aril ésteres del ácido 1,2-bencenodicarboxílico [193] que se emplean de forma masiva en la sociedad actual en distintos campos como son la cosmética, la fabricación de pinturas y barnices, en el envasado de diversos productos, etc. En este sentido los ftalatos de mayor peso molecular son comúnmente añadidos como aditivos en plásticos, especialmente en el cloruro de polivinilo (PVC) y en aquellos destinados al envasado de alimentos, aumentando la flexibilidad de los mismos [194]. Al ser mezclados con el polímero en diferentes proporciones, se obtienen materiales de distinta flexibilidad que pueden ser utilizados en la elaboración de un gran número de productos como son tubos, válvulas, juguetes, chupones, etc. En todos estos materiales los ftalatos no están unidos químicamente al polímero y por tanto, pueden migrar muy fácilmente llegando así al medioambiente o a los productos alimenticios envasados con

ellos [195]. Por otro lado, los ftalatos de menor peso molecular son empleados en la producción de adhesivos, cosméticos, insecticidas y en la industria textil [196]. En efecto, hoy en día prácticamente todos los productos de consumo contienen trazas de ftalatos, bien porque son añadidos al producto en sí o bien, como consecuencia del recipiente de envasado.

En cosmética, los ftalatos se añaden a las formulaciones de forma intencionada como solubilizadores, para aumentar la persistencia de los perfumes o para mejorar la penetración de los cosméticos en contacto con la piel. Así se pueden encontrar ftalatos en esmaltes de uñas, cremas, geles, champús, desodorantes, perfumes, etc., [197] que no permanecen en la capa más superficial de la piel, sino que se absorben y pasan a la sangre. Además, hay que considerar que a pesar de que se encuentran en bajas concentraciones, son productos que la mayoría de las personas, especialmente las mujeres, emplean a diario y por tanto, la cantidad de sustancias dañinas que termina entrando en nuestro organismo puede llegar a ser bastante elevado.

Por todos estos motivos, el uso de ftalatos está cada vez más controlado y de hecho, en el caso de los cosméticos la Unión Europea, a través de la normativa 76/768/ECC, prohíbe totalmente el empleo de los ftalatos dietil hexil ftalato (DEHP), dibutil ftalato (DBP) y butil benzil ftalato (BBP) en estos productos. Sin embargo, existe muy poca información acerca de los niveles de ftalatos en productos cosméticos y de higiene personal. Por ello, se hace necesario desarrollar métodos rápidos y sencillos que permitan su determinación en diferentes matrices.

La separación y determinación de ftalatos parentales ha sido frecuentemente realizada por GC, debido principalmente a la elevada volatilidad y estabilidad térmica que presentan estos compuestos. En efecto, en una revisión bibliográfica relativamente reciente [198] en la que se recoge la información referente a los métodos de separación empleados en la determinación de ftalatos parentales y otros compuestos utilizados en la fabricación de plásticos, queda patente la gran aplicabilidad de la GC en este campo, especialmente acoplada a MS. Por otra parte la HPLC y la CE, aunque son técnicas que

han cobrado protagonismo en la última década en este campo se han empleado muchísimo menos. En efecto, por HPLC existen en la bibliografía quince trabajos dedicados a la separación y determinación de ftalatos parentales en diferentes tipos de matrices, principalmente aguas naturales [199-202], aguas embotelladas [203, 204] y otro tipo de bebidas [203, 205]. En ellos se estudia fundamentalmente la posible migración de los ftalatos desde el plástico de embasado a la bebida. También, se han determinado en otros tipos de muestras como orina, leche [206] y muestras biológicas [207-210]. En el caso concreto de la CE, el número de trabajos descritos en la bibliografía es muy limitado como lo es también el tipo de muestras en las que se han determinado y el número de ftalatos que se pueden separar de forma simultánea. Asimismo, los analitos estudiados se limitan a los ftalatos más hidrofóbicos [211, 212].

La **Tabla I.11** agrupa los trabajos publicados en relación a la separación de ftalatos por CE. Debido al carácter neutro de los ftalatos parentales en todo el rango de pH, el modo de trabajo más empleado ha sido MEKC con tensioactivos aniónicos, en particular SDS [211-215], aunque también se ha utilizado colato sódico (SC, sal biliar) [216]. Destacar que los tiempos de análisis obtenidos son en todos los casos largos para tratarse de una técnica como la CE. Solamente en uno de los trabajos, que emplea el modo CEC, se obtuvieron tiempos de análisis inferiores a 10 min [217]. Además, a pesar de la presencia de este tipo de compuestos en todo tipo de muestras, las matrices estudiadas son bastante escasas limitándose a muestras de suero, suelos y pólvoras y no existiendo ningún trabajo que describa la determinación de los ftalatos parentales en productos cosméticos aun existiendo normativa relativa a la prohibición de algunos de ellos en este tipo de muestras.

Tabla I.11. Métodos analíticos para la separación y determinación de ftalatos parentales por CE.

Ftalatos	Modo de CE-Detección	Muestra	Medio de Separación	Tiempo de Análisis	Referencia
DEP, DIPP, DBP	MEKC-APCI-MS	--	BGE1: tampón borato - fosfato (pH 7.0) + SDS BGE 2: tampón borato-fosfato (pH 2.2) + SDS y metanol BGE3: ácido fosfórico-fosfato (pH 2.2) + SDS BGE 4: ácido fosfórico-fosfato (pH 2.2) + SDS y metanol	15.5-16.0 min	[211]
DMP, DBP, DEP	MEKC-UV (200 nm)	Pólvora	Tampón borato 40 mM (pH 9.2) + SDS 16 mM + CDTA 0.5 mM	32.5 min	[212]
DMP, DEP, DBP, DAP, BBP, DEHP	MEKC-UV (210 nm)	--	Tampón borato 0.1 M - fosfato 0.05 M (pH 6.0) + SDS 10 mM	25 min	[213]
DMP, DEP, DBP, DAP, BBP, DEHP	MEKC-UV (210 nm)	--	Tampón borato 0.1 M - fosfato 0.05 M (pH 6.0) + SDS 10 mM	25 min	[214]
DMP, DEP, DIPP, DNPP, DIBP, DBP, BBP, DNAP, DEHP, DNOP	MEKC-UV (210 nm)	--	Tampón fosfato-borato 0.02 M (pH 9.0) + SDS 0.05 M y con 20% de metanol	58 min	[215]
DMP, DEP, DBP, DNOP, DEHP, DCP	MEKC-UV (214 nm)	Suelos	tampón borato 50 mM (pH 8.5) + SC 100 mM y con 15 % metanol	40 min	[216]
DMP, DEP, DAP, DPP, BBP, DBP, DIBP	CEC-UV (250 nm)	Suero	Tampón Tris 25 mM (pH 8.5):AcN 20:80 v:v o 75:25 v:v Fase estacionaria Hypersyl C-18 ODS (3µm)	6.3 min	[217]

Los agentes tireostáticos son un grupo de sustancias que inhiben la acción del tiroides, lo que provoca una disminución de la producción de las hormonas tiroideas: triiodotironina (T3) y tiroxina (T4) [218]. Aunque en su origen también se les denominó “anti-hormonas”, este término no es del todo correcto porque las anti-hormonas contrarrestan la acción de las hormonas pero no impiden su producción, como es el caso de los tireostáticos [219]. Los tireostáticos se pueden dividir en dos grupos principales: naturales y sintéticos, siendo estos últimos los que se han estudiado en este trabajo de investigación. Se consideran tireostáticos naturales los iones inorgánicos de litio (Li^+), el perclorato (ClO_4^-) y el tiocianato (SCN^-) [220], mientras que los tireostáticos sintéticos son tioamidas de bajo peso molecular, polares y de carácter anfótero. Una de las características principales de todos ellos es la existencia de una unión nitrógeno-carbono-azufre, y es probablemente en esta unión, donde reside la acción inhibitoria del tiroides que presentan dichos compuestos.

Los fármacos tireostáticos se emplean en el tratamiento del hipertiroidismo y la enfermedad de Grave en medicina convencional, pero también se han usado durante muchos años para el engorde rápido del ganado, siendo los más empleados para este fin el tapazol (TAP) y el mercaptobencimidazol (MBI) [218]. Estos compuestos pueden ser administrados oralmente, son baratos y relativamente fáciles de conseguir en el mercado negro. Se añaden al pienso y se administran al ganado durante un periodo de 40 días antes del sacrificio del mismo, inhibiendo la acción del tiroides y provocando una acumulación de grasa y un aumento de la retención hídrica, siendo por tanto su efecto relativamente rápido. Así, es indudable que la utilización de los mismos supone un fraude para el consumidor ya que la ganancia de peso obtenida en el animal no es debida a un aumento de su masa cárnica sino a una retención hídrica. De esta manera, la carne obtenida no solo es de menor calidad sino que además, se vende agua a precio de carne [221]. Por otra parte, existen indicios que demuestran que pueden ser teratogénicos y carcinogénicos por lo que el consumo de carnes y productos cárnicos que provienen de animales tratados con dichos fármacos puede suponer un riesgo para la salud pública, por lo que es de gran importancia evitar y controlar su uso [222, 223].

En España la normativa sobre promotores del crecimiento data del año 1963, en el que se prohibió el uso de estrógenos para el engorde de pollos, aunque estaba permitido su empleo, junto con el de los tireostáticos en otros animales. En el año 1977 se aprobó la legislación que limita su uso estrictamente en el campo veterinario. En la Unión Europea está completamente prohibido su uso desde el año 1981 [224], en el que se publicó la directiva 81/602/CE [224], que fue posteriormente modificada por la directiva 85/358/CE [225] con el fin de garantizar una aplicación uniforme de la legislación referente a la detección y la monitorización de tireostáticos en los Estados Miembros de la Unión Europea [225]. Posteriormente, la directiva 96/22/CE [226] estableció la prohibición de importar de otros países carne y productos de origen animal que hubieran sido tratados con dichos fármacos y la directiva 96/23/CE [227] estableció las características que deben reunir los métodos analíticos empleados para la determinación de los tireostáticos en productos alimenticios, así como la normativa referente a los residuos de tireostáticos en estas muestras.

Por otro lado, para la correcta implantación de la directiva 96/23/CE es necesario especificar los criterios de interpretación de los resultados analíticos obtenidos. Los aspectos básicos de dicha directiva se recogen en la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE [228], que establece los procedimientos y los criterios para la determinación de residuos de tireostáticos en productos de origen animal. La finalidad de este protocolo es la identificación inequívoca de los compuestos, empleando para ello la espectrometría de masas como sistema de detección en otro modo de adquisición que no sea *full-scan*. Se basa en el empleo de diversos puntos de identificación para la determinación de cada sustancia, siendo necesarios al menos cuatro puntos de identificación (el tiempo de retención del analito, dos transiciones MRM para cada compuesto y la abundancia relativa de dichas transiciones) para la confirmación de la presencia de sustancias prohibidas en muestras alimentarias.

El carácter altamente polar y anfotérico de estos compuestos y su habilidad para adoptar diversas formas tautoméricas, afecta negativamente a la extracción y a la separación cromatográfica de los mismos y además, debido al reducido tamaño de las

moléculas la detección por MS proporciona en general una escasa sensibilidad. Por ello, la mayoría de los trabajos encontrados en la bibliografía emplean una derivatización previa de los analitos de forma que se produce un derivado de mayor peso molecular, menor polaridad y mucho más estable [222, 229]. La separación y determinación de fármacos tireostáticos se ha llevado a cabo principalmente por HPLC, aunque en menor medida, también se encuentran en la bibliografía trabajos que utilizan las técnicas de CE y GC. Con respecto a la CE, existen únicamente cuatro trabajos en los que se emplea el modo CZE con detección UV-Vis [230, 231], LIF [232] o electroquímica [233] y los métodos desarrollados se aplican a muestras de orina y piensos, siendo el número máximo de compuestos separados simultáneamente de cinco [233]. Por otra parte, la GC se ha utilizado como técnica de separación para la determinación de fármacos tireostáticos en siete trabajos en los que se emplea detección por espectrometría de masas [234-240], a excepción de uno de ellos en el que se emplea también el detector de nitrógeno-fósforo [241]. Los métodos desarrollados por GC se han aplicado a muestras de tejido animal (tiroides y tejido muscular) [234, 235, 237-239], orina [236, 240, 241] y leche [236]. La **Tabla I.12** recoge los métodos desarrollados para la determinación de fármacos tireostáticos por HPLC. Las muestras en las que se ha llevado a cabo su determinación son principalmente muestras biológicas (orina, tiroides, tejidos), excepto en un trabajo donde la determinación se llevó a cabo en formulaciones farmacéuticas comerciales [242]. Teniendo en cuenta que aunque dichos fármacos se emplean en el tratamiento de enfermedades del tiroides, también es común la administración de estos fármacos al ganado con fines no terapéuticos, no es de extrañar su presencia en el medioambiente a partir de la excreción de los mismos. Sin embargo, no existía ninguna metodología analítica desarrollada para la determinación de fármacos tireostáticos en muestras de agua por ninguna de las técnicas mencionadas. Por todos estos motivos, es necesario el desarrollo de métodos de separación y determinación de fármacos tireostáticos que eliminen la etapa previa de derivatización, que reduzcan el tiempo de preparación de muestra y que permitan obtener LODs adecuados en muestras medioambientales.

Tabla I.12. Métodos analíticos para la separación y determinación de fármacos tiroestáticos por HPLC.

Fármacos Tiroestáticos	Muestra	Columna	Fase Móvil	Detección	Referencia
TAP, MBI, TU, MTU, PTU, PhTU	Tejidos tiroideos y musculares	Pro C18 column Zorbax Eclipse XDB C18	A: AcN B: 0.035 M acetato amónico (pH 5.0) C: 0.1 % ácido acético Gradiente TAP y MBI: 0-7 min 1:98:1 v:v:v, 7-8 min 6:88:6 v:v:v y se mantiene esta composición hasta el min 12, 12-13 min 18:64:18 v:v:v, 13-28 min 13.5:73:13.5 v:v:v, 28-29 min 45:10:45 v:v:v y se mantiene esta composición hasta el min 34, 34-35 min 1:98:1 v:v:v Gradiente TU, MTU, PTU, PhTU: 0 min 2.5:95:2.5 v:v:v, 0-5 min 4:92:4 v:v:v, 5-10 min 16.5:67:16.5 v:v:v, 10-15 min 20:60:20 v:v:v, 15-19.55 min 45:10:45 v:v:v y se mantiene esta composición hasta el min 21.55, 21.55-22-min 50:0:50 v:v:v, 22-23 min 4:92:4 v:v:v, 23-27 min 2.5:95:2.5 v:v:v	UV (255 nm, 300 nm) ESI-MS (QqQ)	[234]
TU, MTU, PTU, PhTU, TAP, MBI	Tiroides	Acquity UPLC™ BEH C18	A: 0.1 % HCOOH en H ₂ O B: 0.1 % HCOOH en AcN Gradiente: 0 -2 min 100 % A, 2-8 min 50 % B y se mantiene esta composición hasta el min 9, 9-9.1 min 100 % A	ESI-MS (QqQ)	[236]
TAP	Productos farmacéuticos	Symmetry C18	AcN:2.5% azida de sodio:H ₂ O 20:50:30 v:v:v	UV-Vis por reacción con azida de sodio	[242]

Tabla I.12. Continuación.

Fármacos Tirostáticos	Muestra	Columna	Fase Móvil	Detección	Referencia
TU, MTU, PTU, PhTU, TAP	Tiroides y suero	LiChrosorb C18	A: AcN B: tampón fosfato (pH 3.0) Gradiente TU, MTU, PTU, PhTU: 0 min 100 % B, 0-9 min 99 % B, 9-35 min 66 % B Gradiente TAP: 0 min 95 % B, 0-20 min 65 % B	UV (258 nm, 276 nm)	[243]
TAP	Peces	Atlantis dC18	A: tampón fosfato (pH 6.7) B: MeOH Gradiente: 0 min 100 % A, 2-4 min 90 % A y mantener al 90 % A hasta el minuto 8, 8-10 min 100 % A	UV (220 nm, 255 nm)	[244]
PTU	--	Novapak C8	A: H ₂ O B: MeOH 70:30 v:v	UV (276 nm)	[245]
TAP	Orina	Zorbax SB-C18	A: ácido tricloroacético 0.05 M (pH 3.2) B: AcN Gradiente: 0-3 min 12 % B, 3-9 min 30 % B, 9-12 min 12 % B	UV (345 nm)	[246]
TU, MTU, PTU, PhTU, TAP, MBI	Tiroides	Acquity UPLCTM BEH C18	A: 0.1 % HCOOH en H ₂ O B: 0.1 % HCOOH en AcN Gradiente: 0-2 min 100 % A, 2-8 min 50 % B y se mantiene esta composición hasta el min 9, 9-9.1 min 100 % A	ESI-MS (QqQ)	[247]
PTU	Orina	Symmetry C18	AcN:2.5 % azida de sodio:H ₂ O 24:50:26 v:v:v	UV-Vis por reacción con azida de sodio	[248]
TAP	Orina	Symmetry C18	AcN:2.5% azida de sodio:H ₂ O 1:50:49 v:v:v	UV-Vis por reacción con azida de sodio	[249]

Tabla I.12. Continuación.

Fármacos Tiroestáticos	Muestra	Columna	Fase Móvil	Detección	Referencia
TU, MTU, PTU, PhTU, TAP	Orina y tiroides	Acquity UPLCTM BEH C18	A: H ₂ O:AcN:CH ₃ COOH 80:20:0.1 v:v:v B: H ₂ O:AcN:CH ₃ COOH 10:90:0.1 v:v:v Gradiente: 0-1 min 100 % A, 1-8 min incremento lineal hasta 100 % B, mantener 2 min y 10-11 min 100 % A	ESI-MS (QqQ)	[250]
MMI, PTU, Carb	Orina	Diasfer-110-C18	A: AcN B: tampon fosfato (pH 6.86) 25:75 v:v	UV (254 nm, 275 nm, 292 nm)	[251]
TAP	Muestras biológicas	Hypersil-ODS	A: MeOH B: 0.02 M KH ₂ PO ₄ 3:7 v:v	UV (254 nm)	[252]
TU, DMTU, MTU, PTU, ETU, PhTU, TAP, MBI	Orina	Acquity UPLC HSS T3	A: 0.1 % HCOOH en H ₂ O B: 0.1 % HCOOH en MeOH Gradiente: 0-1.65 min 95 % A, 1.65-5.2 min aumento lineal hasta 100 % B y mantener durante 0.5 min, 5.7-7.7 min 95 % A	ESI-MS (QqQ)	[253]
TU, MTU, PTU, PhTU, TAP	Orina bovina y porcina	Nucleosil 100-5 C18 AB	A: AcN B: 0.1 % CH ₃ COOH ESI-IT: 0-5 min A:B 15:85 v:v, 5-20 min 70:30 v:v, 20-35 min 15:85 v:v, 35-45 min 15:85 v:v ESI-QqQ: 0 min 30:70, 0-20 min 70:30 v:v, 20- 25 min 30:70 v:v, 25-30 min 30:70 v:v	ESI-MS (IT y QqQ)	[254]
PTU	Muestras biológicas	ODS-H C18	A: 10 mM acetato de amonio (pH 5.3) B: MeOH 50:50 v:v	UV (275 nm)	[255]

Finalmente, a lo largo de los últimos años, la problemática sobre los residuos de hormonas esteroideas en los alimentos ha despertado un gran interés debido fundamentalmente al impacto que los disruptores endocrinos tienen sobre la salud humana y el medioambiente [256, 257]. Así, y a pesar de que muchas hormonas esteroideas son naturales y cumplen una función vital en el organismo (por ejemplo en la reproducción) el consumo de elevadas concentraciones de las mismas a través de los alimentos supone un riesgo para la salud. Además, existen multitud de hormonas que son sintéticas y que no se deberían encontrar en la naturaleza, pero que han sido empleadas durante años con fines ilícitos, como por ejemplo para el engorde rápido del ganado, y que suponen también un gran riesgo para la salud.

La administración de promotores del crecimiento anabólicos en animales esta actualmente prohibido en la Unión Europea [226] debido, como se ha dicho, al riesgo potencial que representan para la salud humana [258]. Sin embargo, a veces se ignoran estas normativas con el fin de obtener beneficio económico en la cría del ganado. Una pequeña parte de estos compuestos es excretada y por tanto llega al medioambiente; sin embargo, la mayor parte de estos compuestos permanece en el animal. De esta manera, hay que considerar que el consumo de carnes y productos de origen animal, como la leche, puede ser una fuente importante de ingesta de hormonas esteroideas.

La leche es un alimento muy consumido mundialmente por su elevado valor nutricional. Sin embargo, en los últimos años se ha cuestionado su seguridad ya que puede constituir también una fuente muy importante de hormonas esteroideas [259] en la dieta humana pues contiene de forma natural algunos estrógenos como estrona (E1), estradiol (E2) o estriol (E3). Se ha observado que el consumo por parte de los seres humanos de altos contenidos de dichas hormonas puede estar estrechamente ligado a los problemas reproductivos que se conocen en la actualidad [260] o incluso, al desarrollo de algunos tipos de cáncer [261]. Además, también pueden aparecer otras hormonas esteroideas no-naturales, como por ejemplo dietilestilbestrol (DES) o etinilestradiol (EE2), que se han administrado al ganado durante su desarrollo con el fin de obtener el engorde rápido del animal.

Existen numerosos trabajos que han llevado a cabo la separación y determinación de hormonas esteroideas en muestras de leche tanto por GC como por HPLC. La GC, especialmente acoplada a MS, es una técnica que goza de gran popularidad en este campo y existen un gran número de trabajos bibliográficos que describen nuevas metodologías por esta técnica [262, 263]. Todos ellos, incluyen una etapa previa de derivatización de los analitos que supone un gran consumo de tiempo, por lo que la HPLC se presenta como una alternativa a la GC y de hecho, podemos encontrar algunos trabajos que emplean ya esta técnica para la determinación de hormonas esteroideas en leche [264-266]. La **Tabla I.13** agrupa los artículos publicados en relación a la determinación de hormonas esteroideas en leche por HPLC. En general, en estos trabajos se utiliza la SPE o la extracción líquido-líquido (con menos frecuencia) para la extracción de las hormonas y la MS como sistema de detección debido a las claras ventajas que ofrece especialmente en cuanto a sensibilidad, así como, con el fin de solucionar el posible problema de las coeluciones causado por la similitud estructural de la mayoría de las hormonas esteroideas que dificulta su separación cromatográfica. Sin embargo, teniendo en cuenta que uno de los retos más importantes para los químicos analíticos hoy en día es el desarrollo de protocolos de extracción, purificación y preconcentración de los analitos presentes en muestras reales y que uno de los campos de investigación más novedoso es el desarrollo de nuevos materiales que puedan ser empleados con este fin, este ha constituido uno de los objetivos del trabajo de investigación recogido en esta memoria con el fin de desarrollar nuevas metodologías analíticas sencillas por HPLC-UV para la separación de mezclas de hormonas esteroideas.

Tabla I.13. Métodos analíticos para la separación y determinación de hormonas esteroideas en leche por HPLC.

Hormonas Esteroideas	Muestra	Extracción	Columna	Fase móvil	Detección	Ref.
Pregnenolona, progesterona, 17-hidroxi-pregnenolona, 17-hidroxi-progesterona	Leche bovina	Extracción líquido-líquido	Synergi Fusion RP	A: 0.1 % HCOOH en H ₂ O B: 0.1 % HCOOH en MeOH Gradiente: 0-3 min 90 % A, 3-8 min bajar a 20 % A, 8-11 min subir a 50 % A, 11-19 min subir a 90 % A	ESI-MS/MS (Q-Trap)	[264]
17 β -estradiol, estriol, Estrona, dietilstilbestrol, etinilestradiol, hexestrol, dienestrol, testosterona, metiltestosterona, estanzolol, trembolona, nandrolona	Leche	SPE con cartuchos HLB	Capcell Pak phenyl column	A: ACN o MeOH B: H ₂ O Gradiente: 0-3 min 35 % A, 3-27 min subir a 100 % A y mantener 5 min, 32-33 volver a 35 % A	ESI-MS/MS (QqQ)	[265]
Estrona, estradiol, estriol, 16-epiestriol, 2-metoxiestrona, 4-metoxiestrona, 2-metoxiestradiol, 4-metoxiestradiol, 2-hidroxiestrona, 2-hidroxiestradiol 4-hidroxiestrona	Leche y productos lácteos	Extracción líquido-líquido	Synergi Hydro-RP	A: MeOH B: 0.1 % HCOOH en H ₂ O Gradiente: 0 min 72 % B, 0-75 min incremento lineal hasta 85 % B	ESI-MS/MS (QqQ)	[266]
Testosterona, progesterona, estriol, estradiol, etinilestradiol, estrona, dietilstilbestrol	Leche	SPE con cartuchos GCB	Acquity UPLC BEH C18	A: 0.1 % HCOOH en H ₂ O B: MeOH Gradiente: 0 min 65 % A, 0-4 min baja a 50 % A, 4-4.5 min bajar a 0 % A y mantener hasta 7 min, 7-7.5 min bajar a 50 %	ESI-MS/MS (QqQ)	[267]
Estrona, 17 β -estradiol, estriol, etinilestradiol, dietilstilbestrol	Leche bovina	SPE en línea con un relleno C30	Symmetry-C18	Cuatro fases móviles para llevar a cabo la extracción on-line y la separación simultáneamente	ESI-MS (Q)	[268]

Tabla I.13. Continuación .

Hormonas Esteroides	Muestra	Extracción	Columna	Fase móvil	Detección	Ref.
Estrona, 17 β -estradiol, estriol, etinilestradiol	Leche	SPE con cartuchos HLB y NH ₂ acoplados	Betabasic C18	A: NH ₄ OH 5 mM:MeOH 96:4 v:v B: NH ₄ OH 5 mM:MeOH:ACN 10:10:80 v:v:v Gradiente: 0-2 min 100 % A, 2-14 min gradiente lineal hasta 0 % A y mantener 3 min, 17-18 volver a 100 % A	ESI-MS/MS (QqQ)	[269]
Estrona, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, estriol	Leche natural y procesada	SPE con cartuchos C18	Luna C18	A: ACN:H ₂ O:ácido fórmico 40:60:0.40 v:v:v B: ACN:H ₂ O:ácido fórmico 90:10:0.40 v:v:v Gradiente: 0-1 min 100 % A, 1-10 min gradiente lineal hasta 0 % A y mantener durante 14 min.	APCI-MS/MS	[270]
Medroxiprogesterona acetato, melengestrol acetato, megestrol acetato, delmadinona acetato, clormadinona acetato, metilboldenona, metiltestosterone, fluoximesterona, α -trenbolona, β -trenbolona, 16 β -hidroxi estanozol, dienestrol, hexestrol, dietilestilbestrol, etinilestradiol, flumetasona	Leche bovina	Extracción en fase sólida dispersiva con partículas C18	Eclipse Plus C18	A: Acetato amónico 0.5 mM:MeOH 70:30 v:v B: Acetato amónico 0.5 mM:MeOH 5:95 v:v Gradiente: 0-1 min 75 % A, 1-3 min bajar a 50 % A, 3-4 min bajar a 25 % A y mantener durante 1 min y finalmente 5-6 min volver a condiciones iniciales.	ESI-MS/MS (QqQ)	[271]

Tabla I.13. Continuación .

Hormonas Esteroideas	Muestra	Extracción	Columna	Fase móvil	Detección	Ref.
Estrona, estradiol, estriol, dienestrol, hexestrol, dietilestilbestrol, etimilestradiol	Leche	Extracción en fase sólida con nanopartículas de magnetita/ polipirrol	Shim-pack VP-ODS	ACN:H ₂ O 50:50 v:v	ESI-MS/MS (QqQ)	[272]
Progesterona, androstenediona, testosterona-17 β , testosterona-17 α , 19 nor-androstenediona, 19 nor-testosterona-17 β , 19 nor-testosterona-17 α , estrona, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, estriol	Calostro bovino	Extracción líquido-líquido	Estrógenos: Acquity UPLC BEH Andrógenos y progesterona: Luna C18	Estrógenos: A: 0.1 % NH ₄ OH en H ₂ O B: 0.01 % NH ₄ OH en MeOH Gradiente: 0-0.5 min 30 % B, 0.5-6 min subir a 80 % B, 6-7 min subir a 95 % B y mantener un minuto, 8-8.1 bajar a 30 % B y mantener hasta el minuto 10 Andrógenos y progesterona: A: 0.007 % HCOOH en H ₂ O B: 0.007 % HCOOH en MeOH Gradiente: 0 min 65 % B, 0-20 min subir a 100 % B y mantener durante 10 min, 30-30.1 65 % B y mantener hasta el minuto 45	ESI-MS/MS (QqQ) (estrógenos) ESI-MS/MS (QqQ) (andrógenos y progesterona)	[273]
Cortisol, hidrocortisona acetato, cortisona, cortisona acetato, dexametasona, betametasona, flumetasona, prednisolona, prednisolona acetato, metilprednisolona, prednisona, triamcinolona	Leche bovina	SPE con cartuchos C18	Alltima C18	A: ACN B: H ₂ O Gradiente: 0-10 min 65 % B, 10-20 min bajar a 40 % B y finalmente bajar en 0.1 min hasta 0 % B y mantener durante 5 min	ESI-MS/MS (QqQ)	[274]

Artículo 1

“Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids”

V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina

Journal of Chromatography A 1217 (2010) 968-989

Artículo 2

“Chiral separation of agricultural fungicides”

V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina

Journal of Chromatography A 1218 (2011) 6561-6582

Artículo Científico 1

“Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids”

V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina

Journal of Chromatography A 1217 (2010) 968-989



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Review

Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids

Virginia Pérez-Fernández, María Ángeles García, María Luisa Marina*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Alcalá. Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 31 October 2009

Keywords:

Chiral analysis

Pyrethroids

Capillary electrophoresis

High performance liquid chromatography

Gas chromatography

Sub or supercritical fluid chromatography

ABSTRACT

Pyrethroids are synthetic pesticides that originated from the modification of natural pyrethrins to improve their biological activity and stability. They are a family of chiral pesticides with a large number of stereoisomers. Enantiomers of synthetic pyrethroids present different insecticidal activity, toxicity against aquatic invertebrates and persistence in the environment so the development of rapid and sensitive chiral methods for the determination of different enantiomers is necessary. Several techniques have been employed for this purpose including gas chromatography, high performance liquid chromatography or more recently capillary electrophoresis and sub or supercritical fluid chromatography. A general view on the different chiral separation methods applied to the analysis of pyrethroids and the most important information about these pesticides is provided in this review.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	968
2. Chemical characteristics and classification	969
3. Insecticidal activity and toxicology	975
4. Environmental behaviour	976
5. Enantiomeric analysis	977
5.1. Sample preparation	977
5.2. Separation and determination	977
5.2.1. Gas chromatography	977
5.2.2. High performance liquid chromatography	979
5.2.3. Capillary electrophoresis	985
5.2.4. Subcritical and supercritical fluid chromatography	988
6. Concluding remarks and future trends	989
Acknowledgements	989
References	989

1. Introduction

Separation of chiral compounds is an interesting and challenging topic of research in many analytical chemistry areas, especially in pharmaceutical, biomedical, and environmental fields where pure enantiomeric forms are widely required [1,2]. It is already well-known that enantiomers, in spite of their very similar structure, when exposed to an identical biological environment can show very different biological activity.

Pesticides in general and especially insecticides, are considered a class of important pollutants that are widespread over the envi-

ronment. About 25% of the existing agrochemicals contain chiral centers and are produced and used as racemic mixtures [3]. In some cases, only one of the isomers of the pesticide is active, while the other may have less activity or even toxic effects against non-target organisms; unfortunately, no such specific studies are routinely required for active substances constituted by isomeric mixtures [4]. Another fact that has to be taken into account is that when racemic mixtures are used as pesticides, the enantiomers are often degraded at different rates [5]. Therefore, the chiral separation of pesticides is necessary in order to optimize enantioselective production processes, assessing the enantiopurity of formulations and monitoring their presence in the environment or into different types of matrices.

The use of insecticides in agriculture is growing at a high speed due to the rise in the productivity. There are different types of insect-

* Corresponding author. Tel.: +34 91 8854935; fax: +34 91 8854971.
E-mail address: mluisa.marina@uah.es (M.L. Marina).

ticides including organophosphorous, carbamates, organochloride, etc., but nowadays, pyrethroids are the most frequently used insecticides. Furthermore, it is expected to be even more important in the future given increasing restrictions on organophosphorous pesticides [6]. Pyrethroids are used worldwide as insecticides in agriculture, forestry, households, public health and stored products [7,8]. They act on the axons in the nervous systems, interact with the sodium channels and affect the electric impulse transmission. This stimulates the nervous cells and produces several electric shocks producing a total paralysis of the insect [9]. These chemicals are much less toxic for mammals than organophosphorous and carbamate compounds but they present an acute toxicity for a wide range of aquatic organisms and honeybees at low concentrations [10]. Pyrethroids are known to be strongly adsorbed to soil particles. However, this is not likely to render them immobile post-application, because they can be moved in runoff with soil particles to which they are attached, and end up in sediments [6]. Once in sediments, they can enter in aquatic ecosystems [11] and be bioavailable to the aquatic food web [12,13]. For this reason they have a devastating effect on aquatic invertebrates, with a median lethal concentration (LC₅₀) lower than 1 ppb [14].

One of the most significant differences of pyrethroids in comparison with many other pesticides is that most of them have one to three chiral centers [11]. Pyrethroids constitute the 20% of the insecticides used in the world [15], but only 6% of the market products are sold as single isomers [3]. Usually, pyrethroid insecticide formulations are mixtures of isomers [16]. These compounds show enantiomeric selectivity, with biological activity generally residing in only one of the enantiomers. This enantioselectivity phenomenon has important implications in the manufacture and use of chiral agrochemicals in general [17]. Thus, there is an increasing need for rapid separation methods for the determination of enantiomers of pyrethroids.

The most important information on chiral pyrethroids (chemical characteristics, classification, insecticide activity, toxicology and environmental behaviour) and the chiral separation techniques employed in their determination have been reviewed in this article.

2. Chemical characteristics and classification

Pyrethroids are synthetic pesticides obtained in 1949 from the modification of natural pyrethrins to improve their biological activity and stability [7]. In nature there are six different pyrethrins that can be classified in two different groups (Table 1): crysantemic acid esters derivatives (group I) and pyrethric acid esters derivatives (group II). As it can be observed in Table 1, all of them have the same structure and differ only in the substituents.

Pyrethroids can be classified in two different ways: (1) according to the time they were synthesized [18] or (2) according to their chemical nature [19]. Table 2 groups the synthetic pyrethroids and the derivatives more used in the world. In this table the structure, the number of stereoisomers and the generation and type of pyrethroids are given according to the different classifications.

Pyrethroids can have one, two or three chiral centers so they present two, four or eight stereoisomers respectively [20] (see Table 2). This property makes synthetic pyrethroids the pesticide group with one of the highest chirality [21]. Some pyrethroids are synthesized optically pure for example deltamethrin or bioresmethrin while even some pyrethroids are sold as enantiomerically enriched products such as in the case of allethrin, cyhalothrin, or cypermethrin [15]. Stereochemistry affects not only the insecticidal activity of pyrethroids but also toxicity against non-target organisms [8,11,22–24] and distribution in the environment [11,13,25–30]. However, the low availability of single enantiomer

Name	Formula	R ₁	R ₂	MW	Group I		Group II	
					Pyrethrin I	Pyrethrin II	Jasmoline I	Cinereine II
					<chem>C21H28O3</chem> <chem>CH3</chem> <chem>CH2CH=CHCH=CH2</chem> 328.4	<chem>C27H38O5</chem> <chem>COOCH3</chem> <chem>CH2CH=CHCH=CH2</chem> 372.4	<chem>C27H38O5</chem> <chem>COOCH3</chem> <chem>CH2CH=CHCH2CH3</chem> 360.4	<chem>C27H36O5</chem> <chem>COOCH3</chem> <chem>CH2CH=CHCH3</chem> 374.4
					<chem>C29H36O3</chem> <chem>CH3</chem> <chem>CH2CH=CHCH3</chem> 330.4	<chem>C29H36O3</chem> <chem>CH3</chem> <chem>CH2CH=CHCH3</chem> 330.4	<chem>C29H36O3</chem> <chem>CH3</chem> <chem>CH2CH=CHCH3</chem> 316.4	

Table 1
Structure of natural pyrethrins.

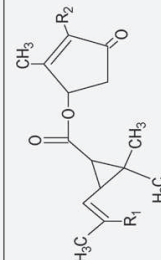


Table 2
Structure and classification of pyrethroids.

Structure	Name (number of stereoisomers)	Derivatives (number of stereoisomers)	R ₁	R ₂	Generation according to developing time
	Acrinathrin (8) ^a				4
	Cyhalothrin (8) ^a	γ-Cyhalothrin (1) λ-Cyhalothrin (2)			4
	Cypermethrin (8) ^a	α-Cypermethrin (2) β-Cypermethrin (4) θ-Cypermethrin (2) ζ-Cypermethrin (4)			4
	Cyphenothrin (8) ^a				4
	Deltamethrin (1) ^a				4
	Permethrin (4) ^a	Biopermethrin (1) Transpermethrin (2)			3
	Phenothrin (4) ^a				2
	Flumethrin (8) ^a				4


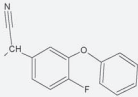

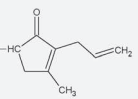

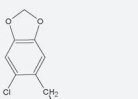

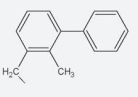

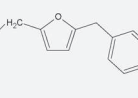

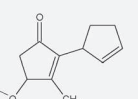

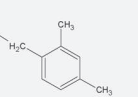
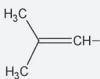
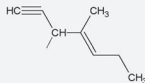

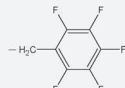

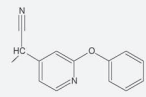
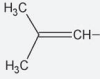
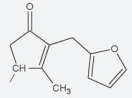
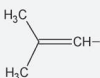
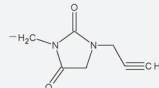
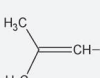
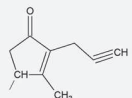
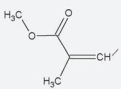
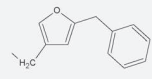
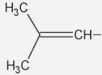
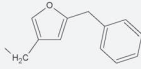
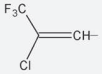
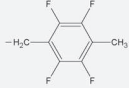
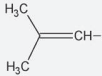
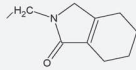
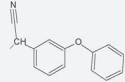

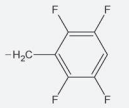
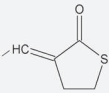
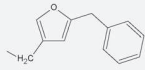
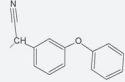

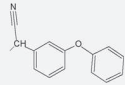
Cyfluthrin (8) ^a	β-Cyfluthrin (4)			4
Allethrin (8) ^a	Bioallethrin (2)			1
Barthrin (4) ^a				4
Bifenthrin (4) ^a				4
Bioetanomethrin (4) ^a				4
Cyclethrin (8) ^a				4
Dimethrin (4) ^a				4

Table 2 (Continued)

Structure	Name (number of stereoisomers)	Derivatives (number of stereoisomers)	R ₁	R ₂	Generation according to developing time
	Empenthrin (8) ^a				4
	Fenfluthrin (4) ^b				4
	Fenpirithrin (8) ^a				4
	Furethrin (8) ^a				4
	Imiprothrin (4) ^a				4
	Prallethrin (8) ^a				4
	Pyresmethrin (4) ^a				4

				2
Resmethrin (4) ^a	Bioresmethrin (1) Cismethrin (2)			
				4
Tefluthrin (4) ^a				
				2
Tetramethrin (4) ^a				
		$-\text{CHBr}-\text{C}(\text{Br})_3$		4
Tralomethrin (1) ^a				
				4
Transfluthrin (4) ^a				
				4
Kadethrin (2) ^a				
		$-(\text{CH}_3)_2$		4
Fenpropathrin (2) ^a				
				3
Fenvalerate (4) ^a	Esfenvalerate (1)			

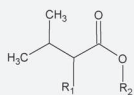
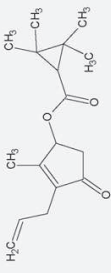
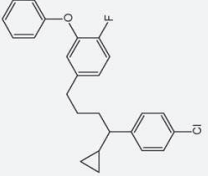


Table 2 (Continued)

Structure	Name (number of stereoisomers)	Derivatives (number of stereoisomers)	R ₁	R ₂	Generation according to developing time
R ₁ -CH ₂ -O-CH ₂ -R ₂	Flucythrinate (4) ^a				4
	Fluvalinate (4) ^a	<i>trans</i> -Fluvalinate (2)			4
	Brofluthrin (4) ^a				4
	Etofenprox (1) ^b				4
	Flufenprox (2) ^b				4
	Halfenprox (1) ^b				4
		Cycloprothrin (4) ^a			

Table 2 (Continued)

Structure	Name (number of stereoisomers)	Derivatives (number of stereoisomers)	R ₁	R ₂	Generation according to developing time
	Terallethrin (2) ^a				4
	Protifenbutire (2) ^c				4

^a Ester pyrethroids.^b Ether pyrethroids.^c Non-ester pyrethroids.

standards limits the ability to conduct enantiomer specific toxicity studies [15].

3. Insecticidal activity and toxicology

Pyrethroid toxicity is highly dependent on stereochemistry and each isomer has its own toxicity [8]. It has been reported that the toxicity of pyrethroids is dependent on the configuration of the chiral carbon adjacent to the carboxylic group [31]. For example, permethrin enantiomers having the *R* configuration at this carbon are about 25 times more toxic to houseflies than those with the *S* configuration [32]. Fenvalerate enantiomers having the *S* configuration at this carbon (spatially equivalent to the *R* configuration in the dimethylcyclopropanecarboxylic acids) are 10–100 times more toxic to houseflies than those with the *R* configuration [31] and the same has been observed for fluralinate [17]. Also, the toxicity of the insecticides having a chiral cyano-substituted benzylic carbon present in the 3 phenoxybenzyl alcohol portion of the molecule (e.g., fenvalerate or cypermethrin) are affected by the configuration of this chiral carbon, with the *S* configuration being more toxic to houseflies by a factor of 20–100 [33]. Furthermore, in general the *cis* isomers are more toxic than the *trans* ones. Acute toxicity of a mixture of two isomers depends on the ratio of amounts of the two isomers in the formulation. For example, the female rat acute oral LD₅₀ of permethrin increases from 224 mg/kg of bodyweight to 6000 mg/kg as the proportion of the *trans* isomer increases from 20 to 80% [8].

In many cases there is only one active enantiomer in the formulation. This is the case of cypermethrin whose insecticidal activity is only associated to 1*R*,*cis*, α *S* and 1*R*,*trans*, α *S* and the other six isomers have been demonstrated to be inactive [34]. Furthermore, from the two active isomers the *cis* one is much more persistent in soil. In conclusion, the employment of the racemic mixture is illogical because useless isomers are applied to the environment and bigger amounts of product are needed compared to the use of optically pure product [6]. In another sense, formulations made of a single isomer (for example, deltamethrin) are likely to be much more effective than those with four to eight isomers [8].

Pyrethroids are not toxic for mammals but their lethal doses for aquatic invertebrates are very low. For instance, the LC₅₀ of *cis*-bifenthrin against *Ceriodaphnia dubia*, a commonly used indicator for invertebrate toxicity, is only 0.078 mg/L and that of permethrin is 0.550 mg/L [35].

The toxicity against aquatic invertebrates may also be enantioselective. Significant differences were observed in LC₅₀ for the eight isomers of cypermethrin, with two enantiomers at least 10 times more toxic [22]. The commercial formulation of bifenthrin is made with the *cis* enantiomers: 1*R*-*cis*-bifenthrin and 1*S*-*cis*-bifenthrin. In this case (*cis*-bifenthrin) the toxicity of (1*R*)-bifenthrin is greater than that of (1*S*)-bifenthrin for *Daphnia* and fish [23]. Regression of the survival rate of *Ceriodaphnia dubia* neonates with the initial pesticide concentration gave LC₅₀ values of 0.079 ± 0.018 and 0.144 ± 0.026 mg/L for 1*R*-*cis*-bifenthrin and the racemic *cis*-bifenthrin, respectively. The difference in the measured toxicity suggests that 1*R*-*cis*-bifenthrin was probably the only active isomer in *cis*-bifenthrin for causing toxicity to *Ceriodaphnia dubia* [11,22].

The same pattern has been observed for permethrin [11]. Formulations of permethrin are made of equal ratios of *cis*-(1*R*,*cis* and 1*S*,*cis*) and *trans*-permethrin (1*R*,*trans* and 1*S*,*trans*). Toxicity assays yielded similar LC₅₀ values for *cis*-permethrin (0.540 ± 0.055 mg/L) and *trans*-permethrin (0.519 ± 0.058 mg/L) diastereomers which was consistent with the previously reported value of 0.550 mg/L for the permethrin mixture. Because of the lack of standards for permethrin enantiomers, the measured biological activity was not related experimentally to the individual stereoisomers. However,

given the great similarities in the chemical structure between bifenthrin and permethrin and the fact that chirality for both compounds originates from C1 and C3 on the cyclopropane ring, it is reasonable to assume that as with *cis*-bifenthrin, the aqatically active enantiomer in *cis*-permethrin was probably 1*R*,*cis*-permethrin.

Xu et al. [24] reported the aquatic toxicity of enantiomers of λ -cyhalothrin. λ -Cyhalothrin is the form of cyhalothrin mainly used in the commercial formulations to control mosquitoes, flies, etc. It contains only two of the eight isomers of the pyrethroid: 1*R*,*cis*, α S and 1*S*,*cis*, α R, that are considered the most active. Although the activity against target organisms is the same, the toxicity of the two enantiomers differs a lot. Enantioselectivity in acute aquatic toxicity was evaluated via 96 h toxicity tests using *zebrafish*. Significant differences in LC₅₀ were observed for the two isomers being the (–)-enantiomer 60 times more toxic after 24 h test and 162 times more toxic after 96-h exposure than the (+)- λ -cyhalothrin. Finally, for cycloprothrin, the insecticidal activity of 1*R*, α R towards larvae of *Mythimaseparata* and *Aphismedicagini* is respectively six times and four times higher than that of the racemate [36].

4. Environmental behaviour

In the environment, pyrethroids are usually degraded by one or more biotic and abiotic processes: metabolic degradation by plants, animals, and microorganisms and degradation by light [8]. Degradation may be enantioselective, resulting in different distribution patterns and bioaccumulation potentials between enantiomers [21].

To interpret the enantioselective degradation of environmental pollutants the enantiomeric ratio is usually defined as (ER = (+)-enantiomer/(–)-enantiomer), the enantiomeric fraction (EF = Area₁/(Area₁ + Area₂)) or the enantiomer ratio doubling time (T_{ER} = 2) [13]. If a chiral contaminant is applied as racemate its EF is 0.5, and any deviation of this value in environmental samples is a direct indicator of bioactivity of the given chiral compound. The comparison of concentration of individual enantiomers or the change in the stereoisomeric profiles can also be used for this purpose [13].

After pyrethroids based insecticide application, the *trans* isomer is generally degraded faster than the *cis* isomer [15]. Moreover, in some cases it has been demonstrated that the less active enantiomer persists in the environment for much more time than the enantiomer with more insecticidal activity. The direction of the enantioselective degradation can be influenced by the sampling location and environmental conditions [13]. This may be because there are variations in the microbial population as a result of pH, soil oxidation state, etc. [26].

Morgan et al. [37] determined the EF of *cis*-permethrin after application to prove the enantioselective degradation of the pesticide. The samples analyzed were dust, floor surface wipes and food preparation wipes. The EF values for *cis*-permethrin obtained ranged from 0.412 to 0.535 in all samples so it proves that there is enantioselective degradation. The same degradation pattern for permethrin was observed by Qin and Gan [27] in soil and sediments.

In this case, the degradation products for *cis*-permethrin were more persistent than those for *trans*-permethrin.

Due to the similarities in the structure of permethrin and bifenthrin, similar behaviour was observed in their degradation in sediments as shown in Fig. 1. A preferential degradation of the (–)-enantiomer of *cis*-bifenthrin resulted in a relative enrichment of the aqatically active (+)-enantiomer [29]. The same pattern was observed by Liu and Gan in water [38]. A preferential degradation of the 1*S*,*cis* enantiomer over 1*R*,*cis* enantiomer for (*Z*)-*cis*-bifenthrin and *cis*-permethrin in water was shown.

Liu et al. demonstrated the enantioselective degradation of bifenthrin, permethrin, cypermethrin and cyfluthrin in soil and sediments [26,30]. Both, soil and sediment were collected in the southern California region from the 0–10 cm surface layer. By comparing the chromatograms of the standards and soil and sediment samples, clear enantioselective degradation could be observed. However, the environmental conditions such as the season were important parameters in the degradation of synthetic pyrethroids.

Studies using 14C-labeled isomers showed that significantly faster degradation occurred with the *trans* diastereomers than with the corresponding *cis* diastereomers, and in the same diastereomeric pair, with the *R,S*-enantiomer than with the corresponding *R,R*-enantiomer of cypermethrin [39]. Under laboratory controlled conditions several studies demonstrated the same degradation trends [13]. Cypermethrin was spiked in sediment from Irvine, Canada with no cypermethrin residue in origin. The samples were stored at room temperature under aerobic conditions and changes in isomer composition were determined. The results showed that the *cis* pair of enantiomers was considerably more persistent than the *trans* one [40].

Isomer conversion or enantiomerization is another important process that may occur with pyrethroids [13]. There are several factors (e.g., heat, water, light, microorganisms) that can induce the enantioselective degradation or isomer conversion of pyrethroids. Liu et al. [28] reported the chiral stability of *cis*-bifenthrin, permethrin, cypermethrin and cyfluthrin during gas chromatography analysis, where high temperatures are needed and different solvents are used for sample preparation. In nature, the most important solvent is water so the study of the chiral stability in this medium is also important. Only temperatures above 180 °C were enough to show isomer conversion in some cases. Pyrethroids with chirality only in the cyclopropyl ring (bifenthrin and permethrin) were found to be stable, but those with α C (cypermethrin and cyfluthrin) were unstable and gave an epimer. In organic solvents such as hexane, ethyl acetate and dichloromethane, and in sterile water, stereoisomers of *cis*-bifenthrin and permethrin did not show any isomer conversion. However for cypermethrin and cyfluthrin, when exposed to water a slow enantiomerization was observed.

Compared with natural pyrethrins, pyrethroids have an enhanced stability under light. However, photochemical reactions are very common. Holmstead et al. [41] observed that when permethrin was irradiated with UV light ($\lambda > 290$ nm) or sunlight the isomers underwent an extensive isomerization of the cyclo-

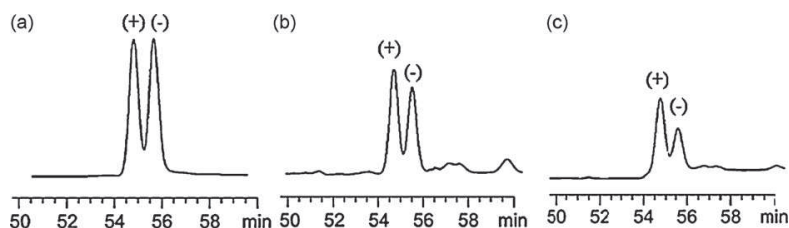


Fig. 1. Chiral GC chromatograms of *cis*-bifenthrin in sediments from different depths. (a) 0–15 cm, (b) 15–30 cm, and (c) 30–45 cm. Reprinted with permission from Ref. [29].

propane ring. Maguire [13,42] performed the evaluation of the isomerization of deltamethrin (1*R*,*cis*, α *R*) in hexane under bright summer sunshine for 5 days. The treatment resulted in the formation of 1*S*-*cis*- α *S*, 1*R*-*trans*- α *S* and 1*S*-*trans*- α *R*. No isomerization was observed when samples were stored in hexane in the dark so this effect was probably due to the light. However, this situation does not occur always, sometimes solvents can induce this epimerization [12,34].

In other studies the isomerization of some pyrethroids in water was observed even without light. Maguire [42] in a study on deltamethrin stability, observed the isomerization of 1*R*,*cis*, α *S* to 1*S*,*cis*, α *S*. However, no isomer conversion occurred for *cis*-bifenthrin and permethrin [13,28]. In the case of cyfluthrin interconversion from *trans* to *cis* isomer was observed after incubation in soil. This leads to a time dependent variation of the isomeric ratio of permethrinic acids in the soil extracts [43].

5. Enantiomeric analysis

5.1. Sample preparation

Sample treatment can be the most laborious part of every analytical methodology. Frequently, when real samples are analyzed, the components of interest are present at levels too low for their detection. Therefore, previous preconcentration of the analytes is required in order to make their concentration adequate to the separation technique employed. In the case of pyrethroids, their low levels in environmental samples make necessary the use of this type of procedures. Different extraction techniques have been employed for this purpose including solid-phase microextraction (SPME), solid-phase extraction (SPE), liquid-liquid extraction (LLE), supercritical fluid extraction (SFE), and micro solid-phase dispersion extraction (MSPD) enabling the chiral determination of pyrethroids in several matrices such as soil, water, sediments or biological samples.

The extraction techniques mainly employed previous enantiomeric determination of pyrethroids in soil, water, sediments and biological samples (*Ceriodaphnia dubia*) by GC were mainly SPME and LLE. Liu and Gan [38] developed a SPME method for the extraction of *cis*-bifenthrin and *cis*-permethrin from water samples. The SPME methodology was carefully optimized to obtain as good recuperation as possible for the studied analytes. Factors like sampling time, temperature and organic solvents used were the most important parameters to be optimized. The comparison of SPME with LLE for the two above-mentioned pyrethroids indicated a clear higher selectivity of the first one in the extraction of these compounds. However, when cypermethrin and cyfluthrin were determined by the same authors in water [21] and sediments [29] samples, LLE with ethyl acetate or acetone:hexane (1:1, v/v) was the extraction technique chosen. A very similar procedure was followed for the extraction of bifenthrin, permethrin, cypermethrin and cyfluthrin from soils [26]. In the case of biological matrices like *Ceriodaphnia dubia* [11] a more laborious extraction method was required for the determination of bifenthrin and permethrin. Several consecutive LLE steps were performed with different solvents before GC analysis.

HPLC has been the most employed technique to achieve the chiral separation of synthetic pyrethroids. Several extraction techniques have been applied previous to HPLC analysis of pyrethroids in environmental (soil and water) samples. Although the extraction from soil has been mainly achieved by LLE, MSPD was also employed for this purpose [30]. When using LLE for soil samples different solvents were tested: hexane, acetone, methanol and mixtures of them. Each author has his own methodology for

the extraction. Chapman [31] performed the extraction of cypermethrin by adding acetone to the soil that after evaporation was redissolved in hexane. The extract was transferred to a silica Sep-Pak cartridge to preconcentrate the analyte. Qin and Gan [25] performed the extraction of permethrin by LLE with a mixture of acetone:hexane (1:1, v/v). When water samples were analyzed, SPE with C-18 cartridges enabled the determination of τ -fluvinate and permethrin [44]. The initial volume of 500 mL of water was passed through the cartridge and eluted three times with a total volume of 50 mL of n-hexane. The extract was then dried and evaporated to dryness and the residue was redissolved in 1 mL of n-hexane. Finally, a MSPD methodology was used by Li et al. [30] for the extraction of β -cypermethrin and β -cyfluthrin from soils. In this case, soil samples were placed into a mortar and Florisil adsorbent and distilled water were added. Once the mixture was homogenized, it was introduced into a glass chromatographic column and a mixture of n-hexane/ethyl acetate was added and allowed to elute dropwise by gravity. The initial 15 mL eluent was collected and blown to dryness with nitrogen. The final residue was dissolved in the HPLC mobile phase (n-hexane:propan-2-ol, 100:0.1, v/v) and subjected to HPLC analysis.

The limited LODs achieved with the CE methodologies require good preconcentration methodologies. Water samples containing bioallethrin, fenpropathrin and phenothrin were extracted by SPE with Oasis HLB cartridges (Waters Corp. Milford, MA) [17]. Moreover, the extraction of fenpropathrin, fenvalerate and fluvinate from a cellulose matrix by SFE with supercritical CO₂ was also reported [7].

5.2. Separation and determination

5.2.1. Gas chromatography

GC has been widely used for the enantioseparation of several insecticides and environmental pollutants mainly due to the low LODs achieved in general by GC compared with other techniques [2,45]. The direct separation involving the use of chiral stationary phases (CSP) usually based on cyclodextrins (CD) is the most commonly approach used. However, the main problems are the high cost of this type of columns, large time of analysis and the thermal instability of some pesticides [16].

There are several works in which GC is employed for the chiral separation of pyrethroid pesticides (see Table 3). Kutter and Class [46] carried out the separation of the enantiomers of allethrin and cypermethrin. For allethrin resolution, a CDX-B chiral column (permethylated- β -CD) (J&W, Folson, CA, USA) coupled to an achiral DB 1701 (14% cyanopropyl phenyl methyl polysiloxane) (J&W, Folson, CA, USA) column was employed. The enantioresolution of *trans* isomers was achieved but *cis* isomers were not separated. Diastereomeric but not enantiomeric selectivity by GC was achieved for cypermethrin with an apolar DB 5 column (5% phenyl)-methylpolysiloxane) (J&W, Folson, CA, USA). The separation was applied to study the composition of cypermethrin in insecticidal formulations (Ripcord) and to compare with the extracts obtained after forestry application.

Nie et al. [47] performed the enantiomeric separation of some ester pyrethroids with different chiral stationary phases: permethylated- β -CD (PM- β -CD), heptakis (2,6-di-O-butyl-3-O-butyl)- β -CD (DBB- β -CD), heptakis (2,6-di-O-nonyl-3-O-trifluoroacetyl)- β -CD (DNT- β -CD), the mixture of PM- β -CD and DBB- β -CD and the mixture of PM- β -CD and DNT- β -CD. With CSPs containing the mixtures of derivatized cyclodextrins, the enantiomeric separation was improved significantly for some compounds when compared with the single cyclodextrin CSPs derivatives. Synergistic effects were observed for some racemate compounds on the mixed cyclodextrin derivative CSPs. In general, the best resolution was obtained with PM- β -CD+DBB- β -CD

Table 3
Chiral separation of pyrethroids by GC.

Pyrethroid	Matrix	Separation conditions	Sample preparation/comments	References
Allethrin Cypermethrin	Ripcord (CP) formulation in extracts of bark	Allethrin CSP: CDX-B + DB1701 columns 170 °C isothermal program Cypermethrin CSP: DB 5 T program: 70 °C (1 min), 30 °C/min to 220 °C, 1 °C/min to 240 °C Detection: ECD, 310 °C	Higher photostability was observed for <i>trans</i> isomers of cypermethrin after forestry applications. Only partial resolution Analysis time Cypermethrin ≈ 13 min Allethrin ≈ 75 min	[46]
- Chrysanthemic methyl ester - Chrysanthemic l-methyl ester - Permethrinic methyl ester - 2,2-dimethylcyclopropane carboxylic methyl ester - 3-(2,2,2-trichloroethyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic ethyl ester	–	CSP PM-β-CD DBB-β-CD DNT-β-CD PM-β-CD + DBB-β-CD PM-β-CD + DNT-β-CD Detection: FID, 250 °C	Different CDs and CD combinations CSPs were tested	[47]
cis-Bifenthrin cis-Permethrin	Water	CSP: BGB 172 T program: Initial hold at 180 °C for 2 min, ramped at 1 °C/min to 230 °C until elution Detection: ECD, 310 °C	On-line SPME with 100 μm layer PDMS fiber. Fiber was introduced in the sample 2.0 cm from the surface and it was desorbed in the GC inlet during 3.0 min Analysis time cis-Bifenthrin ≈ 78 min cis-Permethrin ≈ 51 min	[38]
cis-Bifenthrin cis-Permethrin	Field sediments	CSP: BGB 172 column T program: 180 °C for 2 min, ramp at 5 °C/min to 230 °C and held at this T until complete elution. Detection: ECD, 310 °C	LLE with acetone:hexane (1:1, v/v) No interconversion of enantiomers was observed	[29]
Cypermethrin Cyfluthrin	Water and sediments	CSP: BGB 172 column T program: 160 °C for 2 min, ramp at 1 °C/min to 220 °C, held at this T for 60 min, ramped at 5 °C/min to 230 °C, held at 230 °C till complete elution Detection: ECD, 310 °C	LLE with ethyl acetate and after evaporation the extract was redissolved in 4.0 mL acetone:hexane (1:1, v/v) Only partial resolution of six peaks Analysis time Cypermethrin ≈ 145 min Cyfluthrin ≈ 134 min	[21]
Bifenthrin Permethrin	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CSP: BGB 172 column T program: 180 °C (2 min), ramp at 5 °C/min to 230 °C, followed by an isothermal hold at 230 °C until elution Detection: ECD, 310 °C	LLE with ethyl acetate and after evaporation the extract was redissolved in 4.0 mL acetone:hexane (1:1, v/v) No resolution for <i>trans</i> -permethrin Extraction of the samples with ethyl acetate Analysis time cis-Bifenthrin ≈ 55.5 min cis-Permethrin ≈ 88.5 min	[11]
cis-Bifenthrin Permethrin Cypermethrin Cyfluthrin	–	CSP: BGB 172 column T program: 160 °C for 2 min, ramped at 1 °C/min to 220 °C, held at 220 °C for 60 min, ramped at 5 °C/min to 230 °C and held at this T till complete elution Detection: ECD, 310 °C	Conversion at the αC	[28]

Table 3 (Continued)

Pyrethroid	Matrix	Separation conditions	Sample preparation/comments	References
cis-Bifenthrin Permethrin Cyfluthrin Cypermethrin	Soil and sediments	CSP: BGB 172 column T program: 160 °C for 1 min and then ramped to 230 °C at 1 °C/min Detection: ECD, 310 °C	Centrifugation of the sample during 25 min at 10,000 rpm. The supernatant was decanted. The residue was extracted with acetone:methylene chloride (1:1, v/v) that after evaporation was reconstituted in 1 mL hexane In lab incubation experiments, an enantioselective degradation was observed for cis-bifenthrin, permethrin and cyfluthrin	[26]
Permethrin Cypermethrin	-	CSP: BGB 172 column T program: 160 °C for 1 min and then ramped to 230 °C at 1 °C/min. Hold at 230 °C till complete elution Detection: ECD, 310 °C	Enantioimerization was observed: (1) cypermethrin was stable in propan-2-ol and methanol but not in n-hexane, acetone and methylenechloride (2) Permethrin was stable under all conditions	[27]

stationary phase. All separations were performed isothermally and flame-ionization detector (FID) was used.

Several methods were developed by Liu and Gan for determining optical isomers of (Z)-cis-bifenthrin, cis-permethrin, cypermethrin and cyfluthrin [11,20,26,28,29,38] and the aquatic toxicity of their enantiomers against *Ceriodaphnia dubia* [11] using a BGB 172 column (20% tert-butylidimethylsilyl-β-CD dissolved in 15% diphenyl and 85% dimethylpolysiloxane) (BGB Analytik, Adliswil, Switzerland) after probing different CSPs. It was the first time that coupled solid-phase microextraction and enantioselective GC with electron capture detector (ECD) was used for the analysis of the two first compounds [38] and the first time GC was applied to a biological matrix for the chiral analysis of pyrethroids [11]. Moreover, the thermal stability of these four commonly used pyrethroids during GC analysis and sample preparation was also studied [28] showing that chiral stability of pyrethroids depends on the origin of chirality. In the first work, the enantiomers of (Z)-cis-bifenthrin and cis-permethrin were baseline separated [38] with LODs of 0.05 μg/L and 0.10 μg/L for each pyrethroid. The integrated SPME-enantioselective GC method was used to analyze surface runoff water samples. The analysis showed preferential degradation of the 1S,3S enantiomer over 1R,3R enantiomer for both compounds studied. The concentrations detected were substantially smaller than those determined following solvent extraction, suggesting that SPME-enantioselective GC analysis selectively measured the dissolved fraction. Once the method was optimized it was applied to sediment samples containing residues of these pyrethroids, extracted with acetone:hexane 1:1 (v/v) for the evaluation of changes in the ER [29]. The same method was applied to the analysis of cyfluthrin and cypermethrin, giving six peaks that could be identified using enantiomerically enriched products [20]. Complete separation of enantiomers occurred for both cis diastereomers and between cis and trans diastereomers, but not for enantiomers from the same trans diastereomers. The method was also applied to quantify the enantiomers in water and sediment samples. The detection limits (LODs) obtained ranged from 7.5 to 15.0 μg/L for cypermethrin and from 3.5 to 7.5 μg/L for cyfluthrin. Finally, in the last paper the enantioselective degradation of the cited pyrethroids in soil and sediments was evaluated by comparing changes of stereoisomers profiles from the original values [26]. Good resolution was obtained for cis diastereomers but not for the trans diastereomers, as it can be observed in Fig. 2 that shows the GC chromatograms of permethrin under enantioselective analytical conditions in standard (Fig. 2a) and a sediment sample (Fig. 2b). Clear enantioselective degradation can be observed.

As said, some pyrethroids can show thermal instability and may be degraded during GC analysis resulting in enantiomer conversion. Sometimes pyrethroids can show this effect in organic solvents. In this sense, Qin and Gan [27] demonstrated by using GC analysis, that permethrin is stable in all the organic solvents used (n-hexane, methylene chloride, propan-2-ol, acetone and methanol) but cypermethrin was unstable in acetone and methylene chloride. The extent of enantiomerization was affected by temperature dependence and was also influenced by water as a cosolvent. Results from this study suggest that the exposure to certain solvents and water may cause artefacts in chiral analysis. Also, they showed that for isomer-enriched pyrethroids products such abiotic enantiomerization may render the products less effective because the conversion leads to the formation of inactive stereoisomers.

5.2.2. High performance liquid chromatography

HPLC is a very useful technique for the separation of enantiomers because it is quite rapid, non-destructive and there is little possibility of epimerization during the analysis as seen in GC [48,49]. Apart from analysis, HPLC is also the best technique for small-scale preparation of enantiopure chemicals.

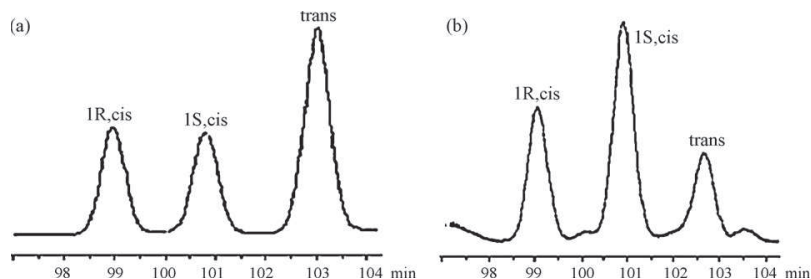


Fig. 2. Chiral GC chromatograms of permethrin pyrethroid. (a) The standard reference racemic mixture and (b) a sediment sample from San Diego Creek in California. Experimental conditions in the text. Reprinted with permission from Ref. [26].

In chiral HPLC the selectors used in the chiral stationary phases include cyclodextrins, proteins, crown ethers, polysaccharides, polyacrylamides, polymeric chiral surfactants, macrocyclic antibiotics and some low-molecular-weight molecules such as Pirkle type compounds [50].

Table 4 groups all the chiral separations of pyrethroids performed by HPLC including the compounds separated and the most important separation conditions. It can be seen that several chiral columns have been employed for the enantiomeric resolution of pyrethroid insecticides. While for α -cyano pyrethroids polymeric CSPs based on cellulose derivatives seemed to be the most suitable for their resolution, multiple interaction Pirkle type CSPs showed advantages in the enantiomeric separation of α -cyano pyrethroids [51]. UV detection is used in all the articles and sometimes other detection modes are used as complementary detection systems (laser polarimeter detector, NMR, etc). Only in seven of the publications the developed method has been applied to a real matrix [25,30,31,44,46,52,53] to confirm the existence of these compounds and in two of the total articles the degradation products of pyrethroids were analyzed [43,54]. One of the most popular column is Pirkle type 1-A (NH_2 bonded Spherisorb column containing (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoyl)-phenylglycine) (Regis, Morton, Grove, IL, USA) and (Technicol, Stockport, UK) [31,52,55]. This column enabled the chiral separation of fenproanate, fenvalerate, cypermethrin and cyfluthrin using 0.1% propan-2-ol in hexane as mobile phase [31]. The method was applied to the analysis of cypermethrin residues in soil samples in different periods after application of the pesticide as shown in Fig. 3.

A systematic study of the separation of thirteen pyrethroids grouped in four different categories, was carried out by Cayley and Simpson [55]. The separation was achieved with a mobile phase composition ranging from 0.025 to 0.1% propan-2-ol in hexane. Useful resolution was obtained in analysis times between 8 and 60 min. These results were confirmed by Lisseter and Hambling and demonstrated that the bonding of the column (ionically or covalently bonded) can influence the separation of the pyrethroids [52]. In effect, while for allethrin, α -cypermethrin, cypermethrin, fenpropathrin, fenvalerate, permethrin, phenothrin, resmethrin and tetramethrin a better separation was obtained with the ionically bonded column, for cyfluthrin, λ -cyhalothrin, cyhalothrin, flucythrinate and flumethrin better separations were obtained with the covalently bonded column. The authors applied the method to the analysis of a formulated product of cypermethrin, fenvalerate and permethrin. It was noticed that the commercial ionic column rapidly lost selectivity when exposed to the formulation.

Sumichiral OA (Sumika Chemical Analysis Service, Osaka, Japan) type columns were for the first time used for the chiral analysis of pyrethroids by Oi et al. [48] for the resolution of ten pyrethroids with three different columns: Sumichiral OA-4000 ((*S*)-valine and (*S*)-1-(α -naphthyl)-ethylamine), Sumichiral OA-4600 ((*S*)-tert-leucine and (*S*)-1-(α -naphthyl)-ethylamine) and Sumichi-

ral OA-2500 ((*R*)-1-naphthylglycine and 3,5-dinitrobenzoic acid). Each CSP was capable to manage the enantioseparation of a number of pyrethroids using hexane-dichloroethane-ethanol in different proportions as mobile phases. The resolutions obtained were higher than 1.03 for all compounds. Sumichiral OA-2500 CSP was also employed for the enantioseparation of *cis*-bifenthrin with hexane-1,2-dichloroethane [22,29] or *n*-hexane-propan-2-ol-ethanol (99.8:0.06:0.14) as mobile phases with reasonable retention times (14.8–16.3 min) and high resolution ($R_s = 3$) [23]. A laser polarimeter detector was used in the detection of pyrethroids [23]. This detector was employed earlier for fenpropathrin detection [56].

Kutter and Class [46] performed the enantioselective liquid and gas chromatography of allethrin and cypermethrin. Enantiomeric selectivity was observed for cypermethrin in normal phase-HPLC (NP-HPLC) with a Pirkle type chiral stationary phase made of *L*-tartaric acid and *L*-dinitrobenzylphenylethylamine (Marcherey-Nagel, PA, USA), but very strong interactions and therefore long retention times prevented the separation of allethrin in these phases. *trans*-Allethrin isomers were separated on a chiral β -cyclodextrin RP-HPLC column but no selectivity was obtained for the *cis* isomers of allethrin and some difficulties due to isomerization of cypermethrin were also reported. The enantiomeric selectivity observed for cypermethrin in NP-HPLC with a Pirkle type chiral stationary phase was used by Class in other work [53] for

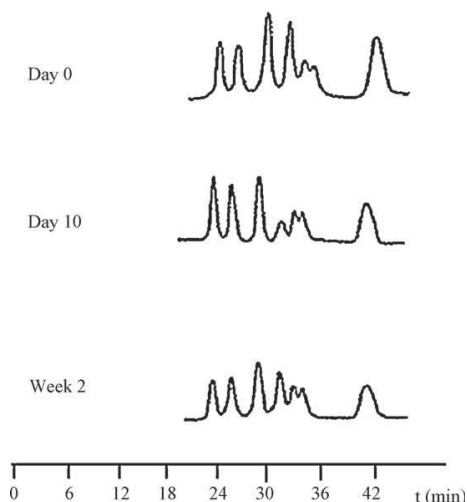


Fig. 3. Separation of cypermethrin soil extracts after forestry application by HPLC using 0.1% propan 2-ol in hexane. Column: Pirkle 1-A, flow 1 mL/min. Reprinted with permission from Ref. [31].

Table 4
Chiral separation of pyrethroids by HPLC.

Pyrethroid	Matrix	Separation conditions	Sample preparation/comments	References
Fenproanate Fenvalerate Cypermethrin Cyfluthrin	Soil	CSP: Pirklde type 1A column Mobile phase: propan-2-ol:hexane 0.1:99.9 Detection: UV 200 nm	LLE with acetone and after evaporation the extract was transferred to a silica cartridge and eluted with 20 mL propan-2-ol:hexane (1:99, v/v). The extract was evaporated to 5 mL. Analysis time Fenproanate ≈ 15 min Cypermethrin ≈ 31 min Cyfluthrin ≈ 35 min Fenvalerate ≈ 32 min	[31]
Type I: Fenpropathrin Type II: Resmethrin Bioresmethrin Permethrin Type III: Phenothrin Fenvalerate Fluvalinate Type IV: Allethrin Bioallethrin Cypermethrin Fastac® Karate® Deltamethrin	–	CSP: Pirklde type 1-A column Mobile phase Type I: 0.1% propan-2-ol in hexane as mobile phase Type II: 0.025% propan-2-ol in hexane Type III: 0.1% propan-2-ol in hexane Type IV: 0.1% propan-2-ol in hexane Detection: UV 240/280 nm	A cyano-bonded column was also tested	[55]
d-Allethrin (a) d-Allethrin (b) Cyfluthrin (c) λ-Cyhalothrin (d) Cyhalothrin (e) α-Cypermethrin (f) Cypermethrin (g) Fenpropathrin (h) Fenvalerate (i) Flucythrinate (j) Flumethrin (k) Permethrin (l) d-Phenothrin (m) Resmethrin (n) Tetramethrin (o)	Formulated products of permethrin	CSP: Pirklde type 1-A column (a), (b), (g), (h), (o) ionic column/0.15 (% propan-2-ol in hexane) (c), (j), (k) covalent column/0.05 (% propan-2-ol in hexane) (d), (e) covalent column/0.15 (% propan-2-ol in hexane) (f), (i) covalent ionic column/0.15% propan-2-ol in hexane (l), (m), (n) ionic column/0.05 (% propan-2-ol in hexane) Detection: UV 230 nm	Analysis time Cypermethrin ≈ 36 min Cyfluthrin ≈ 80 min Permethrin ≈ 27 min	[52]
Terallethrin (a) Fenpropathrin (b) Resmethrin (c) Pemethrin (d) Phenothrin (e) Tetramethrin (f) Fenvalerate (g) Cypermethrin (h) Allethrin (i) Bioallethrin (j)	–	(a) CSP: Sumichiral OA-4000 column Mobile phase: hexane-1,2-dichloroethane-ethanol 500:30:15 (b), (h), (i) CSP: Sumichiral OA-4600 Mobile phase: hexane-1,2-dichloroethane-ethanol 500:10:0.05 (c), (d), (e), (f), (g) CSP: Sumichiral OA-25001 Mobile phase: hexane-1,2-dichloroethane-ethanol 500:1 Detection: UV 230 nm	The first time these columns were tested in the chiral separation of pyrethroids Analysis time: <60 min for all compounds	[48]
Type I: cis-bifenthrin Permethrin Type II: Cypermethrin Cyfluthrin	–	Type I: CSP: Sumichiral OA-2500-1 column Mobile phase: hexane:1,2-dichloroethane 500:1 Type II: CSP: two chained Chirex 00G-3019-DO columns Mobile phase: hexane:1,2-dichloroethane:ethanol 500:10:0.05 Detection: laser polarimeter detector 675 nm and UV	Toxicity studies demonstrated the different contribution of each enantiomer in the toxicity against <i>Ceriodaphnia dubia</i> and <i>Daphnia magna</i> Analysis time cis-Bifenthrin ≈ 12 min Permethrin ≈ 38 min Cypermethrin ≈ 90 min	[22]
cis-Bifenthrin cis-Permethrin trans-Permethrin	–	CSP: Sumichiral OA-25001 column Mobile phase: hexane:dichloroethane 99.5:0.05 Detection: UV 230 nm	–	[29]

Table 4 (Continued)

Pyrethroid	Matrix	Separation conditions	Sample preparation/comments	References
Permethrin	Soil and sediment	CSP: Sumichiral OA-25001 column Mobile phase: hexane:dichloroethane 99.5:0.05 Detection: UV 230 nm	LLE with acetone:hexane (1:1, v/v) Enantioselective degradation was observed	[25]
Bifenthrin	–	CSP: Sumichiral OA-25001 column Mobile phase: propan-2-ol:ethanol:n-hexane 0.06:0.14:99.8 Detection: UV 230 nm, MS and polarimeter	Toxicity studies showed that (–)-Bifenthrin was 10 times more toxic than its enantiomer	[23]
Allethrin (a) Cypermethrin (b)	Allethrin indoor formulation	(a) CSP: silica-gel modified with β-CD, (Cyclobond I) column Mobile phase: acetonitrile:water 22:78 (b) CSP: silica-gel modified with L-tartaric acid and L-dinitrobenzylphenylethylamine (Pirkle type) Mobile phase: 0.05% trifluoroacetic acid and 0.5% propan-2-ol in hexane Detection: UV 220 nm	Photosensitive degradation was observed through the study of enantiomeric profiles Analysis time Cypermethrin ≈ 42 min Allethrin ≈ 16 min (trans)	[46]
Cypermethrin	Soil	CSP: silica-gel modified with L-tartaric acid and L-dinitrobenzylphenylethylamine (Pirkle type column) Mobile phase: 0.05% trifluoroacetic acid and 0.05% propan-2-ol in hexane Detection: UV 220 nm	Investigation of environmental degradation after forestry application	[53]
Fenpropathrin (a) Bifenthrin	–	CSP: Chirasper column Mobile phase: hexane:ethanol 99.5:0.5 Detection: diode laser polarimetric detector and UV detection 230 nm	Good resolution Quantification of enantiomers	[56]
Cypermethrin Permethrin	–	CSP: Daicel Chiralcel OD column material (cellulose tris-3,5-dimethylphenylcarbamate derivate bonded to silica) Detection: UV 280 nm and NMR	NMR was employed for the confirmation of the elution order Analysis time Cypermethrin ≈ 50 min Permethrin (incomplete R _s)	[57]
Permethrin Cyfluthrin cis-Bifenthrin Phenothrin	Soil	CSP: (+) (5R,8S,10R) 1-(3-aminopropyl)-terguride based column Mobile phase: 20 mM acetate (pH 4):acetonitrile 6:4 Detection: UV and Polar monitor detector	Monitorization of the hydrolytic degradation products of cyfluthrin in soil	[43]
Alphamethrin (a) Cypermethrin (b)	–	(a) CSP: Cyclobond I 2000 column Mobile phase: 150 mM triethylamine in water with H ₃ PO ₄ (pH 3.5):methanol 50:50 (b) CSP: ChiraDex Mobile phase: 500 mM triethylamine in water with H ₂ SO ₄ (pH 3.5):methanol 45:55 Detection: UV 210 nm	Two same CSPs columns were tested observing that the precedence of them was crucial in the separation Analysis times Cypermethrin ≈ 30 min Alphamethrin ≈ 25 min	[58]
Cyfluthrin (a) Resmethrin (b) cis-Bifenthrin (c) (1R)-Phenothrin (d)	–	(a) CSP: Chiralcel OD-H column coupled with urea CSP Mobile phase: hexane:1,4-dichlorobutane:ethylacetate 500:5:0.15 (b), (c), (d) CSP: Chiralcel OD-H column Mobile phases: n-hexane:propan-2-ol Detection: UV 220 nm	When α-cyano pyrethroids were separated multiple-interaction columns seem to be better while for no-α-cyano compounds cellulose based OD-H columns were most suitable	[51]
Chrysanthemic acid (A) Permethrinic acid (B) Decamethrinic acid (C) And their esters	–	CSP: Chiralpak AS column (CSP amylose tris (5)-α-methylbenzyl carbamate) Mobile phase: hexane:propan-2-ol:trifluoroacetic acid 98.9:1:0.1 Detection: UV 215 nm	–	[54]
Acrinathrin (a) β-Cyfluthrin (b) λ-Cyhalothrin (c) Deltamethrin (d) Esfenvalerate (e) Fenpropathrin (f) fenvalerate (g) τ-Fluvalinate (h) Permethrin (i)	–	(a), (g) CSP: Chiralpak AD and Chiralcel OJ columns Mobile phase: n-hexane:propan-2-ol 90:10 and n-Hexane:ethanol 95:5 respectively (b), (i) CSP: Chiralcel OJ column; mobile phase: ethanol:n-hexane 90:10 (c) CSP: Chiralcel OD-R column; mobile phase: Acetonitrile:water 70:30 (d) CSP: RP-Chiralpak AD column; mobile phase: ethanol:water 85:15 (e), (h) CSP: Chiralcel OJ column; mobile phase: n-hexane:ethanol 95:5 (f) CSP: Chiralcel OD-R column; mobile phase: ethanol:water 85:15 Detection: PDAD 210 nm	Analysis time: λ-Cyhalothrin ≈ 37 min Fenpropathrin ≈ 36 min Deltamethrin ≈ 52 min β-Cyfluthrin ≈ 18 min Esfenvalerate ≈ 16 min Fenvalerate ≈ 30 min τ-Fluvalinate ≈ 16 min Permethrin ≈ 8 min	[59]

τ -Fluvalinate Permethrin	Drinking water	CSP: Chiralcel OJ column; mobile phase: n-hexane:ethanol 90:10 Detection: PDAD 210 nm	SPE with C-18 cartridges (500 mL of sample). The sample was eluted three times with a total volume of 50 mL of n-hexane (20 + 20 + 10) Analysis times: Permethrin \approx 9 min τ -Fluvalinate \approx 19 min	[44]
Fenpropathrin (a) Fenvalerate (b) Brofluthrin (c) Cypermethrin (d) Cyfluthrin (e)	-	CSP: A novel chiral stationary phase connecting (R)-1-phenyl-2-(4-methylphenyl)ethylamine amide derivative of (S)-isoleucine to aminopropyl silica-gel through 2-amino-3,5-dinitro-1-carboxamido-benzene unit Mobile phase (a) n-Hexane-1,2-dichloromethane-propan-2-ol 94:9.5:0.5 (b) n-Hexane-1,2-dichloroethane-propan-2-ol 97.45:2.5:0.05 (c) n-Hexane-1,2-dichloromethane-propan-2-ol 94:9.5:0.5 (d) and (e) n-hexane-1,2-dichloromethane-propan-2-ol 96.8:3:0.2 Detection: UV/circular dichroism 230 nm	Elution orders were assigned by using different stereoisomer-enriched products $R_s > 0.71$ for all pyrethroids Analysis time: Fenpropathrin \approx 20 min Brofluthrin \approx 30 min Fenvalerate \approx 40 min Cypermethrin \approx 38 min Cyfluthrin \approx 50 min	[60]
Fenpropathrin (a) Fenvalerate (b) Brofluthrin (c) Cypermethrin (d) Cyfluthrin (e)	-	CSP: new chiral stationary phase based on the (R)-1-phenyl-2-(4-methylphenyl)ethylamine Amide derivative of (S)-valine and 2-chloro-3,5-dinitrobenzoic acid Mobile phase (a) Hexane-dichloromethane 94:6 (b) Hexane-1,2-dichloromethane-ethanol (98.45:1.2:0.35) (c) Hexane-1,2-dichloromethane-ethanol (93.8:6:0.2) (d) Incomplete (e) Incomplete Detection: UV 230 nm	Analysis time: Fenpropathrin \approx 16 min Brofluthrin \approx 38 min Fenvalerate \approx 32 min Cypermethrin \approx 30 min Cyfluthrin \approx 38 min	[61]
β -Cypermethrin β -Cyfluthrin	Soil	CSP: Chiralcel OD column Mobile phase: n-hexane-propan-2-ol 100:6 for cypermethrin/100:2 for cyfluthrin Detection: UV 230 nm	MSPD extraction, the final residue was redissolved in n-hexane:propan-2-ol (100:0.1, v/v) Quantification to prove enantioselective degradation Analysis time: <15 min previous separation of diastereoisomeric pairs	[30]
Cycloprothrin	-	1S, α ' = CSP: Chiralcel OD-H column Mobile phase: hexane:propan-2-ol 9:1 1R, α ' = CSP: Chiralcel OJ-H column Mobile phase: hexane:propan-2-ol 7:3 Detection: UV 254 nm	Enantioselective insecticidal activity against larvae of <i>Mythimaseparata</i> Analysis time 1S, α ' 18.8-63.1 min 1R, α ' 23.9-41.0 min	[36]
λ -Cyhalothrin	-	CSP: Chiralcel OD column Mobile phase: n-hexane:propan-2-ol 95:5 Detection: circular dichroism/UV 236 nm	Enantioselective toxicity of this pyrethroid and malformations induced mainly by one enantiomer Analysis time <20 min	[24]

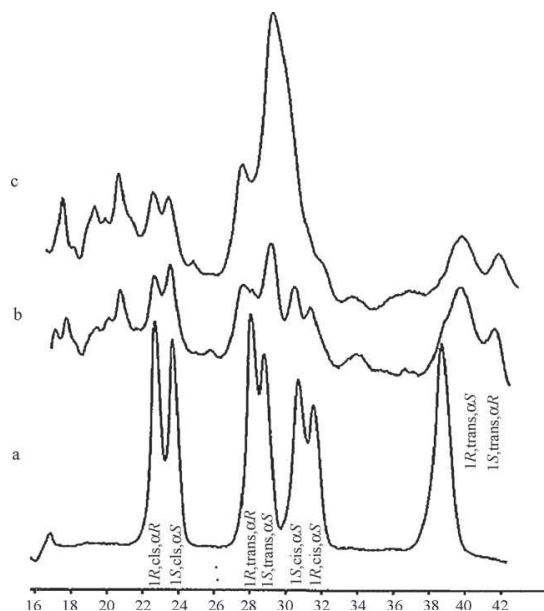


Fig. 4. NP-HPLC chromatograms of cypermethrin (a) standard (b) residual cypermethrin soil extract from the Rübhu (c) from the Tranke site. Column: Pirkle, mobile phase: 0.05% trifluoroacetic acid–0.05% 2-propanol in hexane. Reprinted with permission from Ref. [53].

the analysis of cypermethrin enantiomers and their degradation products in soil extract after forestry application of this compound. Fig. 4 shows chiral NP-HPLC with the Pirkle type phase and 0.05% trifluoroacetic acid (TFA)–0.05% propan-2-ol in hexane as mobile phase [53]. Eight cypermethrin stereoisomers were separated into seven peaks (Fig. 4a) and two soil extracts were also injected (Fig. 4b and c).

In some cases a previous separation of the diastereoisomers and the injection of the fractions in the chiral column were necessary to achieve a good enantioresolution [30,57]. Edwards and Ford [57] resolved the four diastereoisomeric pairs of cypermethrin and the two diastereoisomeric pairs of permethrin on an irregular silica column using hexane–chloroform–diethyl ether (200:1:6). All diastereoisomeric pairs were injected individually in cellulose based chiral HPLC column with hexane–propan-2-ol (250:1) as mobile phase. In the case of cypermethrin the separation of the four diastereoisomeric pairs was achieved with reasonable retention times (<50 min). For permethrin only two of the four enantiomers were baseline separated. Li et al. [30] resolved the four enantiomers of β -cypermethrin and β -cyfluthrin in a Chiralcel OD column (cellulose tris-(3,5-dimethylphenyl)carbamate coated on 10 μ m silica-gel) (Daicel Chemical Industries, Japan). First of all an achiral separation of the two diastereoisomeric pairs of each pyrethroid was carried out and only two peaks were observed that corresponded to 1R,cis,1S+1S,cis,1R and 1R,trans,1S+1S,trans,1R. To identify each peak a standard of α -cypermethrin and α -cyfluthrin (1R,cis,1S+1S,cis,1R) was injected. This method was used for the determination of enantioselective degradation of β -cypermethrin and β -cyfluthrin in soil.

Sometimes there are significant differences among the results obtained with the same CSPs. These results can be due to the influence of the chiral selector bonding to the silica support and/or other possible variation in properties of stationary phases (different surface concentration of chiral selector, accessibility of silanol groups, etc.) [58]. Lemr et al. [58] proved the influence of two β -CD

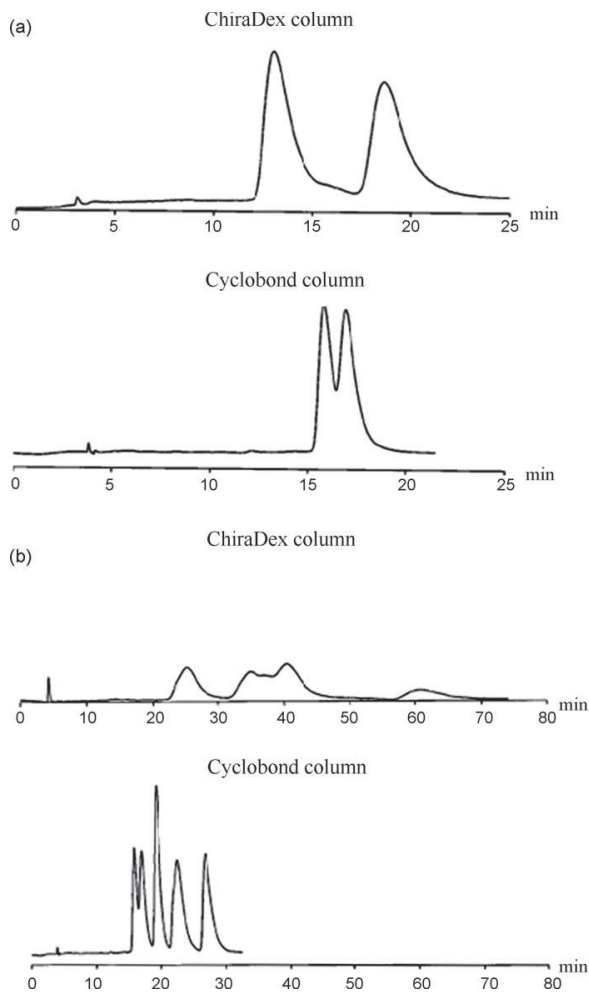


Fig. 5. Chiral separation by HPLC of (a) alphamethrin (b) cypermethrin in two different columns with the same CSP: ChiraDex (mobile phase: 150 mmol/L triethylamine with H_2SO_4 (pH 3.5); methanol 45:55 (v/v); detection: UV absorption at 210 nm; flow-rate: 0.8 mL/min for alphamethrin and 0.6 mL/min for cypermethrin; temperature: 20 °C for alphamethrin and 10 °C for cypermethrin) and Cyclobond I 2000 (mobile phase: 150 mmol/L triethylamine with H_3PO_4 (pH 3.5); methanol 50:50 (v/v); flow-rate: 0.8 mL/min; detection: UV absorption at 210 nm; flow-rate: 1.0 mL/min; temperature: 20 °C). (Reprinted with permission from Ref. [58]).

columns: ChiraDex (Merck, Darmstadt, Germany) and Cyclobond I 2000 (Astec, Whippany, NJ, USA) in the separation of alphamethrin and cypermethrin. As Fig. 5 shows better results were obtained for alphamethrin with ChiraDex- β -CD (Fig. 5a) while for cypermethrin Cyclobond I 2000 column was better (Fig. 5b) under the same other experimental conditions [58].

Yang et al. [59] separated the enantiomers of nine pyrethroids with three polysaccharide-based CSPs: Chiralpak AD (Amylose tris (3,5-dimethylphenyl)carbamate), Chiralcel OD-R (cellulose tris (3,5-dimethylphenyl)carbamate) and Chiralcel OJ (Cellulose tris (4-methylbenzoate)) all of them from Daicel Chemical Industries (Tokyo, Japan) both in reversed and normal HPLC modes. The composition of mobile phase played an important role in the resolution of pyrethroids enantiomers in both modes. Enantiomers of τ -fluvialinate and permethrin were also separated and simultaneously determined by Yang et al. [44] with a Chiralcel

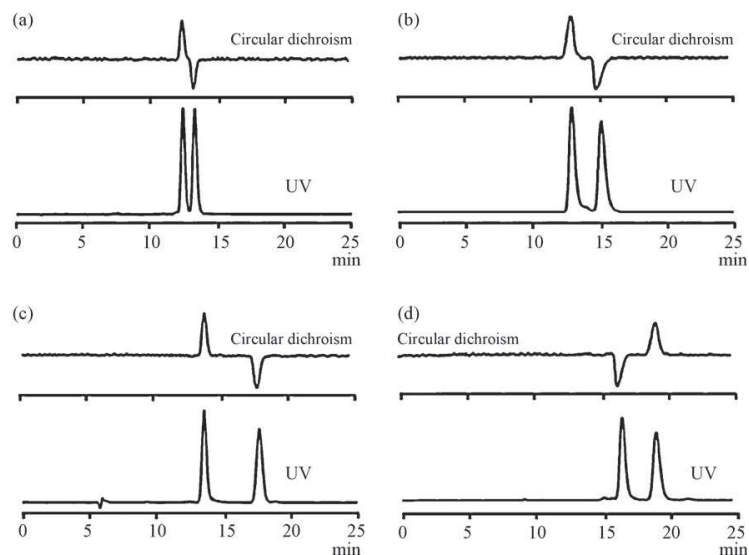


Fig. 6. Chromatograms of λ -cyhalothrin obtained by HPLC on chiral columns detected by circular dichroism and ultraviolet (UV) detection. (a) Chiralpak amylose tris (3,5-dimethylphenyl-carbamate), n-hexane/ethanol (98/2, v/v), 25 °C, 0.40 mL/min; (b) Chiralpak amylose tris-[(S)- α -methylbenzyl-carbamate], n-hexane/ethanol (95/5, v/v), 25 °C, 0.60 mL/min; (c) Chiralcel cellulose tris (3,5-dimethylphenyl-carbamate), n-hexane/propan-2-ol (95/5, v/v), 25 °C, 0.50 mL/min; (d) Chiralcel cellulose tris-(4-methylbenzoate), n-hexane/ethanol (95/5, v/v), 25 °C, 0.60 mL min⁻¹. Reprinted with permission from Ref. [24].

OJ column under normal phase mode and a mobile phase of n-hexane–ethanol (90:10, v/v) with a baseline resolution ($R_s > 1.5$). LODs for τ -fluvalinate and permethrin were 0.12 and 0.14 $\mu\text{g/L}$. The developed method was applied to the determination of these compounds in drinking water samples at ppb levels before solid-phase extraction (SPE) with C-18 cartridges. Recoveries ranged between 103 and 113% and precision values were better than 10%.

The asymmetrically synthesized isomers of cycloprothrin were resolved on a chiral column and the evaluation of the enantioselectivity of their insecticidal activity was studied by Jiang et al. [36]. Complete separation was achieved on a Chiralcel OD-H column (cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) coated on 5 μm silica-gel) (Daicel Chemical Industries, Japan) for (1*S*, α^+)-cycloprothrin isomers with retention times of 18.8 min and 63.1 min. For (1*R*, α^+)-cycloprothrin isomers, a Chiralcel OJ-H column (cellulose tris-(4-methylbenzoate) coated on 5 μm silica-gel) (Daicel Chemical Industries, Japan) gave two peaks with retention times of 23.9 min and 41.0 min. The method allowed individual isomers to be recovered for use in bioassays.

Xu et al. [24] performed the separation of λ -cyhalothrin by HPLC using four different chiral columns: Chiralpak AD, Chiralpak AS (amylose tris-[(S)- α -methylbenzylcarbamate] coated on 10 μm silica-gel) (Daicel Chemical Industries, Japan), Chiralcel OD and Chiralcel OJ. The enantiomers of λ -cyhalothrin were separated completely on all columns tested, but the best resolutions were obtained with Chiralcel OD as stationary phase and n-hexane:propan-2-ol 95:5 as mobile phase. To identify each enantiomer a circular dichroism detector was used. Although lower temperatures and less amounts of modifiers resulted in better separations, the retention times of enantiomers and their peak tailing must also be taken into account when selecting chromatographic conditions. Fig. 6 shows chromatograms of λ -cyhalothrin in different experimental conditions, using circular dichroism and ultraviolet (UV) detection systems [24]. The chromatographic method developed in this work may be suitable for obtaining optically pure enantiomers of λ -cyhalothrin which would be a prerequisite for toxicity assessment.

Finally, Tan et al. [60,61] reported two novel CSPs by bonding (R)-1-phenyl-2-(4-methylphenyl)ethylamine amide derivative of (S)-isoleucine to aminopropyl silica-gel through 2-amino-3,5-dinitro-1-carboxamido-benzene unit in the first one and (R)-1-phenyl-2-(4-methylphenyl)ethylamine amide derivative of (S)-valine in the second column. The new CSPs were applied to the enantioresolution of five pyrethroid insecticides by NP-HPLC. Two enantiomers of fenprothrin and four stereoisomers of fenvalerate were baseline separated using n-hexane:1,2-dichloroethane:propan-2-ol as mobile phase for the first CSP and n-hexane:1,2-dichloroethane:ethanol in the valine derivate CSP, showing that enantioselectivity of this stationary phase is better than that obtained with a Pirkle type 1-A column for the compounds. Only partial separations were observed for brofluthrin, cypermethrin and cyfluthrin.

5.2.3. Capillary electrophoresis

Capillary electrophoresis is a quite new technique in the chiral separation of pyrethroids. Its main limitation is the low concentration sensitivity obtained with optical detection due to the small sample volumes injected and the limited path length employed for on-capillary detection [62]. To avoid these problems different options have been reported such as sample preconcentration procedures and alternative detection systems [62–65]. In on-line UV detection, which is the most common detection mode used in CE, a small enhancement of the sensitivity can be observed by using special designs of the detection window (bubble and Z-cells). Off-line sample preconcentration procedures have been developed to improve the LODs usually achieved by CE. Thus liquid–liquid extraction, solid-phase extraction (SPE), solid-phase microextraction, supercritical fluid extraction and cloud point extraction have demonstrated their usefulness prior to CE analysis of insecticides [62]. On-line preconcentration techniques based on electrophoretic principles such as: sample stacking [66], transient isotachopheresis [67], sweeping [68], and dynamic pH junction [69] have also been employed. However, the use of alternative detection systems, such as laser induced fluorescence (LIF), phosphorescence, MS and electrochemical detection has enabled to achieve the most promising

Table 5
Chiral separation of pyrethroids by CE.

Pyrethroid	Matrix	CE mode	Separation conditions	Sample preparation/comments	References
Bioallethrin Fenpropathrin Pehnothrin	Water	CD-MEKC	Chiral selector: DM- β -CD BGE: 50 mM NaH ₂ PO ₄ + sodium cholate + 15 mM DM- β -CD Capillary: 50 μ m (i.d.) \times 40 cm (47 cm t.L.) Voltage: 20 kV Temperature: 20 °C Detection: UV 214 nm	SPE preconcentration with Oasis HLB cartridges. The analytes were eluted with 6 mL methyl t-butyl ether (90:10, v/v) Analysis time - Bioallethrin \approx 13 min - Fenpropathrin and Phenothrin < 6 min $R_s > 1.5$ for all compounds	[17]
DCA (Permethrin), CA (Phenotrin), DCA (Cypermethrin), CMBA (Sanmarton), TCCA (Fenpropathrin)	–	MEKC	Chiral selector: OG (chiral surfactant) BGE: 100 mM sodium phosphate pH 6.5 + 10% (v/v) acetonitrile + OM 25 mM Capillary: 50 μ m (i.d.) \times 50 cm (57 cm t.L.) Voltage: 19 kV Temperature: 20 °C Detection: UV 255 nm and LIF: λ_{ex} : 360 nm, λ_{em} : 380 \pm 2 nm	Previous derivatization with ANDSA	[16]
CA (Phenothrin), DCA (Cypermethrin), CMBA (Sanmarton)	–	MEKC	Chiral selector: OG (chiral surfactant) BGE: 175 mM phosphate pH 6.5 containing 30 mM OM Capillary: 50 μ m (i.d.) \times 50 cm (57 cm t.L.) Voltage: 18 kV Temperature: 18 °C Detection: LIF: λ_{ex} : 325 nm, λ_{em} : 380 \pm 2 nm and 420 \pm 2 nm	Previous derivatization with ANDSA	[70]
Cypermethrin, Alphamethrin, Permethrin, Fenpropathrin	–	CD-MEKC	Chiral selector: γ -CD BGE: 50 mM sodium phosphate pH 2.5 + 150 mM SDS + 150 mg/mL γ -CD Capillary: 50 μ m (i.d.) \times 30 cm (37 cm t.L.) Voltage: –250 V/cm Temperature: 20 °C Detection: UV 214 nm	Analysis time <15 min for all pyrethroids R_s fenpropathrin: 10 R_s alphamethrin: 1.4	[49]
Fenpropathrin, fenvalerate Fluvalinate	Cellulose	CEC	Chiral selector: Me- β -CD BGE: methanol 25 mM Tris pH 8.3 + Me- β -CD 70 mM Capillary: 75 μ m (i.d.) \times 21 cm (30 cm t.L.) Voltage: 25 kV Temperature: 20 °C Detection: UV 214 nm	SFE from a cellulose matrix using CO ₂ Analysis time - Fenpropathrin > 25 min Fenvalerate and fluvalinate were not completely resolved	[7]
Chrysanthemic acid Permethrinic acid Deltamethrinic acid	–	CD-EKC	Chiral selector: PMMA- β -CD BGE: 40 mM boric + 40 mM acetic + 40 mM phosphoric acids (1:2:2) Capillary: 50 μ m (i.d.) \times 50 cm (58.5 cm t.L.) Voltage: 30 kV Detection: UV 202 and 220 nm	–	[71]

sensitivity enhancements. The combination of preconcentration techniques with alternative detectors makes it possible to achieve the highest sensitivity enhancements [63–65].

A few articles have been published on the separation of pyrethroids (see Table 5) and only in some of them the developed method has been applied to the analysis of real matrices [17]. The most extended CE mode used for enantioseparations of pyrethroids is Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC) both with chiral and achiral surfactants and MEKC in presence of cyclodextrins (CD-MEKC), although Capillary Electrochromatography (CEC) and Electrokinetic Chromatography with cyclodextrin (CD-EKC) have also been employed.

Karcher and El Rassi [16] developed the separation of permethrin, phenothrin, cypermethrin, fenpropathrin and Sanmarton (fenvalerate) hydrolysis products by MEKC with *n*-octyl- β -*D*-glucoside (OG) and *n*-octyl- β -*O*-maltopyranoside (OM) as chiral surfactants. Hydrolysis gave as product the corresponding carboxylic acid that contains less chiral centers so this way the number of enantiomers was reduced, making the separation easier. The detection system used was LIF previous derivatization of the carboxylated hydrolytic products with 7-aminonaphthalene-1,3-disulfonic acid (ANDSA), which apart from making possible the LIF detection, increased the solubility of the analytes rendering them more amenable to analysis by aqueous CE. LIF detection is a good choice but it involves the introduction of an additional step in the analysis that has to be carefully optimized [1]. The same authors [70] intended to extend this method for the chiral separation of phenothrin, cypermethrin and Sanmarton (fenvalerate) and their respective hydrolysis products. The detection system was also LIF but in this case different fluorescent labels were tested: 5-aminonaphthalene-1-sulfonic acid (ANSA), ANDSA and 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid (ANTS), with different number of sulfonic acid groups (1, 2 or 3 respectively), and the same two chiral surfactants: OM and OG to improve the separations. The magnitude of enantioseparation was shown to vary greatly among the fluorescence labels, with ANDSA providing the best overall enantioresolution. Furthermore, a change in enantioresolution was observed when changing the ionic strength as well as the nature

and concentration of surfactant. The best resolutions were obtained with ANDSA and OG.

Another electrophoresis mode that has been applied to the chiral separation of pyrethroids is CD-MEKC in which the enantiomers are separated based on their different interactions with the micelles and the cyclodextrin. Ševčík et al. [49] compared CD-MEKC and HPLC for the separation of the lipophilic uncharged pyrethroids cypermethrin, alphamethrin, permethrin and fenpropathrin. Different kinds of cyclodextrins (β -CD, HP- β -CD, DM- β -CD, TM- β -CD, γ -CD), surfactants (SDS and CTAB), and some background electrolytes at pH 2.5 were tested. Optimized conditions (background electrolyte: 50 mmol/L sodium phosphate, pH 2.5, 150 mmol/L SDS, 150 mmol/L γ -cyclodextrin) allowed the separation of alphamethrin, the eight cypermethrin stereoisomers being eluted in seven peaks and the separation of two enantiomers of fenpropathrin with resolution $R_s = 10$. Under the tested experimental conditions, complete separation of four permethrin stereoisomers was not obtained. In comparison to HPLC, alphamethrin enantiomers were separated by both methods, CD-MEKC allowed enantioseparation of fenpropathrin with very high resolution and better separation of cypermethrin stereoisomers, and HPLC offered better possibilities in the analysis of permethrin.

Shea et al. [17] carried out the separation of the enantiomers of seven pesticides, three of them were pyrethroids (bioallethrin, fenpropathrin and phenothrin) by MEKC or CD-MEKC, and they applied the method to the analysis of fortified water samples. In this case, they investigated the use of two surfactants, sodium dodecyl sulfate (SDS) and sodium cholate (SC (chiral surfactant)) alone or in combination with different cyclodextrins (β -CD, DM- β -CD, TM- β -CD, HP- β -CD, γ -CD, HP- γ -CD) in a phosphate buffer (pH 7.0). With SDS, bioallethrin and fenpropathrin enantiomers were separated in presence of DM- β -CD ($R_s = 0.8$) and γ -CD ($R_s = 7.1$), respectively. With SC, bioallethrin enantiomers were resolved with β -CD ($R_s = 1.3$), DM- β -CD ($R_s = 1.5$), and HP- β -CD ($R_s = 2.4$); fenpropathrin enantiomers were resolved only in presence of DM- β -CD ($R_s = 1.5$); and phenothrin enantiomers were resolved when using DM- β -CD ($R_s = 1.5$) and HP- β -CD ($R_s = 0.7$). Fig. 7 shows the separation of bioallethrin enantiomers (Fig. 7a) with SDS and DM-

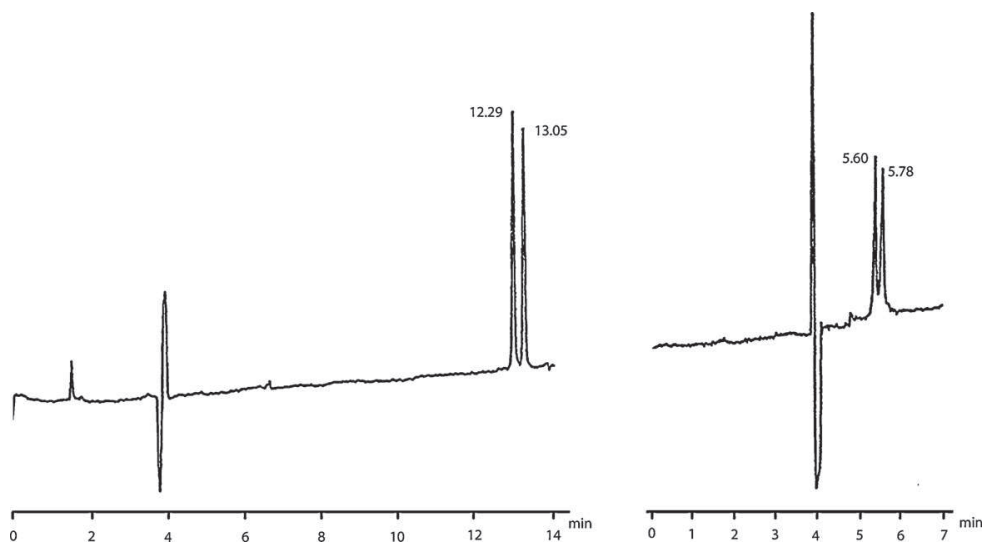


Fig. 7. Chiral separation by CD-MEKC for (a) bioallethrin with 50 mM NaH_2PO_4 + 50 mM SDS + 15 mM DM- β -CD buffer, pH 7 and (b) fenpropathrin enantiomers with 50 mM NaH_2PO_4 + 50 mM SC + 15 mM DM- β -CD buffer, pH 7. Other experimental condition (capillary: 50 μm i.d. \times 47 cm L_{ef} (40 cm L_t); pressure injection 2 s; 20 kV; $\lambda = 214$ nm). Reprinted with permission from Ref. [17].

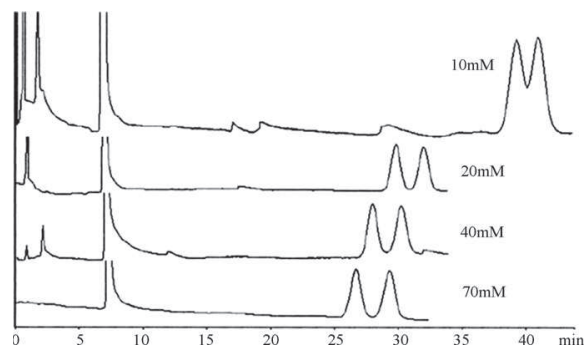


Fig. 8. Electropherograms corresponding to the separation of fenpropathrin with increasing Me- β -CD concentration. Experimental conditions: mobile phase: methanol–25 mM Tris pH 8.3 (75:25) (10, 20, 40, and 70 mM Me- β -CD); column: 30 cm \times 75 μ m i.d. (21 cm packed length) 5 μ m packed Hypersil ODS; voltage: 25 kV; temperature: 20 °C; λ : 214 nm; electrokinetic injection: 5 kV \times 3 s. Sample: thiourea and fenpropathrin in 100% methanol. Reprinted with permission from Ref. [7].

β -CD and fenpropathrin (Fig. 7b) with SC bile salt and DM- β -CD [17]. Analysis of fortified water samples under the experimental conditions suitable for baseline resolution of enantiomers of the three pyrethroids studied in this work, yielded recoveries (for the total concentration of each compound, not for the concentration of each enantiomer) ranging from 49 to 84% and detection limits ranging from 0.27 to 2.1 ppb.

There is only one publication in which CEC is used for the enantioselective separation of three pyrethroids (fenpropathrin, fenvalerate and fluvalinate) [7]. The chiral separations were investigated by using Hypersil 5 μ m ODS stationary phase (Shandon, Runcon, UK), Me- β -CD and HP- β -CD as chiral additives at different concentrations and methanol as organic modifier in a mobile phase 25 mM Tris at pH 8.3. No chiral discrimination was achieved for fluvalinate in any experimental condition. Fenvalerate only showed slight resolution ($R_s = 0.42$) with Me- β -CD (80 mM). However, the enantiomers of fenpropathrin were partially resolved with HP- β -CD (20 mM, $R_s = 0.53$) and baseline separation was obtained with Me- β -CD. Fig. 8 shows the separation of the enantiomers of fenpropathrin in a methanol–25 mM Tris pH 8.3 (75:25) mobile phase with differ-

ent concentrations of Me- β -CD [7]. Optimum resolution ($R_s = 1.4$) was obtained at 70 mM cyclodextrin concentration. This work also reported the use of CEC for monitoring the extraction of three pyrethroids insecticides from a cellulose matrix by SFE using as supercritical fluid, CO₂. LODs achieved for fenpropathrin, fenvalerate and fluvalinate were 4.7, 3.8 and 2.1 μ g/mL respectively.

Finally, Iványi et al. using positively ionizable permethyl monoamino β -cyclodextrin (PMMA- β -CD) separated all enantiomers and diastereomers of chrysanthemic, permethrinic and deltamethrinic pyrethroidic acids in one run with the exception of *trans*-chrysanthemic acid, which was only partially separated [71]. PMMA- β -CD seems to be a much better chiral selector than other CDs used in this work.

It can be emphasized that only in one article dealing with the separation of pyrethroids by CE the quantification of the enantiomers was achieved [7].

5.2.4. Subcritical and supercritical fluid chromatography

Only one article has reported the use of sub or supercritical fluid chromatography for the separation of enantiomers of pyrethroids. Although the use of supercritical fluid chromatography is not very extended it can present some advantages when compared to HPLC. For example, when the same columns are used in HPLC and SFC, shorter analysis times can be expected in SFC since the viscosity of supercritical fluid is lower than that for a liquid [72]. Other advantages are easy elimination of the eluent and the use for preparative purposes [72]. Although SFC has been applied to the chiral separation of some compounds, it has rarely been applied to agrochemical compounds [72]. Nishikawa [72] performed the enantioselective separation of fenpropathrin and fenvalerate by subcritical (SubFC) and SFC fluid chromatography using the Pirkle type chiral stationary phases developed for HPLC and CO₂ with ethanol, dichloromethane and hexane as modifier to the mobile phase. The Pirkle columns used were Sumichiral OA-2000 ((*R*)-phenylglycine and 3,5-dinitrobenzoic acid) for fenvalerate and Sumichiral OA-4000 for fenpropathrin. Fig. 9 shows the subcritical fluid chromatogram corresponding to the separation of the four enantiomers of fenvalerate (Fig. 9a) and of the two enantiomers of fenpropathrin (Fig. 9b) [72]. The modifiers were 10% ethanol in hexane and hexane respectively. Enantioselectivity mainly depended on the temperature, and not as strongly on other parameters, such

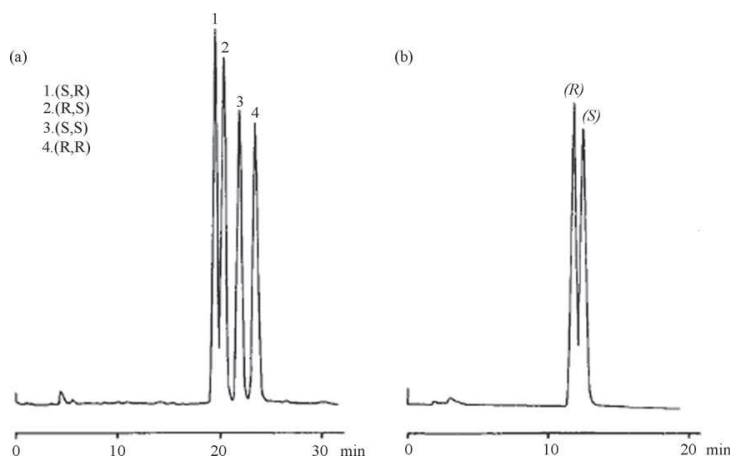


Fig. 9. Subcritical fluid chromatogram of (a) fenvalerate enantiomers on a Sumichiral OA-2000 chiral column (experimental conditions: mobile phase carbon dioxide at 300 μ L/min and 10% ethanol in hexane at 10 μ L/min; pressure 200 kg/cm² (backpressure); column temperature held at 20 °C; detection, UV at 210 nm) and (b) fenpropathrin enantiomers on a Sumichiral OA-4000 chiral column experimental conditions: mobile phase carbon dioxide at 300 μ L/min and hexane at 2 μ L/min; pressure, 170 kg/cm² (backpressure); column temperature held at 25 °C; detection, UV at 210 nm). Reprinted with permission from Ref. [72].

as the nature of the polar modifier. Operation below 20 °C improved the separation while with higher temperatures the resolution was scarce.

6. Concluding remarks and future trends

The chiral separation of synthetic pyrethroids has been mainly achieved by HPLC or GC techniques. Different types of chiral columns based on cyclodextrins have been used for this purpose. The developed methods were applied to different matrices like water, soil, sediments and biological samples. A search of literature cited here indicates few reports about the chiral resolution of these environmental pollutants by CE. MEKC is the mode of CE mainly used in all the publications both with achiral and chiral surfactants necessary due to the poor solubility of pyrethroids in aqueous media. The major concern in CE is the lack of sensitivity. Several approaches may be useful to overcome this problem. They include on-line preconcentration techniques or alternative detection systems. This seems to be a promising area in the study of pyrethroids in real samples.

About the different pyrethroids studied it is necessary to bring out that only few of them have been studied in the field of chiral separations perhaps due to the difficulties in the obtention of pure standards and single isomers. There is a wide range of synthetic pyrethroids yet to be studied for separating their enantiomers.

Acknowledgements

The authors thank the Ministry of Education and Science (Spain), the Ministry of Science and Innovation (Spain) and the Comunidad Autónoma of Madrid (Spain) for financial support (projects CTQ2006-03849/BQU, CTQ2009-09022/BQU and S-0505/AGR-0312, respectively). V. Pérez-Fernández thanks the University of Alcalá for her research grant.

References

- [1] J. Hernández-Borges, F.J. García-Montelongo, M.A. Rodríguez-Delgado, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 26 (2005) 3799.
- [2] E. Eljarrat, P. Guerra, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 847.
- [3] A. Williams, *Pest. Sci.* 46 (1996) 3.
- [4] J.O. Magrans, J.L. Alonso-Prados, J.M. Garcia-Baudín, *Chemosphere* 49 (2002) 461.
- [5] A.W. Garrison, P. Schmitt, D. Martens, A. Ketrup, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 2249.
- [6] Ch.S. Wong, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 544.
- [7] T. O'Mahony, S. Moore, B. Brosnan, J.D. Glennon, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 83 (2003) 681.
- [8] D. Mueller-Beilschmidt, *J. Pest. Reform* 10 (1990) 32.
- [9] J. Laufer, M. Pelhate, D.B. Sattelle, *Pest. Sci.* 16 (1996) 651.
- [10] I.R. Hill, *Pest. Sci.* 27 (1989) 429.
- [11] W. Liu, J. Gan, S. Lee, I. Werner, *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 1861.
- [12] S.J. Maund, M.J. Hamer, M.C. Lane, E. Farrelly, J.H. Rapley, U.M. Goggin, W.E. Gentle, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 9.
- [13] S. Qin, W. Liu, J. Gan, Chiral selectivity in the environmental fate of pyrethroids, in: *Synthetic Pyrethroids: Occurrence and Behaviour in Aquatic Environments*, ACS Symposium Series, 2008 (Chapter 12).
- [14] A. Mekebri, D.B. Crane, G.J. Blondina, D.R. Oros, J.L. Rocca, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80 (2008) 455.
- [15] E.M. Ulrich, *Chim. Oggi* 25 (2008) 37.
- [16] A. Karcher, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 18 (1997) 1173.
- [17] D. Shea, V. Penmetsa, R.B. Leidy, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 1550.
- [18] G.W. Ware, D.M. Whitacre, *An Introduction to Insecticides, the Pesticide Book*, 4th ed., MeisterPro Information Resources, Ohio, 2004.
- [19] N. George, M. Kalyanasundaram, *J. Sci. Ind. Res.* 53 (1994) 933.
- [20] I. Ali, V.K. Gupta, H. Aboul-Enein, *Curr. Sci.* 84 (2003) 152.
- [21] W.P. Liu, J.J. Gan, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 755.
- [22] W. Liu, J.J. Gan, S. Qin, *Chirality* 17 (2005) S127.
- [23] T.L. Liu, Y.S. Wang, J.H. Yen, *J. Food Drug Anal.* 13 (2005) 357.
- [24] Ch. Xu, J. Wang, W. Liu, D. Sheng, Y. Tu, Y. Ma, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 174.
- [25] S. Qin, J. Gan, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9145.
- [26] S. Qin, R. Budd, S. Bondarenko, W. Liu, *J. Gan, J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5040.
- [27] S. Qin, J. Gan, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 5734.
- [28] W. Liu, S. Qin, J. Gan, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3814.
- [29] W. Liu, J. Gan, D. Schlenk, W.A. Jury, *PNAS* 102 (2005) 701.
- [30] Z.Y. Li, Z.C. Zhang, L. Zhang, L. Leng, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80 (2008) 335.
- [31] R.A. Chapman, *J. Chromatogr.* 258 (1983) 175.
- [32] P.E. Burt, M. Elliott, A.W. Farnham, N.F. Janes, P.H. Needham, D.A. Pulman, *Pest. Sci.* 5 (1974) 791.
- [33] M. Elliot, A.W. Farnham, N.F. Janes, D.M. Soderlund, *Pest. Sci.* 9 (1978) 112.
- [34] W. Leicht, R. Fuchs, M. Londershausen, *Pest. Sci.* 48 (1996) 325.
- [35] L.E. Mokry, K.D. Hoagland, *Environ. Toxicol. Chem.* 9 (1990) 1045.
- [36] B. Jiang, H. Wang, Q.M. Fu, Z.Y. Li, *Chirality* 20 (2008) 96.
- [37] M.K. Morgan, L.S. Sheldon, C.W. Croghan, P.A. Jones, J.C. Chuang, N.K. Wilson, *Environ. Res.* 104 (2007) 266.
- [38] W. Liu, J.J. Gan, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 736.
- [39] S. Sakata, N. Mikami, H. Yamada, *J. Pest. Sci.* 17 (1992) 169.
- [40] W. Liu, J. Gan, S. Lee, I. Werner, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 6233.
- [41] R.L. Holmstead, J.E. Casida, L.O. Ruzo, D.G. Fullmer, *J. Agric. Food Chem.* 26 (1978) 590.
- [42] R.J. Maguire, *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 1613.
- [43] M. Dondi, M. Flieger, J. Olsovska, C.M. Polcaro, M. Sinibaldi, *J. Chromatogr. A* 859 (1999) 133.
- [44] G.S. Yan, P. Parrilla-Vázquez, A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, H.Y. Aboul-Enein, *Chromatographia* 60 (2004) 523.
- [45] H.Y. Aboul-Enein, I. Ali, *Toxicol. Environ. Chem.* 86 (2004) 1.
- [46] J.P. Kutter, T.J. Class, *Chromatographia* 33 (1992) 103.
- [47] M.Y. Nie, L.M. Zhou, Q.H. Wang, D.Q. Zhu, *Chromatographia* 51 (2000) 736.
- [48] N. Ooi, H. Kitahara, R. Kira, *J. Chromatogr.* 515 (1990) 441.
- [49] J. Ševčík, K. Lemr, Z. Stránský, T. Večeřa, J. Hlaváč, *Chirality* 9 (1997) 162.
- [50] F. Gasparini, D. Misiti, C. Villani, *J. Chromatogr. A* 906 (2004) 35.
- [51] A.M. Girelli, A. Messina, M. Sinibaldi, *Annali di Chimica* 92 (2001) 417.
- [52] S.G. Lister, S.G. Hambling, *J. Chromatogr.* 539 (1991) 207.
- [53] T.J. Class, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 49 (1992) 189.
- [54] W. Lee, *Chromatographia* 53 (2001) 156.
- [55] G.R. Cayley, B.W. Simpson, *J. Chromatogr.* 356 (1986) 123.
- [56] F. García-Sánchez, A. Navas-Díaz, A. García-Pareja, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 97.
- [57] D.P. Edwards, M.G. Ford, *J. Chromatogr. A* 777 (1997) 363.
- [58] K. Lemr, J. Ševčík, D. Friedecký, A. Jonáková, D. Jírovský, *Acta Univ. Palacki. Olomouc. Chem.* 38 (1999) 41.
- [59] G.S. Yan, P. Parrilla-Vázquez, A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, H.Y. Aboul-Enein, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 27 (2004) 1507.
- [60] X. Tan, S. Hou, M. Wang, *Chirality* 19 (2007) 574.
- [61] X. Tan, S. Hou, J. Jiang, M. Wang, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1888.
- [62] J. Hernández-Borges, S. Frías-García, A. Cifuentes, M.A.J. Rodríguez-Delgado, *Sep. Sci.* 27 (2004) 947.
- [63] M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel (Eds.), *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, Comprehensive Analytical Chemistry, vol. XLV, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [64] C. García-Ruiz, M.L. Marina, *Electrophoresis* 27 (2006) 195.
- [65] L. Sánchez-Hernández, A.L. Crego, M.L. Marina, C. García-Ruiz, *Electrophoresis* 29 (2008) 237.
- [66] R.L. Chien, D.S. Burgi, *Anal. Chem.* 64 (1992) 489; J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 119.
- [67] D. Kaniansky, J. Marák, *J. Chromatogr.* 498 (1990) 191.
- [68] J.P. Quirino, S. Terabe, *Science* 282 (1998) 465.
- [69] P. Britz-McKibbin, G.M. Bebauld, D.D.Y. Chen, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1729.
- [70] A. Karcher, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 21 (2000) 2043.
- [71] R. Ivanyi, L. Jicsinsky, Z. Juvancz, *Electrophoresis* 22 (2001) 3232.
- [72] Y. Nishikawa, *Anal. Sci.* 9 (1993) 33.

Artículo Científico 2

“Chiral separation of agricultural fungicides”

V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina

Journal of Chromatography A 1218 (2011) 6561-6582



Review

Chiral separation of agricultural fungicides

Virginia Pérez-Fernández, María Ángeles García, María Luisa Marina*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Alcalá, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 May 2011

Received in revised form 21 July 2011

Accepted 26 July 2011

Available online 3 August 2011

Keywords:

Fungicides

Chiral separation

Capillary electrophoresis

Gas chromatography

High performance liquid chromatography

Supercritical fluid chromatography

ABSTRACT

Fungicides are very important and diverse environmental and agricultural concern species. Their determination in commercial formulations or environmental matrices, requires highly efficient, selective and sensitive methods. A significant number of these chemicals are chiral with the activity residing usually in one of the enantiomers. The different toxicological and degradation behavior observed in many cases for fungicide enantiomers, results in the need to investigate them separately. For this purpose, separation techniques such as GC, HPLC, supercritical fluid chromatography (SFC) and CE have widely been employed although, at present, HPLC still dominates chromatographic chiral analysis of fungicides. This review covers the literature concerning the enantiomeric separation of fungicides usually employed in agriculture grouping the chiral separation methodologies developed for their analysis in environmental, biological, and food samples.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	6561
2. Chiral separation of fungicides	6564
2.1. Gas chromatography	6564
2.2. High performance liquid chromatography	6565
2.3. Supercritical fluid chromatography	6574
2.4. Capillary electrophoresis	6575
3. Concluding remarks and future trends	6580
Acknowledgements	6581
References	6581

Abbreviations: BGE, background electrolyte; CD, cyclodextrin; CD-EKC, cyclodextrin modified electrokinetic chromatography; CD-MEKC, cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography; CDMPC, cellulose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate); CM- γ -CD, carboxymethyl- γ -cyclodextrin; CSP, chiral stationary phase; CTB, cellulose tribenzoate; CTMB, cellulose-tris-(4-methylbenzoate); CTPC, cellulose triphenylcarbamate; DS, degree of substitution; ECD, electron capture detector; EKC, electrokinetic chromatography; EOF, electroosmotic flow; HE- β -CD, hydroxyethyl- β -cyclodextrin; HP- β -CD, hydroxypropyl- β -cyclodextrin; HP- γ -CD, hydroxypropyl- γ -cyclodextrin; HSA, human seroalbumin; LC50, median lethal concentration; MEKC, micellar electrokinetic chromatography; MSPD, matrix solid phase dispersion; SBE- β -CD, sulpho-butyl-ether- β -cyclodextrin; SC, sodium cholate; SDS, sodium dodecyl sulphate; SFC, supercritical fluid chromatography; SPE, solid phase extraction; SRMM, stacking with reverse migrating micelles; Succ- β -CD, succinyl- β -cyclodextrin; Succ- γ -CD, succinyl- γ -cyclodextrin.

* Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 8854935; fax: +34 91 8854971.

E-mail address: mluisa.marina@uah.es (M.L. Marina).

1. Introduction

The main aim of all research studies about new agricultural products, is the development of new compounds able to offer the same effectiveness with lower application rates, higher selectivity, less cost and less undesired effects [1]. Approximately a 25% of all the agrochemicals used in the world are chiral and this property can have influence on all these aspects due to the different activity that stereoisomers may have [2]. In fact, although stereoisomers have exactly the same physical and chemical characteristics, when exposed to a chiral environment they use to behave very different and this can lead to different activities, toxicology or degradation patterns. If this is the case, when racemic mixtures are employed, from a 50 to a 75% of the amount added into the environment corresponds to an undesired and unneeded compound which may be less active as pesticide or even be toxic against non-target organisms [3]. In spite of this behavior, the most part of these

products are marketed and employed as racemates although the total amount of compound released to the environment could be greatly reduced if enantiomerically enriched products were used [4]. The different activity of pesticide enantiomers and the use of pure enantiomers as agrochemicals makes necessary their stereoselective determination in order to optimize enantioselective production processes, assessing the enantiopurity of formulations and monitoring their presence in the environment or into different types of matrices.

Fungicides are chemical compounds or biological organisms used to kill or inhibit fungi or fungal spores. Taking into account that the amount of pesticides employed per year is increasing, the amount of fungicides released to the environment increases at the same rate [5].

There is a great number of types of fungicides. They can be classified according to different criteria but perhaps the most usually employed are (1) mode of action and (2) chemical group [6]. Although some fungicides are chiral there is not much information concerning the role that chirality plays in their properties. Conazole and amide type fungicides are the best documented and there are some works showing the clear differences between the behavior of their enantiomers. Regarding the pesticide activity there are many compounds for which this property is only or mainly associated to one enantiomer. For example, for conazole type fungicides, the R-enantiomer of diniconazole and uniconazole, shows stronger fungicidal activity than the S-enantiomer, whereas the latter has higher plant growth regulating activity [7,8]. The same behavior has been observed for tebuconazole [9] and dichlofenazole whose R-enantiomer is over one hundred times more active as fungicide than the S-enantiomer, but the latter possesses very marked plant growth regulatory properties [10]. Another example is paclobutrazol since its fungicide activity is connected with 2R,3R-paclobutrazol while 2S,3S-paclobutrazol is responsible for the anti-gibberellin activity in plant growth regulation [11]. For triadimenol, a fungicide that possesses four stereoisomers, the (–)-threo-1S,2R-enantiomer shows the highest fungitoxicity against *Rhizoctonia solani* among the four enantiomers [12]. In the case of amide type fungicides most information found in the literature refers enantiomers of metalaxyl and benalaxyl. All the fungicidal activity of these compounds lies in the (+)-enantiomer or R-enantiomer [13].

When biological processes take place, the degradation patterns of each enantiomer may also differ a lot, resulting for example in the higher persistence of the non-active enantiomers. Furthermore, the toxicity against non-target organisms may also be different. For example, tebuconazole is degraded in rabbits following a pseudo-first-order kinetics and the degradation of the S-tebuconazole was much faster than that of the R-enantiomer in plasma after administration of the racemic compound [14]. Enzymatic reactions in rat microsomal material show that under physiological conditions of rat, the *trans*-isomer of bromuconazole reacts faster than the *cis*-isomer. Moreover, *trans*-bromuconazole was found to undergo stereoselective metabolism as evidenced by a change in the enantiomeric ratio (*trans* (–)/*trans* (+)) with time [15]. It was also reported that (–)-imazalil was degraded more quickly than (+)-imazalil in oranges [16], however, when imazalil was analyzed in soil extracts the degradation observed for both enantiomers was just the same. Due to the fact that the pH of the soils analyzed in this study was slightly alkaline, it is possible that the microbial activity under these conditions was limited and thus the degradation was not enantioselective [17]. The degradation of metalaxyl in most type of soils was shown to be enantioselective with the fungicidal active enantiomer, R-metalaxyl being degraded faster than the inactive S-enantiomer, resulting in residues enriched with S-metalaxyl when the racemic compound was incubated [13]. However, the S-enantiomer of this compound showed a faster

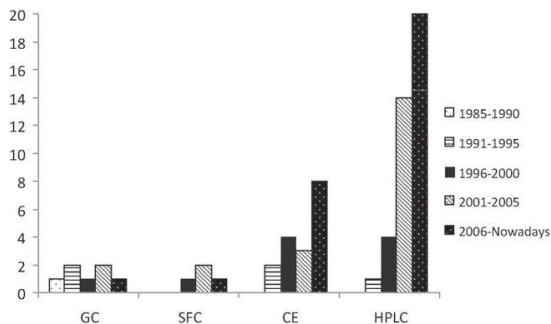


Fig. 1. Graphic showing the number of publications per year of each technique in the field of chiral separation of fungicides.

degradation in plants [18] and in rabbits, where its levels in plasma, liver and kidney decreased more rapidly than for the R-enantiomer [19]. Furthermore, acute toxicities of racemic metalaxyl and R-metalaxyl to *Daphnia magna* were determined and compared by Chen et al. [20]. The median lethal concentration (LC50) values for racemic and R-metalaxyl to *D. magna* showed the clear difference in the toxicity of the two enantiomers against this organism. In the case of benalaxyl, several articles have reported the differences in degradation between its two enantiomers in tomato, tobacco, sugar beet, capsicum, cucumber, and some kind of soils [21,22]. The results in soil showed that R-enantiomer dissipated faster than S-enantiomer and the stereoselectivity might be caused by microorganisms [21,22]. In tobacco, tomato, sugar beet and capsicum plants, there was significantly stereoselective metabolism. In effect, the preferential absorption and degradation of S-benalaxyl resulted in an enrichment of the R-enantiomer residue in these vegetables [21]. In terms of enantiotoxicity, for earthworm in paper contact test, after 48 h of exposure, the calculated LC50 values of the R-form and S-form were 4.99 and 6.66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively, demonstrating the clear differences in the toxicity of the two enantiomers of benalaxyl against this non-target organism [23]. Finally, vinclozolin (dicarboximide fungicide) has been proved to be enantioselectively degraded in wines during wine-making process, resulting in the enrichment of (–)-vinclozolin [24].

Taking into account all mentioned, chiral separation techniques with high efficiency are needed to determine the stereoisomers of pesticides in environmental and other many matrices and to understand the enantiomeric discrimination in these media in order to improve both our understanding of the pesticides and safety to humans, animals and environment [25].

Chiral separation of fungicides has been performed by different techniques (GC, HPLC, SFC, and CE). A chiral separation by these analytical techniques can be performed by two different experimental approaches: indirect or direct separations. Indirect separation needs a previous derivatization step with a chiral agent in order to transform the enantiomers into diastereoisomers that can be easily separated into an achiral column. To achieve the chiral separation successfully a nearly 100% pure enantiomeric derivatization reagent is needed [26]. Only a work is described in the literature using this strategy [27], being the direct separation of fungicide enantiomers employed in most cases. This strategy involves the addition of a chiral selector to the separation media or the employ of CSPs. The formation of reversible diastereoisomeric complexes is the responsible for the chiral discrimination [28]. As it can be observed in Fig. 1, the most employed technique for the determination of fungicide enantiomers is HPLC. In fact, the wide variety of chiral columns able to resolve a large number of fungicides has made HPLC a versatile technique widely applied to the determination of fungicides at low concentration levels. UV detec-

Table 1
Chiral separation of fungicides by GC.

Fungicide	Sample	Separation conditions	Sample preparation/comments	Reference
Triadimenol (a) Bitertanol (b) Triapenthenol (c) Paclobutrazol (d) Diclobutrazol (e) Dichlofentetozol (f)		<p>Achiral column: SE-52 (5% phenyl-methylpolysiloxane) (indirect approach). T program: 120 °C to 250 °C at 5 °C/min. Detection: FID and MS (when this detector is employed an OV-1 column was used).</p>	<p>Previous derivatization by reaction with acid chlorides. Analysis times and Rs: (a) 1.4 min, >baseline (b) 3.8 min (c) 1.2 min (d) 1.6 min, >baseline (e) 1.8 min (f) 1.5 min, >baseline.</p>	[27]
Metaxyl		<p>CSP: OV1701-BSCD (<i>tert</i>-butyldimethylsilyl-β-CD) column. T program: 70 °C (2 min), 20 °C/min to 120 °C, then at 3 °C/min to 230 °C. Injection: On-column at 70 °C. Detection: MS.</p>	<p>Analysis time: 23 min Rs: <baseline.</p>	[31]
Metaxyl	Soil, sewage sludge and surface waters	<p>CSP: OV1701-BSCD column. T program: 70 °C (2 min), 20 °C/min to 120 °C, then at 3 °C/min to 230 °C. Injection: On-column at 70 °C. Detection: MS.</p>	<p>Soil: Extraction with methanol reextraction with ethyl acetate. Purification in a silica microcolumn. Sewage sludge: Extraction with ethyl acetate and then followed as for soil. Water: Percolation through a Bio-Rad S-X2 macroreticular resin column. Analysis time: 23 min Rs: <baseline.</p>	[32]
Metaxyl (a) Metaxyl acid (b)	Soil	<p>CSP: PS086-BSCD (<i>tert</i>-butyldimethylsilyl-β-CD) column. T program: 70 °C (2 min), 20 °C/min to 120 °C, then 3 °C/min to 230 °C. Injection: split/splitless (250 °C, 60 s splitless) Detection: MS.</p>	<p>Extraction of metaxyl from soil with methanol. Derivatization of metaxyl acid with diazoethane and extraction with acetone first and methylene chloride later. Analysis time: 29 min (simultaneous separation) Rs: (a) 1.5 (b) 0.8.</p>	[33]
Metaxyl (a) Metaxyl acid (b)	Soil	<p>CSP: OV1701 and 25% of octakis (bis-<i>tert</i>-butyldimethylsilyl)-γ-CD column. T program: 70 °C (2 min), 20 °C/min to 120 °C, then at 3 °C/min to 230 °C. Injection: split/splitless (250 °C, 60 s splitless) Detection: MS.</p>	<p>Extraction of the compounds from soil samples first with methanol, second with acetone/water (1:1) and third with water. Acidification with H₂SO₄ and partition with dichloromethane. Derivatization of metaxyl-acid by ethylation with diazoethane. Analysis time: 20.5 min (simultaneous separation) Rs: (a) 1.5 (b) 1.3.</p>	[34]
Epoxiconazole (a) Cyproconazole (b)	Soil	<p>CSP: PS086 and 25% (w/w) of octakis-(bis-<i>tert</i>-butyldimethylsilyl)-γ-CD column. T program: 70 °C (2 min), 20 °C/min to 160 °C, then at 3 °C/min for epoxiconazole or 2.5 °C/min for cyproconazole to 220 °C. Injection: split/splitless (250 °C, 60 s splitless). Detection: MS.</p>	<p>Extraction from soil samples by adding first phosphate buffer and after shaking for 1 min, 5 ml of acetone was added. Reextraction with methanol and partition with dichloromethane. For clean up, the extracts were passed through silica mini column and then epoxiconazole eluted with ethyl acetate and cyproconazole eluted with ethyl acetate/methanol (95:5). Analysis times and Rs: (a) 19.5 min, >baseline (b) 20 min, <baseline.</p>	[35]

Table 1 (Continued)

Fungicide	Sample	Separation conditions	Sample preparation/[comments]	Reference
Hexaconazole (a)		CSP: 6- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl and 6- <i>O</i> - <i>tert</i> -hexyldimethylsilyl- β and - γ derivative columns. T program: isothermal between 140 and 220 °C depending the compound. Injection: Split ratio (1:30). Detection: FID.	Rs: (a) 1.3 (b) 1.0 (c) 2.9 (d) 2.0 (e) 1.7 (f) 1.6 (g) 3.6 (h) 1.5 (i) 0.2 (j) No separation (k) 4.4.	[36]
Fenarimol (b)				
Imazalil (c)				
Metalaxyl (d)				
Myclobutanil (e)				
Niarimol (f)				
Penconazole (g)				
Propiconazole (h)				
Tebuconazole (i)				
Triadimefon (j)				
Vinclozolin (k)				

tion was employed in these works showing a lack in the use of other detection systems such as MS. On the other hand, CE is a promising technique in this area due to its high resolution and separation efficiency, simplicity, rapidity, short analysis times, small sample and reagents consumption, etc. However, it is known that CE suffers from limited sensitivity due to the short optical pathlength of in-capillary detection. Surprisingly, in all the works reported in this review optical detection was employed in CE as well as in HPLC. Finally, there are also some works by GC and SFC but they suppose the minor part of the articles published although for example SFC offers quite low analysis times and acceptable resolutions in all the reported works. The main problem when analyzing fungicides by GC is that there are some groups thermally unstable and/or with a really high boiling point.

This review covers the literature concerning the enantiomeric separation of agricultural fungicides including the characteristics of the chiral methodologies employed in their determination as well as the most relevant results obtained.

2. Chiral separation of fungicides

2.1. Gas chromatography

Chiral GC is widely used for the analysis of volatile chiral compounds that are thermally stable; this includes molecules having few functional groups that can volatilize easily. Compared to other techniques, GC has as its main advantages the high efficiency, sensitivity and reproducibility [29]. Furthermore, the combination of GC with detectors like MS, electron capture detector (ECD) or the coupling with a second chromatographic dimension (GC \times GC) makes this technique very appropriate to analyze environmental, agricultural and food samples [29].

In the direct separation by chiral GC several types of CSPs may be employed. The most usual are classified in three groups: (1) amino acid derivatives and diamides, (2) chiral metallic complexes, and (3) cyclodextrin derivatives [30]. However, the last type accounts about 90% of successful chiral separations in general and the same can be said in the case of the chiral separation of agricultural fungicides, as shown in Table 1. It can be observed that the compounds enantiomerically separated by GC are quite limited focusing mainly the works published on the chiral separation of pyrimidine fungicides, conazole fungicides and amide fungicides and the most employed detection is MS.

The first enantiomeric separation of fungicides by GC was performed by Burden et al. [27] employing an indirect approach in 1987. The fungicides triadimenol, bitertanol, triapenthenol, paclobutrazol, diclobutrazol and dichlopentezol, all of them triazole alcohols, were derivatized with acid chlorides to obtain the corresponding diastereoisomeric ester. The diastereoisomers formed were resolved in an achiral SE-52 (5% phenylmethylpolysiloxane) fused silica column in less than 3.8 min and with almost baseline separation for triadimenol, paclobutrazol and dichlopentezol.

Buser and Muller [31] developed the first methodology employing the direct approach, for the chiral resolution of the fungicide metalaxyl in combination with some herbicides not shown in Table 1 (alachlor, acetochlor, metolachlor, dimethenamid). The employ of a *tert*-butyldimethylsilyl- β -CD based CSP column (cyanopropylphenyldimethyl polysiloxane modified with the cited cyclodextrin (CD), OV1701-BSCD) and using MS as detector permitted the partial separation of metalaxyl enantiomers in 23 min. This method was later applied to the determination of these five compounds in sewage sludge, soils and surface waters previous extraction with an organic solvent for the first two matrices (methanol for soils and ethyl acetate for sewage sludge) and a

subsequent cleanup step with a silica microcolumn for sewage sludge and soil samples and a percolation through a Bio-Rad S-X2 resin column for water samples [32]. Enantioselective degradation was observed in soil and sewage sludge for all compounds except for acetochlor. Only for metalaxyl different enantioselectivity was demonstrated in the two different media studied with the S-enantiomer being faster degraded in sewage sludge and the more active enantiomer (R-metalaxyl) being faster degraded in soil. Analyzed surface and rain waters contained detectable amounts of all the fungicides and in all but one of the samples the enantiomeric composition was close to those of the technical product demonstrating that no biological degradation had occurred. A similar CSP, based on the same CD (PS086-BSCD, tert-butyl dimethylsilyl- β -CD) was also employed for the detection of metalaxyl and its corresponding metabolite in soils by the same research group [33]. Metalaxyl acid is the main metabolite of metalaxyl in environmental samples and it is also chiral. The two analytes were extracted from soil with methanol. After this step, an ethylation reaction was performed to make possible the detection of metalaxyl acid as ethyl ester. The optimal temperature conditions selected for the analysis, 70 °C for 2 min followed by a ramp of 20 °C/min to 120 °C and a second ramp at 3 °C/min till 230 °C, allowed the simultaneous separation of both compounds in approximately 30 min. Finally, the degradation pattern of the compounds was studied showing in both cases the preferential degradation of one of the enantiomers as it can be seen in Fig. 2. This figure shows the EI SIM chromatograms for metalaxyl and metalaxyl acid (analyzed as ethyl ester) from the incubation of racemic metalaxyl in soil samples after (A) 0 days, (B) 28 days and (C) 74 days of the application. The chromatograms confirm an initially racemic composition of metalaxyl (Fig. 2A) and its enantioselective degradation leading to residues enriched with the first eluted S-enantiomer, and the concurrent formation and subsequent degradation of metalaxyl acid (Fig. 2B). The residues from racemic metalaxyl were dominated by S-metalaxyl and S-metalaxyl acid (Fig. 2C) and both compounds were configurationally stable in soil and no interconversion was observed. When employing a chiral stationary phase based on octakis [(bis-tert-butyl dimethylsilyl)]- γ -CD [34] the separation of these two compounds was obtained in less than 21 min (approximately 10 min less than the obtained when employing the same CD but β derivative) and with resolutions higher than 1.3. The degradation results showed that depending on the pH of the soil the enantioselective degradation of metalaxyl was in one or in other sense but this did not occur for metalaxyl acid. In fact, in aerobic soils with pH > 5 the fungicidally active R-metalaxyl was degraded faster than the S-metalaxyl, at pH 4–5 both enantiomers were degraded at similar rates and at pH < 4 or in anaerobic soils the enantioselectivity was reversed. A similar study was achieved for the fungicides epoxiconazole and cyproconazole using a CSP based on the same CD [35]. The separation of epoxiconazole enantiomers was obtained in 19.5 min with good resolution but only the partial separation of the four enantiomers of cyproconazole was possible in 20 min. The degradation study of these compounds in soils showed that in alkaline and slightly acidic soils the degradation of epoxiconazole was enantioselective whereas in more acidic soils both enantiomers were degraded at similar rates. The four stereoisomers of cyproconazole were also degraded at different rates in various soils, but only the stereoselectivities between epimers showed some correlations with pH whereas enantioselectivities did not. Both fungicides were configurationally stable in soil, and no enantiomerization or epimerization was observed.

Finally, a comparative study on the use of 6-O-tert-butyl dimethylsilyl and 6-O-tert-hexyl dimethylsilyl- β or - γ derivative columns was performed for the separation of fungicide racemates of different volatility (hexaconazole, fenarimol, imazalil, metalaxyl, myclobutanil, nuarimol, penconazole,

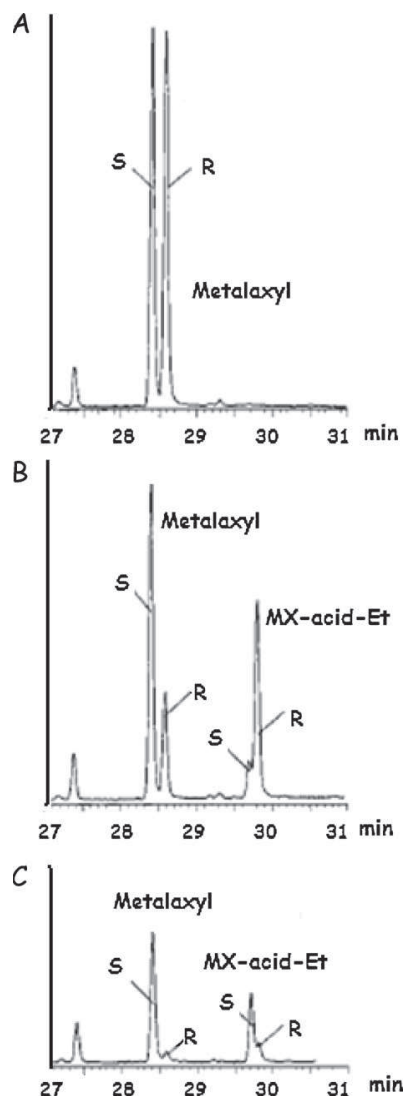


Fig. 2. EI SIM chromatograms (m/z 220) of metalaxyl and metalaxyl acid (analyzed as ethyl ester) by GC–MS from the incubation of racemic metalaxyl in soil samples after (A) 0 days, (B) 28 days and (C) 74 days after application using a chiral column. *Experimental conditions:* Column: PS086-BSCD (tert-butyl dimethylsilyl- β -CD); T program: 70 °C (2 min), 20 °C/min to 120 °C/min, then 3 °C/min to 230 °C; injection: split/splitless (250 °C, 60 s splitless); detection: MS. Reprinted with permission from Ref. [33].

propiconazole, tebuconazole, triadimefon and vinclozolin) by Bicchi et al. [36]. For high-to-medium volatile racemates, the 6-O-tert-butyl dimethylsilyl- β -CDs based CSP was the most enantioselective, while for medium-to-low volatile racemates the 6-O-tert-hexyl dimethylsilyl- γ derivatives had a better enantioselectivity.

2.2. High performance liquid chromatography

HPLC has been the most widely employed technique for chiral separations, because it is quite rapid, non-destructive, there is little possibility of epimerization during the analysis [37] and it is the best technique for small-scale preparation of enantiopure

Table 2
Chiral separation of fungicides by HPLC.

Fungicide	Sample	Separation conditions	Sample preparation/comments	Reference
Metalaaxyl (a) Metalaaxyl intermediate (b)	–	CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenyl)carbamate) column. Mobile phase: (a) hexane/isopropanol 85:15 (v/v) (b) hexane. Detection: UV 230 nm. CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenyl)carbamate) column. Mobile phase: hexane/isopropanol 85:15 (v/v) for plasma and 92:8 (v/v) for tissues. Detection: UV 220 nm, polarimetric detector.	Analysis times and Rs: (a) ~7 min, 5.3 (b) ~21 min, 9.4. Decreasing the proportion of 2-propanol in the mobile phase increased resolution. Analysis time: ~25 min.	[48]
Tebuconazole	Rabbit (plasma and tissues)	CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenyl)carbamate) column. Mobile phase: hexane/isopropanol 85:15 (v/v) for plasma and 92:8 (v/v) for tissues. Detection: UV 220 nm, polarimetric detector.	[0.4-5]Rs: baseline LOD: 0.025 µg/ml LOQ: 0.10 µg/ml Preferential degradation of (+)-(-)-tebuconazole was observed. Extraction from soil and plants with methanol and reextraction with ethyl acetate followed by SPE. Analysis time: ~17.6 min.	[14]
Metalaaxyl	Soil and sunflower plants	CSP: Chiralcel OJ column. Mobile phase: n-hexane/isopropanol 85:15 (v/v). Detection: UV 254 nm.	Extraction from soil and plants with methanol and reextraction with ethyl acetate followed by SPE. Analysis time: ~17.6 min.	[18]
Metalaaxyl	Rabbit plasma, liver and kidney tissue	CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenyl)carbamate) column. Mobile phase: methanol/water 55:45 (v/v) Detection: UV 220 nm, MS.	Rs: 1.3. S-metalaaxyl was faster degraded in plants and R-metalaaxyl was faster degraded in soil. Extraction with ethyl acetate. Analysis time: 23 min Rs: >1.5 LOD: 0.01 µg/ml LOQ: 0.03 µg/ml Preferential degradation of (+)-(-)-metalaaxyl.	[19]
Benalaxyl	Tomato, tobacco, sugar beet, capsicum and soil	CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenyl)carbamate) column. Mobile phase: n-hexane/isopropanol 90:10 (v/v) for soil and 98:2 (v/v) for plants. Detection: UV 210 nm.	Extraction from soil with acetone and reextraction with dichloromethane. Evaporated and reconstituted in isopropanol. Extraction from plants with ethyl acetate, redissolved in petroleum ether and SPE. Analysis time: 18 min for soil and 50 min for plants. Rs: >1.5 LOD: 0.05 µg/g Preferential degradation of (-)-(-)-benalaxyl in soils and (+)-(-)-benalaxyl in plants.	[21]

Table 2 (Continued)

Fungicide	Sample	Separation conditions	Sample preparation/comments	Reference
Benalaxyl	Soil and cucumber plants	CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenyl)carbamate) column. Mobile phase: hexane/isopropanol 96:4 (v/v) for plants and 95:5 (v/v) for soils. Detection: UV 220 nm, polarimetric detector.	Soil: Extraction with acetone, followed by SPE. Plants: Extraction with ethyl acetate, followed by SPE. Analysis time: ~22 min Rs: > 1.5	[22]
Benalaxyl	Earthworm tissues and soil	CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenyl)carbamate) column. Mobile phase: n-hexane/isopropanol 97:3 (v/v). Detection: UV 230 nm.	LOD: 0.10 µg/g Extraction from soil with ethyl acetate. Extraction from earthworm tissues with ethyl acetate. Addition of acetonitrile for fat destruction, liquid-liquid extraction with n-hexane followed by SPE. Analysis time: ~34 min Rs: > 1.5	[23]
Metalaxyl	-	CSP: Chiralcel OD-R column. Mobile phase: acetonitrile/water 40:60 (v/v). Detection: UV 254 nm and polarimetric.	LOD: 0.20 mg/kg. Analysis time: ~16 min Rs: 5.	[31]
Uniconazole Diniconazole Propiconazole	Soil	CSP: Pirkle type Chirex 3020 column ((S)-tert-leucine and (R)-1-(α-naphthyl)ethylamine) Mobile phase: n-hexane/isopropanol (100:4 (v/v) for uniconazole and diniconazole and 100:2 (v/v) for propiconazole). Detection: UV 230 nm.	MSPD extraction. Analysis times and Rs: (a) ~13 min, 1.7 (b) ~14 min, 1.9 (c) ~14 min, 2.8 LODs: (a) 0.03 µg/g (b) 0.03 µg/g (c) 0.04 µg/g. Rs: (a) 2.2 (b) 1.3 (c) 1.0 (d) 1.6.	[37]
Benalaxyl (a) Vinclozolin (b) Tebuconazole (c) Hexaconazole (d)	-	CSP: cellulose triphenylcarbamate column. Mobile phase: (a) (c) n-hexane/isopropanol 90:10 (v/v) (b) (d) n-hexane/isopropanol 95:5 (v/v). Detection: UV 230 or 210 nm and circular dichroism.	Rs: (a) 0.03 µg/g (b) 0.03 µg/g (c) 0.04 µg/g. Rs: (a) 2.2 (b) 1.3 (c) 1.0 (d) 1.6.	[38]
Metalaxyl (a) Metalaxyl intermediate (b) Hexaconazole (c)	-	CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenyl)carbamate) column. Mobile phase: (a) n-hexane/isopropanol 85:15 (v/v) (b) n-hexane (c) n-hexane/isopropanol 95:5 (v/v) Detection: UV.	Rs: (a) 5.3 (b) 1.2 (c) 1.8.	[41]
Tebuconazole	-	CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenyl)carbamate) column. Mobile phase: hexane/isopropanol 94:6 (v/v). Detection: UV 230 nm.	Analysis time: ~25 min Rs: 1.4.	[42]
Diniconazole (a) Tebuconazole (b) Hexaconazole (c) Thiadimefon (d) Flutriafol (e)	-	CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenyl)carbamate) column. Mobile phase: (a) hexane/n-butanol 98:2 (v/v) (b) hexane/ethanol 98:2 (v/v) (c) and (e) hexane/isopropanol 98:2 (v/v) (d) hexane/n-butanol 99:1 (v/v). Detection: UV 220 nm.	Analysis times and Rs: (a) ~22 min, 1.6 (b) ~45 min, 1.7 (c) ~30 min, 2.5 (d) ~30 min, 1.7 (e) ~45 min, 2.0.	[43]
Diniconazole (a) Uniconazole (b) Pacllobutrazol (c) and their acyl derivatives	-	CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenyl)carbamate) column. Mobile phase: n-hexane/organic modifier 85:15 (v/v) (ethanol, 1-propanol, 1-butanol, isopropanol, t-butanol). Detection: UV 230 nm.	Study of the influence of mobile phase, temperature, and structural features upon isomer separation. For the linear alcohol series, the Rs value increased steadily as the alcohol chain length was increased. Increasing the ethanol concentration, the Rs for all the solutes decreased, suggesting that hydrogen bonding plays a key role in the retention mechanism.	[44]

Table 2 (Continued)

Fungicide	Sample	Separation conditions	Sample preparation/comments	Reference
Benalaxyl (a) Vinclozolin (b)	Soil and water	CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenylcarbamate) column. Mobile phase: (a) <i>n</i> -hexane/butanol 98:2 (v/v) (b) <i>n</i> -hexane/isopropanol 99:1 (v/v). Detection: UV 210 nm and circular dichroism. CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenylcarbamate) column. Mobile phase: <i>n</i> -hexane/isopropanol 97:3 (v/v). Detection: UV 220 nm, polarimetric detector.	Soil: Extraction with acetone, reextraction with dichloromethane. Water: SPE Analysis time and Rs: (a) ~34 min, 7.8 (b) 1.5 LOD (Benalaxyl): 0.13 ng/L. Extraction with ethyl acetate. Analysis time: ~24 min Rs: >1.5 LOD: 0.10 µg/ml LOQ: 0.25 µg/ml. The study demonstrated that the pharmacokinetic of benalaxyl enantiomers is enantioselective in rabbits. Analysis times and Rs: (a) ~10 min, 6.7 (b) ~11 min, 1.8.	[45] [46]
Epoxiconazole (a) Benalaxyl (b)	-	CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylcarbamate) column. Mobile phase: (a) AcN/water 70:30 (v/v) (b) methanol/water 85:15 (v/v). Detection: UV 230 or 210 nm, circular dichroism. CSP: new bonded cellulose (3,5-dimethylphenylcarbamate) column. Mobile phase: hexane/isopropanol 80:20 (v/v). Detection: UV 230 nm.		[47]
Metalaxyl	-	CSP: new bonded cellulose (3,5-dimethylphenylcarbamate) column. Mobile phase: (a) <i>n</i> -hexane/isopropanol 80:20 (v/v) (b) <i>n</i> -hexane/isopropanol 90:10 (v/v). Detection: UV 230 nm.	Analysis time: ~20 min Rs: 3.5.	[50]
Metalaxyl (a) Tebuconazole (b)	-	CSP: cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenylcarbamate) column. Mobile phase: (a) <i>n</i> -hexane/isopropanol 80:20 (v/v) (b) <i>n</i> -hexane/isopropanol 90:10 (v/v). Detection: UV 230 nm.	Analysis time and Rs: (a) from 7 to 17 min depending on the T, 3.26 (20 °C) (b) from 10 to 17 min depending on the T, 1.1 (20 °C).	[51]
Metalaxyl	-	CSP: novel cellulose- <i>tris</i> -(<i>N</i> -3,5-dimethylphenylcarbamate) column. Mobile phase: hexane/isopropanol 70:30 (v/v). Detection: UV 230 nm.	Analysis time: ~20 min Rs: 3.8.	[52]
Diniconazole (a) (<i>RS</i>)-1- <i>p</i> -chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-pental-3-ol (b)	Commercial product of diniconazole	CSP: Chiralcel OD-H cellulose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenylcarbamate) column. Mobile phase: (a) hexane/isopropanol 96:4 (v/v) (b) hexane/isopropanol 85:15 (v/v). Detection: UV 254 nm for (a) and 225 nm for (b).	Analysis time and Rs: (a) 11 min, 1.7 (b) 15 min, 1.4. Determination of optical purity of technical products.	[53]
Hexaconazole (a) Triadimefon (b) Tebuconazole (c) Diniconazole (d) Flutriafol (e) Propiconazole (f) Difenoconazole (g)	-	CSP: Chiralcel OD column (cellulose <i>tris</i> -(4-methylbenzoate)) (g). Mobile phase: hexane/ethanol or isopropanol 90:10 (v/v). Detection: UV [(a) 230 nm, (b) 228 nm, (c) 227 nm, (d) 253 nm, (e)-(g) 230 nm] and circular dichroism.	Analysis times and Rs: (a) ~17 min, 3.0 (b) ~12 min, 2.1 (c) ~42 min, 1.3 (d) ~10 min, 1.2 (e) ~26 min, 1.4 (f) ~34 min, 3.0, 2.7, 1.0 (g) ~55 min, 1.1, 1.0, 3.8.	[54]
Hexaconazole (a) Triadimenol (b) <i>cis/trans</i> -1,4-chlorophenyl-2- <i>1H</i> -1,2,4-triazol-1-yl-cyclopentanol (c)	-	CSP: Chiralcel OJ, Chiralcel OD, Chiralpak AD amylose- <i>tris</i> -(3,5-dimethylphenylcarbamate), Chiralpak AS (amylose- <i>tris</i> -(<i>S</i>)-1-phenylethylcarbamate) columns. Mobile phase: depends on the CSP employed. Detection: UV 254 nm.	Analysis time: ~40 min (simultaneous separation). Rs: 0.7–10.3 in different conditions. The elution order of the enantiomers varied with the stationary phase. The carbamate phases were more versatile than the ester phases.	[55]

Table 2 (Continued)

Fungicide	Sample	Separation conditions	Sample preparation/comments	Reference
Metaxyl (a) Myclobutanil (b) Triadimefon (c)	–	CSP: Chiralcel OD column. Mobile phase: (1) methanol/water 55:45 (v/v) or (2) acetonitrile/water 50:50 (v/v). Detection: UV (a) 230 nm, (b) 254 nm, and (c) 225 nm.	Rs: mobile phase 1 (a) 5.7 (b) 2.0 (c) 2.3 Enantioselectivity increased when increasing water concentration in mobile phase, when decreased column temperature, and it was not modified with the pH. Extraction with methanol and a reextraction with ethyl acetate followed by SPE for the cleanup step.	[56]
Metaxyl	Sunflower plants	CSP: Chiralcel OJ column. Mobile phase: n-hexane/isopropanol 85:15 (v/v). Detection: UV 254 nm.		[57]
Epoxiconazole	Soil and water	CSP: microcrystalline cellulose triacetate column (CTPC). Mobile phase: methanol/water 87:13 (v/v) Detection: UV 230 nm.	Extraction from soil with methanol/water 95:5 (v/v). For the analysis of tap waters, the analyte was preconcentrated in a short Separon SGX C ₁₈ column prior to the chiral separation and in this way the interferences were eliminated (heart-cut technique). Analysis time: ~31.7 min Rs: 1.17.	[58]
Tebuconazole (a) Hexaconazole (b) Myclobutanil (c) Diniconazole (d) Uniconazole (e) Paclobutrazol (f) Triadimenol (g)	–	CSP: Different chiral columns were tested: (S,S)-Whelk OI, cellulose tribenzoate (CTB), cellulose tri-(4-methylbenzoate) (CTMB), cellulose triphenylcarbamate (CTPC) and cellulose tris-(3,5-dimethylphenyl carbamate) (CDMPC), being the last one the most suitable for all compounds. Mobile phase: (a) and (b) hexane/isopropanol (1.20 M) (c) hexane/isopropanol (3.43 M) (d)–(f) hexane/n-butanol (1.20 M) (g) hexane/ethanol (0.51 M). Detection: UV (a) 269.8 nm, (b) 270.9 nm, (c) 221.5 nm, (d) 298.7 nm, (e) (f) 268.6 nm, and (g) 278.0 nm.	Analysis times and Rs in CDMPC column: (a) ~45 min, 2.55 (b) ~28 min, 4.79 (c) ~26 min, 11.15 (d) ~15 min, 1.24 (e) ~15 min, 1.45 (f) ~15 min, 1.42 (g) ~35 min, 0.64, 2.87, 0.37 Among the self prepared cellulose columns the resolution decreased in the order: CDMPC > CTPC > CTMB > CTB (no enantioseparation in the last column). Analysis times and Rs: (a) ~30 min, 3.8 (b) ~50 min, 1.5 (c) ~23 min, 0.9 (d) ~30 min, 1.8.	[59]
Metaxyl (a) Myclobutanil (b) Imazalil (c) Triadimefon (d)	–	CSP: amylose tris-(S)-1-phenylethylcarbamate column. Mobile phase: (a)–(c) n-hexane/isopropanol 95:5 (v/v) (d) n-hexane/isopropanol 98:2 (v/v). Detection: UV (a–c) 230 nm, (d) 220 nm and circular dichroism for the identification of the elution order.		[60]
Metaxyl (a) Benalaxyl (b)	–	CSP: amylose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) column. Mobile phase: (a) n-hexane/isopropanol 98:2 (v/v) (b) n-hexane/isopropanol 95:5 (v/v). Detection: UV 230 nm and circular dichroism.	Analysis times and Rs: (a) ~40 min, 1.1 (b) ~16 min, 2.8.	[61]
Paclobutrazol (a) Myclobutanil (b) Uniconazole (c)	Soil and water	CSP: Chiralpak AD column. Mobile phase: (a) and (c) n-hexane/isopropanol 90:10 (v/v) (b) n-hexane/isopropanol 80:20 (v/v). Detection: UV (a) 221 nm, (b) 223 nm and (c) 255 nm and circular dichroism.	Extraction from soil with acetone. Extraction from water by SPE. Analysis times, Rs and LOD: (a) ~17 min, 2.5, 0.025 mg/kg (b) ~20 min, 4.0, 0.05 mg/kg (c) ~20 min, 2.3, 0.05 mg/kg.	[62]

Table 2 (Continued)

Fungicide	Sample	Separation conditions	Sample preparation/comments	Reference
Metaxyl	Sewage sludge	CSP: Chiralpak AS-H column. Mobile phase: n-hexane/isopropanol 85:15 (v/v) Detection: UV 220 nm and circular dichroism.	Analysis time: 12 min Rs: > 1.5.	[63]
Ketoconazole (a) Itraconazole (b)	-	CSP: (a) Chiralcel OD column (b) Chiralpak AS column. Mobile phase: (a) hexane/isopropanol 70:30 (v/v) + 10 mmol octanoic acid (b) hexane/methanol/ethanol 75:12:13 (v/v/v) + 10 mmol octanoic acid. Detection: UV 254 nm and optical rotation. CSP: Chiralpak IA amylose tris (3,5-dimethylphenyl/carbamate) column. Mobile phase: (a) Methyl-t-butyl ether 100% (b) Ethylacetate/hexane 30:70 (v/v) (c) CH ₂ Cl ₂ /hexane 25:75 (v/v) (d) CHCl ₃ /hexane 25:75 (v/v). Detection: UV. CSP: Whelk-O column. Mobile phase: hexane/isopropanol 70:30 (v/v). Detection: UV 254 nm. CSP: Whelk-O1 chiral column equipped with a diol precolumn. Mobile phase: n-hexane/isopropanol 80:20 (v/v). Detection: UV 205 nm. CSP: Whelk O1 column. Mobile phase: hexane/isopropanol 80:20 (v/v). Detection: UV 205 nm and MS/MS	Analysis times and Rs: (a)? min, 1.7 (b) ~110 min, 1.94, 0.68, 1.13 (two diastereoisomeric pairs).	[64]
Metaxyl	-	CSP: Chiralpak IA amylose tris (3,5-dimethylphenyl/carbamate) column. Mobile phase: (a) Methyl-t-butyl ether 100% (b) Ethylacetate/hexane 30:70 (v/v) (c) CH ₂ Cl ₂ /hexane 25:75 (v/v) (d) CHCl ₃ /hexane 25:75 (v/v). Detection: UV. CSP: Whelk-O column. Mobile phase: hexane/isopropanol 70:30 (v/v). Detection: UV 254 nm. CSP: Whelk-O1 chiral column equipped with a diol precolumn. Mobile phase: n-hexane/isopropanol 80:20 (v/v). Detection: UV 205 nm. CSP: Whelk O1 column. Mobile phase: hexane/isopropanol 80:20 (v/v). Detection: UV 205 nm and MS/MS	Rs: (a) 3.5 (b) 6.19 (c) 5.58 (d) 3.75.	[65]
Metaxyl	-	CSP: Whelk-O column. Mobile phase: hexane/isopropanol 70:30 (v/v). Detection: UV 254 nm. CSP: Whelk-O1 chiral column equipped with a diol precolumn. Mobile phase: n-hexane/isopropanol 80:20 (v/v). Detection: UV 205 nm. CSP: Whelk O1 column. Mobile phase: hexane/isopropanol 80:20 (v/v). Detection: UV 205 nm and MS/MS	Analysis time and Rs: ~13 min, ~1.5	[66]
Metaxyl	Soil	CSP: Whelk-O1 chiral column equipped with a diol precolumn. Mobile phase: n-hexane/isopropanol 80:20 (v/v). Detection: UV 205 nm. CSP: Whelk O1 column. Mobile phase: hexane/isopropanol 80:20 (v/v). Detection: UV 205 nm and MS/MS	Extraction with methanol (acidified with formic acid), the extract was cleaned-up by SPE. Analysis time: ~12 min Rs: >baseline.	[67]
Metaxyl	Soil	CSP: Whelk O1 column. Mobile phase: hexane/isopropanol 80:20 (v/v). Detection: UV 205 nm and MS/MS	Extraction from soil with methanol, the suspension was acidified with formic acid, followed by SPE. Analysis time: ~12.5. Rs: >1.5.	[68]
Benalaxyl	Soil and water	CSP: (R,R) Whelk-O1 column. Mobile phase: hexane/isopropanol in different proportions. Detection: UV 220 nm and circular dichroism.	Soil: extraction with acetone and clean up using a silica gel column. Water: SPE. Analysis time: ~18 min Rs: 5.9 using hexane/isopropanol 90:10 (v/v) LODs: 0.004 mg/kg soil 0.01 mg/kg water.	[69]

Table 2 (Continued)

Fungicide	Sample	Separation conditions	Sample preparation/comments	Reference
Metalaxyl (a)	-	CSP: amylopectin-tris(phenylcarbamate) based column.	Analysis times and Rs:	[70]
Benalaxyl (b)	-	Mobile phase:	(a) ~26 min, 1.37	
Miclobutanil (c)	-	(a) and (c) n-hexane/isopropanol 90:10 (v/v)	(b) ~25 min, 1.01	
Hexaconazole (d)	-	(b) n-hexane/isopropanol 97:3 (v/v)	(c) ~38 min, 1.47	
Tebuconazole (e)	-	(d)-(g) n-hexane/isopropanol 95:5 (v/v).	(d) ~14 min, 2.45	
Uniconazole (f)	-	Detection: UV 230 nm and circular dichroism.	(e) ~29 min, 1.54	
Paclitrazolol (g)	-	CSP: Hypersil BDS C8 for the separation of 2R,3S and 2S,3R enantiomers.	(f) ~31 min, 2.05	
Voriconazole	-	and Chirobiotic V tm for the separation of 2R,3R and 2S,3S columns.	(g) <31 min, 2.42.	[71]
		Mobile phase: methanol/20 mM KH ₂ PO ₄	Analysis time: ~42 min for 2R,3S and 2S,3R enantiomers and ~7 min for 2R,3R and 2S,3S.	
		60:100 (v/v) with SBE-β-CD as chiral additive for the separation of 2R,3S and 2S,3R enantiomers and cyclohexane/ethanol/TFA 70:30:0.075 (v/v) for the separation of 2R,3R and 2S,3S.	The use of CDs in the mobile phase and the employ of vancomycin in the CSP were examined. CDs only were able to separate one pair of diastereoisomers while for the other pair it was necessary the chiral column containing vancomycin.	
		Detection: UV 254 nm.		

chemicals [38]. The design of new CSPs capable of effective chiral recognition is the key point of this technique [39]. Although several CSPs have been probed in the field of chiral separation of fungicides, polysaccharides are among the ones that have shown best chiral recognition ability. In particular, cellulose and amylose derivatives are the most popular and successful CSPs used in this field.

Among the methods used to achieve the chiral separation of fungicides, direct resolution of the enantiomers by HPLC using columns packed with CSPs is the most routinely used, as it can be seen in Table 2. The compounds analyzed are again mainly focused in amide and conazole type fungicides perhaps because to date, triazoles (corresponding to conazole group) represent the most important category of fungicides [40]. There are a lot of different chiral stationary phases that have been employed for the enantiomeric separation of fungicides by HPLC as shown in Fig. 3 being the most frequent a cellulose derivative: cellulose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) commercially known as Chiralcel OD. This CSP was first employed by Zhou et al. [41] for the enantiomeric separation of metalaxyl, metalaxyl intermediate and hexaconazole using hexane/isopropanol as mobile phase for the first and third compound and only hexane for metalaxyl intermediate, achieving resolutions of 5.3, 1.2, and 1.8, respectively. After this first work the research group studied other compounds such as tebuconazole [14,42,43], diniconazole [43,44], triadimefon [43], flutriafol [43], benalaxyl [21–23,45–47], vinclozolin [45], epoxiconazole [47], uniconazole [44] and paclobutrazol [44], using in most cases hexane/isopropanol as mobile phase although sometimes the addition of different alcohols such as ethanol or isobutanol to the mobile phase was also investigated. In some works the influence of the alcohol added to the mobile phase [41,43–45,47] or its concentration on the chiral separation was studied [48]. In general, a lower concentration of organic modifier resulted in higher resolution values. Although for temperature there is not a general tendency since for each compound a maximum Rs is reached at a different value, it can be considered that usually lower temperatures result in higher enantioselectivity [45,47]. It has to be mentioned that analysis times were in all cases between 7 (metalaxyl) [48] and 45 min (tebuconazole and flutriafol) [43]. Concerning chiral resolution, values of 1.2 were obtained in the worst case [41] and near 9.5 in the best one [48] both for metalaxyl intermediate. The samples analyzed in all these works were of different nature, some fungicides were extracted from biological samples like rabbit plasma, tissues, liver and kidney [14,19,46] or earthworm tissues [23]. Some others were analyzed in environmental and food samples (soils [21–23,45], water [45], cucumber plants [22], tomato, tobacco and sugar beet [21]). Always a sample treatment step was necessary to extract the analytes. Liquid extraction with an organic solvent (acetone, methanol or ethyl acetate) was used in all the works mentioned and sometimes a subsequent clean up step was performed by solid phase extraction (SPE), especially when soil samples were analyzed. Fig. 4 shows an example of the results obtained for extracts from soil (Fig. 4A–C) and cucumber leaves (Fig. 4D–F) spiked with racemic benalaxyl at a concentration of 5 µg/g. The extraction of benalaxyl from soil samples was firstly performed with acetone, followed by a clean-up step by SPE and in plants the extraction solvent was ethyl acetate also followed by a clean-up step by SPE. The results shown in Fig. 4 compare the blank samples (Fig. 4A and D), the samples just in the same moment they were spiked with racemic benalaxyl (Fig. 4B and E) and the samples several days after the application or racemic benalaxyl (Fig. 4C and F). As it can be observed, a preferential degradation of one of the enantiomers is clearly obtained, actually the (+)-S-benalaxyl showed a faster degradation in plants, while the (–)-R-benalaxyl showed a faster degradation in soils [22]. Other real samples also showed this enantioselective degradation, for example for rabbit

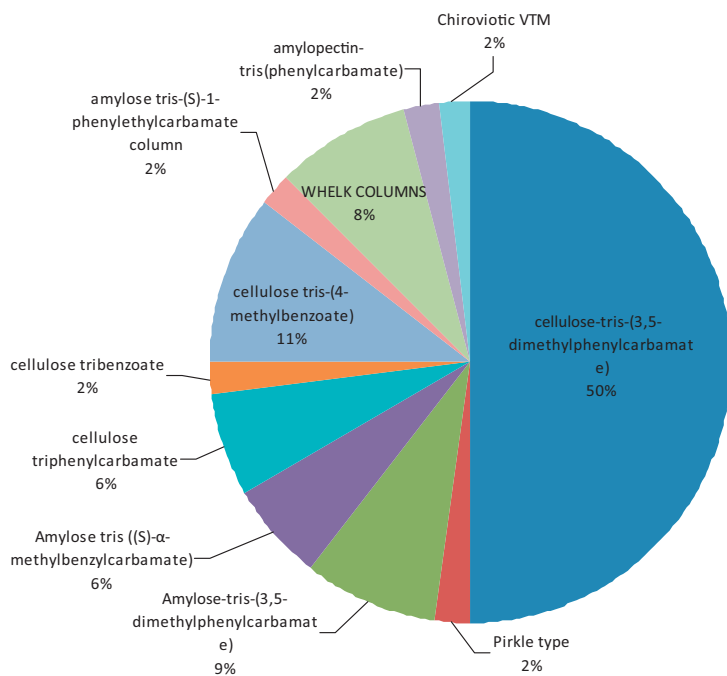


Fig. 3. Graphic showing the number of publications by HPLC with each chiral stationary phase.

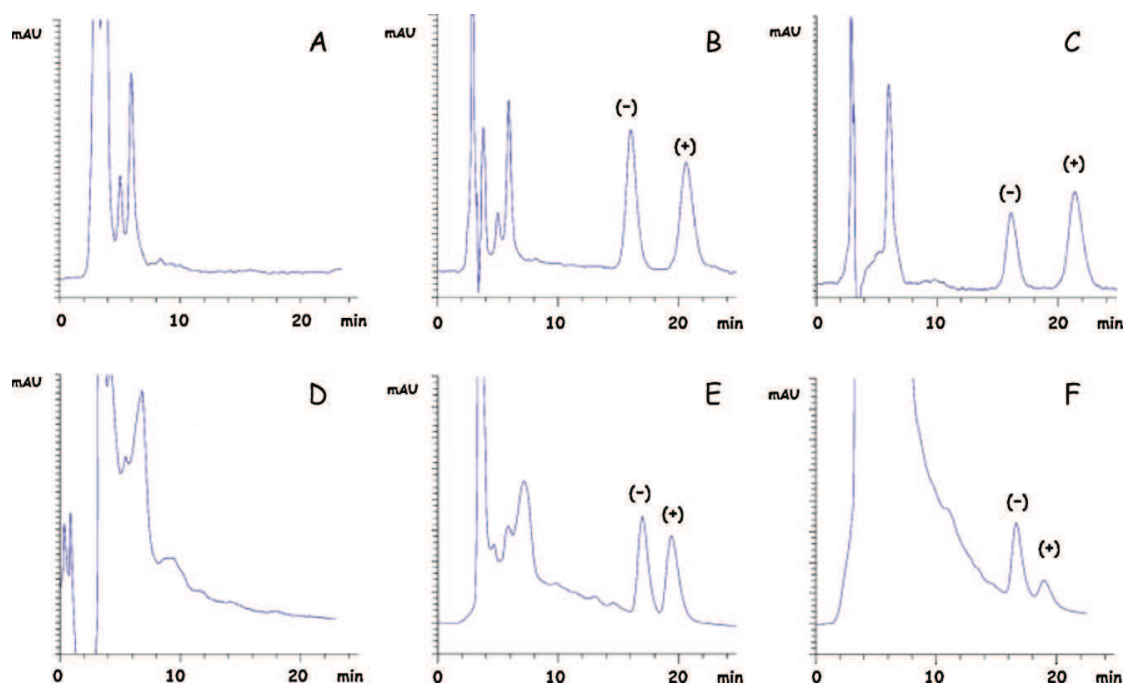


Fig. 4. HPLC chromatograms of (A) extract blank from soil, (B) extract from soil fortified with racemic benalaxyl (5 μ g/g), (C) extract from soil after 50 days incubation, mobile phase for A–C hexane/isopropanol 95:5 (v/v), (D) extract from blank cucumber leaves, (E) extract from cucumber leaves fortified with racemic benalaxyl (5 μ g/g), (F) extract from cucumber leaves 7 days after treatment with racemic benalaxyl, mobile phase for D–F hexane/isopropanol 96:4 (v/v). Other experimental conditions: Column: CDMPC-CSP (cellulose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)); detection: UV 220 nm.

Reprinted with permission from Ref. [22].

plasma and tissues (*S*)-tebuconazole was preferentially degraded [14], while in plants like tomato, tobacco, sugar beet and capsicum (*S*)-benalaxyl was faster degraded [21].

Ming et al. reported the use of the same CSP (cellulose-*tris*-(3,5-dimethylphenylcarbamate)), following the method described by Yashima et al. [49], for the separation of the enantiomers of metalaxyl [50,51] and tebuconazole [51]. The influence of the separation temperature is of great importance as was demonstrated in these two works, only changing the temperature in the range from 10 to 40 °C, the analysis times can be reduced from 20 to approximately 7 min for metalaxyl and approximately 10 min for tebuconazole [51]. The composition of mobile phase may also influence the analysis times as demonstrated by Ge et al. [52]. In this work, employing hexane/isopropanol 70:30 (v/v) the separation of metalaxyl enantiomers was achieved in less than 20 min. The analysis time can be reduced by increasing the proportion of isopropanol in the mobile phase and changing the temperature [51]. In general, when increasing the temperature, the analysis time decreased and the enantioselectivity was improved.

The commercial column of this CSP, Chiralcel OD has also been employed in the chiral separation of agricultural use fungicides. Shapovalova et al. [53] enantiomerically resolved two triazole fungicides: diniconazole and (*R*)-1-*p*-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-pental-3-ol) using hexane/isopropanol 96:4 (v/v) for diniconazole and 85:15 (v/v) for the other triazole. This column showed a high recognition ability with respect to these two compounds obtaining the chiral separation in less than 15 min for both analytes and with resolutions higher than 1.4. The method was successfully applied to the analysis of commercial formulations containing diniconazole confirming the fact that in all these commercial products racemic mixtures were employed. Six conazole type fungicides (hexaconazole, triadimefon, tebuconazole, diniconazole, flutriafol and propiconazole) were enantiomerically resolved with the same column by Zhou et al. [54] obtaining for all of them resolutions of at least 1. The separation of difenoconazole could not be achieved with this column and a Chiralcel OJ column (cellulose-*tris*-(4-methylbenzoate) coated on 10 μm silica gel) was necessary. In all cases, the influence of the temperature on the retention factor of each compound was proved to be very important but not for all analytes and while for hexaconazole, tebuconazole, flutriafol, propiconazole and difenoconazole the separation achieved depended on the separation temperature employed, for triadimefon and diniconazole the retention factors keep unchanged in the range 10–35 °C. The comparison of this column with some other commercially available polysaccharide based CSPs such as Chiralcel OJ, Chiralpak AD (amylose-*tris*-(3,5-dimethylphenylcarbamate) coated on 10 μm silica gel) and Chiralpak AS (amylose-*tris*-[(*S*)-α-methylbenzylcarbamate] coated on 10 μm silica gel) was achieved for the evaluation of their applicability in the chiral separation of the fungicides hexaconazole, triadimenol and *cis/trans*-1,4-chlorophenyl-2-1*H*-1,2,4-triazol-1-yl-cyclopentanol [55]. It was concluded that the CSP employed has influence on the elution order of the enantiomers and also on the effectivity of the separation being cellulose and amylose carbamate phases more versatile than the ester phase in general. Results showed that Chiralcel OD separated the enantiomers of hexaconazole much better than the other CSPs and Chiralpak AD exhibited the best separation for triadimenol and also showed some resolution for all the other compounds but when all the compounds were injected at once in this CSP the overlapping of some peaks occurred. With respect to the mobile phase, it was shown that its composition did not have influence on the elution order of the enantiomers. Yang et al. [56] employed a Chiralcel OD column for the enantiomeric separation of metalaxyl, triadimefon and myclobutanil. The organic solvent employed in the mobile phase had a great importance in the chiral separation achieved, for example chang-

ing acetonitrile for methanol the chiral resolution increased from 4.4 to 5.7 for fungicide metalaxyl. Water content had also a great influence on the chiral resolution since according to these authors when increasing the water content in the mobile phase, enantioselectivity increased. This fact was demonstrated by Buser and Muller [31] that resolved metalaxyl enantiomers employing just the same conditions but with a 10% more of water in the mobile phase. These authors reached lower higher resolution for this compound than in the previous work.

There are some other cellulose derivatives that enabled the chiral separation of some fungicides. For example Chiralcel OJ column allowed the chiral separation of metalaxyl in two different works [18,57], and the developed method was applied to the determination of the degradation pattern in soils and sunflower plants [18,57] showing that *S*-metalaxyl was faster degraded in plants and *R*-metalaxyl was faster degraded in soils. The extraction of metalaxyl from both samples was performed following the same protocol that consisted in a first extraction of the matrix with methanol followed by a reextraction with ethyl acetate and finally a clean up step by SPE.

The microcrystalline cellulose triacetate CSP studied by Dutta et al. [58] showed a limited potential for the enantiomeric separation of epoxiconazole achieving only an enantiomeric resolution of 1.17. After optimizing all the experimental parameters the method was successfully applied to the determination of epoxiconazole in tap and surface waters and the separation of the two enantiomers of epoxiconazole from an eleven pesticide mixture in soil samples extracted with methanol/water. For this purpose a previous extraction of the compound was done employing methanol/water 95:5 (v/v) for soils and a preconcentration step in a short Separon SGX C18 column for tap waters. Cellulose triphenylcarbamate (CTPC) based chiral column was employed by Wang et al. [38] for the fungicides benalaxyl, vinclozolin, tebuconazole and hexaconazole among some other pesticides. Benalaxyl and tebuconazole were separated using *n*-hexane/isopropanol 90:10 (v/v) as mobile phase and for vinclozolin and hexaconazole *n*-hexane/isopropanol 95:5 (v/v) was found to be the most suitable condition. Resolutions from 1.0 to 2.2 were obtained under these conditions.

To conclude with cellulose based CSPs, a comparison can be established among different cellulose derivatives in the analysis agricultural use fungicides. Pan et al. [59] compared the columns named cellulose tribenzoate (CTB), cellulose-*tris*-(4-methylbenzoate) (CTMB), CTPC and cellulose-*tris*-(3,5-dimethylphenylcarbamate) (CDMPC), all of them self prepared, in the separation of seven triazole fungicides (tebuconazole, hexaconazole, myclobutanil, diniconazole, uniconazole, paclobutrazol and triadimenol). The results revealed that the enantiomeric resolution capability generally decreased in the order: CDMPC > CTPC > CTMB > CTB, with the last column being unable to resolve any of the compounds. These results justify why in the main part of works where cellulose based CSPs were employed, cellulose-*tris*-(3,5-dimethylcarbamate) was chosen.

Amylose derivatives are also very popular as CSPs in the enantiomeric separation of fungicides. Spitzer et al. [55] employed for the first time an amylose derivative column as described earlier. Wang et al. [60] employed amylose derivative column for fungicides metalaxyl, myclobutanil, imazalil and triadimefon. Later, some other compounds such as benalaxyl, paclobutrazol and uniconazole were enantiomerically separated in amylose *tris*(3,5-dimethylphenylcarbamate) [61] or a commercial Chiralpak AD column [62] by the same research group. In the first work (for metalaxyl, myclobutanil, imazalil and triadimefon) [60] while for the first three compounds the mobile phase was *n*-hexane/isopropanol 95:5 (v/v), triadimefon needed a different mobile phase (*n*-hexane/isopropanol 98:2 (v/v)). Every compound was enantiomerically resolved in times between 23 and 50 min.

If the results obtained with this column and with amylose-*tris*-(3,5-dimethylphenylcarbamate) [61] CSP are compared, using in both cases almost the same mobile phase hexane/isopropanol (98:2 (v/v) for metalaxyl and 95:5 (v/v) for benalaxyl) the analysis times were increased in approximately 10 minutes for metalaxyl and the chiral resolution is quite lower also. Finally, the commercial Chiralpak AD column was employed for the chiral separation of the enantiomers of paclobutrazol, myclobutanil and uniconazole [62] employing again hexane/isopropanol mixtures. For myclobutanil, a slight change in the proportions of mobile phase and the employ of the commercial column, supposed a reduction of 30 min in the analysis time and chiral resolution increased from 1.5 [60] to 4.0 [62]. The three pesticides were isolated from soil by liquid extraction with acetone and from water by SPE with a C18 cartridge. Chen et al. [63] employed a Chiralpak AS-H (amylose-*tris*-[(*S*)- α -methylbenzylcarbamate]) column for the resolution of metalaxyl enantiomers. Compared with the use of other amylose derivatives, the analysis times were reduced under the 50%. Chiralpak AS was also employed for the enantioseparation of itraconazole and ketoconazole [64]. The results obtained were compared with those achieved by SFC employing the same chiral column. The main difference was in the analysis times being those for HPLC quite longer (around 110 min in HPLC and approximately half of time in SFC). Lastly, Zhang et al. [65] employed the Chiralpak IA (amylose 3,5-dimethylphenylcarbamate) for the chiral separation of metalaxyl and studied its solvent versatility when "non-standard" organic solvents were employed in mobile phase. 100% Methyl *t*-butyl ether, CHCl₃/hexane 25:75 (v/v), CH₂Cl₂/hexane 25:75 (v/v) and ethylacetate/hexane 30:70 (v/v) gave the best chiral resolution in this order (values from 3.5 to 6.19 were achieved).

Apart from the cited CSPs some other chiral columns were tested. One of them was Pirkle-type column, concretely that commercially known as Whelk O [59,66–69]. In the first work developed with this type of column [59] it was compared with some cellulose based chiral columns for the enantiomeric analysis of tebuconazole, hexaconazole, myclobutanil, diniconazole, uniconazole, paclobutrazol and triadimenol. The results revealed that with Whelk O1 column only hexaconazole and triadimenol underwent enantioresolution. In all the following works this type of column was only tested for metalaxyl and benalaxyl fungicides. Welch et al. [66] evaluated this column for the first time for the chiral separation of metalaxyl reaching resolutions near to baseline (~1.5) in 13 min. Later, Monkiedje et al. [67,68] published two works corresponding to the application of this commercial column to the analysis of metalaxyl employing the same column and the same mobile phase than before (hexane/isopropanol) but reducing a little the percentage of isopropanol in the mobile phase. This slight change resulted in minimizing the analysis time to 12.0–12.5 min with the same chiral resolution. The methods were applied to the determination of metalaxyl in soil samples with the aim of studying the degradation behavior of this compound. Samples were extracted with methanol and a SPE clean up step was performed later. The determination of benalaxyl in soil and water using Whelk O1 (1-(3,5-dinitrobenzamido)-1,2,3,4-tetrahydrophenanthrene) chiral column was developed by Liu et al. [69]. After evaluating the effects of mobile phase composition and column temperature, the method was applied to the enantioselective analysis of this fungicide in soil and water samples after liquid extraction with acetone and a subsequent clean up step with silica for soil and a SPE for water. Limits of detection (LODs) around 0.004 mg/kg in soil and 0.001 mg/kg in water were achieved. Recoveries were between 79 and 101% both for soil and water. Finally, Li et al. [37] employed another Pirkle-type column (Chirex 3020) ((*S*)-*tert*-leucine and (*R*)-1-(α -naphthyl)ethylamine urea linkage) for the enantiomeric separation of three conazole fungicides (uniconazole, diniconazole, propiconazole) in soil samples extracted by

matrix solid phase dispersion (MSPD). For all the compounds resolutions higher than baseline were achieved in analysis times below 14 min.

Apart from all these types of CSP there are some more employed for the chiral separation of fungicides of agricultural use. Wang et al. [70] employed an amylopectin based CSP for the chiral separation of a large series of fungicides (metalaxyl, benalaxyl, miclobutanil, hexaconazole, tebuconazole, uniconazole and paclobutrazol) with analysis times lower than 38 min for every compound and resolutions of at least 1.01. Ones again it was proved the great influence of the polar alcoholic component in the mobile phase, showing that when the content was reduced, the enantioseparation was better.

Owens et al. [71] studied the chiral separation of the four stereoisomers of voriconazole by the use of different approaches. The first one consisted in the use of a non-chiral column (HyperSil BDS C8) with different CDs as additives in the mobile phase. Several CDs were tested but only hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), hydroxyethyl- β -cyclodextrin (HE- β -CD) and sulphobutyl-ether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD) produced some chiral discrimination. However, the resolution of the four enantiomers of voriconazole was not possible by this approach since only one enantiomeric pair was separated under these conditions (2R,3S and 2S,3R). To separate the other two enantiomers (2R,3R and 2S,3S) a second approach was employed consisting in a chiral column with a macrocyclic antibiotic (vancomycin) as chiral selector: (Chirobiotic VTM). The optimized mobile phase consisting in cyclohexane/ethanol/trifluoroacetic acid 70:30:0.075 (v/v) allowed the chiral separation of the other pair of enantiomers in approximately 7 min.

2.3. Supercritical fluid chromatography

In the last few years, SFC has emerged as a powerful alternative for chiral separations [72]. The physico-chemical properties of the supercritical fluids allow obtaining separations with high efficiencies and quite short analysis times for polar or thermolabile compounds [73].

There are only few articles reporting the chiral separation of agricultural use fungicides employing SFC and all of them are focused on the analysis of conazole type fungicides: cyproconazole, propiconazole, diniconazole, hexaconazole, tebuconazole, tetraconazole, triadimefon, triadimenol, ketoconazole, itraconazole, miconazole, econazole and sulconazole (see Table 3). In all works CO₂ has been the supercritical fluid employed adding always an organic modifier to increase its polarity. Among all the organic modifiers useful in SFC in the analysis of pesticides methanol and ethanol are the most common although propanol has also been used sometimes. In order to obtain better peak shapes other additives may also be added (i.e. triethylamine) [72]. Finally, it has to be highlighted that the SFC methods have not been already applied to the analysis of any real sample.

The first enantiomeric separation of a fungicide by SFC was developed by Thienpont et al. [64]. In this work, the stereoselective separation of ketoconazole and itraconazole with an amylose derivative column (ChiralPak AS) was reported. The main parameters examined were pressure and nature and percentage of the polar modifier added to the supercritical fluid (CO₂). A 17% of methanol/ethanol mixture with 10 mmol of octanoic acid was the most appropriate modifier with a pressure of 35 MPa. Under these conditions resolutions from 0.8 to 2.0 were achieved.

Toribio et al. [72–74] described the chiral separation of a large list of conazole fungicides by SFC using an amylose derivative column in all cases (Chiralpak AD). Each compound needed a different organic modifier in order to enable the best chiral separation possible. For example, miconazole, econazole, sulconazole [74], cyproconazole and tebuconazole [72] were resolved with resolu-

Table 3
Chiral separation of fungicides by SFC.

Fungicide	Sample	Separation conditions	Sample treatment/comments	Reference
Miconazole (a) Econazole (b) Sulconazole (c) Itraconazole (d)	–	CSP: Chiralpak AD column. Supercritical fluid: CO ₂ Organic modifier: (a) 15% methanol (b) 15% methanol (c) 20% methanol (d) 40% ethanol/isopropanol 15:85 (v/v). Pressure: 20 MPa. Temperature: 35 °C. Flow rate: 2 ml/min. Detection: UV 225 nm.	Analysis times and Rs: (a) ~8 min, 3.6 (b) ~8 min, 3.4 (c) ~10 min, 2.8 (d) ~80 min, 1.2, 1.4, 2.4.	[74]
Ketoconazole (a) Itraconazole (b)	–	CSP: Chiralpak AS column. Supercritical fluid: CO ₂ . Organic modifier: 17% methanol/ethanol (1:2 for ketoconazole and 1:1 itraconazole)+ octanoic acid 10 mmol. Pressure: 35 MPa. Temperature: 30 °C. Flow rate: 2.5 ml/min. Detection: UV 254 nm.	Rs: (a) 0.8 (b) 2.0, 1.1, 1.3.	[64]
Cyproconazole (a) Propiconazole (b) Diniconazole (c) Hexaconazole (d) Tebuconazole (e) Tetraconazole (f)	–	CSP: Chiralpak AD column. Supercritical fluid: CO ₂ Organic modifier: (a) 5% methanol (b) 5% isopropanol (c) 15% ethanol (d) 10% isopropanol + 0.1% triethylamine + 0.1% TFA (e) 10% 2-metanol + 0.1% triethylamine + 0.1% TFA (f) 4% ethanol. Pressure: 20 MPa. Temperature: 35 °C. Flow rate: 2 ml/min. Detection: UV 220 nm.	Analysis times and Rs: (a) ~32 min, 1.5, 1.0, 2.8 (b) ~10 min, 4.0, 3.1, 2.7 (c) ~5 min, 3.1 (d) ~10 min, 4.4 (e) ~10.5 min, 1.5 (f) ~5 min, 2.1.	[72]
Triadimefon Triadimenol	–	CSP: Chiralpak AD. Supercritical fluid: CO ₂ Organic modifier: Ethanol gradient (5% 2 min to 25% at 1.8%/min). Pressure: 200 bar. Temperature: 35 °C. Flow rate: 2 ml/min. Detection: UV 220 nm.	Total analysis time: 15.5 min Rs: >1.5 The use of different achiral columns for the separation of triadimenol diastereoisomers was studied. Resolutions >3 were obtained in times close to 5 min.	[73]

tions in most cases higher than 2 using methanol in supercritical CO₂ as organic modifier. On the other hand, for triadimefon, triadimenol [73] and diniconazole [72] ethanol was more appropriate both in isocratic as well as in gradient and finally there are some other conazole fungicides for which mixtures of solvents were employed. The analysis times were quite short (<15.5 min) for all the fungicides except for itraconazole, that was resolved in approximately 80 min due to the presence in this fungicide of a large number of functional groups that may interact with the CSP, and cyproconazole that was resolved in approximately 32 min. As an example Fig. 5 shows the simultaneous separation of triadimefon and its degradation product triadimenol using SFC. The experimental conditions employed consisted on an ethanol gradient from 5% (2 min) to 25% at 1.8%/min. As it can be observed, the simultaneous analysis was performed in less than 16 min with at least baseline resolution [73].

2.4. Capillary electrophoresis

The interest of electromigration techniques in the analysis of environmental samples is growing up every day. CE has shown to be a powerful alternative in chiral analysis compared to HPLC and GC [75]. Its high resolution efficiency, minimum solvent and reagent

consumption and short analysis times are the main reasons for the increasing interest of this technique [76]. Furthermore, the versatility of CE in its various separation modes (EKC, MEKC, etc.) makes possible the analysis of a wide range of compounds.

Several works have been published dealing with the enantiomeric separation of agrochemical fungicides (see Table 4) but

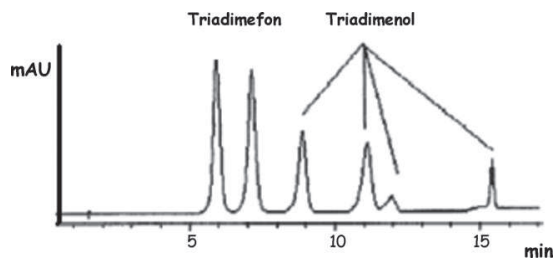


Fig. 5. Simultaneous separation of triadimefon and triadimenol enantiomers by SFC. *Experimental conditions:* Column: Chiralpak AD; organic modifier of supercritical CO₂: ethanol programmed from 5% (2 min) to 25% at 1.8%/min; pressure: 200 bar; temperature: 35 °C; detection: UV 220 nm. Reprinted with permission from Ref. [73].

Table 4
Chiral separation of fungicides by CE.

Fungicide	Sample	CE mode	Separation conditions	Sample preparation/comments	Reference
Diniconazole (a) Uniconazole (b)	-	CD-MEKC	Chiral selector: γ -CD. BGE: 100 mM borate buffer (pH 9.0) + 100 mM SDS + 5% 2-methyl-2-propanol + 50 mM CD. Capillary: 75 μ m (i.d.) \times 50 cm (57 cm t.l.) Voltage: 15 kV. Temperature: 25 °C. Detection: UV 254 nm.	Total analysis time: ~42 min Rs: (a) 2.1 (b) 2.5.	[7]
Diniconazole (a) Uniconazole (b)	-	CD-MEKC	Chiral selector: γ -CD. BGE: 100 mM borate buffer (pH 9.0) + 100 mM SDS + 5% (v/v) 2-methyl-2-propanol + 50 mM CD + 2 M urea. Capillary: 75 μ m (i.d.) \times 50 cm (57 cm t.l.) Voltage: 15 kV. Temperature: 25 °C. Detection: UV 254 nm.	Total analysis time: ~42 min Rs: (a) 3.6 (b) 3.9.	[8]
Imazalil	Orange	CD-EKC	Detection: UV 254 nm. Chiral selector: HP- β -CD. BGE: 5 mM ammonium dihydrogenphosphate-50 mM phosphate buffer (pH 3.0) + 4 mM CD. Capillary: bubble cell 75 μ m (i.d.) \times 56 cm (64.5 cm t.l.) Voltage: 25 kV. Temperature: 20 °C. Detection: UV 200 nm.	Extraction with acetonitrile under basic conditions. The extract was purified by SPE. Analysis time: ~15 min (a) Rs: ~6 (b) LOD: 0.10 mg/l.	[16]
Imazalil	Soil	CD-EKC	Detection: UV 200 nm. Chiral selector: β -CD. BGE: 50 mM NaH ₂ PO ₄ + 5 mM (NH ₄) ₂ PO ₄ (pH 3.0) + 5 mM CD. Capillary: 75 μ m (i.d.) \times 50 cm t.l. Voltage: 25 kV. Temperature: 20 °C. Detection: UV 214 nm.	Extraction of imazalil from soil with methanol. Analysis time: <10 min Rs: ~4 LODs 0.24 and 0.26 μ g/ml for (-) and (+)-imazalil, respectively.	[17]
Propiconazole Tebuconazole Fenbuconazole	Grapes	CD-MEKC	Detection: UV 214 nm. Chiral selector: HP- γ -CD. BGE: 25 mM phosphate buffer (pH 3.0) + 50 mM SDS + 30 mM CD. Capillary: 50 μ m (i.d.) \times 56 cm (64.5 cm t.l.) Voltage: -25 kV. Temperature: 20 °C. Detection: UV 200 nm.	On-line sample concentration strategy: sweeping (a 100 fold increase in the sensitivity). Grapes were extracted by SPE. Analysis time: <18 min (simultaneous separation). LODs from 0.09 to 0.1 μ g/ml. Recoveries ranging from 73 to 100%. Rs: 1.5.	[40]
Voriconazole	-	CD-EKC	Chiral selector: SBE- β -CD. BGE: 50 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7.0) + 25 mM CD. Capillary: 50 μ m (i.d.) \times 50 cm (57 cm t.l.) Voltage: 15 kV. Temperature: 17 °C. Detection: UV 214 nm.	Analysis time: ~25 min Rs: 1.5.	[71]
Nuarimol	-	Affinity EKC-partial filling	Chiral selector: HAS (human serum albumin). BGE: 50 mM Tris (pH 7.3) + 160 μ M HAS. Capillary: 50 μ m (i.d.) \times 47.5 cm (56 cm t.l.) Voltage: 15 kV. Temperature: 30 °C. Detection: UV 220 and 278 nm.	Analysis time: <17 min Rs: <baseline LOD: 1.6 \times 10 ⁻⁴ M for each enantiomer.	[77]

Table 4 (Continued)

Fungicide	Sample	CE mode	Separation conditions	Sample preparation/comments	Reference
Uniconazole (a) Diniconazole (b)	-	CD-EKC	Chiral selector: CM- γ -CD. BGE: 50 mM phosphate (pH 6.5) + 5 mM CD. Capillary: 50 μ m (i.d.) \times 50 cm (65 cm t.l. for the LauerLabs instrument and 58.5 for the HP ^{3D} CE system) Voltage: 20 kV. Temperature: 50 °C. Detection: UV 220 nm.	Total analysis time: <5 min Rs: (a) >baseline (b) >baseline.	[80]
Hexaconazole (a) Penconazole (b) Myclobutanil (c)	-	CD-MEKC	Chiral selector: HP- γ -CD. BGE: 25 mM phosphate buffer (pH 3) + 50 mM SDS + 40 mM CD. Capillary: 50 μ m (i.d.) \times 56 cm (64.5 cm t.l.). Voltage: -25 kV. Temperature: 25 °C. Detection: UV 200 nm.	Analysis time: ~15 min (simultaneous separation). Rs: >1.6 LODs: (a) 4.6 mg/l (b) 4.1 mg/l (c) 5.6 mg/l	[81]
Hexaconazole Penconazole Myclobutanil	-	CD-MEKC	Chiral selector: HP- γ -CD. BGE: 25 mM phosphate buffer (pH 3) + 50 mM SDS + 40 mM CD. Capillary: 50 μ m (i.d.) \times 56 cm (64.5 cm t.l.). Voltage: -25 kV. Temperature: 35 °C. Detection: UV 200 nm.	Analysis time ~15 min (depending on the on-line preconcentration method employed). Rs: >baseline. Two different preconcentration strategies were tested: Stacking with reverse migrating micelles (SRMM) and sweeping (injection 50 mbar \times 70 s). LODs: 0.1–0.2 mg/l.	[82]
Propiconazole (a) Bitertanol (b) Triadimenol (c) Dimethomorph (d)	-	CD-MEKC	Chiral selector: (a) DM- β -CD (b) TM- β -CD (c) HP- γ -CD (d) TM- β -CD BGE: (a,d,c) 50 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7.0) + 50 mM SDS + 15 mM CD (b) 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7.0 + 50 mM SC + 15 mM CD Capillary: 50 μ m (i.d.) \times 40 cm (47 cm t.l.). Voltage: 20 kV. Temperature: 20 °C. Detection: UV 214 nm.	Analysis times and Rs: (a) ~12.5 min, 1.5 (b) ~5.5 min, 1.1 and 1.2 (c) ~12 min, 1.5 (d) ~10 min, 1.5.	[83]
Triadimefon Triadimenol	Soil	CD-EKC	Chiral selector: Sulfated- β -CD. BGE: phosphate buffer (pH 2.5) + 2% CD. Capillary: 50 μ m (i.d.) \times 53 cm (60 cm t.l.). Voltage: -20 kV. Detection: UV 220 nm.	Extraction with acetone and the extract was subsequently enriched by SPE. Recoveries ~80%. Analysis time: <30 min (simultaneous separation).	[84]

most of them were focused on the analysis of conazole type fungicides (diniconazole, uniconazole, hexaconazole, tebuconazole, tetraconazole, propiconazole, etc.). The different solubility and character of the fungicides is the reason for using different CE separation modes: Affinity-EKC, CD-EKC and CD-MEKC. As it can be seen in Table 4, CDs are employed in most of the works as chiral selectors (both native and derivatized CDs). Only in one work another chiral selector was used: a macrocyclic antibiotic (vancomycin) [77]. The chiral resolution of the mentioned fungicides by CE is described in Table 4 by considering the optimization of the chiral selectors and experimental conditions (composition and pH of the background electrolyte (BGE), applied voltage, separation temperature and other parameters), the detection employed (UV detection in all cases) and the sample treatment necessary. It has to be emphasized that the real samples analyzed were soil samples, food samples and commercial formulations.

The first separation of agricultural fungicides by CE was performed in 1994 by Furuta and Doi [7]. The simultaneous separation of diniconazole and uniconazole using commercial products containing diniconazole-M (R-diniconazole) and uniconazole-P (S-uniconazole) was achieved using a native CD (γ -CD) as chiral selector dissolved in a 100 mM borate buffer containing 100 mM of sodium dodecyl sulphate (SDS) and a little percentage of organic modifier that was demonstrated to be crucial for the enantiomeric separation of diniconazole. It has been proved that sometimes the addition of a small amount of organic modifier to the electrolytic buffer may improve the enantioselectivity of some compounds in MEKC [78,79]. The resolution obtained was higher than 2 for both compounds in approximately 42 min of total analysis time. As demonstrated later by the same authors, just in the same experimental conditions above, the addition of urea to the buffer might increase the resolution more than 1 unit keeping the analysis time also in approximately 42 min [8]. The comparison of these results with the employ of the same CD as bonded CSP in HPLC showed a high enantioselectivity difference for both compounds [8] being the resolutions obtained much higher in CE in shorter analysis time. Finally, the same analytes were enantiomerically resolved in a quite shorter analysis time by Martín-Biosca et al. [80] employing only a charged CD as pseudostationary phase. In fact, although several MEKC systems were also tried in this work using chiral surfactants alone (bile salts) or adding neutral CDs to micellar systems containing SDS and also mixtures of CDs, no satisfactory results were obtained and no chiral discrimination was observed. For this reason, the use of carboxymethyl- γ -cyclodextrin (CM- γ -CD) in a phosphate buffer was chosen as the most suitable CD and baseline resolution was achieved for both compounds in less than 5 min. Propiconazole, tebuconazole, fenbuconazole [40], hexaconazole, penconazole and myclobutanil [81,82] were chiral resolved adding 30–40 mM of hydroxypropyl- γ -cyclodextrin (HP- γ -CD) to a BGE containing 50 mM SDS. Since the level of pollutants in environmental samples is very low, methods to increase the sensitivity in CE are necessary. One of these methods is the employ of on-line preconcentration strategies. As an example, propiconazole, tebuconazole and fenbuconazole were extracted from grapes and separated by CD-MEKC. SPE with C18 cartridges and dichloromethane as eluent was employed to extract the fungicides from grapes [40]. An on-line preconcentration strategy (sweeping) was applied to enhance the sensitivity in a factor of 100-fold. The electropherogram in Fig. 6 shows the separation obtained for the standard solutions of propiconazole, tebuconazole and fenbuconazole (Fig. 6A) and a spiked grape sample (0.05 mg/kg) after preconcentration by SPE (Fig. 6B) with an injection of 50 mbar during 120 s, applying a negative separation voltage (–25 kV) to achieve the separation in shorter analysis times (<18 min). The limit of detection for the three triazoles ranged from 0.09 to 0.1 μ g/ml and recoveries of the developed method varied from

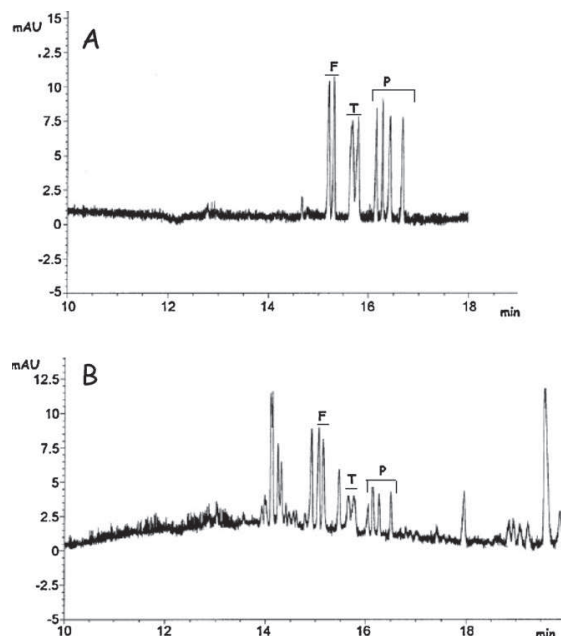


Fig. 6. Electropherograms of fenbuconazole (F), tebuconazole (T) and propiconazole (P) by sweeping-CD-MEKC at acidic pH (pH 3.0). (A) Standards at a concentration of 1 μ g/ml and (B) spiked grapes samples after preconcentration by SPE. Sample in buffer solution without micellar phase injected 50 mbar \times 120 s. Other experimental conditions: BGE: 25 mM phosphate buffer at pH 3.0 containing 50 mM SDS and 30 mM HP- γ -CD; capillary: 50 μ m i.d. \times 56 cm; voltage: –25 kV; temperature: 20 $^{\circ}$ C; detection: UV 200 nm.

Reprinted with permission from Ref. [40].

73 to 100%. For hexaconazole, penconazole and myclobutanil, the same research group [82] compared this on-line preconcentration strategy (sweeping) and stacking with reverse migrating micelles (SRMM) and showed that the first one was much more suitable for these compounds, leading to better peak shapes and higher sensitivity enhancement factors.

Shea et al. [83] achieved the chiral separation of propiconazole, bitertanol, triadimenol and dimethomorph enantiomers using a different CD derivative for each compound. The CDs were combined with non-chiral surfactants (SDS) or with chiral surfactants (sodium cholate (SC)) in the BGE in order to achieve the highest resolution possible for the four compounds. For all compounds except for bitertanol, the use of SDS in the BGE provided a good separation for the enantiomers of the fungicides while for bitertanol, SDS in combination with the CDs did not produce any chiral discrimination. However, for this compound the addition of SC enabled the separation of the enantiomers of bitertanol. The chirality of SC may help in the chiral resolution of bitertanol. Every compound was separated in less than 12.5 min and with at least a resolution of 1.1.

The neutral character of the most part of fungicides makes necessary the employ of a pseudostationary phase able to give mobility to the analytes (i.e. charged surfactants). The use of charged CDs is the most extended strategy to avoid the use of surfactants (CD-EKC separation mode). Wu et al. [84] reported the simultaneous chiral separation of triadimefon and triadimenol by CD-EKC. Triadimefon is one of the most important azole-class fungicides [85] and in almost all the application media (i.e. soil, water, and plants) it is transformed into triadimenol. The enantiomeric separation of these two compounds was reported by Wu et al. [84] by adding a sulfated- β -CD to a phosphate buffer (pH 2.5). This pH value demonstrated to increase the interactions CD-analyte for triadimefon and

triadimenol but it almost suppressed the electroosmotic flow (EOF). Due to the fact that the CD employed was anionic, a negative voltage was applied (-20 kV) to allow the detection of the analytes at the end of the capillary. The applicability of the method to extracts of soils was studied. After 15 days of incubation of these soil samples with racemic triadimefon, they were extracted with acetone and the extract obtained was enriched by SPE with a 500 mg ODS-6 Whatman cartridge (octadecyl silica, 22% carbon load) using acetone as eluent. In less than 30 min the simultaneous separation of the enantiomers of both compounds was obtained and the recoveries of the methodology were about 80% for both fungicides. This chiral selector (sulfated- β -CD) was also able to separate the enantiomers of a list of 14 triazole fungicides in less than 38 min of total analysis time [86]. The analysis of all the fungicides was performed in two runs because it was not possible to achieve the separation of all of them simultaneously due to the coelution observed for some fungicides. Furthermore, this approach is most adequate to allow the correct identification of each peak and it enabled the study of the influence of the structure on the interactions with sulfated- β -CD, concluding that those triazole fungicides with less crowded structure resulted in stronger interactions with the selected CD.

Sometimes the employ of the same CD but with different degree of substitution may have great influence on the resolution achieved in the chiral separation [87]. This is for example the case of voriconazole when using SBE- β -CD with different substitution degrees (6.5, 4.5 and 1), dissolved in phosphate buffer at 25 mM [71]. While at higher degrees of substitution the chiral discrimination obtained was quite poor, a pronounced effect on the chiral separation was observed for CDs with lower substitution degrees. The intermediate degree of substitution (DS: 4) was chosen as the most appropriate allowing the separation of the two diastereoisomeric pairs of voriconazole in 25 min and with almost baseline resolution.

The chiral determination of a fungicide (imazalil) in food samples (oranges) by CD-EKC was reported by Kodama et al. [16]. The developed method consisted in HP- β -CD diluted in 5 mM ammonium dihydrogenphosphate/50 mM phosphate buffer pH 3.0. A bubble cell capillary was employed in order to achieve better sensitivity. The extraction of imazalil from oranges was performed with acetonitrile under basic conditions and the extract was purified by SPE in a Sep-Pak Plus PS-2 (polystyrene gel) cartridge. A resolution around 6 was achieved in less than 15 min and the obtained results were applied to the study of degradation patterns of imazalil in this fruit showing a clear enrichment of (+)-imazalil in the samples analyzed. The use of a native CD (β -CD) by Chu et al. [17] maintaining all the other experimental conditions as above enabled the reduction of the analysis time (less than 10 min) and obtaining resolutions around 4. After extracting imazalil from soil samples with methanol, the degradation pattern of the compound was studied in soil under different conditions: under sunlight, in darkness, under UV irradiation, in sterilized soil and in soil with wheat planted. The degradation rate of imazalil in soil under the five different sets of conditions decreased in the order: UV irradiation > sunlight > soil with wheat planted > sterilized soil > soil kept in darkness.

Metalaxyl has been separated three times by CE. In the first work [88] a chiral methodology consisting of a CD-MEKC method was developed using as chiral selector γ -CD and SDS as surfactant. The purpose of this work was the study of the degradation pattern of metalaxyl in soil samples. A liquid extraction was employed using methanol as extraction solvent. The extraction was performed at different times since the application of the racemic metalaxyl into the soil in order to study the chiral degradation of the compound among different times. A preferential degradation of one of the enantiomers was observed, resulting in the total disappearance of R-metalaxyl in approximately 17 days. Santilio et al. [89] developed a methodology for the chiral separation of metalaxyl avoiding

the use of surfactants. For this purpose an anionic CD was added to the buffer at a quite high concentration (55 mM succinyl- β -CD (succ- β -CD)) obtaining the enantiomeric separation of metalaxyl in approximately 19.5 min with a chiral resolution of 1.68. The quantification of a commercial fungicide formulation containing only one enantiomer of metalaxyl (metalaxyl-M) was performed in this research article but the content of impurity could not be determined because this was below the LOD of the method. Finally, our research group developed a CD-EKC method for the enantiomeric separation of metalaxyl employing succinyl- γ -CD (succ- γ -CD) as chiral selector [90]. Several CDs were tested but this one offered the best results for metalaxyl. The analysis times were lower than in previous works (11.5 min) and chiral resolution was above 3. Moreover, in the same work, the first chiral separation of benalaxyl by CE was reported, in this case a succ- β -CD was selected as the most adequate achieving a really high chiral resolution (close to 15) in 7.5 min. In addition, these two fungicides were simultaneously separated from folpet because its presence is very usual in commercially available products containing metalaxyl or benalaxyl. The three compounds were determined in commercial formulations containing racemic benalaxyl or the active isomer of metalaxyl (in some of the formulations mixed with folpet). The employ of an on-line preconcentration strategy enabled to reach enough sensitivity to determine enantiomeric impurities present in those products labelled as enantiomerically pure in metalaxyl-M (enantiomeric impurities up to 1.2% could be determined).

Sometimes the simultaneous separation of several compounds is achieved combining two or more chiral selectors. Wan Ibrahim et al. [91] investigated the simultaneous enantiomeric separation of cyproconazole, bromuconazole and diniconazole by CD-MEKC. Since the use of a single CD was not able to separate all the enantiomers of the three fungicides, the use of dual native CD systems was investigated. A mixture of 27 mM HP- β -CD and 3 mM HP- γ -CD dissolved in a BGE containing 40 mM SDS was the most appropriate to achieve the separation (resolutions between 1.1 and 15.9) enabling the simultaneous separation of all the enantiomers (two enantiomers of diniconazole, four of bromuconazole and four of cyproconazole) in less than 22 min.

Most of the articles concerning enantiomeric separations used CDs as chiral selector although there are more compounds that could be able to achieve the same results (antibiotics, chiral surfactants, crown ethers, etc.) [92]. Some proteins can also perform this function although the addition of proteins into the running buffer has some drawbacks related to the adsorption of proteins onto the capillary wall and the UV absorption of protein solutions. This is for example the case of the method developed by Martinez-Gomez et al. [77] in which human seroalbumin protein (HSA) was the chiral selector employed. The selected fungicide was nuarimol (pyrimidine fungicide). To avoid the problems related to proteins in CE, the partial filling technique was evaluated. In this technique the capillary is partially filled with the protein solution, while the rest of the capillary contains the electrophoretic buffer. The analyte migrates through the selector plug and enantiomers can be separated and detected out of the protein zone. The experimental conditions selected were 50 mM Tris buffer at pH 7.3 with 160 μ M HSA solution applied at 50 mbar for 156 s was the BGE employed. Baseline resolution was obtained in less than 17 min.

3. Concluding remarks and future trends

A significant number of the fungicides released to the environment are chiral. However, the activity and toxicity of the different enantiomers is not the same. In this sense chiral analysis is a powerful and necessary tool for studying the behavior of environmental pollutants during biological and environmental processes. For this

purpose, chromatographic techniques are undoubtedly the most employed chiral techniques. A great number of analytical methodologies have been developed for the determination of a wide variety of fungicides, mostly by HPLC and CE although GC and SFC were also employed. Moreover, the number of articles published is continuously growing and this fact demonstrates the great concern in the determination of environmental contaminants. Several types of CSPs have been employed in HPLC but probably the cellulose derivatives are the most popular. Due to the high advantages that miniaturized techniques offer, CE using CDs as chiral selectors (CD-EKC and CD-MEK) has become a very employed technique but the problems of sensitivity derived from the use of on-line UV detection do not make this technique the most appropriate for the analysis of environmental and food matrices and tedious sample preparation methods are required previous to the analysis of the real samples. In this context, in-capillary preconcentration methods can be used increasing the sensitivity of the analytical methodologies developed and enabling their application to the analysis of real samples like food samples. Although some works dealing with the chiral separation of fungicides by GC and SFC were also reported, the fungicides studied were more limited.

Finally, it has to be noted the small number of fungicides enantiomerically separated, taking into account the large number of groups of different fungicides known. This fact may be a result of the lack of information concerning the differences in characteristics and behavior of the enantiomers of these agrochemicals mainly known for conazole and amide group fungicides. As a consequence, it can be concluded that developing new chiral separation methods for the enantiomeric analysis of fungicides is crucial not only for controlling the new developed commercial products but also to study the behavior of the enantiomers of each compound in several environmental, biological, and food matrices. It is expected that other detection methods such as MS will be more employed in the next years in the stereoselective determination of fungicides.

Acknowledgements

Authors thank the Ministry of Science and Innovation for research project CTQ2009-09022/BQU and the Comunidad Autónoma de Madrid (Spain) and European funding from FEDER programme for project S2009/AGR-1464 (ANALISYC-II). Virginia Pérez-Fernández thanks the Gobierno Vasco for her research grant.

References

- [1] B.S. Sekhon, *J. Pestic. Sci.* 34 (2009) 1.
- [2] A.W. Garrison, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 16.
- [3] D.W. Armstrong, G.L. Reid III, M.L. Hilton, C.D. Chang, *Environ. Pollut.* 79 (1992) 51.
- [4] A.W. Garrison, P. Schmitt, D. Martens, A. Ketrup, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 2249.
- [5] www.marm.es.
- [6] www.frac.info.
- [7] R. Furuta, T. Doi, *J. Chromatogr. A* 676 (1994) 431.
- [8] R. Furuta, T. Doi, *Electrophoresis* 15 (1994) 1322.
- [9] D. Stehmann, M.A. Waard, *Pestic. Sci.* 44 (1995) 183.
- [10] J. Miyamoto, P.C. Kearney, *Proceedings of the 5th International Congress of Pesticide Chemistry*, Pergamon, Kyoto, Japan, 1983.
- [11] B. Sugavanam, *Pest. Sci.* 15 (1984) 296.
- [12] W. Krämer, K.H. Bücher, W. Draber, *Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment*, Pergamon Press, Oxford, 1983.
- [13] F. Spindler, T. Früt, *Chiral Acylamides and Chiral Triazole-related Fungicides. Chirality in Agrochemicals*, Wiley & Sons, Chichester, UK, 1998.
- [14] W. Zhu, J. Qiu, Z. Dang, C. Lv, G. Jia, L. Li, Z. Zhou, *Chirality* 19 (2007) 141.
- [15] C.S. Mazur, J.F. Kenneke, C. Tebes-Stevens, M.S. Okini, J.C. Lipscomb, *J. Toxicol. Environ. Health* 70 (2007) 1241.
- [16] S. Kodama, A. Yamamoto, T. Ohura, A. Matsunaga, T. Kanbe, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 6128.
- [17] B.L. Chu, B.Y. Guo, Z. Peng, Z. Wang, G. Guo, J.L. Lin, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 923.
- [18] C. Marucchini, C. Zadra, *Chirality* 14 (2002) 32.
- [19] J. Qiu, Q. Wang, P. Wang, G. Jia, J. Li, Z. Zhou, *Pestic. Biochem. Physiol.* 83 (2005) 1.
- [20] S. Chen, W. Liu, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81 (2008) 531.
- [21] X. Gu, P. Wang, D. Liu, C. Lv, Y. Lu, Z. Zhou, *Chirality* 20 (2008) 125.
- [22] X. Wang, G. Jia, J. Qiu, J. Diao, W. Zhu, C. Lv, Z. Zhou, *Chirality* 19 (2007) 300.
- [23] P. Xu, D. Liu, J. Diao, D. Lu, Z. Zhou, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 8545.
- [24] S. Kodama, A. Yamamoto, Y. Saitoh, A. Matsunaga, K. Okamura, R. Kizu, K. Hayakawa, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1312.
- [25] W. Yen-Shung, T. Kok Thong, Y. Jui-Hung, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57 (2004) 346.
- [26] R. Vespalec, P. Boček, *Chem. Rev.* 100 (2000) 3715.
- [27] R.S. Burden, A.H.B. Deas, T. Clark, *J. Chromatogr.* 391 (1987) 273.
- [28] S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 735 (1996) 77.
- [29] L. He, T.E. Beesley, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28 (2005) 1075.
- [30] V. Shurig, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 275.
- [31] H.-R. Buser, M.D. Muller, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2023.
- [32] M.D. Muller, H.-R. Buser, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2031.
- [33] H.R. Buser, M.D. Muller, T. Poiger, M.E. Balmer, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 221.
- [34] I.J. Buerge, T. Poiger, M.D. Müller, H.-R. Buser, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2668.
- [35] I.J. Buerge, T. Poiger, M.D. Müller, H.R. Buser, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5443.
- [36] C. Bicchi, G. Cravotto, A. DiAmato, P. Rubiolo, A. Galli, M. Galli, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 487.
- [37] Z.Y. Li, Z.C. Zhang, Q.L. Zhou, Q.M. Wang, R.Y. Gao, Q.S. Wang, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 521.
- [38] P. Wang, S. Jiang, D. Liu, W. Shan, H. Zhang, Z. Zhou, *J. Chromatogr. Sci.* 44 (2006) 602.
- [39] E. Yashima, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 105.
- [40] W.A. Wan Ibrahim, D. Hermawan, M.M. Sanagi, *J. Chromatogr. A* 1170 (2007) 107.
- [41] Z.Q. Zhou, P. Wang, S.R. Jiang, M. Wang, L. Yang, J. Li, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26 (2003) 2873.
- [42] S.C. Hou, Z.Q. Zhou, Z. Qiao, H.C. Guo, X.Y. Shi, M. Wang, *Chromatographia* 57 (2003) 177.
- [43] P. Wang, S. Jiang, D. Liu, P. Wang, Z. Zhou, *J. Biochem. Biophys. Methods* 62 (2005) 219.
- [44] C. Lv, G. Jia, W. Zhu, J. Qiu, X. Wang, Z. Zhou, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 344.
- [45] P. Wang, S. Jiang, D. Liu, H. Zhang, Z. Zhou, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 1577.
- [46] J. Qiu, Q. Wang, W. Zhu, G. Jia, X. Wang, Z. Zhou, *Chirality* 19 (2007) 51.
- [47] Q. Tian, C. Lv, P. Wang, L. Ren, J. Qiu, L. Li, Z. Zhou, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 310.
- [48] Z. Zhou, J. Qiu, X. Yang, S. Jiang, *Anal. Lett.* 37 (2004) 167.
- [49] E. Yashima, H. Fukaya, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A* 677 (1994) 11.
- [50] Y.F. Ming, L. Zhao, H.L. Zhang, Y.P. Shi, Y.M. Li, L.R. Chen, *Chin. Chem. Lett.* 17 (2006) 1213.
- [51] Y. Ming, L. Zhao, H. Zhang, Y. Shi, Y. Li, *Chromatographia* 64 (2006) 273.
- [52] L. Ge, L. Zhao, Y.P. Shi, *Chin. J. Chem.* 26 (2008) 139.
- [53] E.N. Shapovalova, O.A. Shpigun, L.M. Nesterova, M.Y. Belov, *J. Anal. Chem.* 59 (2004) 290.
- [54] Y. Zhou, L. Li, K. Liu, X. Zhu, W. Liu, *Chirality* 21 (2009) 421.
- [55] T. Spitzer, E. Yashima, Y. Okamoto, *Chirality* 11 (1999) 195.
- [56] L. Yang, Y. Liao, P. Wang, C. Bi, Z. Zhou, S. Jiang, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27 (2004) 2935.
- [57] C. Zadra, C. Marucchini, A. Zazzerini, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5373.
- [58] M. Hutta, I. Rybár, M. Chalányova, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 143.
- [59] C.X. Pan, B.C. Shen, B.J. Xu, J.J. Chen, X.Z. Xu, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2004.
- [60] P. Wang, D. Liu, X. Lei, S. Jiang, Z. Zhou, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 265.
- [61] P. Wang, D. Liu, S. Jiang, Y. Xu, X. Gu, Z. Zhou, *Chirality* 20 (2008) 40.
- [62] P. Wang, D. Liu, X. Gu, S. Jiang, Z. Zhou, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 1007.
- [63] S. Chen, W. Liu, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82 (2009) 327.
- [64] A. Thienpont, J. Gal, C. Aeschlimann, G. Félix, *Analisis* 27 (1999) 713.
- [65] T. Zhang, C. Kientzy, P. Franco, A. Ohnishi, Y. Kagamihara, H. Kurosawa, *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 65.
- [66] C.J. Welch, T. Szczerba, *Enantiomer* 3 (1998) 37.
- [67] A. Monkiedje, M. Spitteler, K. Bester, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 707.
- [68] A. Monkiedje, M. Spitteler, *Environ. Res. Public Health* 2 (2005) 272.
- [69] D. Liu, P. Wang, W. Zhou, X. Gu, Z. Chen, Z. Zhou, *Anal. Chim. Acta* 555 (2006) 210.
- [70] P. Wang, D. Liu, S. Jiang, X. Gu, Z. Zhou, *Chirality* 19 (2007) 114.
- [71] P.K. Owens, A.F. Fell, M.W. Coleman, J.C. Berridge, *Enantiomer* 4 (1999) 79.
- [72] L. Toribio, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, J.J. Jimenez, C. Alonso, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 249.
- [73] M.J. del Nozal, L. Toribio, J.L. Bernal, N. Castaño, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 135.
- [74] L. Toribio, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, C. Alonso, J.J. Jimenez, *J. Chromatogr. A* 1144 (2007) 255.
- [75] J. Hernandez-Borges, M.A. Rodriguez-Delgado, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 26 (2005) 3799.
- [76] G. Gübitz, M.G. Schmid, *Electrophoresis* 28 (2007) 114.
- [77] M.A. Martínez-Gómez, L. Escuder-Gilabert, R.M. Villanueva-Camañas, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernández, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3265.
- [78] J. Gorse, A.T. Balchunas, D.F. Swaile, M.J. Sepaniak, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 11 (1988) 554.
- [79] K. Otsuka, S. Terabe, *Electrophoresis* 11 (1990) 982.
- [80] Y. Martín-Biosca, C. García-Ruiz, M.L. Marina, *Electrophoresis* 21 (2000) 3240.

- [81] W.A. Wan Ibrahim, D. Hermawan, M.M. Sanagi, H.Y. Aboul-Enein, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 466.
- [82] W.A. Wan-Ibrahim, D. Hermawan, M.M. Sanagi, H.Y. Aboul Enein, *Chromatographia* 71 (2010) 305.
- [83] D. Shea, K.V. Penmetsa, R.B. Leidy, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 1550.
- [84] Y.S. Wu, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *Electrophoresis* 21 (2000) 1611.
- [85] L. Zirngibl, *Antifungal Azoles*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998, p. 1.
- [86] Y.S. Wu, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 171.
- [87] I.E. Valko, H.A.H. Billiet, J. Frank, K.Ch.A.M. Luyben, *J. Chromatogr. A* 678 (1994) 139.
- [88] J.L. Jarman, J.J. Lorrie, A. Howell, A.W. Garrison, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 6175.
- [89] A. Santilio, M. D'Amato, A. Sorbo, R. Dommarco, J. Cap. *Electrophor. Microchip Technol.* 9 (2006) 79.
- [90] V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4877.
- [91] W.A.W. Ibrahim, S.A. Warno, H.Y. Aboul-Enein, D. Hermawan, M.M. Sanagi, *Electrophoresis* 30 (2009) 1976.
- [92] M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2005.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de investigación ha sido desarrollar nuevas metodologías analíticas empleando técnicas de separación electroforéticas y cromatográficas para la determinación de contaminantes químicos en muestras medioambientales, alimentarias, en productos cosméticos y en formulaciones comerciales con el fin de proponer estrategias rápidas, sensibles y de bajo coste económico y medioambiental que constituyan herramientas valiosas para la determinación de dichos contaminantes. Debido a que muchos de los contaminantes químicos de mayor interés son quirales, una parte de nuestro trabajo se ha centrado en el desarrollo de metodologías de análisis estereoselectivas con el fin de hacer posible la determinación individual de los estereoisómeros de estos compuestos, información muy valiosa por permitir el control de productos agroquímicos comerciales etiquetados como enantioméricamente puros, la evaluación de la toxicidad real de las muestras medioambientales o la investigación de los procesos metabólicos que afectan de distinta forma a los estereoisómeros de un compuesto determinado.

Con el fin de conseguir este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos concretos:

- ❖ Desarrollar una metodología analítica por CE en el modo CD-MEKC para la separación enantiomérica del insecticida piretroide *cis*-bifentrina y aplicar dicha metodología al análisis de formulaciones insecticidas comerciales.
- ❖ Desarrollar metodologías analíticas por CE en el modo CD-EKC para la separación enantiomérica de los fungicidas tipo amida, metalaxil y benalaxil y para su separación del fungicida folpet y aplicarlas al análisis de distintas formulaciones comerciales y a la determinación de la pureza enantiomérica de metalaxil en formulaciones etiquetadas como enantioméricamente puras en M-metalaxil.

- ❖ Evaluar nuevas fases estacionarias quirales en CEC y nano-LC con el fin de estudiar su potencial en la separación enantiomérica de un grupo de pesticidas.
- ❖ Desarrollar una metodología por CEC empleando nuevas fases estacionarias quirales para la separación enantiomérica rápida del fungicida metalaxil y aplicar dicha metodología a la determinación de la pureza enantiomérica en productos agroquímicos comerciales y en muestras medioambientales (suelo y agua).
- ❖ Estudiar el empleo de diversas columnas quirales en MDGC en el modo *heart-cut* para la separación atropoisomérica simultánea de PCBs y sus metabolitos metilsulfonados y aplicar las metodologías desarrolladas a la determinación de las fracciones enantioméricas de estos compuestos en alimentos.
- ❖ Proponer un nuevo método por CE en el modo CD-MEKC para la separación simultánea de mezclas multicomponente de ftalatos parentales con el fin de aplicarlo a la determinación de los mismos en productos cosméticos.
- ❖ Desarrollar un nuevo método analítico por HPLC-MS para llevar a cabo la determinación de fármacos tireostáticos en aguas naturales.
- ❖ Evaluar nuevas sílices mesoporosas funcionalizadas con grupos C18 como rellenos para cartuchos de SPE para la extracción de hormonas esteroideas en muestras de leche para su posterior análisis mediante HPLC.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

III.1 REACTIVOS, PATRONES, MUESTRAS Y FASES ESTACIONARIAS

III.1.1 Reactivos

Todos los reactivos empleados en este trabajo han sido de grado analítico y el agua utilizada en la preparación de las disoluciones se purificó mediante un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA).

III.1.1.1 Reactivos empleados para la preparación de tampones de separación en CE y CEC

Para la preparación de los tampones de separación se utilizaron el ácido bórico (Fluka, Buchs, Suiza), el ácido 2-morfolino etano sulfónico (MES) (Merck, Darmstadt, Alemania), el ácido fórmico y el ácido acético (Riedel-de Haën, Seelze, Alemania) y el ácido 2-[N-ciclohexilamino]-etano sulfónico (CHES) (Sigma, St. Louis, USA). Para el ajuste del pH se empleó hidróxido sódico o hidróxido amónico suministrados por Merck.

III.1.1.2 Aditivos añadidos a los medios de separación en CE

Los disolventes orgánicos añadidos como aditivos al medio de separación en CE han sido acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH) suministrados por Scharlab (Barcelona, España).

Los selectores quirales empleados han sido CDs procedentes de distintas casas comerciales: Aldrich (Steinheim, Alemania), Sigma, Fluka y Cyclolab (Budapest, Hungría). En la **Tabla III.1** se muestran las características de las CDs empleadas en este trabajo, así como, su procedencia.

Tabla III.1. Características de las CDs empleadas.

CD	Acrónimo	Naturaleza	Distribuidor comercial
α -CD	α -CD	Neutra	Fluka
β -CD	β -CD	Neutra	Fluka
γ -CD	γ -CD	Neutra	Cyclolab
Metil- β -CD	Me- β -CD	Neutra	Fluka
Metil- γ -CD	Me- γ -CD	Neutra	Cyclolab
(2,6-di-O-metil)- β -CD	DM- β -CD	Neutra	Sigma
(2,3,6-tri-O-metil)- β -CD	TM- β -CD	Neutra	Fluka
2-Hidroxiopropil- β -CD	HP- β -CD	Neutra	Cyclolab, Sigma
2-Hidroxiopropil- γ -CD	HP- γ -CD	Neutra	Cyclolab
Acetil- β -CD	Ac- β -CD	Neutra	Cyclolab
Acetil- γ -CD	Ac- γ -CD	Neutra	Cyclolab
Carboximetil- β -CD	CM- β -CD	Neutra (pH \leq 3) Aniónica (pH > 3)	Fluka, Cyclolab
Carboxietil- β -CD	CE- β -CD	Neutra (pH \leq 3) Aniónica (pH > 3)	Cyclolab
Carboximetil- γ -CD	CM- γ -CD	Neutra (pH \leq 3) Aniónica (pH > 3)	Cyclolab
Carboxietil- γ -CD	CE- γ -CD	Neutra (pH \leq 3) Aniónica (pH > 3)	Cyclolab
Succinil- β -CD	Succ- β -CD	Neutra (pH \leq 3) Aniónica (pH > 3)	Cyclolab
Succinil- γ -CD	Succ- γ -CD	Neutra (pH \leq 3) Aniónica (pH > 3)	Cyclolab
β -CD sulfatada	HS- β -CD	Aniónica	Fluka
γ -CD sulfatada	HS- γ -CD	Aniónica	Cyclolab
6-monodeoxi-6-monoamino- β -CD		Catiónica	Cyclolab

Los tensioactivos empleados han sido el SDS (Merck) y las sales biliares SC, deoxicolato sódico (SDC), taurocolato sódico (STC) y taurodeoxicolato sódico (STDC) (Sigma).

Finalmente, en el caso de compuestos altamente hidrofóbicos, se añadió al medio de separación urea suministrada por Fluka.

III.1.1.3 Reactivos empleados en la preparación de las fases móviles para HPLC y nano-LC

Para la preparación de las fases móviles en HPLC y nano-LC se emplearon ACN y MeOH (Scharlab y Sigma) y ácido fórmico (Fluka).

III.1.1.4 Reactivos empleados en la preparación de patrones y en la extracción y disolución de las muestras

Las disoluciones patrón se prepararon empleando MeOH y ACN (Scharlab y Sigma), isoootano de grado Pestipur® (SDS, Peypin, Francia) y hexano (Merck).

Para la preparación de las muestras se emplearon MeOH, hidróxido sódico y ácido sulfúrico (Scharlab o Sigma), dimetil sulfoxido (DMSO) y ACN (Scharlab), hexano (Scharlab y Merck), acetato de etilo (Panreac, Barcelona, España), sulfato sódico anhidro (J.T. Baker, PA, USA), diclorometano (DCM), ácido clorhídrico (HCl), amoníaco, cloruro de tetrabutil amonio (TBACl) y ácido acético todos ellos de Fluka y acetato de etilo y acetato de amonio de Sigma.

III.1.1.5 Reactivos empleados en la preparación de las sílices mesoporosas

En la síntesis de las sílices mesoporosas utilizadas en el capítulo IX se emplearon tetraetilortosilano (TEOS), poli(etilenglicol)-poli(propilenglicol)-poli(etilenglicol) (P123),

bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), tolueno, éter etílico, etanol y cloro (dimetil) octadecil silano todos ellos de Sigma, HCl de Scharlau y etanol de Panreac.

III.1.2 Patrones

Los pesticidas estudiados en los capítulos IV y V de esta memoria, todos ellos como racematos excepto el uniconazol-P, metalaxil-M y benalaxil-M, que se adquirieron como enantiómeros puros, se agrupan en la **Tabla III.2** junto con su estructura y origen comercial. Todos fueron suministrados por Fluka y por Chem Service (West Chester, PA, USA).

Los PCBs y MeSO₂-PCBs estudiados en el capítulo VI se adquirieron en Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania) y Accustandard (New Haven, CT, USA), respectivamente. En la **Tabla III.3** se agrupan los distintos PCBs y MeSO₂-PCBs estudiados.

Los ftalatos estudiados en el capítulo VII eran de Sigma. Sus estructuras y abreviaturas se muestran en la **Tabla III.4**.

Los patrones de los fármacos tireostáticos estudiados en el capítulo VIII se adquirieron en Sigma. Sus estructuras y abreviaturas se agrupan en la **Tabla III.5**.

Las hormonas esteroideas investigadas en el capítulo IX (estrona, etinilestradiol, estradiol, estriol, dietilestilbestrol y progesterona) fueron de Sigma y la testosterona de Fluka. Sus estructuras y abreviaturas se recogen en la **Tabla III.6**.

Tabla III.2. Estructura de los pesticidas estudiados y distribuidor comercial.

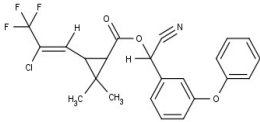
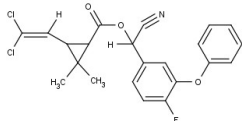
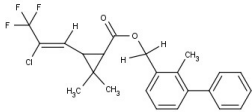
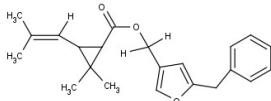
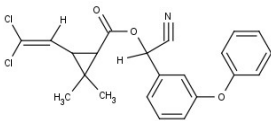
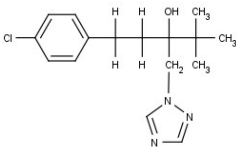
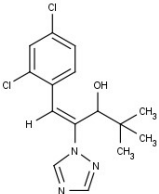
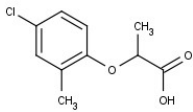
PESTICIDA	ESTRUCTURA	DISTRIBUIDOR COMERCIAL
λ -cialotrina		Fluka
β -ciflutrina		Fluka
Cis-bifentrina		Fluka
Resmetrina		Chem Service
α -cipermetrina		Fluka
Tebuconazol		Fluka
Diniconazol		Chem Service
Mecoprop		Fluka

Tabla III.2. Continuación.

PESTICIDA	ESTRUCTURA	DISTRIBUIDOR COMERCIAL
Uniconazol-P		Chem Service
Hexaconazol		Fluka
Metalaxil		Fluka
Benalaxil		Fluka
Miclobutanil		Fluka
Diclorprop		Fluka
Fenpropatrina		Chem Service
Flutriafol		Fluka

Tabla III.3. Estructuras generales y posición de los sustituyentes de los PCBs y MeSO₂-PCBs estudiados.

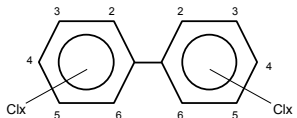
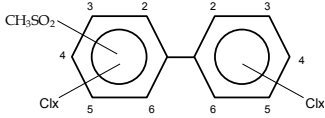
	PCB o MeSO ₂ -PCBs	POSICIÓN DE LOS SUSTITUYENTES
	PCB 45	2,2',3,6-TetraCB
	PCB 84	2,2',3,3',6-PentaCB
	PCB 91	2,2',3,4',6-PentaCB
	PCB 95	2,2',3,5',6-PentaCB
	PCB 131	2,2',3,3',4,6-HexaCB
	PCB 132	2,2',3,3',4,6'-HexaCB
	PCB 135	2,2',3,3',5,6'-HexaCB
	PCB 136	2,2',3,3',6,6'-HexaCB
	PCB 144	2,2',3,4,5',6-HexaCB
	PCB 149	2,2',3,4',5',6-HexaCB
	PCB 171	2,2',3,3',4,4',6-HeptaCB
	PCB 174	2,2',3,3',4,5,6'-HeptaCB
	PCB 175	2,2',3,3',4,5',6-HeptaCB
	PCB 176	2,2',3,3',4,6,6'-HeptaCB
PCB 183	2,2',3,4,4',5',6-HeptaCB	
	5-MeSO ₂ -CB91	3-metilsulfonyl-2,2',4',5,6-pentaclorobifenilo
	4-MeSO ₂ -CB91	4-metilsulfonyl-2,2',3,4',6-pentaclorobifenilo
	3'-MeSO ₂ -CB95	3-metilsulfonyl-2,2',3',5,6'-pentaclorobifenilo
	4'-MeSO ₂ -CB95	4-metilsulfonyl-2,2',3',5,6'-pentaclorobifenilo
	5'-MeSO ₂ -CB132	3-metilsulfonyl-2,2',3',4',5,6-hexaclorobifenilo
	4'-MeSO ₂ -CB132	4-metilsulfonyl-2,2',3,3',4',6-hexaclorobifenilo
	5-MeSO ₂ -CB149	3-metilsulfonyl-2,2',4',5,5',6-hexaclorobifenilo
	4-MeSO ₂ -CB149	4-metilsulfonyl-2,2',3,4',5',6-hexaclorobifenilo
5'-MeSO ₂ -CB174	3-metilsulfonyl-2,2',3',4',5,5',6-heptaclorobifenilo	
4'-MeSO ₂ -CB174	4-metilsulfonyl-2,2',3,3',4',5',6-heptaclorobifenilo	

Tabla III.4. Estructura de los ftalatos estudiados.

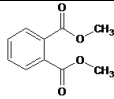
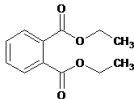
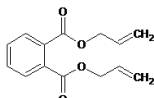
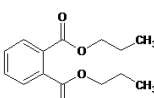
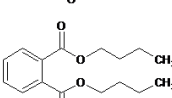
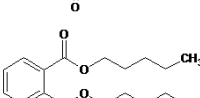
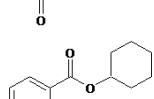
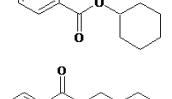
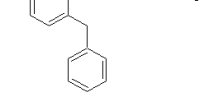
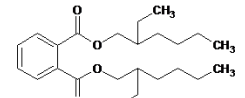
FTALATO	ABREVIATURA	ESTRUCTURA
Dimetil ftalato	DMP	
Dietil ftalato	DEP	
Dialil ftalato	DAP	
Dipropil ftalato	DPP	
Dibutil ftalato	DBP	
Dipentil ftalato	DNPP	
Diciclohexil ftalato	DCP	
Butil bencil ftalato	BBP	
Dietil hexil ftalato	DEHP	
Diocil ftalato	DNOP	

Tabla III.5. Estructura de los fármacos tireostáticos estudiados.

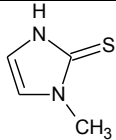
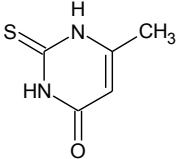
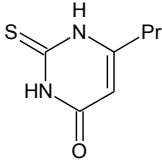
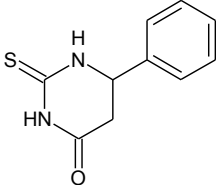
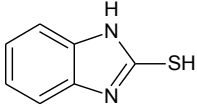
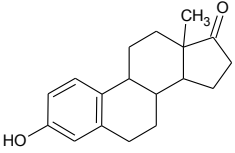
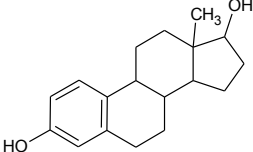
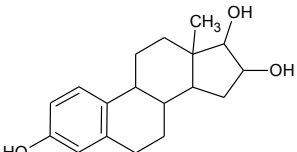
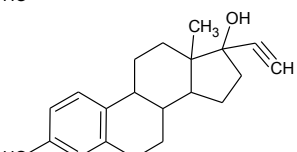
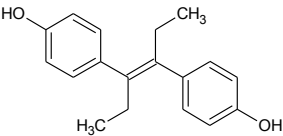
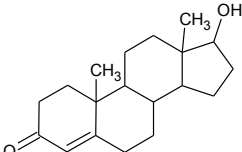
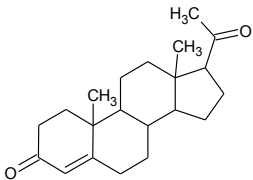
FÁRMACO TIREOSTÁTICO	ABREVIATURA	ESTRUCTURA
Tapazol	TAP	
Metil tiuracilo	MeTU	
Propil tiuracilo	PTU	
Fenil tiuracilo	PhTU	
Mercaptobencimidazol	MBI	

Tabla III.6. Hormonas esteroideas estudiadas junto con su abreviatura y estructura.

HORMONA ESTEROIDEA	ABREVIATURA	ESTRUCTURA
Estrona	E1	
Estradiol	E2	
Estriol	E3	
Etinilestradiol	EE2	
Dietilestilbestrol	DES	
Testosterona	T	
Progesterona	P	

III.1.3 Muestras

La pureza enantiomérica para el pesticida metalaxil (capítulos IV y V) se determinó en formulaciones comerciales adquiridas en establecimientos de la Comunidad de Madrid y La Rioja.

Las muestras de aguas y suelos analizadas en el capítulo V procedían de Alcalá de Henares (Madrid) y las muestras de aguas analizadas en el capítulo VIII se recogieron en diferentes puntos de la provincia de Lazio (Italia), concretamente en el río Tiber, los lagos Bracciano, Martignano y Vico y en la reserva natural de Farfa.

Los aceites de pescado analizados en el capítulo VI se adquirieron en distintos supermercados y herbolarios de Madrid y el hígado de ternera analizado en este mismo capítulo se adquirió en un supermercado de Madrid.

Los perfumes analizados en el capítulo VII se adquirieron en perfumerías de Alcalá de Henares (Madrid).

Las muestras de leche empleadas en el capítulo IX procedían de supermercados de Madrid.

III.1.4 Cartuchos de extracción en fase sólida, rellenos para preparar columnas multicapa y sílices mesoporosas

Los cartuchos de extracción en fase sólida Discovery DSC-18, Envicarb, Discovery DPA-6S, Discovery-DSC-18LT, LC-18, SCX y DSC-NH₂ fueron de Supelco (Bellefonte, PA, USA), los Oasis-HLB de Waters Corporation (Milford, MA, USA), los Sampli-Q Evidex de Agilent (Palo Alto, CA, USA) y los MFE-Pak C18 de Análisis Vínicos (Tomelloso, España).

El gel de sílice empleado en el capítulo VI de este trabajo de investigación para rellenar las columnas cromatográficas de vidrio para la extracción de las muestras de aceite de

pescado e hígado de ternera, fue suministrado por Merck y se modificó al 44 % con ácido sulfúrico o al 56 % con hidróxido potásico.

Las sílices mesoporosas empleadas en el capítulo IX se sintetizaron en el propio laboratorio siguiendo los procedimientos presentados en el apartado III.3.5 de esta memoria.

III.1.5 Fases estacionarias para nano-LC y CEC

Las fases estacionarias quirales Sepapak-2 (celulosa tris-(3-cloro-4-metilfenilcarbamato)) y Sepapak-4 (celulosa tris(4-cloro-3-metilfenilcarbamato) empleadas en el capítulo V fueron suministradas por el Profesor Bezhan Chankvetadze de la *School of Exact and Natural Sciences* (Tbilisi, Georgia).

III.2 INSTRUMENTACIÓN

III.2.1 Equipo de cromatografía de gases multidimensional

La configuración cromatográfica empleada en el capítulo VI consistió en dos sistemas independientes de cromatografía de gases, modelo CP3800 de Varian (CA, USA) cada uno de ellos equipado con un ECD. Los dos sistemas cromatográficos se conectaron entre sí mediante una válvula neumática DEANS, controlada por dos unidades de control de presión independientes con el fin de lograr una adecuada transferencia de la muestra de la primera a la segunda columna.

Las columnas capilares empleadas en este trabajo han sido dos columnas VF-5 (5 % fenil metil polisiloxano) de 15 y 30 metros de longitud y 0.25 mm de diámetro interno de Varian. Estas columnas se emplearon en la primera dimensión, donde se llevó a cabo la separación no quiral de los analitos de interés. En la segunda dimensión se utilizaron diversas columnas capilares, todas ellas derivadas de β -CDs: BGB-176SE (20 % 2,3-di-O-

metil-6-O-tert-butildimetilsilil- β -CD diluida en SE-52, 5 % fenil metilpolisiloxano) de 15 y 30 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno (BGB Analytic, Schlossböckelheim, Alemania), BGB-172 (25 % 2,3,6-tert-butildimetilsilil- β -CD diluida en PS086, 15 % fenil metilpolisiloxano) de 30 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno (BGB Analytic) y Chirasil-Dex (2,3,6-tri-O-metil- β -CD unida químicamente a polisiloxano) de 30 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno (Astec, NJ, USA).

III.2.2 Equipo de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas y de cromatografía de líquidos con detección UV

En el capítulo VIII se empleó un equipo de cromatografía de líquidos modular modelo PE Series 200 de Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA) con un sistema de desgasificación, una bomba binaria y un inyector automático. Para la separación cromatográfica se utilizó una columna X-Terra MS C18 de 4.6 x 150 mm con un tamaño de partícula de 5 μ m de Waters Corporation y una precolumna del mismo tipo de 4.0 x 10 mm con un tamaño de partícula de 5 μ m. El acoplamiento entre el equipo de HPLC y el MS se llevó a cabo empleando una interfase de ionización por ESI. El modelo de MS utilizado fue el 4000 Qtrap® de AB SCIEX (Foster City, CA, USA). El control del equipo y la adquisición de datos se realizaron con el software Analyst de AB SCIEX.

En el capítulo IX se empleó un equipo de HPLC-UV de Varian ProStar (Varian Ibérica, Madrid, España) con una bomba ternaria 230 ProStar, un muestreador automático ProStar 410 con una válvula de inyección de seis vías (Rheodyne) equipada con un *loop* de 20 μ l, un detector DAD 335 ProStar UV-Vis y un sistema de adquisición de datos Varian Star Workstation. Para la separación cromatográfica se utilizó una columna Ascentis C18 de 4.6 x 250 mm con un tamaño de partícula de 5 μ m suministrada por Supelco.

III.2.3 Equipo de electroforesis capilar

Los análisis realizados por CE, CEC y nano-LC se llevaron a cabo utilizando un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE de Agilent Technologies (Palo Alto, USA) con detector de absorción UV-Vis de diodos en serie (DAD). El control del equipo y la adquisición de datos se realizaron con el software HP^{3D}CE Chemstation de Agilent. Este equipo se empleó en los capítulos IV, V y VII.

Los capilares utilizados para llevar a cabo las separaciones por CE eran de sílice fundida de Polymicro Technologies (Phoenix, USA) de 50 µm de diámetro interno y 375 µm de diámetro externo. Para la fabricación de las columnas empleadas en CEC y nano-LC se utilizaron capilares de 100 µm de diámetro interno y 375 µm de diámetro externo. La longitud efectiva de los capilares utilizados fue diferente según la separación a realizar.

III.2.4 Instrumentación adicional

- Balanza analítica AE 260 Delta Range de Mettler (Greifensee, Suiza).
- Baño de ultrasonidos modelo Ultrasons-H de J.P. Selecta (Barcelona, España).
- Evaporador Labconco (Barcelona, España).
- pH-metro modelo 744 de Metrohn (Herisau, Suiza).
- Bomba LC-10 AS de Shimadzu (Duisburg, Alemania).
- Soporte de extracción en fase sólida VISIPREPTM de Supelco.
- Centrífuga Heraeus (Hanau, Francia).
- Mufla Hobersal (Barcelona, España).
- Rotavapor modelo Rotavapor R II de Büchi (Milan, Italia).

-Liofilizador modelo Cryodos de Telstar (Madrid, España).

-Horno cilíndrico.

III.3 PROCEDIMIENTOS

III.3.1 Cromatografía de gases multidimensional

III.3.1.1 Preparación de las disoluciones patrón y muestras

Las disoluciones patrón de PCBs y MeSO₂-PCBs se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de los mismos en isooctano para obtener la concentración necesaria en cada momento.

Las muestras de aceite de pescado e hígado de ternera se prepararon siguiendo el procedimiento descrito por Hovander *et al.* [275].

Para los aceites de pescado se pesó 0.5 g de la muestra y se disolvió en 5 mL de hexano. Se añadió 1 mL de DMSO anhidro y se agitó la mezcla durante 10 min antes de proceder a su centrifugación a 3000 rpm durante 6 min. A continuación, se separaron las dos fases y se procedió a reextraer de nuevo la fracción de DMSO con 2 mL de hexano. Posteriormente se combinaron las dos fracciones de hexano que contenían los PCBs. Para extraer los MeSO₂-PCBs de la fase de DMSO, se añadieron 1.5 mL de agua fría y se matuvo la muestra en hielo para de evitar el calentamiento de la misma. A continuación se añadieron 4 mL de hexano, se agitó la muestra durante 5 min y se centrifugó a 3000 rpm durante 6 min. Se repitió este proceso una vez más y finalmente se mezclaron las dos fracciones de hexano obtenidas.

La purificación de la fracción obtenida con los PCBs, se realizó en una columna cromatográfica que se preparó con 10 g de gel de sílice modificado con un 44 % de ácido

sulfúrico. La columna se acondicionó previamente con hexano y se eluyeron los analitos con 30 mL de hexano.

La fracción obtenida para los MeSO₂-PCBs se purificó en una columna multicapa que contenía 0.1 g de gel de sílice, 0.4 g de gel de sílice modificado con un 56 % de hidróxido sódico y 0.8 g de gel de sílice modificado con un 44 % de ácido sulfúrico. La columna se acondicionó con 8 mL de una mezcla hexano:diclorometano (2:1 v:v). Posteriormente se pasó la muestra, se lavó la columna con 8 mL de hexano:diclorometano (2:1 v:v) y se eluyeron los analitos con 25 mL de diclorometano.

Una vez obtenidas ambas fracciones, la correspondiente a los PCBs y la correspondiente a los MeSO₂-PCBs, se combinaron, se evaporó a sequedad, se añadió 50 µL de iso octano y se inyectó directamente en el sistema *heart-cut* MDGC.

En el caso de la muestra de hígado de ternera, en primer lugar se tuvo que extraer la fracción lipídica de la misma por MSPD, debido a que al ser los PCBs y sus metabolitos compuestos altamente hidrófobos, se acumulan en esta fracción. Para ello se trituró finamente el hígado y se liofilizó. A continuación, se pesaron 3 g de la muestra liofilizada y se homogeneizó con 25 g de sulfato sódico anhidro. La mezcla se trituró en un mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo y después se introdujo en una columna cromatográfica de vidrio. Posteriormente, los analitos se extrajeron con una mezcla acetona:hexano (1:1 v:v) y el extracto obtenido se evaporó a sequedad y se reconstituyó en 5 mL de hexano. Este último extracto se sometió al mismo proceso que se ha descrito para los aceites de pescado.

III.3.2 Cromatografía de líquidos

III.3.2.1 Preparación de las fases móviles

Las fases móviles empleadas en el capítulo VIII de esta memoria fueron una fase agua:ACN (50:50 v:v) con 6 mM de ácido fórmico (fase móvil A) y una fase móvil que únicamente contenía agua Milli-Q (fase móvil B).

Las fases móviles empleadas en el capítulo IX fueron una fase que únicamente contenía agua Milli-Q (fase móvil A) y ACN (fase móvil B).

III.3.2.2 Preparación de las disoluciones patrón y muestras

Las disoluciones patrón correspondientes a los fármacos tireostáticos se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de cada compuesto en MeOH para obtener la concentración necesaria en cada caso. Todas las disoluciones patrón se almacenaron en la oscuridad y a -20°C.

Las disoluciones patrón de las hormonas esteroideas se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de cada compuesto en MeOH para obtener disoluciones individuales de cada hormona a una concentración de 500 mg/L. A partir de ellas, se preparó una disolución que contenía las siete hormonas a una concentración de 50 mg/L. Para la optimización del método cromatográfico se empleó una disolución que contenía una mezcla de todas las hormonas a una concentración de 10 mg/L.

Las muestras de aguas naturales analizadas en el capítulo VIII se prepararon evaporando 250 mL de agua a sequedad y reconstituyendo la muestra en 5 mL de MeOH. Posteriormente se centrifugó para eliminar los posibles residuos sólidos y el sobrenadante se evaporó hasta obtener un volumen final de 500 µL, que se inyectó directamente en el sistema HPLC-MS.

La extracción de las hormonas esteroideas de las muestras de leche analizadas en el capítulo IX se realizó empleando un procedimiento descrito en la bibliografía [267]. Se pesó 1 g de la muestra de leche y se fortificó con los siete analitos de interés para obtener una concentración de 2 mg/kg de cada uno de ellos. Se añadieron 2 mL de tampón acetato 0.2 M (pH 5.2) y se agitó. A la mezcla, se añadieron 5 mL de MeOH y se agitó de nuevo durante 2 min en un vortex. Se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min y al sobrenadante se le añadió agua Milli-Q hasta obtener un volumen final de 25 mL. El extracto obtenido se purificó mediante SPE. En el caso de emplear cartuchos rellenos de sílices mesoporosas o con relleno C18 comercial, se emplearon las cantidades y volúmenes indicados anteriormente y en el caso de emplear cartuchos comerciales HLB, C18 o combinaciones C18 + NH₂ y HLB + NH₂, las cantidades y volúmenes utilizados fueron cinco veces más grandes ya que la cantidad de fase estacionaria de estos cartuchos era cinco veces superior. Los cartuchos de SPE rellenos de sílices mesoporosas, los C18 y los HLB se acondicionaron con 3 mL de MeOH antes de cargar la muestra a una velocidad aproximada de una gota por segundo. Una vez que se pasó toda la muestra por el cartucho, se lavó con 1 mL de agua Milli-Q con el fin de eliminar los posibles interferentes y se eluyeron los analitos en 2 mL de MeOH o ACN, que se optimizó en cada caso para obtener la máxima recuperación. Finalmente, se evaporó el extracto a sequedad, se reconstituyeron los analitos en 1 mL de MeOH y se inyectó la muestra en el equipo de HPLC-UV. En el caso de emplear un segundo cartucho de extracción (por ejemplo en las combinaciones C18 + NH₂ y HLB + NH₂), el cartucho amino se acondicionó con 4 mL de una mezcla DCM:MeOH (70:30 v:v) y se acopló debajo del primer cartucho de extracción justo antes de eluir los analitos retenidos en el primer cartucho de SPE. En este caso, la elución de las hormonas esteroideas se realizó con diclorometano:MeOH (70:30 v:v). El disolvente de elución se añadió al primer cartucho de forma que el eluato pasase directamente al cartucho de NH₂ acoplado debajo. Finalmente, el eluato se sometió al mismo proceso de evaporación indicado previamente y el extracto se reconstituyó en 1 mL de MeOH.

III.3.3 Electroforesis capilar

III.3.3.1 Acondicionamiento de los capilares

Antes de proceder a utilizar un capilar nuevo, se llevó a cabo el lavado del mismo con MeOH durante 5 min, una disolución de NaOH 1 M durante 30 min, 5 min de agua Milli-Q y finalmente 60 min del tampón de separación usando en todos los pasos una presión de 1 bar.

Al comienzo de cada jornada de trabajo el capilar se lavó durante 20 min con la disolución del BGE a una presión de 1 bar. Al final de cada jornada de trabajo, el capilar se lavó durante 5 min con agua Milli-Q, 5 min con una disolución de NaOH 0.1 M y 5 min de nuevo con agua Milli-Q, aplicando también una presión de 1 bar en todos los pasos. Durante la noche el capilar se guardó con agua Milli-Q en su interior y con los dos extremos sumergidos también en agua Milli-Q.

Para el acondicionamiento entre inyecciones se utilizaron diferentes secuencias de lavado según el trabajo que se estaba llevando a cabo y las necesidades del mismo. Por lo general, se realizó un lavado con agua Milli-Q, NaOH 0.1 M y BGE, variando los tiempos en función de la aplicación para obtener una adecuada repetibilidad de los resultados.

III.3.3.2 Preparación de tampones y medios de separación electroforéticos

Las disoluciones tampón empleadas en los capítulos IV y VII de esta memoria, se prepararon pesando la cantidad adecuada del reactivo correspondiente y disolviéndolo en agua Milli-Q para obtener la concentración deseada. A continuación, se ajustó el pH de la disolución con NaOH 0.1 o 1 M.

Los medios de separación electroforéticos que contenían aditivos como CDs, urea, tensioactivos o alcoholes se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de los mismos

en el tampón de separación previamente preparado para obtener la concentración o el porcentaje en volumen adecuado en cada caso.

Todos los medios de separación se filtraron a través de filtros de nylon de un tamaño de poro de 0.45 μm de Titan (Eatontown, NJ, USA) previamente a su utilización en el sistema de CE.

III.3.3.3 Preparación de disoluciones patrón y muestras

Las disoluciones patrón de los pesticidas *cis*-bifentrina, metalaxil, metalaxil-M, benalaxil, benalaxil-M y folpet (capítulo IV) se prepararon pesando la cantidad adecuada de los mismos y disolviéndolos en MeOH para obtener una concentración de 2000 mg/L que posteriormente se diluyó para obtener la concentración necesaria en cada caso. Las disoluciones patrón de los ftalatos (capítulo VII) se prepararon pesando la cantidad adecuada de los mismos y disolviéndolos en MeOH para obtener disoluciones individuales de cada analito a concentraciones de 1000 mg/L y 10000 mg/L. A partir de ellas, se prepararon las disoluciones de trabajo por dilución con MeOH. Todas las disoluciones se almacenaron en la oscuridad a 4°C.

Los productos pesticidas comerciales en forma líquida analizados en el capítulo IV se diluyeron con MeOH para obtener la concentración adecuada según su etiquetado. Los productos pesticidas sólidos se pesaron, se disolvieron en MeOH y se sonicaron durante 15 min para favorecer su solubilización. Ambos tipos de productos se filtraron antes de su inyección en el sistema de CE. Para la determinación del porcentaje de impureza enantiomérica de metalaxil-M en productos comerciales etiquetados como enantioméricamente puros y con el fin de realizar una preconcentración de la muestra dentro del capilar, la muestra previamente disuelta en MeOH se diluyó de nuevo con una mezcla de BGE:agua (50:50 v:v).

El tratamiento de muestra en el caso de los perfumes analizados en el capítulo VII consistió en la dilución de 500 μL de cada perfume con 10 mL de MeOH y su sonicación

durante 30 min. A continuación, la muestra se evaporó a sequedad y se redisolvió en 25 mL de MeOH al 40 %, para ser sometida a una extracción SPE con cartuchos C18. Los cartuchos se acondicionaron previamente con 5 mL de MeOH, 5 mL de agua Milli-Q y 5 mL de MeOH al 40 %. A continuación se pasó la muestra, se lavó el cartucho con 5 mL de MeOH al 40 % y se eluyeron finalmente los analitos con 5 mL de MeOH.

III.3.4 Electrocromatografía capilar y nano-LC

III.3.4.1 Preparación de las columnas

El empaquetado de las columnas de CEC y nano-LC empleadas en el capítulo V se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Chankvetadze [276] y que se muestra esquemáticamente representado en la **Figura III.1**. En este caso, se emplearon capilares de sílice fundida de 100 μm de diámetro interno, 375 μm de diámetro externo y 35 cm de longitud total. Uno de los extremos del capilar (extremo *outlet*) se conectó a un tubo de HPLC comercial de 4.6 x 50 mm, que se empleó como reservorio de la fase estacionaria. Antes de proceder al empaquetado, el capilar se lavó con MeOH durante 30 min a 100 bar para eliminar cualquier residuo procedente de la fabricación del mismo. A continuación, el extremo libre del capilar (extremo *inlet*) se conectó a una frita metálica comercial de porosidad adecuada para retener la fase estacionaria. Después, se dispersaron 20 mg de la fase estacionaria en 2.5 mL de una mezcla MeOH:agua (80:20 v:v) y se sonicó durante 30 min antes de transferirla al reservorio. Posteriormente se rellenó el capilar aplicando 350 bar de presión mediante una bomba de HPLC a la vez que se mantenía la totalidad del capilar sumergido en un baño de ultrasonidos para conseguir el correcto empaquetado de la fase estacionaria dentro del mismo. Esta presión se aplicó hasta rellenar una longitud del capilar de aproximadamente 30 cm. A continuación, se lavó el capilar ya relleno con una mezcla MeOH:agua (50:50 v:v) durante 1 h a 350 bar y se realizaron las fritas mediante calentamiento a 700 °C durante 4-5 s a 24 cm de distancia una de la otra. Posteriormente, se dio la vuelta al capilar y se eliminaron los restos de fase estacionaria lavando el capilar a 100 bar con la fase móvil que se emplearía durante los análisis.

Finalmente, se realizó la ventana de detección a 0.5 cm de la frita situada en el lado del extremo *outlet*.

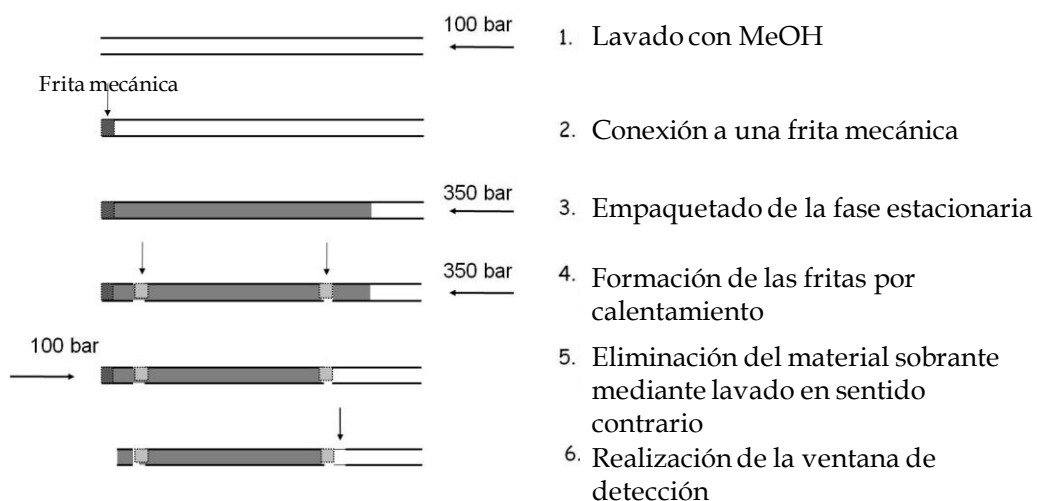


Figura III.1. Procedimiento esquemático seguido para el llenado de las columnas de CEC y nano-LC.

III.3.4.2 Acondicionamiento de las columnas

Antes de emplear por primera vez una columna, se lavó con la fase móvil que se emplearía durante los análisis hasta obtener una línea base estable.

Al comienzo de cada jornada de trabajo la columna se lavó con el medio de separación durante 30 min aplicando una presión de 12 bar. En el modo nano-LC no se llevó a cabo acondicionamiento entre inyecciones, mientras que en el modo CEC el acondicionamiento entre inyecciones consistió en lavar la columna capilar con el medio de separación durante 10 min a 12 bar. Al final de cada jornada de trabajo, el capilar se lavó con ACN:agua (80:20 v:v) durante 15 min a 12 bar y se mantuvo la columna con esta disolución en su interior hasta la siguiente jornada de trabajo.

III.3.4.3 Preparación de tampones y fases móviles

Las disoluciones tampón empleadas en CEC se prepararon en el caso de reactivos sólidos (ácido bórico) pesando la cantidad adecuada del mismo y disolviéndolo en agua Milli-Q y en el caso de reactivos líquidos (ácido fórmico y ácido acético) diluyendo el volumen adecuado con agua Milli-Q. A continuación se ajustó el pH de las disoluciones con NaOH 0.1 o 1 M.

Las fases móviles y medios de separación se prepararon mezclando distintos volúmenes de tampón:ACN:agua ó tampón:MeOH:agua con el fin de obtener la composición deseada.

III.3.4.4 Preparación de las disoluciones patrón y muestras

Las disoluciones patrón de todos los pesticidas se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de los mismos en ACN hasta obtener disoluciones individuales a concentraciones de 2000 mg/L. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo por dilución de las mismas con una mezcla ACN:agua (80:20 v:v).

Para la preparación de las muestras de suelo analizadas en el capítulo V, se realizó una extracción sólido-líquido de 50 g de suelo seco con 50 mL de MeOH. Para ello, el suelo se fortificó con el producto comercial que contenía el pesticida metalaxil-M y se agitó la mezcla durante una hora para asegurar la correcta adsorción del pesticida y su distribución homogénea. A continuación, se pesaron 50 g de suelo fortificado con el producto comercial y se extrajo con dos fracciones de 50 mL de MeOH. Se mezclaron las dos fracciones de MeOH obtenidas y se evaporaron hasta un volumen final de 5 mL. El extracto resultante se redisolvió en 20 mL de agua Milli-Q y posteriormente se reextrajo con tres fracciones de 40 mL de acetato de etilo. Una vez combinadas las tres fracciones obtenidas, se añadió sulfato sódico anhidro para eliminar los posibles restos de agua y el extracto resultante se filtró, se evaporó a sequedad y se redisolvió en 2 mL de hexano. Finalmente, se purificó por SPE empleando un cartucho de sílice previamente

acondicionados con hexano. Para la purificación del extracto, se realizó un lavado con 5 mL de hexano, 5 mL de acetato de etilo:hexano (5:95 v:v), 5 mL de acetato de etilo:hexano (10:90 v:v) y 5 mL de acetato de etilo:hexano (15:85 v:v) y los analitos se eluyeron con 25 mL de acetato de etilo:hexano (20:80 v:v). El eluato obtenido se evaporó a sequedad, se reconstituyó en 500 μ L de una mezcla ACN:agua (80:20 v:v) y se inyectó directamente en el sistema de CE.

Para la extracción de las muestras de agua analizadas en el capítulo V, se fortificaron 50 mL de agua de grifo con el producto comercial de metalaxil-M. Esta muestra se pasó por un cartucho C18 de SPE previamente acondicionado con 3 mL de MeOH y 3 mL de agua Milli-Q y se eluyeron los analitos con 5 mL de MeOH. El extracto obtenido se evaporó a sequedad, se reconstituyó en 500 μ L de una mezcla ACN:agua (80:20 v:v) y se inyectó en el sistema de CE.

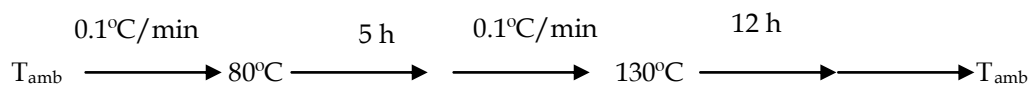
Para el análisis de la formulación comercial analizada en el capítulo V se diluyó el volumen adecuado de muestra en ACN:agua (80:20 v:v) para obtener una concentración aproximada según el etiquetado del producto de 75 mg/L de metalaxil-M.

III.3.5 Sílices mesoporosas

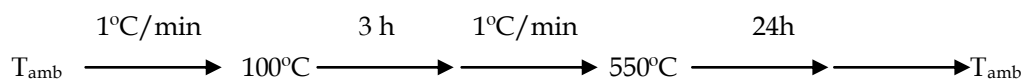
III.3.5.1 Síntesis de la sílice mesoestructurada SM

La sílice esférica mesoestructurada SM se sintetizó siguiendo el método descrito por Ma *y col.* [277]. Para ello, se pesaron 18 g de P123 en un vaso de precipitados. Debido a la textura tipo vaselina de este compuesto, se calentó en una placa calefactora hasta que el reactivo se volvió líquido y se pudo transferir en su totalidad a un matraz de fondo redondo de 2 L. A continuación, se añadieron 3 g de CTAB, 360 mL de HCl 2M, 150 mL de etanol y 180 mL de agua Milli-Q. La mezcla se agitó a 1000 rpm y a temperatura ambiente hasta su total disolución. Posteriormente, se añadió gota a gota 60 mL de TEOS manteniendo la agitación a 1000 rpm y una vez añadido todo el TEOS se mantuvo la

agitación durante 30 min. Finalmente, se transfirió la mezcla a un reactor autoclave y se la sometió al siguiente programa de temperatura:



Transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar y se obtuvo un sólido blanco que se lavó con abundante agua Milli-Q en un embudo de filtración. Para eliminar todo el CTAB y el P123, se calcinó el sólido blanco obtenido aplicando el siguiente programa de temperatura:



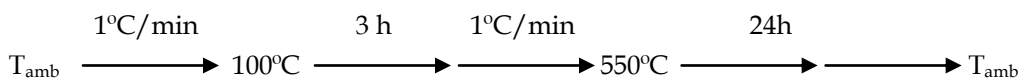
Finalmente, se trituroó el material en un mortero y se pesó la cantidad de sílice SM obtenida.

Con el fin de funcionalizar con grupos C18 la sílice sintetizada, se procedió en primer lugar a su activación. Para ello, se pesó aproximadamente 11 g de SM en un *schlenk* previamente pesado a vacío. La SM se calentó en un horno circular a 150°C durante 20 h y por diferencia de pesada se calculó la masa de SM que se iba a funcionalizar. Para esto, en el mismo *schlenk* donde se había activado la sílice, se añadió tolueno hasta formar una suspensión homogénea y la cantidad correspondiente a un 15 % en masa de cloro (dimetil) octadecil silano con respecto a la masa de SM activada. La mezcla se mantuvo a 80°C con agitación (500 rpm) durante 24 horas. Finalmente, se lavó con dos fracciones de tolueno, etanol y éter etílico de 50 mL cada una de ellas y se dejó secar a vacío durante aproximadamente 20 h.

III.3.5.2 Síntesis de la sílice mesoestructurada SBA15

La sílice SBA15 se sintetizó mediante el siguiente procedimiento experimental: Se pesaron 48.4 g de P123 en un vaso de precipitados. Al igual que el caso anterior y debido a la textura tipo vaselina de este compuesto, se calentó en una placa calefactora hasta que el reactivo se volvió líquido y se pudo transferir en su totalidad a un matraz de fondo redondo de 2 L. Se añadieron 1440 g de HCl 2M y 360 mL de agua Milli-Q y la mezcla se agitó a 1000 rpm y se calentó en un baño de silicona a 35°C hasta su total disolución. A continuación, se añadió a una velocidad de una gota por segundo, 102 g de TEOS y se mantuvo en agitación a 35°C durante 20 h. Posteriormente, se paró la agitación para no modificar la estructura de la matriz y se aumentó la temperatura a 80°C durante 24 h.

Para recuperar el material mesoporoso se lavó con abundante agua Milli-Q en un embudo de filtración y el sólido blanco obtenido se calcinó mediante el siguiente programa de temperatura para eliminar todo el P123:



Finalmente se trituro el material en un mortero y se pesó la cantidad de sílice SBA15 obtenida.

Para activar la sílice sintetizada, se pesaron aproximadamente 15 g de SBA15 en un *schlenk* previamente pesado a vacío. La SBA15 se calentó en un horno circular a 150°C durante 20 h y por diferencia de pesada se calculó la masa de SBA15 que se iba a funcionalizar. Para funcionalizar la sílice con grupos C18, se añadió tolueno hasta formar una suspensión homogénea y la cantidad correspondiente a un 15 % en masa de cloro (dimetil) octadecil silano con respecto a la masa de SBA15 activada. Toda la mezcla se mantuvo a 80°C con agitación (500 rpm) durante 24 horas. Finalmente, se lavó con dos

fracciones de tolueno, etanol y éter etílico de 50 mL cada una de ellas y se dejó secar a vacío durante aproximadamente 20 h.

III.4 TRATAMIENTO DE DATOS

Los valores de resolución (R_s) se calcularon con el software de la ChemStation según la ecuación:

$$R_s = 1.18 \times \frac{t_2 - t_1}{W_{1/2(1)} + W_{1/2(2)}} \quad (\text{Ecuación III.1})$$

donde t_1 y t_2 son los tiempos de migración de los picos correspondientes a cada uno de los enantiómeros o analitos y $w_{1/2(1)}$ y $w_{1/2(2)}$ sus anchuras a mitad de altura.

La eficacia se calculó como el número de platos por metro, definido como [278]:

$$N/m = 5,54 \left[\frac{t}{W_{1/2}} \right]^{1/2} \times \frac{100}{l_c} \quad (\text{Ecuación III.2})$$

donde t es el tiempo de retención o migración del pico, $w_{1/2}$ su anchura a mitad de altura y l_c la longitud de la columna empleada en centímetros.

Con el fin de compensar las fluctuaciones en las condiciones electroforéticas y mejorar la reproducibilidad cuantitativa de los resultados, se emplearon las áreas de pico corregidas respecto a los tiempos de migración, que se obtienen dividiendo el área de pico por el tiempo de migración [279]. Esta corrección se debe a que el valor de las áreas de los picos depende de la velocidad de migración del analito en el momento de la detección y de la cantidad inyectada de los mismos [280].

El cálculo de los límites de detección (LOD) y de los límites de cuantificación (LOQ) se realizó experimentalmente en base a la concentración de analito correspondiente a una relación señal/ruido (S/N) igual a 3 o a 10 respectivamente, o bien, a partir de las rectas de calibrado según las ecuaciones [281]:

$$\text{LOD} = 3.29 S_a/b \quad (\text{Ecuación III.3})$$

$$\text{LOQ} = 10 S_a/b \quad (\text{Ecuación III.4})$$

donde S_a es el valor del error estándar de la ordenada en el origen y b es la pendiente de la recta de calibrado.

El mínimo límite de cuantificación (LLOQ) calculado en el capítulo VIII, se determinó experimentalmente en función de la concentración de analito correspondiente a una relación S/N igual a 5.

El límite de detección relativo (RLOD), se calculó según la ecuación [282]:

$$\text{RLOD} = \frac{\text{LOD}_{\text{Mín}}}{C_{\text{Maj}}} \times 100 \quad (\text{Ecuación III.5})$$

donde C_{Maj} es la concentración máxima del componente mayoritario que puede estar presente sin causar problemas de solubilidad ni pérdida de resolución y $\text{LOD}_{\text{mín}}$ es el LOD del componente minoritario.

El cálculo del porcentaje de impureza se llevó a cabo utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ Impureza} = \frac{A_{\text{Imp}}}{A_{\text{Total}}} \times 100 \quad (\text{Ecuación III.6})$$

donde A_{Imp} es el área del pico de la impureza enantiomérica y A_{Total} es el valor correspondiente a la suma de las áreas de los picos de los dos enantiómeros de un compuesto.

III.4.1 Programas empleados

Para el análisis de los datos experimentales obtenidos, así como, para la representación de gráficos los programas empleados fueron Excell Microsoft Office 2010, Statgraphics Plus 5.1 y Origin 6.0.

CAPÍTULO IV

SEPARACION Y DETERMINACIÓN ENANTIOMÉRICA DE INSECTICIDAS Y FUNGICIDAS POR CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA

IV. 1 INTRODUCCIÓN

Como se ha puesto de manifiesto en la Introducción de esta memoria, la determinación enantiomérica de pesticidas presenta un gran interés ya que aproximadamente el 25 % de los pesticidas empleados hoy en día son quirales. Esta propiedad juega un papel fundamental en la efectividad, toxicidad y persistencia de estos compuestos ya que en muchos casos solamente uno de los enantiómeros es activo mientras que los otros no presentan ningún tipo de actividad o incluso pueden ser tóxicos para los organismos no-diana.

La electroforesis capilar en su modo EKC es una técnica con gran potencial en el campo de las separaciones quirales (ver el capítulo I de esta memoria) debido a las ventajas que ofrece con respecto a otras técnicas separativas y microseparativas:

- Los pequeños volúmenes de muestra y de disolución electrolítica necesarios para llevar a cabo las separaciones, confieren a esta técnica un valor añadido desde el punto de vista medioambiental.
- Su elevada eficacia de separación permite que una pequeña diferencia de selectividad entre los enantiómeros de un compuesto quiral sea suficiente para originar la enantioseparación.
- El selector quiral está libre en disolución y esto favorece la interacción del mismo con los analitos.

En este capítulo se ha empleado la CE en el modo EKC utilizando CDs y/o tensioactivos quirales con el fin de desarrollar nuevas metodologías analíticas para la separación quiral del insecticida piretroide *cis*-bifentrina y de los fungicidas tipo amida metalaxil y benalaxil.

La *cis*-bifentrina es un compuesto quiral constituido por dos enantiómeros (*1R,cis* y *1S,cis*) cuyas estructuras se representan en la **Figura IV.1**. Se ha comprobado que el

responsable de la toxicidad hacia los organismos invertebrados acuáticos es únicamente el isómero *1R,cis* [151, 283]. Por otro lado, cuando se aplica la mezcla racémica, el enantiómero *1R,cis* es mucho más persistente en el medioambiente [284]. Teniendo en cuenta que para el caso concreto de este piretroide, la actividad insecticida es similar para los dos enantiómeros *cis*, el uso de una mezcla racémica resulta innecesario. Por ello, sería de gran interés el utilizar fórmulas comerciales preparadas únicamente con el enantiómero *1S,cis* puro lo que requiere el desarrollo tanto de procedimientos de síntesis enantioselectiva que puedan ser utilizados en las plantas de producción como de metodologías para llevar a cabo el control de los productos obtenidos en dichas síntesis y de los productos comerciales (metodologías analíticas para la determinación de la pureza enantiomérica en estos productos).

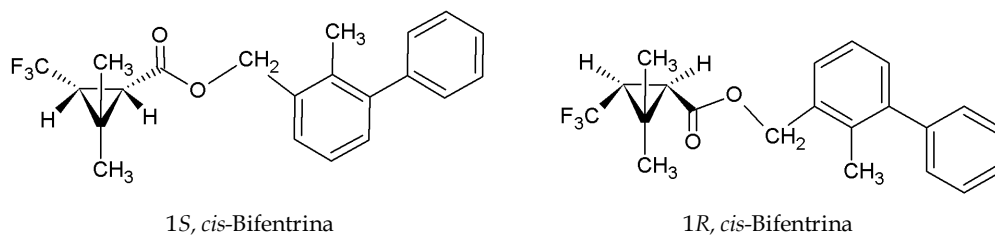


Figura IV.1. Estructura de los dos enantiómeros de *cis*-bifentrina.

Dado que, como se ha comentado en la Introducción de esta memoria, en el momento de iniciar este trabajo de investigación no existía ningún método que permitiera la separación de los enantiómeros de la *cis*-bifentrina por CE, este fue uno de los objetivos del trabajo recogido en este capítulo. Es cierto que se habían descrito en la bibliografía algunos métodos para la separación enantiomérica de *cis*-bifentrina por HPLC [149-153] o GC [140, 154-156] pero, como ya se ha comentado, las ventajas de la CE en las separaciones quirales (no son necesarias columnas quirales de elevado coste como en

HPLC y GC, la cantidad necesaria de reactivos y muestras para llevar a cabo los análisis es muy baja y por tanto el impacto ambiental de estos procedimientos es reducido, la posibilidad de ensayar de forma rápida un enorme número de selectores quirales al estar estos disueltos en el medio de separación conduce a una simplicidad y ahorro enorme en columnas quirales, etc.) permite pensar en las considerables ventajas de desarrollar estas metodologías en el formato de la CE. Además de todo ello, hay que reconocer también el enorme reto que supone el desarrollar metodologías analíticas para la separación enantiomérica de compuestos altamente hidrófobos en el formato de la CE por su enorme complejidad a priori, así como, por la importancia de esta contribución a la hora de ampliar el campo de aplicación de la CE.

Los fungicidas metalaxil y benalaxil pertenecen a uno de los dos grupos de fungicidas más empleados, los tipo amida (ver capítulo I de esta memoria).

El fungicida amida metalaxil [(*R,S*)-metil-*N*-(2-metoxiacetil)-*N*-(2,6-xilil)-*DL*-alalinato], es un compuesto quiral que posee un centro estereogénico y por tanto dos enantiómeros. La **Figura IV.2** muestra la configuración espacial de cada uno de los enantiómeros de metalaxil. Fue sintetizado en 1977 con el fin de controlar las afecciones causadas en plantas por los patógenos de la familia *Oomycota* [285]. Hay que destacar que el metalaxil es uno de los pocos fungicidas que desde 1996 se comercializa además de como mezcla racémica como enantiómero puro (Metalaxil-M, Mefenoxam o (*R*)-Metalaxil).

Es conocido que el enantiómero *R* del metalaxil (metalaxil-M) es unas 1000 veces más efectivo como insecticida que el correspondiente enantiómero *S* [285]. Si se sintetiza a partir de reactivos racémicos y no se purifica posteriormente, es de esperar que los dos enantiómeros se encuentren en una proporción 1:1; sin embargo, una vez que se encuentran en el medioambiente las relaciones enantioméricas varían a causa de la población microbiana. En efecto, se ha demostrado que existe una degradación preferente de uno de los enantiómeros en suelos y que dependiendo de las condiciones del suelo (población microbiana, pH, localización, etc.) esa degradación se ve favorecida hacia uno u otro enantiómero, pero generalmente el resultado es el enriquecimiento del enantiómero

sin actividad fungicida (enantiómero *S*) [157, 286-289]. Del mismo modo, se ha descrito una degradación preferente del enantiómero *S* del metalaxil en plantas [288]. Los enantiómeros de este fungicida también se comportan de manera diferente cuando entran en el metabolismo de los seres vivos, donde todos los receptores de la maquinaria celular poseen una configuración definida y por lo tanto, las interacciones que se dan son enantioselectivas. Así, cuando se administra metalaxil racémico de forma intravenosa a conejos (40 mg/kg), los niveles en plasma, hígado y riñones decrecen mucho más rápidamente para el enantiómero *S* del metalaxil que para el enantiómero *R* [159].

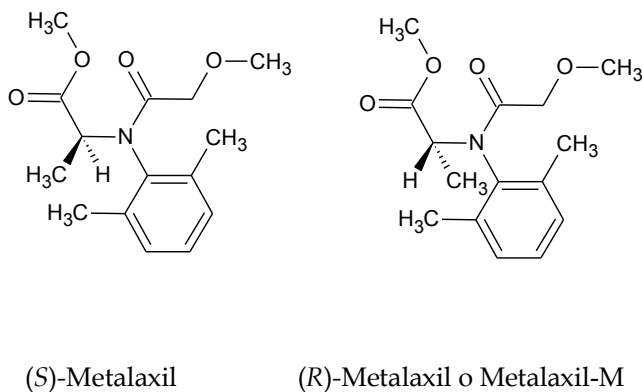


Figura IV.2. Estructura de los dos enantiómeros del fungicida metalaxil.

El benalaxil [(*R,S*)-metil-*N*-fenilacetil-*N*-2,6-xilil-alaninato] es un fungicida que pertenece a la misma familia del metalaxil. Consta de un carbono asimétrico, por lo que como en el caso anterior también posee dos enantiómeros diferentes tal y como se muestra en la **Figura IV.3**. Sin embargo, y del mismo modo que ocurre para metalaxil, la actividad pesticida reside básicamente en el enantiómero *R* también conocido como benalaxil-M [290]. La degradación que se da del mismo en alimentos y medioambiente es también enantioselectiva. En efecto, en muestras vegetales como son tabaco, tomates, remolachas

[291] y pepinos [292], se ha observado una degradación preferente del enantiómero (S)-benalaxil; sin embargo, en suelos el comportamiento es justamente el contrario y permanece mucho más tiempo el enantiómero S del benalaxil [291, 292]. Además, la toxicidad de sus dos enantiómeros hacia organismos que no sean los organismos diana también es enantioselectiva, encontrándose valores de LC₅₀ en lombrices para (R)-benalaxil y (S)-benalaxil de 4.99 y 6.66 µg/cm³, respectivamente [293].

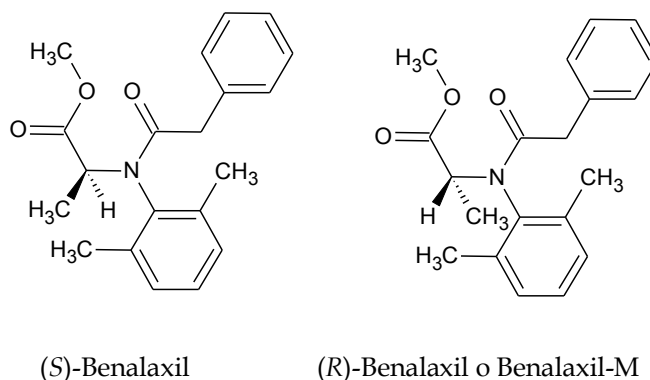


Figura IV.3. Estructura de los dos enantiómeros del fungicida benalaxil.

El metalaxil y el benalaxil se pueden encontrar en multitud de productos comerciales, bien como racematos o bien como enantiómeros puros, tanto solos como combinados con otros compuestos fungicidas de tipo protector como son el cobre o el folpet. El folpet [N-(triclorometiltio)ftalimida], es un fungicida no quiral que pertenece al grupo de las dicarboximidias y que se suele añadir a los productos comerciales, en combinación con otros fungicidas, con el fin de complementar la actividad fungicida de los mismos.

Como se ha indicado en la Introducción de esta memoria no existía ningún antecedente de la separación de benalaxil en el formato de la CE y la separación de metalaxil por CE había sido escasamente estudiada [157, 158] en condiciones en las que se

hacía necesaria una cantidad elevada de CD en el medio de separación y habiéndose obtenido resoluciones a línea base en el mejor de los casos (insuficientes cuando se pretende determinar una impureza enantiomérica en presencia del otro enantiómero mayoritario) y en tiempos de análisis que postulamos como mejorables al iniciar este trabajo de investigación. Si bien existían algunos trabajos relacionados con la utilización de otras técnicas de separación como HPLC o GC, con el fin de separar los enantiómeros de estos compuestos (ver capítulo I), el desarrollo de metodologías analíticas en el formato de la CE para el control de la pureza enantiomérica de estos fungicidas presentaba un gran interés por los mismos motivos ya detallados anteriormente para el caso de la *cis*-bifentrina.

En este capítulo se recoge por tanto el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral con el fin de desarrollar nuevas metodologías analíticas por EKC que han permitido llevar a cabo por un lado la primera separación enantiomérica del insecticida piretroide *cis*-bifentrina por CE mediante el empleo simultáneo de una CD y un tensioactivo quirál, y por otro lado la separación enantiomérica de los fungicidas metalaxil y benalaxil utilizando una CD en el medio de separación. Los enantiómeros del benalaxil se han separado por CE por primera vez en este trabajo. Además, debido a la presencia habitual del fungicida folpet en los productos comerciales de metalaxil y/o benalaxil, los métodos desarrollados se aplicaron también a la separación y determinación de estos tres compuestos en mezclas binarias metalaxil/folpet y benalaxil/folpet. Se evaluaron las características de los métodos desarrollados para su posterior aplicación al control de la composición enantiomérica de productos pesticidas comerciales y al control de la pureza enantiomérica de productos comerciales, que en el caso del metalaxil aparecían etiquetados como enantioméricamente puros.

IV.2 OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo ha sido el desarrollo de métodos analíticos por EKC con detección UV que permitan la separación enantiomérica del insecticida piretroide *cis*-bifentrina y de los fungicidas amidas metalaxil y benalaxil.

Con este fin se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Desarrollar metodologías de separación quiral de interés en el campo agroquímico y medioambiental aprovechando al máximo las características inherentes de la CE como son la versatilidad, la rapidez o el bajo consumo de reactivos y muestras.
2. Estudiar la influencia de la adición de distintos tensioactivos (SDS (tensioactivo no quiral) y sales biliarias (tensioactivos quirales)) al medio de separación con el fin de obtener la separación enantiomérica de *cis*-bifentrina.
3. Optimizar las condiciones experimentales de separación quiral por CD-MEKC de *cis*-bifentrina y por CD-EKC de metalaxil y benalaxil con el fin de obtener los mejores resultados posibles en cuanto a resoluciones y tiempos de análisis.
4. Separar simultáneamente los enantiómeros de metalaxil y benalaxil y el fungicida folpet, debido a la presencia habitual de este último compuesto en las formulaciones comerciales de metalaxil y benalaxil.
5. Aplicar los métodos quirales desarrollados al análisis de distintos productos agroquímicos disponibles comercialmente que contienen *cis*-bifentrina, metalaxil o benalaxil o bien cualquiera de los dos últimos compuestos con folpet.
6. Determinar el porcentaje de impureza enantiomérica en formulaciones comerciales que según el etiquetado únicamente poseen el enantiómero activo de metalaxil (metalaxil-M).

IV.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de desarrollar el primer método por CE que permita la separación de los enantiómeros del piretroide *cis*-bifentrina, y dadas las características de este compuesto se decidió utilizar CDs y tensioactivos en el medio de separación, para facilitar tanto la separación quiral como la solubilización del analito en el medio de separación.

En efecto, la *cis*-bifentrina es un compuesto de elevada hidrofobicidad, por lo que su solubilización en el medio de separación electroforético puede resultar difícil y derivar en problemas de precipitación dentro del capilar de separación. En estos casos, es habitual emplear tensioactivos en el medio de separación para evitar el problema pero sin embargo, y con el fin de simplificar el sistema electroforético en la medida de lo posible, se plantearon una serie de experimentos preliminares que consistían en emplear únicamente CDs en el BGE para alcanzar la separación enantiomérica de este compuesto. Debido al carácter neutro de *cis*-bifentrina en todo el intervalo de pH, se seleccionaron una serie de CDs cargadas, bien de carácter aniónico (CM- β -CD, CM- γ -CD y HS- β -CD) o bien de carácter catiónico (6 monodeoxi-6-monoamino- β -CD), que se adicionaron individualmente al medio de separación electroforético. Sin embargo, ninguna de estas CDs permitió la correcta solubilización del compuesto en el BGE, ni tan siquiera cuando se añadía al medio de separación urea, algún modificador orgánico (ACN, MeOH, propanol o dimetilformamida) o SDS por debajo de su CMC (para evitar la formación de micelas pero ayudar a la solubilización del compuesto). Por ello, al inyectar el analito en el sistema de CE no se observaba el pico correspondiente ya que el compuesto precipitaba dentro del capilar y no llegaba al detector.

A la vista de los resultados obtenidos en estos experimentos iniciales, se decidió añadir micelas al BGE para poder llevar a cabo la separación enantiomérica del piretroide *cis*-bifentrina. Así, el primer paso en el desarrollo de dicho método se centró en el estudio del efecto de la adición de distintas sales biliares al medio de separación. Esta estrategia tiene como ventaja, que en el caso de querer separar quiralmente analitos hidrofóbicos como es el caso de la *cis*-bifentrina, un único aditivo ayuda a la solubilización de los

compuestos y actúa a la vez como selector quiral. Sin embargo, en este caso ninguna de las sales biliares estudiadas (SC, SDC, STC y STDC) fue capaz de producir la discriminación quiral de los enantiómeros de *cis*-bifentrina por sí solas. Por este motivo, se realizó un barrido con varios tensioactivos (quirales (SC, SDC, STC y STDC) y no quirales (SDS)) en combinación con una serie de 11 CDs neutras (α -CD, β -CD, γ -CD, Me- β -CD, Me- γ -CD, DM- β -CD, TM- β -CD, HP- β -CD, HP- γ -CD, Ac- β -CD y Ac- γ -CD) que dio lugar a un total de 55 experimentos. Para todos estos experimentos se seleccionó como condiciones iniciales una concentración 50 mM para el tensioactivo y 15 mM para la CD. De todas las combinaciones tensioactivo-CD probadas, la que dio lugar a una mejor separación enantiomérica fue la combinación SC y TM- β -CD. Aunque la combinación DSC y DM- β -CD también proporcionó cierta discriminación quiral hacia los enantiómeros de *cis*-bifentrina, la resolución obtenida para los mismos fue de tan solo 1.3 mientras que para SC y TM- β -CD se obtuvo una resolución de 2.05.

Una vez seleccionados el tensioactivo y la CD más adecuados, se estudió la influencia de diferentes variables experimentales que podrían afectar a la resolución quiral obtenida. Estas variables incluyen la concentración de sal biliar y CD, el voltaje aplicado durante la separación y la temperatura. La optimización individual de cada uno de estos parámetros experimentales permitió establecer las mejores condiciones para la separación quiral de *cis*-bifentrina: capilar 50 μ m x 50 cm (58.5 cm l.t.), BGE: SC 100 mM - TM- β -CD 20 mM en tampón borato 100 mM (pH 8.0) con urea 2 M, inyección hidrodinámica 50 mbar x 2 s, 15°C, 30 kV, longitud de onda de detección UV: 210 \pm 2 nm (sin referencia). En estas condiciones, se obtuvo la separación quiral de los enantiómeros de *cis*-bifentrina en un tiempo de análisis de 9.2 min y con una resolución de 2.8. Esta separación supone la primera contribución de la CE al análisis quiral del piretroide *cis*-bifentrina. Indicar que tanto el tiempo de análisis como la resolución se pueden considerar excelentes dadas las características de la *cis*-bifentrina mostrando el enorme potencial de la CE en su modo CE-MEKC para la separación quiral de compuestos de alto carácter hidrofóbico.

Con el fin de aplicar el método desarrollado a la determinación enantiomérica de *cis*-bifentrina en un producto insecticida comercial, se procedió a la evaluación de las

características analíticas del método en términos de linealidad, LODs y LOQs, precisión, selectividad y exactitud. El estudio de todos estos parámetros permitió confirmar la validez del método para la determinación de *cis*-bifentrina en una muestra comercial que contenía este piretroide como principio activo. Así, se determinó la cantidad de *cis*-bifentrina presente en dicho insecticida comercial que contenía según el etiquetado una cantidad de principio activo de 2000 mg/L. La cuantificación de la muestra mediante el método de calibrado del patrón externo permitió establecer una concentración de 1060 ± 39 mg/L y de 1017 ± 49 mg/L para el primer y segundo enantiómero, respectivamente. De este modo, se mostró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de *cis*-bifentrina etiquetada en el producto comercial y la determinada mediante el método analítico desarrollado, corroborando por tanto, que la formulación comercial del insecticida contenía la mezcla racémica de *cis*-bifentrina.

En lo que se refiere al desarrollo de un método para la separación quiral de los fungicidas metalaxil y benalaxil, se seleccionó el modo CD-EKC porque la hidrofobicidad de ambos compuestos es menor a la del compuesto *cis*-bifentrina permitiendo pensar en la posibilidad de llevar a cabo la separación con CDs sin ser necesaria la presencia de tensioactivos.

En el campo de las separaciones quirales por EKC, la elección del selector quiral es uno de los pasos críticos a la hora de obtener una separación enantiomérica adecuada. En nuestro caso y dada la naturaleza neutra en todo el intervalo de pH de los dos fungicidas objeto de estudio, metalaxil y benalaxil, se pensó en la posibilidad de emplear ciclodextrinas cargadas que confirieran movilidad a los compuestos y que permitieran discriminar quiralmente los enantiómeros de los dos fungicidas estudiados. Por ello, se seleccionaron una serie de ocho ciclodextrinas de naturaleza aniónica, a una concentración inicial de 15 mM: CM- β -CD, CM- γ -CD, succ- β -CD, succ- γ -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD, CE- β -CD y CE- γ -CD. Por otra parte y con el fin de poder comparar la influencia de la naturaleza del tampón de separación, se emplearon dos tampones diferentes con cada una de las CDs estudiadas, uno de naturaleza inorgánica (borato 50 mM, pH 8.5) y otro de naturaleza orgánica (MES 50 mM, pH 6.5). De los dos tampones de separación ensayados,

cuando se empleó el tampón borato únicamente se consiguió la separación de los enantiómeros de metalaxil a línea base en presencia de dos CDs (CM- β -CD y succ- β -CD), mientras que no fue posible separar los enantiómeros de benalaxil con ninguna CD. Sin embargo, el empleo de un tampón MES, además de permitir la resolución enantiomérica de metalaxil y benalaxil en un mayor número de casos, mejoró en general las resoluciones quirales obtenidas en comparación con las obtenidas con tampón borato, debido fundamentalmente a que favorece la solubilización de ambos compuestos en disolución acuosa, observándose con el mismo además, una mejora en la forma de los picos obtenidos en todas las condiciones experimentales ensayadas. En el caso concreto de metalaxil, se observó que con un tampón MES, las dos únicas CDs que dieron lugar a resoluciones enantioméricas superiores a línea base fueron succ- γ -CD y HS- γ -CD. Sin embargo, la movilidad de esta última CD hacia el ánodo era tan elevada que los tiempos de análisis obtenidos aumentaban considerablemente en comparación con los obtenidos con la succ- γ -CD en las mismas condiciones experimentales, por lo que se seleccionó esta CD. Para benalaxil fueron tres las CDs que produjeron una separación quiral superior a línea de base, CM- β -CD, CM- γ -CD y succ- β -CD. A pesar de que todas ellas proporcionaron resoluciones quirales buenas (entre 3.8 y 12.8) en tiempos de análisis muy semejantes (~18 min), se eligió la succ- β -CD por ofrecer en este caso una discriminación enantiomérica mucho más elevada (R_s 12.8) que las otras dos.

Una vez seleccionada la CD más adecuada para la separación enantiomérica de cada uno de los fungicidas, se estudió la posibilidad de separar ambos compuestos simultáneamente combinando en el BGE las dos CDs seleccionadas, sin embargo, no se pudo alcanzar el objetivo deseado y por ello se decidió desarrollar dos métodos individuales.

A continuación, se procedió a optimizar algunas variables experimentales que podrían mejorar de forma significativa la resolución quiral obtenida para ambos fungicidas. Así, se optimizaron de forma individual variables como la concentración de CD o el tiempo de inyección con el fin de mejorar la forma de los picos y no perder resolución quiral. De este modo, se establecieron las condiciones óptimas para cada uno de los compuestos. Para

metalaxil se eligieron las siguientes condiciones experimentales: capilar 50 μm x 50 cm (58.5 cm l.t.), BGE: succ- γ -CD 15 mM en tampón MES 50 mM (pH 6.5) con urea 2M, 15°C, 30 kV, inyección hidrodinámica 25 mbar x 3s, longitud de onda de detección UV: 210 \pm 2 nm (sin referencia). En estas condiciones, se obtuvo la separación de los dos enantiómeros de metalaxil en un tiempo de análisis de 11.5 min y con una resolución de 3.1, lo que supone una gran mejora con respecto a los dos métodos de CE publicados hasta el momento para la separación quiral de este fungicida, donde la mayor resolución obtenida era de 1.68 en 19 min. Para benalaxil las condiciones experimentales seleccionadas como óptimas fueron: capilar 50 μm x 50 cm (58.5 cm l.t.), BGE: succ- β -CD 5 mM en tampón MES 50 mM (pH 6.5) con urea 2M, 15°C, 30 kV, inyección hidrodinámica 25 mbar x 3s, longitud de onda de detección UV: 210 \pm 2 nm (sin referencia). En estas condiciones, se obtuvo la separación de los enantiómeros de benalaxil en un tiempo de análisis de 7.5 min y con una resolución de aproximadamente 15 constituyendo ésta la primera separación quiral de benalaxil en el formato de la CE.

Debido a la común presencia del fungicida folpet en aquellos productos comerciales que contienen como principio activo metalaxil y/o benalaxil, se decidió estudiar la aplicabilidad de los dos métodos desarrollados a la separación simultánea de los enantiómeros de metalaxil o benalaxil y el folpet. En las condiciones experimentales óptimas para cada compuesto se obtuvo la separación simultánea de los enantiómeros de metalaxil y el folpet en un tiempo de 12.5 min y la de los enantiómeros de benalaxil y el folpet en un tiempo de 10.5 min. Si se comparan los resultados obtenidos solo para los fungicidas quirales y para la mezcla de estos con folpet, se puede concluir que la presencia de folpet no afecta de manera apreciable a ninguna de las separaciones quirales, es decir, no se modifican prácticamente ni los tiempos de migración de los enantiómeros de metalaxil y benalaxil, ni las resoluciones quirales previamente obtenidas para ambos compuestos en ausencia de folpet siendo los tiempos de análisis totales similares a los obtenidos previamente para los fungicidas solos.

Posteriormente, se evaluaron las características analíticas de los dos métodos en términos de linealidad, LODs y LOQs, precisión, selectividad y exactitud, con el fin de

aplicarlos a la determinación de los enantiómeros de ambos fungicidas en formulaciones comerciales y a la determinación del porcentaje de impureza enantiomérica de metalaxil en productos etiquetados como enantioméricamente puros. Se obtuvieron valores adecuados para todos los parámetros estudiados y un LOD inferior a 4.2 mg/L para los enantiómeros de metalaxil e inferior a 5.6 mg/L para los enantiómeros de benalaxil y se confirmó la ausencia de interferencias de matriz para las tres muestras comerciales analizadas. De esta manera, y mediante el método de calibrado del patrón externo se procedió a la determinación de metalaxil-M, benalaxil y folpet en diversas formulaciones comerciales (dos muestras metalaxil-M + folpet, una muestra benalaxil + folpet). Los valores de concentración determinados para los productos comerciales solo se correspondieron con los etiquetados en el caso del fungicida benalaxil. En el caso de las dos muestras comerciales que contenían metalaxil-M, se obtuvieron valores por encima del contenido etiquetado en ambas muestras (entre un 35 y un 45 % superiores). Finalmente, en el caso de folpet se obtuvieron siempre valores de concentración mucho menores que los valores etiquetados.

Por otro lado, hay que destacar que en las formulaciones comerciales etiquetadas como enantioméricamente puras en metalaxil-M se pudo observar un pequeño pico correspondiente a la impureza enantiomérica (*S*-metalaxil). Sin embargo, la determinación de las impurezas enantioméricas requiere de métodos analíticos más sensibles que el desarrollado hasta el momento. Por este motivo, se procedió a mejorar la sensibilidad del método quiral para metalaxil aplicando la técnica de preconcentración por acumulación de muestra (*sample stacking*). De este modo, la cantidad de muestra que puede ser inyectada sin perder resolución aumenta y se mejora la sensibilidad del método. Mediante la preparación de la muestra en una mezcla BGE:agua 50:50 v:v, en lugar de en MeOH como hasta el momento, se pudo pasar de una inyección de 25 mbar x 3s a una de 25 mbar x 10 s lo que supuso un aumento en la sensibilidad del método en un factor de tres. A continuación, se evaluó el nuevo método en los mismos términos citados anteriormente obteniéndose valores adecuados para todos los parámetros estudiados. En cuanto a los límites de detección (1.2 mg/L), decir que esta estrategia permitió detectar impurezas de

S-metalaxil de hasta un 1.2 % con respecto al pico mayoritario, lo que fue suficiente para poder determinar el porcentaje de impureza en las dos formulaciones comerciales citadas. El análisis de las mismas demostró que ambos productos contenían impurezas enantioméricas del 4 y 5 %.

Los resultados obtenidos en este capítulo se recogen en los siguientes artículos científicos:

Artículo 3

“Enantiomeric separation of cis-bifenthrin by CD-MEKC: Quantitative analysis in a commercial insecticide formulation”

V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina

Electrophoresis 31 (2010) 1533-1539.

Artículo 4

“Chiral separation of metalaxyl and benalaxyl fungicides by electrokinetic chromatography and determination of enantiomeric impurities”

V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina

Journal of Chromatography A 1218 (2011) 4877-4885.

Artículo Científico 3

*“Enantiomeric separation of cis-bifenthrin by CD-MEKC:
Quantitative analysis in a commercial insecticide formulation”*

V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina

Electrophoresis 31 (2010) 1533-1539

Virginia Pérez-Fernández
María Ángeles García
María Luisa Marina

Department of Analytical
Chemistry, Faculty of Chemistry,
University of Alcalá, Spain

Received November 26, 2009

Revised January 19, 2010

Accepted January 19, 2010

Research Article

Enantiomeric separation of *cis*-bifenthrin by CD-MEKC: Quantitative analysis in a commercial insecticide formulation

The first CE method enabling the enantiomeric separation of the synthetic pyrethroid *cis*-bifenthrin (BF) was developed in this work. CD-MEKC was the CE mode employed for this purpose. The influence of several experimental parameters such as temperature, voltage, type and concentration of surfactant (chiral and achiral) and CD was investigated. The use of the bile salt sodium cholate at a concentration of 100 mM in the presence of 20 mM heptakis (2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD enabled the separation of *cis*-BF enantiomers in less than 10 min and with a resolution of 2.8. The analytical characteristics of the developed methodology were evaluated allowing its application to the quantitation of *cis*-BF in a polyvalent commercial insecticide formulation.

Keywords:

Bile salts / CDs / *Cis*-bifenthrin / MEKC / Pyrethroids

DOI 10.1002/elps.200900718

1 Introduction

Separation of chiral compounds in biological, pharmaceutical and environmental control has become a challenging topic of research [1, 2]. In the environmental field, pollution as a consequence of the great amount of pesticides used per year over the world, is an intricate problem nowadays. Although the monitoring of these pollutants is essential, most methods available do not distinguish between enantiomers [3]. Pesticides in general and especially insecticides are considered the most important group of pollutants. About 25% of them are chiral and this fact has important implications both in their biological activity and degradation patterns [1]. Although the enantiomers of a compound have identical physical-chemical properties, they may behave enantioselectively in biological processes such as uptake, metabolism and excretion [4–6]. Furthermore, apart from the different activities linked to the different enantiomers, they are often degraded at different rates [7, 8]. Therefore, the search of new and effective methods to

resolve enantiomeric mixtures and control the production processes of these chemicals is of great importance.

Pyrethroids are synthetic pesticides obtained from the modification of natural pyrethrins to improve their biological activity and stability [9]. They are widely used for the control of insects in agriculture and around households. With the restrictions in the use of other insecticides such as organophosphorous or carbamates, pyrethroids have become the most extended insecticides in the world especially due to their low toxicity for mammals [10]. However, pyrethroids possess a significant environmental concern because of their high acute toxicity for fish and aquatic invertebrates, with median lethal concentration lower than 1 ppb against some organisms [11]. The property of having one to three chiral centers makes them the family of pesticides with one of the highest chirality [12]. Since the enantiomers of pyrethroids can present different insecticide activity, toxicity against aquatic invertebrates and persistence in the environment [13], the development of adequate chiral analytical methodologies enabling the enantiomeric determination of pyrethroids is of great interest.

Bifenthrin (BF) ((2-methyl-3-phenyl-phenyl) methyl-3-[(*Z*)-2-chloro-3,3,3-trifluoro-prop-1-enyl]-2,2-dimethyl-cyclopropane-1-carboxylate), is an ester pyrethroid [14] classified in the “fourth generation” of pyrethroids according to the development time [15]. Although it contains two chiral centers and so four stereoisomers, only the *cis* diastereomers are employed in commercial formulations due to their higher insecticide activity compared with the *trans* ones [16].

Chiral determination of *cis*-BF has a great interest due to the following reasons. First, the toxicity of *cis*-BF against aquatic invertebrates was demonstrated to be

Correspondence: Professor María Luisa Marina, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares (Madrid), Spain

E-mail: mluisa.marina@uah.es

Fax: +34-91-8854971

Abbreviations: **Ac**, corrected peak areas; **BF**, bifenthrin; **DM- β -CD**, heptakis (2;6-di-*O*-methyl)- β -CD; **DS**, degree of substitution; **SC**, sodium cholate; **SDC**, sodium deoxycholate; **STDC**, sodium taurodeoxycholate; **TM- β -CD**, heptakis (2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD

enantioselective with the toxicity mainly residing in the 1*R*, *cis*-BF enantiomer [17–19]. In fact, regression of the survival rate of *Ceriodaphnia dubia* neonates with the initial pesticide concentration gave median lethal concentration values of 0.079 and 1.342 mg/L for 1*R*, *cis*-BF and 1*S*, *cis*-BF, respectively, suggesting the difference in the measured toxicity that 1*R*, *cis*-BF was probably the only isomer in *cis*-BF causing toxicity to *Ceriodaphnia dubia* [20, 21]. Second, after pesticide application, one of the enantiomers is faster degraded. In the case of BF, the most toxic enantiomer (1*R*, *cis*-BF) is also the most persistent in soil, sediments and water [18, 22, 23]. Taking into account that the insecticide activity is similar for the 1*R* and 1*S* enantiomers of *cis*-BF, the use of the racemic mixture is illogic, so commercial formulations elaborated with the pure enantiomer should be employed making necessary the development of chiral analytical methodologies for quality control.

Separation of the enantiomers of *cis*-BF has been achieved by HPLC [17, 21, 22, 24, 25] and GC [20, 23, 26, 27] showing the interest in the development of chiral methods for the analysis of this insecticide. When using HPLC, different types of chiral columns based on cellulose (Chiralcel OD-H), naphthyl-glycine (Sumichiral OA-2500), and terguride (non-commercial) were tested. In some cases, low analysis times were achieved (12 min) [21], while in others longer analysis times were required to obtain quite good chiral resolutions (18 min, R_s 3.0) [17]. Only in one of the works reported, the developed method was applied to the determination of *cis*-BF in a real sample (soil) using a self-made terguride-based chiral column [24]. GC has been more applied to the determination of the enantiomers of *cis*-BF in real samples. In all the articles published the same type of β -CD based chiral column was employed (BGB 172) by changing the temperature program employed in the separation of this pyrethroid that was achieved in times greater than 56 min. Water [23], soil, sediments [26] and biological samples [20] were analyzed using a previous preconcentration strategy (solid phase microextraction and liquid–liquid extraction with different solvent mixtures) [12, 22, 23] to adequate the insecticide levels to the separation technique.

CE has proven to be a powerful alternative to chromatography to achieve chiral separations due to its simplicity (no chiral columns are needed), low consumption of sample and solvents and applicability to a wide range of compounds using the same instrument and in most cases the same capillary changing only the composition of the BGE [28]. Furthermore, shorter analysis times and higher resolutions can be obtained with CE compared with HPLC or GC. However, in spite of the potential of CE for chiral separations, no references have been found related to the enantiomeric separation of *cis*-BF.

The purpose of this work was the development of a rapid and simple method for the separation of the enantiomers of *cis*-BF by CD-MEKC using neutral CDs and anionic micelles and its application to the quantitation of *cis*-BF in a polyvalent commercial insecticide formulation.

2 Materials and methods

2.1 Reagents and samples

All reagents employed for the preparation of BGEs were of analytical grade. Boric acid and urea were supplied from Fluka (Buchs, Switzerland), bile salts (sodium cholate (SC), sodium deoxycholate (SDC), sodium taurocholate, sodium taurodeoxycholate (STDC)) were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium hydroxide and SDS were from Merck (Darmstadt, Germany) and methanol was purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Water used to prepare all solutions was purified in a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). α -CD, β -CD, methyl- β -CD (degree of substitution (DS), average number of substituents on one CD ring ~ 1.6 –2), heptakis (2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD (TM- β -CD) and sulfated- β -CD (DS ~ 12) were supplied from Fluka. γ -CD, 2-hydroxypropyl- γ -CD (DS $\sim 4.5 \pm 1$), acetyl- γ -CD (DS ~ 7 –8), methyl- γ -CD, acetyl- β -CD (DS ~ 7 –8), 6-monodeoxy-6-monoamino- β -CD (DS ~ 1), carboxymethyl- β -CD (DS ~ 3.5) and carboxymethyl- γ -CD (DS ~ 3.5) were from Cyclolab (Budapest, Hungary). Heptakis (2,6-di-*O*-methyl)- β -CD (DM- β -CD, DS ~ 14 –17) and hydroxypropyl- β -CD (DS ~ 0.6) were from Sigma.

Cis-BF was supplied from Sigma Aldrich as a racemate and this fact was checked in this work by measuring the optical rotation using a 341 Polarimeter (Perkin Elmer, Fremont, CA, USA). The structure of the enantiomers of this pyrethroid is shown in Fig. 1. The commercial polyvalent insecticide formulation was acquired in an agrochemical shop in Alcalá de Henares (Madrid, Spain). A 0.2% (p/v) content of *cis*-BF was indicated on the label of this product.

2.2 Apparatus

A HP^{3D}CE system from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) with a diode array detector was employed for the experiments. Instrument control and data acquisition were performed with the HP^{3D}CE ChemStation software. Separations were performed on an uncoated fused-silica capillary of 50 μ m id (375 μ m od) with a total length of 50 cm (58.5 cm to the detector) purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). UV detection was performed at 210 ± 2 nm. A pH-meter model 744 from Metrohm (Herisau, Switzerland) was used to adjust the pH of the separation buffers. All the solutions were degassed in an ultrasonic bath Ultrasons-H from J.P. Selecta (Barcelona, Spain).

2.3 Procedure

Before first use, the new capillary was rinsed with methanol for 5 min, 1 M NaOH for 30 min, followed by 5 min with water and finally 60 min with the separation buffer at 15°C.

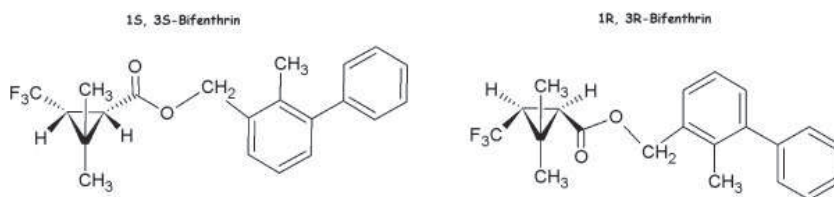


Figure 1. Structure of the two enantiomers of *cis*-BF.

The capillary was rinsed between runs with 4 min water, 2 min 0.1 M NaOH and 4 min BGE. At the end of each day the capillary was rinsed with 5 min water, 5 min 0.1 M NaOH and 5 min water. The capillary ends were maintained all the night submerged in Milli-Q water.

Running buffers were prepared by dissolving the appropriate amount of boric acid in Milli-Q water and adjusting the pH to the desired value with 1 and 0.1 M NaOH. The final volume was adjusted by adding Milli-Q water to get the desired buffer concentration (100 mM). BGEs were prepared by dissolving the appropriate amount of different CDs, surfactants and urea in the running buffer.

Stock standard solutions of *cis*-BF were prepared by dissolving the appropriate amount of the compound in methanol up to a final concentration of 2000 mg/L. To prepare the working solutions, different aliquots were diluted in methanol to obtain concentrations of *cis*-BF between 20 and 300 mg/L of racemate for the calibration by the external standard method. For the optimization of the enantiomeric separation of *cis*-BF a 200 mg/L standard solution was employed. These samples were new prepared every 20 days to avoid the possible degradation of the analyte.

To prepare the commercial formulation for its analysis, an appropriate volume of product was diluted in methanol to obtain a concentration of approximately 200 mg/L considering the labeled amount.

All the solutions were stored at 4°C in the dark and they were filtered with a Nylon 0.45 µm pore size filter from Titan (Eatontown, NJ, USA) before their injection in the CE system.

2.4 Data treatment

The values of areas, migration times and resolution were obtained using the ChemStation software. For data treatment corrected peak areas (A_c) were used to compensate the differences in the electrophoretic conditions of each analyte and to obtain better reproducibility of data [29]. LODs ($3.29 s_a/b$) and LOQs ($10 s_a/b$) for each enantiomer were determined from the calibration curve using the standard error of the intercept (s_a) and the slope (b) [30].

The presence of matrix interferences was investigated by two different methods. The first one consisted in the comparison of the confidence interval of the slopes obtained when using the external standard calibration method and the standard additions calibration method. If the over-

lapping of the confidence intervals of the slopes of both calibration methods was demonstrated, no statistically significant differences between the slopes were obtained; hence the matrix did not produce systematic errors. The second method employed the *t*-test for comparison of two calibration curves. If the *p*-value was up to 0.05 (for a confidence level of 95%) it was considered that there were no significant differences between calibration curves.

Experimental data analysis and composition of graphs were carried out using Excel Microsoft Office 2007, Statgraphics Plus 5.1 and Origin Pro 7.5 software.

3 Results and discussion

3.1 Development of a chiral analytical methodology for *cis*-BF by CD-MEKC

Due to the low solubility in water of pyrethroids in general and of *cis*-BF in particular ($\log P_0 = 7.3$) (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/>), several approaches were employed to try the solubilization of this compound in the BGE employed to achieve its chiral separation before using micelles, that involve a more complex separation mechanism. First, the possibility of using charged CDs was investigated. Three anionic CDs (carboxymethyl- β -CD, carboxymethyl- γ -CD and sulfated β -CD) and a cationic one were tested (6-monodeoxy-6-monoamine- β -CD) using a 15 mM concentration in 100 mM borate buffer (pH 8.0), with a separation voltage of 20 kV, a temperature of 20°C and hydrodynamic injection ($50 \text{ mbar} \times 2 \text{ s}$). However, none of these CDs enabled the solubilization of the analyte, neither alone nor mixed with urea (2 and 5 M). In fact, no peak was observed when injecting the standard solution in the electrophoretic system due to the precipitation of the compound in the capillary. Furthermore, the continuous current cut observed indicated that the obstruction of the capillary happened. Second, the addition of different organic modifiers (methanol, ACN, propan-2-ol and dimethylformamide) in percentages between 10 and 50% instead of urea under the same conditions was also tried. The large volumes of organic modifiers necessary to solve the studied compound derived in instrumental problems as the breakage of the capillary. Finally, the possibility of adding surfactants below but near their CMC was considered. Under these conditions, micelles are not formed and then surfactants are not considered forming a pseudophase but they could help in the solubilization of the analyte due to the

characteristics of surfactants and the premicellar systems present near the CMC. Nevertheless, the results obtained showed that the addition of SDS at concentrations lower than its CMC (8 mM) did not facilitate the solubilization of *cis*-BF in the BGE. As a consequence of these previous results, CD-MEKC was chosen as separation mode to achieve the enantiomeric separation of *cis*-BF.

The first step and probably the most important one in the development of a CD-MEKC methodology is the selection of the most adequate combination of CD and micelles. Taking into account that *cis*-BF is neutral in all the pH range, the use of a pseudophase conferring an electrophoretic mobility to the analyte was necessary. For this reason, several anionic surfactants, both chiral (bile salts: SC, SDC, sodium taurocholate, STDC) and non-chiral (SDS), were tested alone (only bile salts) or in combination with different neutral CDs (acetyl- γ -CD, acetyl- β -CD, 2-hydroxypropyl- γ -CD, DM- β -CD, methyl- γ -CD, methyl- β -CD, hydroxypropyl- β -CD, TM- β -CD, α -CD, β -CD and γ -CD). In all these experiments, the surfactant was at a 50 mM concentration, the CD at a 15 mM concentration and a 100 mM borate buffer (pH 8.0) containing 2 M urea was employed using a separation voltage of 20 kV, a temperature of 15 °C and a 200 mg/L concentration of a racemic *cis*-BF standard solution. The value of 15 °C was chosen in these experiments due to the observed increase in the chiral resolution when decreasing the temperature for many compounds [31]. Also, the use of urea under these conditions was observed to improve the solubilization of *cis*-BF in the BGE and also peaks shape. Only in two cases some chiral discrimination was observed for *cis*-BF: with the mixture SDC/DM- β -CD (R_s 1, analysis time 12.5 min) and with the mixture SC/TM- β -CD (R_s 1.3, 12.0 min). Although according to literature *deoxi* forms of bile salts (SDC and STDC) usually show a better behavior and selectivity with highly hydrophobic solutes [32], this behavior was not observed for *cis*-BF. With respect to SDS, the use of this

surfactant in combination with the CDs studied did not produce any chiral separation. The chiral discrimination observed when using chiral surfactants such as SDC or SC may be justified taking into account the chiral character of bile salts that could interact with the CDs producing a synergic effect enabling the chiral discrimination of *cis*-BF. Taking into account the results obtained, the combination SC/TM- β -CD was chosen and other experimental parameters were optimized to improve the shape of the peaks and the resolution obtained.

It is known that the concentration of the chiral selector affects the affinity of the enantiomers for it [33]. In this work, the influence of the concentration of SC and TM- β -CD was investigated in the range from 25 to 100 mM for SC and from 10 to 20 mM for TM- β -CD. The best results were obtained for concentrations of SC of 50 and 100 mM so only these two SC concentrations are represented in Fig. 2. As this figure shows, for a constant concentration of TM- β -CD the increase in the concentration of SC produced both an increase in the resolution and in the migration times. For a given concentration of SC, an increase in the concentration of TM- β -CD produced an increase in the chiral resolution and a decrease in the migration times. As a compromise between resolution and analysis time, 100 mM SC with 20 mM TM- β -CD were chosen. Under these conditions (100 mM SC with 20 mM TM- β -CD in a 100 mM borate buffer (pH 8.0) with 2 M urea, a temperature of 15 °C and hydrodynamic injection (50 mbar \times 2 s)) the possibility of increasing the voltage of separation to reduce the analysis time was investigated. The influence of the applied voltage was investigated in the range 20–30 kV. Results are shown in Fig. 3A. Although at 30 kV the resolution obtained for the enantiomers of *cis*-BF (R_s 2.8) was worse than for lower separation voltages, 30 kV was chosen to achieve the separation in less time (9.2 min) with an acceptable current intensity (54 μ A).

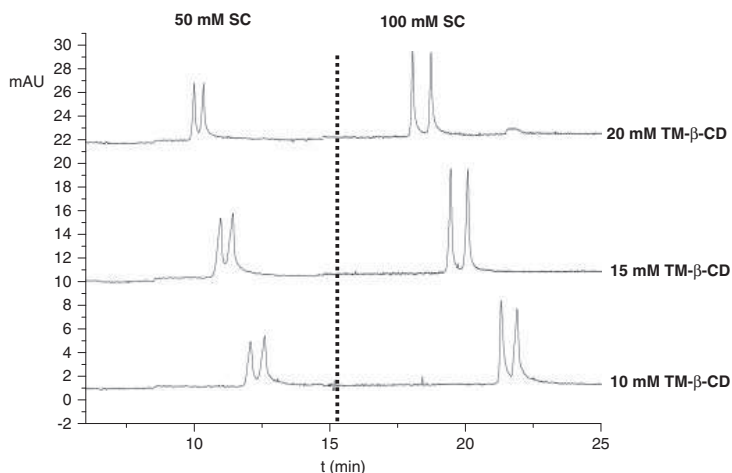


Figure 2. Chiral separation of racemic *cis*-BF (200 mg/L) using different concentrations of SC (50 and 100 mM) and TM- β -CD (10, 15 and 20 mM) in 100 mM borate buffer (pH 8.0) containing 2 M urea. Experimental conditions: uncoated fused-silica capillary 50 μ m id \times 50 cm (58.5 cm to the detector), injection by pressure at 50 mbar \times 2s, applied voltage 20 kV, temperature 15 °C and UV detection at 210 \pm 2 nm.

Using 20 mM of TM- β -CD with 100 mM SC in a 100 mM borate buffer (pH 8.0) containing 2 M urea at 30 kV, the variation of the enantiomeric resolution and the migration times for *cis*-BF enantiomers as a function of the temperature was investigated in the range 15–25°C. The results obtained are shown in Fig. 3B. A clear increase in resolution can be observed when decreasing the temperature. This fact can be attributed to the increase in the stability of chiral selector-analyte complexes when the temperature decreases [31]. As a consequence, 15°C was considered the optimum temperature value. Figure 4A shows the separation of *cis*-BF enantiomers from a standard solution under the optimized conditions in less than 10 min and with a resolution of 2.8.

3.2 Analytical characteristics of the chiral method

In order to apply the chiral methodology developed to the quantitative analysis of *cis*-BF enantiomers in a commercial formulation, the analytical characteristics of the method

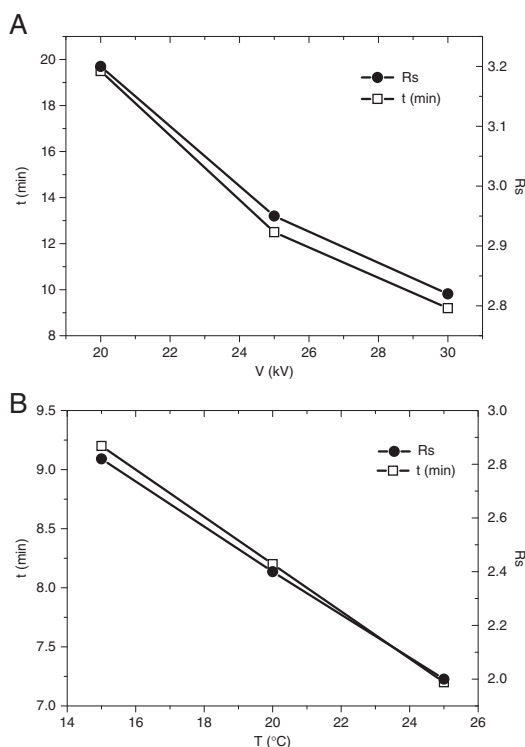


Figure 3. Variation of the enantiomeric resolution and analysis time for *cis*-BF (200 mg/L) as a function of (A) separation voltage and (B) working temperature using 20 mM TM- β -CD with 100 mM SC in 100 mM borate buffer (pH 8.0) with 2 M urea. Other experimental conditions: uncoated fused-silica capillary 50 μ m id \times 50 cm (58.5 cm to the detector), injection by pressure 50 mbar \times 2 s and UV detection 210 \pm 2 nm.

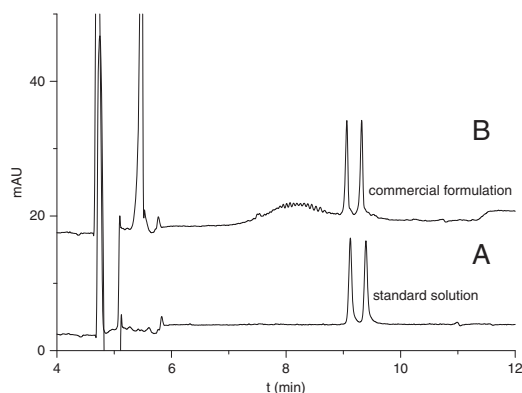


Figure 4. Electropherograms corresponding to the separation of *cis*-BF (A) in a standard solution of 200 mg/L and (B) in a polyvalent commercial insecticide formulation solution with a concentration of approximately 200 mg/L (according to the label of the product) prepared in methanol using 100 mM SC with 20 mM TM- β -CD in 100 mM borate buffer (pH 8.0) with 2 M urea. Experimental conditions: uncoated fused-silica capillary 50 μ m id \times 50 cm (58.5 cm to the detector), injection by pressure 50 mbar \times 2 s, applied voltage 30 kV, temperature 15°C and UV detection 210 \pm 2 nm.

were evaluated in terms of linearity, LODs, LOQs, precision, selectivity and accuracy. The results obtained are grouped in Table 1.

Linearity was determined by plotting the Ac as a function of the *cis*-BF concentration in mg/L. Six standard solutions containing racemic *cis*-BF from 20 to 500 mg/L were prepared individually during three different days and each one injected by triplicate in the CE system. Plotting the values obtained allowed establishing the linear range between 10 and 150 mg/L for each enantiomer (between 20 and 300 mg/L for the racemate). Table 1 presents the linear equation for each enantiomer as well as the standard errors for the intercept (s_a) and the slope (s_b) and the correlation coefficient (r). Moreover, ANOVA confirmed through the p -values (0.8216 and 0.8701 for the first and the second migrating enantiomers, respectively) the data fit to linear models for both enantiomers.

LODs and LOQs for *cis*-BF enantiomers were calculated from the calibration line using the equations described in Section 2. For the first migrating enantiomer a LOD of 4.8 mg/L and a LOQ of 14.6 mg/L were obtained. The corresponding LOD and LOQ values for the second migrating enantiomer were 3.9 and 11.8 mg/L, respectively (see Table 1).

Precision of the method was evaluated as instrumental repeatability and intermediate precision. Instrumental repeatability was determined from six repeated injections of a standard solution of 200 mg/L racemic *cis*-BF. RSD values (%) obtained were lower than 2.2% for corrected peak areas and lower than 0.8% for migration times. Intermediate precision determined by injecting a 200 mg/L solution of racemic *cis*-BF in triplicate during three consecutive days

Table 1. Analytical characteristics of the developed method for the enantiomeric separation and determination of *cis*-BF

Analytical characteristics	First-migrating enantiomer	Second-migrating enantiomer
<i>Precision (RSD)</i>		
Instrumental repeatability ($n = 6$)		
Ac, RSD (%)	2.2	1.9
t , RSD (%)	0.7	0.8
Intermediate precision ($n = 9$)		
Ac, RSD (%)	6.3	3.9
t , RSD (%)	2.0	2.1
<i>Linearity</i>		
Linear range (mg/L)	10–150	10–150
Linear equation	$0.0448x + 0.0437$	$0.0447x + 0.0230$
Standard errors	$s_a = 0.0656$ $s_b = 0.00078$	$s_a = 0.0528$ $s_b = 0.00062$
Correlation coefficient (r)	0.9991	0.9997
$b \pm t \cdot s_b$	0.0448 ± 0.0025	0.0447 ± 0.0020
p -Value of ANOVA	0.8216	0.8701
<i>LOD (mg/L)</i>	4.8	3.9
<i>LOQ (mg/L)</i>	14.6	11.8
<i>Accuracy</i>		
Mean recovery (%)	100 ± 6	98 ± 7
<i>Study of matrix interferences</i>		
p -Value of t -test	0.093	0.113

gave RSD values measured for corrected peak areas and migration times lower than 6.3 and 2.1%, respectively (see Table 1). Intermediate precision was also determined for lower and higher concentrations (50 and 300 mg/L racemate). RSD values lower than 2.7 and 7.0% were obtained for migration times and corrected peak areas for the standard solution of 50 mg/L while for the 300 mg/L standard solution RSD values were about 10.8 and 13.0%, respectively.

The selectivity of the method for the determination of *cis*-BF enantiomers in the commercial sample was demonstrated due to the absence of interferences in the separation of the enantiomers (see Fig. 4B). Also, the slopes of the calibration lines obtained by the external standard and the standard additions methods were compared. The standard additions calibration curve was obtained by spiking the commercial sample (total concentration 150 mg/L) with known concentrations of *cis*-BF (15, 30, 50 and 75 mg/L of each enantiomer) covering a range from 150 to 300 mg/L of racemate. The comparison of the confidence intervals for slopes obtained by this calibration method (0.0397 ± 0.0119 for the first migrating enantiomer and 0.0384 ± 0.0147 for the second migrating enantiomer) and by the external standard calibration method (0.0448 ± 0.0025 for the first migrating enantiomer and 0.0447 ± 0.0020 for the second migrating enantiomer) did not show statistically significant

differences at a confidence level of 95%. Moreover, the results for the p -value obtained by the t -test were over 0.05, also showing that there were not statistically significant differences between the slopes obtained by the two calibration methods. These results demonstrated the absence of matrix interferences, enabling the use of the external standard calibration method to achieve the quantitation of *cis*-BF enantiomers in the commercial formulation.

Accuracy of the method was evaluated as the recovery (%) obtained for *cis*-BF enantiomers when a commercial formulation solution (75 mg/L for each enantiomer) was spiked with known concentrations (15, 30, 50 and 75 mg/L) of each *cis*-BF enantiomer. Mean recovery values obtained for *cis*-BF in the commercial formulation analyzed were 100 ± 6 for the first migrating enantiomer and 98 ± 7 for the second migrating enantiomer.

3.3 Quantitative determination of *cis*-BF enantiomers in a polyvalent commercial insecticide formulation

The chiral developed method was applied to the analysis of a polyvalent commercial insecticide formulation by injecting a diluted sample of this product containing *cis*-BF at a concentration of approximately 200 mg/L (Fig. 4B).

The average concentration of *cis*-BF enantiomers determined in the insecticide formulation analyzed together with their confidence intervals at a 95% confidence level ($n = 3$) were 1060 ± 39 and 1017 ± 49 mg/L for the first and the second migrating enantiomers, respectively. There were not statistically significant differences between the concentrations determined for the two enantiomers according to the use of a racemic mixture in the commercial formulation. In addition, statistically significant differences were not observed between the total concentration determined (2077 ± 89 mg/L and the labeled content (2000 mg/L).

4 Concluding remarks

The first CE methodology enabling the enantiomeric separation of *cis*-BF has been developed in this work. CD-MEKC using 100 mM SC as surfactant in combination with 20 mM TM- β -CD in a 100 mM borate buffer (pH 8.0) with 2 M urea, with a separation voltage of 30 kV and a temperature of 15°C enabled the separation of *cis*-BF enantiomers in an analysis time of 9.2 min and with a resolution of 2.8. Analytical characteristics of the method were evaluated and considered adequate to achieve the quantitation of *cis*-BF enantiomers in a polyvalent commercial insecticide formulation. The proposed methodology is a simple, rapid and non-expensive methodology with a high potential to be applied in a near future to control the quality of formulations elaborated as pure enantiomers that should be employed in order to decrease the toxicity and persistence of commercial insecticide formulations. However, this

application would require the isolation of pure enantiomers in order to establish their migration order and testing of enantiomeric impurity detecting capability.

Authors thank the Ministry of Education and Science and the Ministry of Science and Innovation (Spain) and the Comunidad Autónoma of Madrid (Spain) for financial support (projects CTQ2006-03849/BQU, CTQ2009-09022/BQU and S-0505/AGR-0312, respectively). V.P. thanks the University of Alcalá for her research grant.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Hernandez-Borges, J., García-Montelongo, F. J., Rodríguez-Delgado, M. A., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 3799–3813.
- [2] Eljarrat, E., Guerra, P., Barceló, D., *Trends Anal. Chem.* 2008, 27, 847–861.
- [3] Aboul-Enein, H. Y., Ali, I., *Toxicol. Environ. Chem.* 86, 2004, 1–22.
- [4] Kurihara, N., Miyamoto, J., *Chirality in Agrochemicals*, Wiley, Chichester 1998.
- [5] Ali, I., Aboul-Enein, H. Y., *Chiral Pollutants*, Wiley, Chichester 2004.
- [6] Buser, H. R., Muller, M. D., Rappe, C., *Environ. Sci. Technol.* 1992, 26, 1533–1540.
- [7] Hegeman, W. J. M., Laane, R. W. P. M., *Environ. Contam. Toxicol.* 2002, 173, 85116.
- [8] Garrison, A. W., Schmitt, P., Martens, D., Kettrup, A., *Environ. Sci. Technol.* 1996, 30, 2249–2255.
- [9] ÓMahony, T., Moore, S., Brosnan, B., Glennon, J. D., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 2003, 83, 681–691.
- [10] Hill, I. R., *Pestic. Sci.* 1989, 27, 429–465.
- [11] Mekrebi, A., Crane, D. B., Blondina, G. J., Oros, D. R., Rocca, J. L., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2008, 80, 455–460.
- [12] Liu, W. P., Gan, J. J., *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 755–761.
- [13] Qin, S., Liu, W., Gan, J., Chiral selectivity in the environmental fate of pyrethroids, in synthetic pyrethroids: occurrence and behaviour in aquatic environments, ACS Symposium Series, Washington 2008, pp. 238–253.
- [14] George, N., Kalyanasundaram, M., *J. Sci. Ind. Res.* 1994, 53, 933–945.
- [15] Ware, G. W., Whitacre, D. M., *An Introduction to Insecticides*, MeisterPro Information Resources, Ohio 2004.
- [16] Alzogaray, R. A., Picollo, M. I., Zerba, E. N., *Insect Biochem. Physiol.* 1998, 37, 225–230.
- [17] Liu, T. L., Wang, Y. S., Yen, J. H., *J. Food Drug Anal.* 2005, 13, 357–360.
- [18] Mueller-Beilschmidt, D., *J. Pest. Reform.* 1990, 10, 32–38.
- [19] Mokry, L. E., Hoagland, K. D., *Environ. Toxicol. Chem.* 1990, 9, 1045–1051.
- [20] Liu, W., Gan, J., Lee, S., Werner, I., *Environ. Toxicol. Chem.* 2005, 24, 1861–1866.
- [21] Liu, W., Gan, J. J., Qin, S., *Chirality* 2005, 17, S127–S133.
- [22] Liu, W., Gan, J., Schlenk, D., Jury, W. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 701–706.
- [23] Liu, W., Gan, J. J., *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 736–741.
- [24] Dondi, M., Fliieger, M., Olsovska, J., Polcaro, C. M., Sinibaldi, M., *J. Chromatogr. A* 1999, 859, 133–142.
- [25] Girelli, A. M., Messina, A., Sinibaldi, M., *Ann. Chim.* 2001, 92, 417–424.
- [26] Qin, S., Budd, R., Bondarenko, S., Liu, W., Gan, J., *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 5040–5045.
- [27] Liu, W., Qin, S., Gan, J., *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 3814–3820.
- [28] Van Eeckhaut, A., Michotte, Y., *Electrophoresis* 2006, 27, 2376–2385.
- [29] Schaeper, J. P., Sepaniak, M. J., *Electrophoresis* 2000, 21, 1421–1429.
- [30] Q2: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. Published in the Federal Register 62, 1997, pp. 27463–27467.
- [31] Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, Chichester 1997.
- [32] Crego, A. L., García, M. A., Marina, M. L., *J. Microcol.* 1999, 12, 33–40.
- [33] Marina, M. L., Ríos, A., Valcárcel, M., *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, in *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 45, Elsevier, Amsterdam 2005.

Artículo Científico 4

“Chiral separation of metalaxyl and benalaxyl fungicides by electrokinetic chromatography and determination of enantiomeric impurities”

V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina

Journal of Chromatography A 1218 (2011) 4877-4885



Chiral separation of metalaxyl and benalaxyl fungicides by electrokinetic chromatography and determination of enantiomeric impurities

Virginia Pérez-Fernández, María Ángeles García, María Luisa Marina*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Alcalá, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 5 January 2011

Keywords:

Benalaxyl
EKC
Chiral separation
Commercial formulations
Enantiomeric impurity
Metalaxyl
Folpet

ABSTRACT

The enantiomers of two acylamine fungicides (metalaxyl and benalaxyl) were separated by EKC using CDs as chiral selectors. The use of 15 mM succinyl- γ -CD for metalaxyl and 5 mM succinyl- β -CD for benalaxyl dissolved in a 50 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid buffer (pH 6.5), enabled the chiral separation of metalaxyl enantiomers in 11.5 min with a resolution of 3.1 and the enantiomeric separation of benalaxyl in 7.5 min with a resolution close to 15. Under these conditions, the two enantiomers of each of the chiral compound studied were also separated from folpet, very commonly present in fungicide formulations containing metalaxyl or benalaxyl. The analytical characteristics of the two developed methods were studied in terms of precision, linearity, selectivity, limits of detection (LODs) and limits of quantitation (LOQs) showing their suitability for the determination of these compounds in commercial agrochemical formulations. Finally, the development of an in-capillary preconcentration strategy allowed the detection of enantiomeric impurities up to 1.2% in commercial products labeled as enantiomerically pure in metalaxyl-M.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The research around pesticides is a growing area in the field of analytical chemistry perhaps due to the fact that every year new pesticides are synthesized in order to achieve more effective products with a minor application rate [1]. In this sense, chirality plays an important role because it may have a great influence on the effectiveness and toxicity of the pesticide. Furthermore, when chirality is not considered and racemic compounds are employed, the use of these products may suppose the emission of a 50–75% of unnecessary product [2]. Approximately a 25% of the existing agrochemicals are chiral [3]. In some cases all the pesticide activity resides only in one of the enantiomers being the rest of them partially or totally inactive [4]. In addition, the biological response against non-target

organisms may also differ a lot. Sometimes the enantiomers have similar biological activity, others one of the enantiomers produces a completely different biological response being for example much more toxic, causing malformations or having a carcinogenic effect [5,6]. This is why in order to contribute to risk reduction some of the new pesticides are formulated to contain mainly the active enantiomeric form. The use of enantiopure pesticides in place of racemic products not only supposes lower application rates but also reduces the amounts of pesticides released into the environment, prevents deployment of an inactive isomer to the biosphere, and thus reduces potential side-effects on non-target organisms [7].

From all the pesticides employed annually in Spain, approximately a 28% of them correspond to fungicide group [8]. Although the number of different fungicide types is huge, the major information about the role that chirality plays in their properties is focused in conazole and amide group.

Metalaxyl [(R,S) methyl-N-(2-methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-DL-alaninate] (see Fig. 1a) is an acylamine fungicides (included into the amide group), being the most widely known member of this group [9]. This fungicide, synthesized in 1977, is widely used to control plant diseases caused by pathogens of the *Oomycota* division, in particular, against *Phytophthora infestans* and *Phytophthora ultimum* [10]. Metalaxyl possesses two enantiomers with the same mode of action, that is, both possess fungicidal activity [11]. However, it has been proved that this activity mostly originates from the R-enantiomer [12] being this one almost 1000 times more effective than the S-enantiomer [13]. Its toxicity against non-target organisms has been demonstrated to be enantioselective. Acute

Abbreviations: BGE, background electrolyte; Ac, corrected peak area; CE- β -CD, carboxyethyl- β -cyclodextrin; CE- γ -CD, carboxyethyl- γ -cyclodextrin; CM- β -CD, carboxymethyl- β -cyclodextrin; CM- γ -CD, carboxymethyl- γ -cyclodextrin; CD, cyclodextrin; DAD, diode array detector; EKC, electrokinetic chromatography; EOF, electroosmotic flow; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantitation; LC50, median lethal concentration; MEKC, micellar electrokinetic chromatography; MES, 2-morpholinoethanesulfonic acid; RLOD, relative limit of detection; SDS, sodium dodecyl sulphate; succ- β -CD, succinyl- β -cyclodextrin; succ- γ -CD, succinyl- γ -cyclodextrin.

* Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares (Madrid), Spain. Tel.: +34 91 8854935; fax: +34 91 8854971.

E-mail address: mluisa.marina@uah.es (M.L. Marina).

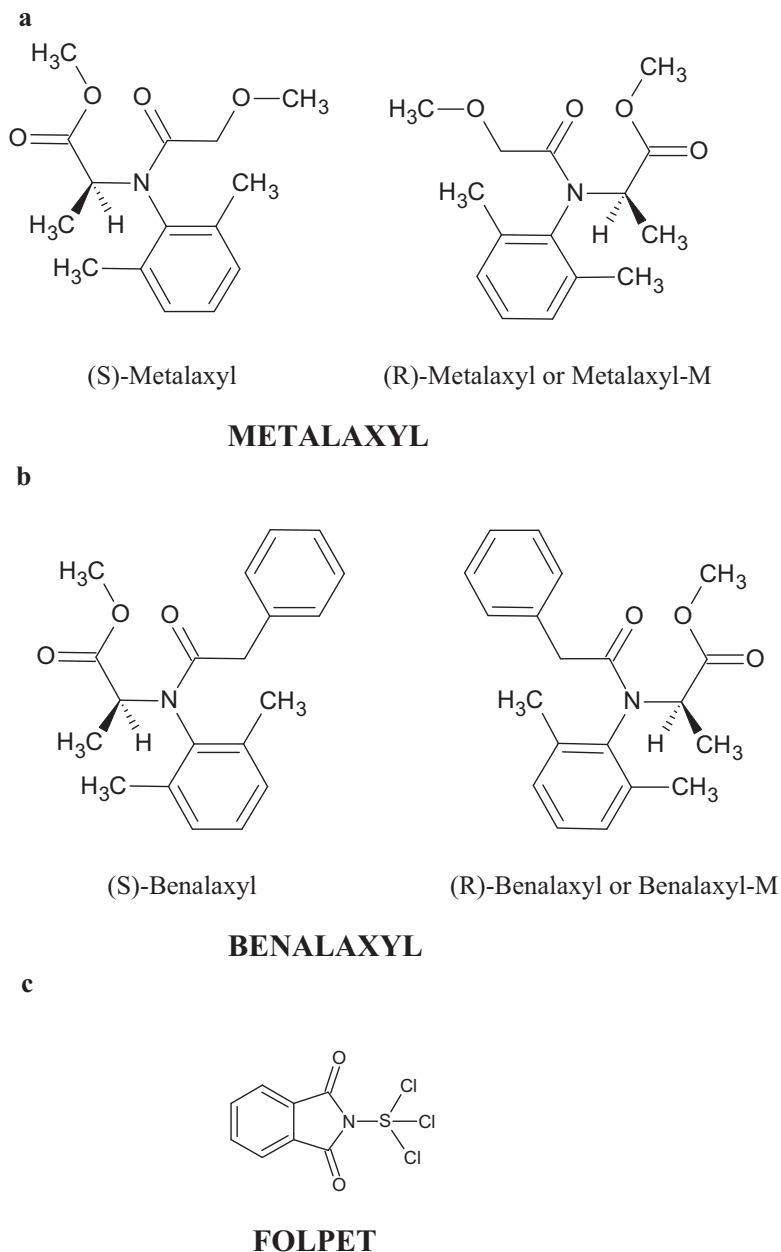


Fig. 1. Structure of the two enantiomers of (a) metalaxyl, (b) benalaxyl and structure of (c) folpet.

toxicities of racemic metalaxyl and R-metalaxyl to *Daphnia magna* were determined and compared by Chen and Liu [14]. The median lethal concentration (LC50) values for racemic and R-metalaxyl to *Daphnia magna* showed the clear difference in the toxicity of the two enantiomers against this organism. The degradation of metalaxyl enantiomers in environment is also clearly enantioselective. Once in environment enantiomeric relations usually change, due to the microbial degradation observed in most samples. In this situation, for example in soils R-enantiomer of metalaxyl uses to show a faster degradation [9,15–17] but this behavior might change with

the conditions of the soil analyzed (i.e. soil pH) [18]. In vegetable samples the behavior is just the opposite than in soil and the S-enantiomer showed a faster degradation [9]. The same degradation pattern has also been studied through the formation of the corresponding metabolite during the process. The acid metabolite is the main breakdown product, both for metalaxyl and metalaxyl-M [19]. In sunflower plants metalaxyl was converted into its acid metabolite with retention of configuration; in fact metalaxyl-M was converted only into an R-acid metabolite without inversion of configuration, so the formation of this metabolite can also be a

way of monitoring the enantioselective degradation of metalaxyl [13]. Finally, in rabbit tissues such as liver, plasma and kidneys a more rapid degradation of S-metalaxyl has also been observed [20].

Benalaxyl [methyl-N-phenylacetyl-N-2,6-xylyl alaninate] (see Fig. 1b) is a systemic fungicide belonging to the acylamine family, with protective, curative and eradicant action [21]. It was first time synthesized in 1981 with the aim of controlling *Oomycetes*, particularly fungi of the family *Peronosporaceae* [22]. Benalaxyl has one chiral center in the alkyl moiety and so it has two different enantiomers that have shown very different fungicidal, biological and degradation patterns. In fact, it is known that as for metalaxyl, the fungicidal activity is mainly residing in the R enantiomer, being the S one almost inactive [23]. The degradation of racemic benalaxyl in water, soils, and different plants is enantioselective. In this context, S-benalaxyl showed a faster degradation in plants such as tomato, tobacco, sugar beet and capsicum plants [24], while the R-benalaxyl showed a faster degradation in soils [24,25]. Finally, for earthworm in paper contact test, after 48 h of exposure, the calculated LC50 values of the R-form and S-form were 4.99 and 6.66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectively, demonstrating the clear differences in the toxicity of the two enantiomers against this non-target organism [26].

Usually, these two chiral fungicides are used in combination with protectant type fungicides such as copper or folpet [27]. Folpet [N-(trichloromethylthio)phthalimide] (see Fig. 1c) is a non-chiral compound relative to dicarboximide fungicide group.

The presence of these pesticides in foods is regulated. Thus, the maximum residual levels (MRLs) [28] are between 0.05 and 10 mg/kg for metalaxyl (being 0.05 mg/kg for grain cereals, asparagus, pea, potato, beet, sunflower seeds, soya and carrot and 10 mg/kg for hop and hot pepper), between 0.02 mg/kg (potatoes) and 0.5 mg/kg (hot pepper and tomato) for benalaxyl, and 0.1 mg/kg for potatoes and 50 mg/kg for lettuce for folpet.

Although different separation techniques have been employed for the chiral separation of metalaxyl and benalaxyl, only two works have been published by CE, both referred to the chiral separation of metalaxyl fungicide [16,29]. In the case of benalaxyl, to our knowledge, no chiral separation has been performed employing this separation technique. In the methods developed for metalaxyl by CE, UV detection was employed and cyclodextrins (CDs) were employed as chiral selectors according to the high discrimination power of these compounds to achieve enantiomeric separations [30–34]. Thus, Jarman et al. [16] achieved the chiral separation of metalaxyl enantiomers by micellar electrokinetic chromatography (MEKC) employing sodium dodecyl sulphate (SDS) as surfactant and 40 mM γ -CD as chiral selector. However, baseline separation was not achieved for this fungicide under the selected conditions. Santilio and Dommarco [29] employed electrokinetic chromatography (EKC) for the same purpose with succinyl- β -cyclodextrin (succ- β -CD) as chiral selector allowing the enantiomeric separation of metalaxyl in approximately 19 min with a resolution of 1.68.

The purpose of this work was the development of chiral methods suitable for the determination of metalaxyl and benalaxyl enantiomers in commercial samples and enabling the determination of the selected fungicides in binary mixtures with folpet, another fungicide very common in commercial formulations containing metalaxyl or benalaxyl. Finally, an in-capillary preconcentration strategy will be developed to detect minor enantiomeric impurities in commercial agrochemical formulations labeled as enantiomerically pure in metalaxyl-M.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and samples

All reagents employed for the preparation of background electrolytes (BGEs) and samples were of analytical grade. Boric

acid and urea were supplied from Fluka (Buchs, Switzerland), sodium hydroxide and 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) from Merck (Darmstadt, Germany) and methanol was purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Water used to prepare all solutions was purified in a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). Carboxymethyl- β -CD (CM- β -CD, degree of substitution (DS), average number of substituents on one CD ring ~ 3) and sulfated- β -CD (DS ~ 12) were supplied from Fluka. Carboxymethyl- γ -CD (CM- γ -CD), carboxyethyl- γ -CD (CE- γ -CD), carboxyethyl- β -CD (CE- β -CD, DS ~ 3), succinyl- γ -CD (succ- γ -CD), succinyl- β -CD (succ- β -CD, DS ~ 3.5) and sulfated- γ -CD were from Cyclolab (Budapest, Hungary).

Standards of racemic metalaxyl, metalaxyl-M, racemic benalaxyl, benalaxyl-M and folpet were supplied from Sigma (St. Louis, MO, USA). The structure of the enantiomers of metalaxyl and benalaxyl and the structure of folpet are shown in Fig. 1. The commercial fungicide formulations were acquired in agrochemical shops in Fuenlabrada (Madrid, Spain) and Haro (La Rioja, Spain). Three commercial formulations were analyzed containing only metalaxyl-M, metalaxyl-M with folpet and racemic benalaxyl with folpet. According to the labeled data, sample 1 (liquid) contains 465 mg/L of metalaxyl-M, sample 2 (solid) contains 4.8% of metalaxyl-M and 40% of folpet and sample 3 (solid) contains 8% of racemic benalaxyl and 50% of folpet.

2.2. Apparatus

A HP^{3D}CE system from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) with a diode array detector (DAD) was employed for the experiments. Instrument control and data acquisition were performed with the HP^{3D}CE ChemStation software. Separations were performed in an uncoated fused-silica capillary of 50 μm i.d. (375 μm o.d.) with a total length of 58.5 cm (to the detector) purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). UV detection was performed at 210 ± 2 nm. A pH-meter model 744 from Metrohm (Herisau, Switzerland) was used to adjust the pH of the separation buffers. All the solutions were degassed in an ultrasonic bath Ultrasons-H from J.P. Selecta (Barcelona, Spain).

2.3. Procedure

Before first use, the new capillary was rinsed with methanol for 5 min, 1 M NaOH for 30 min, followed by 5 min with water and finally 60 min with the separation buffer at 15 °C. After each run the capillary was rinsed with 0.1 M NaOH for 2 min and with BGE for 5 min in order to maintain an adequate repeatability between injections.

Running buffers were prepared by dissolving the appropriate amount of boric acid or MES in Milli-Q water and adjusting the pH to the desired value with 1 M and 0.1 M NaOH. The final volume was adjusted by adding Milli-Q water to get the desired buffer concentration. BGEs were prepared by dissolving the appropriate amount of different CDs, and urea in the running buffer.

Stock standard solutions of racemic metalaxyl, metalaxyl-M, racemic benalaxyl, benalaxyl-M and folpet were prepared by dissolving the appropriate amount of the compound in methanol up to a final concentration of 2000 mg/L. To prepare the working solutions, different aliquots were diluted in methanol to obtain concentrations of metalaxyl, benalaxyl and folpet between 20 and 400 mg/L (this concentration is referred to racemic mixture in the case of metalaxyl and benalaxyl) for the calibration by the external standard method. When the standard addition calibration method was employed, different amounts of standard solutions of metalaxyl, benalaxyl and folpet were added to a commercial sample of known concentration. For the optimization of the enantiomeric

separation of metalaxyl and benalaxyl enantiomers a 200 mg/L standard solution was employed. For the determination of enantiomeric impurity of metalaxyl, working solutions were prepared by diluting the appropriate amount of stock standard solution in a mixture BGE:H₂O 50:50 (v/v).

To prepare the commercial formulations for their analysis, different procedures were followed depending on the physic state of the sample. For solid samples (samples 2 and 3) the appropriate amount of formulation was weighed (to obtain a solution of approximately 2000 mg/L of chiral amide fungicide), dissolved in methanol, and sonicated during 15 min. To prepare the liquid sample (sample 1) an appropriate volume of product was diluted in methanol to obtain a concentration of approximately 4000 mg/L of active ingredient (metalaxyl-M). Working solutions were prepared by diluting these samples in methanol or BGE:H₂O 50:50 (v/v) to obtain a concentration of approximately 200 mg/L of racemic benalaxyl or 100 mg/L of metalaxyl-M.

All the solutions were stored at 4 °C in the dark and they were filtered with a Nylon 0.45 μm pore size filter from Titan (Eatontown, NJ, USA) before their injection in the CE system.

2.4. Data treatment

The values of areas, migration times and resolution were obtained using the ChemStation software. For data treatment corrected peak areas (*A_c*) were used to compensate the differences in the electrophoretic conditions of each analyte and to obtain better reproducibility of data [35]. Limits of detection (LODs) ($3.3 S_b/b$) and limits of quantitation (LOQs) ($10 S_b/b$) for each enantiomer or compound were determined from the calibration line using the standard error of the intercept (*S_a*) and the slope (*b*) [36]. The values achieved were experimentally checked using the S/N ratio equal to 3 and 10 for LODs and LOQs respectively.

Relative limit of detection (RLOD) is defined as the minimum amount of impurity that can be detected as a function of the amount of main enantiomer and it was determined employing the following expression [37]:

$$RLOD = \frac{LOD_{\text{Impurity}}}{C_{\text{Main Enantiomer}}} \times 100$$

where LOD_{Impurity} is the limit of detection for the minor enantiomer (impurity) and $C_{\text{Main Enantiomer}}$ corresponds to the concentration of the major compound or main enantiomer.

The presence of matrix interferences was investigated by two different methods. The first one consisted in the comparison of the confidence interval of the slopes obtained when using the external standard calibration method and the standard additions calibration method. If the overlapping of the confidence intervals of the slopes of both calibration methods was demonstrated, no statistically significant differences between the slopes were obtained; hence the matrix did not produce systematic errors. The second method employed the *t*-test for comparison of two calibration lines. If the *p*-value was up to 0.05 (for a confidence level of 95%) it was considered that there were no significant differences between calibration lines.

Finally, the percentage of enantiomeric impurity in commercial formulations was determined as the area of the peak of the impurity *A_c* divided by the total area ($(A_{\text{C}_{\text{impurity}}}/A_{\text{C}_{\text{impurity}} + A_{\text{C}_{\text{major peak}}}) \times 100$).

Experimental data analysis and composition of graphs were carried out using Excel Microsoft Office 2007, Statgraphics Plus 5.1 and Origin 6.0 software.

3. Results and discussion

3.1. Development of an analytical methodology for the chiral separation of metalaxyl and benalaxyl by EKC

The most critical step in the development of a chiral methodology enabling the separation of the enantiomers of a compound is the appropriate selection of the chiral selector. Due to the fact that metalaxyl and benalaxyl are neutral compounds, several charged CDs were tested at a 15 mM concentration. A screening of eight anionic CDs (CM-β-CD, CM-γ-CD, succ-β-CD, succ-γ-CD, sulfated-β-CD, sulfated-γ-CD, CE-β-CD, CE-γ-CD) was carried out to explore the chiral discrimination against the selected fungicides metalaxyl and benalaxyl. In addition, each CD was tested using two different separation buffers (50 mM borate buffer (pH 8.5) and 50 mM MES buffer (pH 6.5)) to prove the influence of buffer nature. The low solubility of pesticides in general in aqueous media and the previous experience of the research group have demonstrated the convenience of adding urea to the BGE in order to improve the shape of the peaks, the solubility on the media and the resolution achieved. For these reasons, a 2 M concentration of urea was added to the separation buffer. All experiments were performed employing a working temperature of 15 °C, with a separation voltage of 30 kV and a hydrodynamic injection (50 mbar × 4 s). The value of 15 °C was chosen because it is known that at low temperatures the interactions selector–selectand are quite more stable and better resolutions can be obtained [38]. On the other hand, a 30 kV separation voltage was applied in order to reduce the analysis times as much as possible.

Table 1 groups all the experiments performed and the chiral resolution achieved in each case. As it can be observed, among the two separation buffers tested 50 mM MES buffer (pH 6.5) produced the chiral discrimination of both compounds in most cases. No baseline separation was obtained for benalaxyl with borate buffer. This fact may occur because MES buffer allows a better solubilization of the compounds analyzed in the BGE, achieving also a better peak shape under all the experimental conditions proved. For this reason, a 50 mM MES buffer (pH 6.5) was chosen as the most adequate buffer to perform the enantiomeric separation of these two fungicides. Furthermore, in spite of the similar structures of the two compounds analyzed, metalaxyl and benalaxyl (see Fig. 1), the enantioseparation power of the CDs was very different and those CDs that enabled the chiral separation of metalaxyl did not work properly with benalaxyl and vice versa.

For metalaxyl, when using MES buffer, only two CDs offered an enantiomeric resolution higher than baseline separation,

Table 1
Enantiomeric resolution (*R_s*) for metalaxyl and benalaxyl enantiomers under the different experimental conditions employed.

CD	Separation buffer	Metalaxyl (<i>R_s</i>)	Benalaxyl (<i>R_s</i>)
CM-β-CD	50 mM MES (pH 6.5)	–	5.82
	50 mM borate (pH 8.5)	1.45	–
CM-γ-CD	50 mM MES (pH 6.5)	0.68	3.80
	50 mM borate (pH 8.5)	–	–
Succ-β-CD	50 mM MES (pH 6.5)	–	12.80
	50 mM borate (pH 8.5)	1.45	–
Succ-γ-CD	50 mM MES (pH 6.5)	3.10	–
	50 mM borate (pH 8.5)	–	0.55
Sulfated β-CD	50 mM MES (pH 6.5)	–	–
	50 mM borate (pH 8.5)	0.40	–
Sulfated γ-CD	50 mM MES (pH 6.5)	10.10	–
	50 mM borate (pH 8.5)	–	–
CE-β-CD	50 mM MES (pH 6.5)	0.96	–
	50 mM borate (pH 8.5)	–	–
CE-γ-CD	50 mM MES (pH 6.5)	0.58	–
	50 mM borate (pH 8.5)	–	–

succ- γ -CD and sulfated- γ -CD. However, due to the marked anionic character of sulfated- γ -CD, the mobility of this CD against the direction of the electroosmotic flow (EOF) was very high and resulted in higher analysis times than those obtained for succ- γ -CD. Benalaxyl was enantiomerically separated when employing CM- β -CD, CM- γ -CD and succ- β -CD dissolved in MES buffer. Although every CD allowed the chiral separation of benalaxyl enantiomers with resolutions higher than baseline (between 3.8 and 12.8), succ- β -CD was chosen to obtain the chiral separation of the enantiomers of benalaxyl due to the fact that the chiral resolution achieved was higher than that for the other two CDs in approximately the same analysis times. Finally, the possibility of combining the selected CDs was studied in order to obtain the simultaneous separation of metalaxyl and benalaxyl. As positive results were not obtained, it was decided to employ different experimental conditions for each fungicide taking also into account that these two compounds are not simultaneously used in any commercial formulation. In short, succ- γ -CD and succ- β -CD were selected as the most adequate CDs for the chiral separation of metalaxyl (R_s 3.1, ~11.5 min) and benalaxyl (R_s 12.8, ~18 min) respectively.

The different behavior observed for the different CDs with respect to the two compounds studied are in agreement with previous results showing that a slight change in the structure of the analyte can result in a large difference in the interaction with the CD proving the difficulty to predict and explain the success of separation from structural considerations. In fact, CDs can change their shape to interact with analytes because they possess a flexible structure [39] yielding more than one mode of interaction with the analytes.

Once chosen the most suitable CD for the enantiomeric separation of each fungicide, an optimization of the EKC methodology was carried out. First, the influence of the injection employed for the sample introduction into the capillary was studied. As the two analytes are neutral a hydrodynamic injection by pressure was employed for this purpose. Several pressure values (25 or 50 mbar) and injection times (1–4 s) were tested in order to select the injection that offered the best peak shape. Injections involving the highest sample amount (50 mbar \times 4 s, 50 mbar \times 3 s) gave peaks with a slight distortion. For this reason a hydrodynamic pressure injection of 25 mbar \times 3 s was selected as the most appropriate.

The concentration of the chiral selector is one of the factors that has more influence on the enantiomeric resolution obtained for a known compound. However, it is not possible to predict which CD concentration will provide the best enantiomeric separation for a known compound [40] and it is necessary to try experimentally several concentrations in order to find the most appropriate. In this work, the influence of the concentration of the two selected CDs was studied in the range from 1 to 25 mM. Fig. 2 shows the variation of the enantiomeric resolution and analysis times for metalaxyl (Fig. 2a) and benalaxyl (Fig. 2b) as a function of CD concentration chosen for each fungicide. For metalaxyl (Fig. 2a) the resolution achieved increases rapidly when the concentration of succ- γ -CD goes from 1 mM to 10 mM. However, higher concentrations of succ- γ -CD resulted in a chiral resolution almost constant. Nevertheless, the analysis times obtained when using 15 mM succ- γ -CD are lower than those obtained for 10 mM and the shape of the peaks was better perhaps because a major concentration of CD allowed a better solubilization of the corresponding compound. Thus, 15 mM succ- γ -CD was chosen as the most appropriate concentration for the enantiomeric separation of metalaxyl. For benalaxyl (Fig. 2b) there is a clear maximum in the enantiomeric resolution reached when changing the concentration of succ- β -CD from 1 to 25 mM. This concentration corresponds to 5 mM succ- β -CD and the analysis times at this concentration are short enough to select this value as the optimum one.

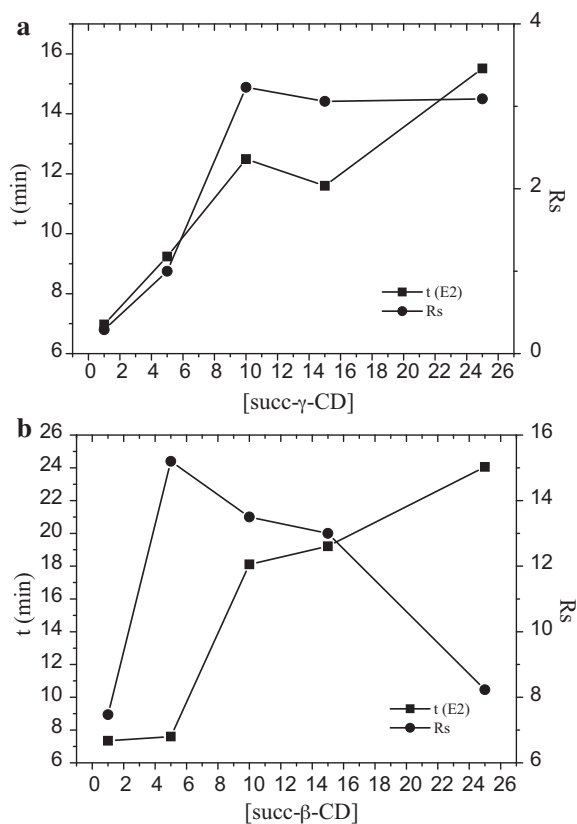


Fig. 2. Variation of the enantiomeric resolution and analysis time for (a) metalaxyl as a function of the concentration of succ- γ -CD and (b) benalaxyl as a function of the succ- β -CD concentration. Experimental conditions: BGE: CD dissolved in 50 mM MES buffer (pH 6.5) with 2 M urea; uncoated fused-silica capillary 50 μ m i.d. \times 50 cm (58.5 cm t.l.); injection by pressure at 25 mbar \times 3 s; applied voltage: 30 kV; temperature: 15 $^{\circ}$ C; λ : 210 \pm 2 nm; [metalaxyl]: 200 mg/L dissolved in methanol; [benalaxyl]: 200 mg/L dissolved in methanol.

As it has been mentioned in Section 1, it is very common to find metalaxyl or benalaxyl mixed with other fungicides able to complement their activity. Folpet is one of these fungicides so it is very important the developed chiral methods to determine not only the enantiomers of metalaxyl or benalaxyl but also folpet in the commercial products analyzed. For this reason each chiral method developed was applied to the separation of binary samples containing metalaxyl or benalaxyl and folpet. Fig. 3a shows the electropherogram obtained for a standard solution containing 200 mg/L of racemic metalaxyl and 200 mg/L of folpet dissolved in methanol under the experimental conditions chosen as optimal for the chiral separation of metalaxyl enantiomers (BGE: 15 mM succ- γ -CD dissolved in 50 mM MES buffer (pH 6.5) with 2 M urea; uncoated fused-silica capillary: 50 μ m i.d. \times 50 cm (58.5 cm t.l.); injection by pressure: 25 mbar \times 3 s; applied voltage: 30 kV; temperature: 15 $^{\circ}$ C; λ : 210 \pm 2 nm). The total separation was achieved in 12.5 min with a chiral resolution of 3.1 for the two enantiomers of metalaxyl. Fig. 4a shows the electropherogram obtained for a standard solution containing 200 mg/L of racemic benalaxyl and 200 mg/L of folpet dissolved in methanol under the experimental conditions chosen as the most appropriate for the enantiomeric separation of benalaxyl enantiomers (BGE: 5 mM succ- β -CD dissolved in 50 mM MES buffer (pH 6.5) with 2 M urea; uncoated fused-silica capillary: 50 μ m i.d. \times 50 cm (58.5 cm t.l.); injection

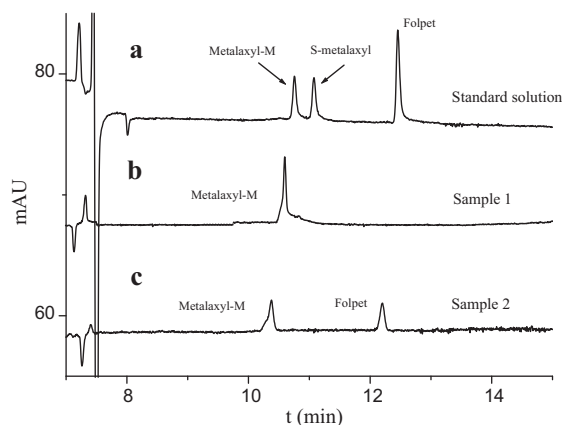


Fig. 3. Electropherograms corresponding to the separation of metalaxyl enantiomers and folpet (a) in a standard solution containing 200 mg/L of racemic metalaxyl and 200 mg/L of folpet, (b) in a commercial fungicide formulations containing metalaxyl-M (approximately 100 mg/L) alone (sample 1) and (c) in a commercial fungicide formulation containing metalaxyl-M (approximately 100 mg/L) combined with folpet (sample 2). Experimental conditions: 15 mM succ- γ -CD in 50 mM MES buffer (pH 6.5) with 2 M urea. Other experimental conditions as in Fig. 2.

by pressure: 25 mbar \times 3 s; applied voltage: 30 kV; temperature: 15 °C; λ : 210 \pm 2 nm). The separation of the two enantiomers of benalaxyl and folpet was achieved in 10.5 min and with a chiral resolution of 14.6 for the enantiomers of benalaxyl.

3.2. Quantitative analysis of metalaxyl enantiomers, benalaxyl enantiomers and folpet in commercial agrochemical formulations

Before carrying out the quantitative determination of metalaxyl, benalaxyl and folpet in commercial fungicide products, the analytical characteristics of the corresponding methods were evaluated in terms of linearity, LODs, LOQs, precision, selectivity and accuracy. The results obtained are grouped in Table 2 for the method developed for metalaxyl–folpet mixtures and

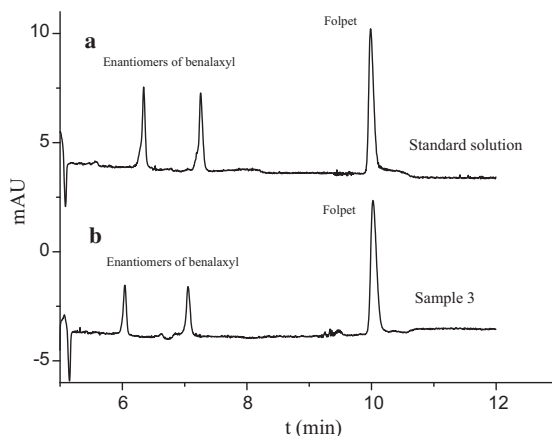


Fig. 4. Electropherograms corresponding to the separation of benalaxyl enantiomers and folpet (a) in a standard solution containing 200 mg/L of racemic benalaxyl and 200 mg/L of folpet and (b) in commercial fungicide formulation containing racemic benalaxyl (approximately 200 mg/L) and folpet (sample 3). Experimental conditions: 5 mM succ- β -CD in 50 mM MES buffer (pH 6.5) with 2 M urea. Other experimental conditions as in Fig. 2.

in Table 3 for the method developed for benalaxyl–folpet mixtures.

Linearity was determined by plotting Ac as a function of the concentration of each compound in the range 20–400 mg/L referred to the racemic mixture in the case of metalaxyl and benalaxyl and for the total amount in the case of folpet. A total number of seven standard solutions were prepared individually during three different days and injected by triplicate each day. These experiments allowed fixing the linear range for each compound and each method. Tables 2 and 3 present this interval, the linear equation obtained in the selected range as well as the standard errors for the intercept (S_a), the slope (S_b) and the determination coefficient (R^2). Satisfactory results were obtained in terms of linearity with $R^2 > 0.99$, moreover, ANOVA confirmed that data fit to a linear model, by the p -values (>0.05 for every linear model).

Table 2

Analytical characteristics of the developed method for the simultaneous separation of the enantiomers of metalaxyl and folpet.

Analytical characteristics	Metalaxyl		Folpet	
	First enantiomer	Second enantiomer		
Precision (RSD)				
Concentration (mg/L)	20	50	20	50
Instrumental repeatability ($n=6$)			100	200
Ac, RSD (%)	4.4	5.0	4.8	5.4
r, RSD (%)	0.7	0.5	0.7	0.5
Intermediate precision ($n=9$)				
Ac, RSD (%)	5.2	4.0	6.2	5.1
r, RSD (%)	1.3	2.2	1.3	2.3
Linearity				
Linear range (mg/L)	10–100	10–100	40–300	
Linear equation	$-0.0464 + 0.0178x$	$-0.0335 + 0.0171x$	$-0.3382 + 0.0206x$	
Standard errors	$S_a = 0.0204$ $S_b = 0.0003$	$S_a = 0.0240$ $S_b = 0.0004$	$S_a = 0.0795$ $S_b = 0.0005$	
Determination coefficient (R^2)	0.998	0.997	0.997	
$b \pm t S_b$	0.0178 \pm 0.0010			
p -value of ANOVA	0.6610	0.4150	0.1448	
LOD (mg/L)	3.4	4.2	12.8	
LOQ (mg/L)	11.4	14.1	38.7	
Study of matrix interferences				
p -value of t -tests				
Sample 1	0.0601	–	–	
Sample 2	0.0730	–	–	
Recovery				
Sample 1	108 \pm 8			
Sample 2	104 \pm 8			

Table 3

Analytical characteristics of the developed method for the simultaneous separation of the enantiomers of benalaxyl and folpet.

Analytical characteristics	Benalaxyl				Folpet	
	First enantiomer		Second enantiomer			
Precision (RSD)						
Concentration (mg/L)	50	100	50	100	100	200
Instrumental repeatability (n = 6)						
Ac, RSD (%)	1.5	3.3	1.8	4.4	2.8	1.2
t, RSD (%)	0.2	0.2	0.2	1.9	0.3	0.3
Intermediate precision (n = 9)						
Ac, RSD (%)	1.8	3.3	3.2	3.6	2.8	2.8
t, RSD (%)	0.3	2.2	0.3	3.6	2.6	2.6
Linearity						
Linear range (mg/L)	10–150		10–150		40–300	
Linear equation	–0.0514 + 0.0279x		–0.0489 + 0.0257x		0.0516 + 0.0202x	
Standard errors	S _a = 0.0475 S _b = 0.0006		S _a = 0.0479 S _b = 0.0006		S _a = 0.0704 S _b = 0.0004	
Determination coefficient (R ²)	0.998		0.998		0.998	
b ± t·S _b	0.0280 ± 0.0016		0.0253 ± 0.0016			
p-value of ANOVA	0.4506		0.4932		0.1400	
LOD (mg/L)	5.1		5.6		11.5	
LOQ (mg/L)	17.0		18.6		34.8	
Study of matrix interferences						
p-value of t-test						
Sample 3	0.0508		0.0696		–	
Recovery (%)						
Sample 3S	98 ± 11		94 ± 10			

LODs and LOQs for the four enantiomers (those for metalaxyl and those for benalaxyl) and folpet were determined from the calibration line using the equations described in Section 2. For metalaxyl (Table 2) LOD values of 3.4 and 4.2 mg/L and LOQ values of 11.4 and 14.1 mg/L were obtained for the first and the second migrating enantiomer, respectively. For benalaxyl (Table 3) the LOD values were of 5.1 and 5.6 mg/L and the LOQs of 17.0 and 18.6 mg/L for the first and the second enantiomer, respectively. Finally, for folpet (Tables 2 and 3) these values were lower than 12.8 mg/L for LODs and lower than 38.7 mg/L for LOQs regardless of the method employed for its determination.

Precision of the methods was evaluated as *instrumental repeatability* and *intermediate precision*. Instrumental repeatability was determined from six repeated injections of a standard solution at two different concentration values of each compound (20 and 50 mg/L for metalaxyl enantiomers, 50 and 100 mg/L for benalaxyl enantiomers and 100 and 200 mg/L for folpet). The RSD values (%) obtained for metalaxyl enantiomers (Table 2) were lower than 0.7% for migration times and lower than 5.4% for Ac. For folpet the RSD values for migration times were lower than 0.7% and lower than 5.5% for Ac (Table 2). For the method enabling the simultaneous separation of the enantiomers of benalaxyl and folpet (Table 3) the RSD values obtained for the instrumental repeatability were lower than 1.9% for the migration times and lower than 4.4% for Ac. For folpet (Table 3) the RSD values for migration times were 0.3% for migration times and lower than 2.8% for Ac. Intermediate precision was assessed at the same concentration values for three consecutive days injecting each sample by triplicate each day. As it can be observed in Table 2 the RSD values achieved for the enantiomers of metalaxyl were under 2.3% and 6.2% for analysis times and Ac respectively. For folpet the RSD values were lower than 2.1% for migration times and than 5.7% for Ac. In the case of enantiomers of benalaxyl (Table 3) and also for the two concentration values studied the RSD values were lower than 3.3% both for migration times and Ac. With this method folpet presents RSD values lower than 2.6% and 2.8% for migration times and Ac, respectively.

The selectivity of the methods was demonstrated due to the absence of matrix interferences. For this purpose there were compared the slopes of the calibration lines obtained by the external calibration method and the standard additions method for each

sample. The standard additions calibration line was obtained by spiking the commercial sample (40 mg/L of metalaxyl-M (samples 1 and 2) or 60 mg/L of racemic benalaxyl (sample 3)) with known concentrations of metalaxyl-M and racemic benalaxyl in the linear interval for each fungicide. The results were confirmed by *p*-value of *t*-test and as it can be observed in Tables 2 and 3, the *p*-values obtained for every commercial sample were >0.05 at a confidence level of 95%. These results demonstrated the absence of matrix interferences and assess the suitability of the external calibration method for the quantitation of the three analytes in the selected commercial formulations.

Accuracy of the developed methods was determined as the recoveries achieved for the two chiral fungicides. For this purpose the commercial formulations were spiked with different known concentrations of R-metalaxyl standard solution for samples 1 and 2 and with known concentrations of racemic benalaxyl standard solution for sample 3 (six concentration levels and three determinations for each level). The mean recoveries obtained were 108 ± 8% (sample 1) and 104 ± 8% (sample 2) for R-metalaxyl, 98 ± 11% for R-benalaxyl and 94 ± 10% for S-benalaxyl.

The developed chiral methods were applied for the determination of metalaxyl-M, racemic benalaxyl and folpet in three commercial fungicide products. Fig. 3 shows the electropherograms obtained for a standard solution containing 200 mg/L of racemic metalaxyl and 200 mg/L of folpet (Fig. 3a) and for two commercial samples containing approximately 100 mg/L of metalaxyl-M (sample 1) (Fig. 3b) and approximately 100 mg/L of metalaxyl-M and 832 mg/L of folpet (sample 2) (Fig. 3c). On the other hand, Fig. 4 shows the electropherograms obtained for a standard solution containing 200 mg/L of racemic benalaxyl and 200 mg/L of folpet (Fig. 4a) and for a commercial sample (sample 3) containing racemic benalaxyl at approximately 200 mg/L and approximately 625 mg/L of folpet (Fig. 4b). The total amounts determined for each fungicide in the three commercial formulations and the labeled amounts are specified in Table 4. Only those contents referred to benalaxyl correspond to the labeled amount. In the two samples containing metalaxyl-M the determined amount is between 35 and 45% above the theoretical value and for folpet the determined amounts are much lower than those specified in the label. The differences in the determined and labeled amounts may be due to the fact that the control in agrochem-

Table 4
Determined contents of metalaxyl-M, benalaxyl and folpet in the commercial fungicide formulations analyzed (average value \pm SD) ($n = 3$).

Sample	Active ingredients	Metalaxyl/benalaxyl First enantiomer (% p/p or g/L)	Second enantiomer (% p/p)	Labeled amount (% p/p or g/L)	Folpet (% p/p)	Labeled amount (% p/p)
1	Metalaxyl-M	627 \pm 13 g/L	-	465 g/L	-	-
2	Metalaxyl-M + folpet	6.96 \pm 0.07 (%)	-	4.8 (%)	3.1 \pm 0.2 (%)	40 (%)
3	Benalaxyl + folpet	4.16 \pm 0.06 (%)	3.83 \pm 0.08 (%)	8 (%)	15.6 \pm 0.4 (%)	50 (%)

ical formulations is mostly referred to the maximum residual concentrations in foods but not to the contents in commercial formulations.

3.3. Purity testing of metalaxyl-M in commercial fungicide formulations

The determination of enantiomeric impurities requires analytical methods sensitive enough to be able to detect minor enantiomeric impurities. In order to obtain the maximum injection volume and so the highest peak areas possible without any loss of resolution, an in-capillary preconcentration strategy (stacking) was tried. To achieve this preconcentration, the standard of racemic metalaxyl was dissolved in the same BGE employed for its chiral separation but diluted with water to 50% instead of methanol, as it was done till this moment. When a voltage is applied between the ends of the capillary, the electric field will be higher in the

sample region, due to its low conductivity and consequently the electrophoretic velocity of the analytes in this region is also higher compared to the separation region. So when the analytes move to the BGE they slow down and focus in the boundary that separates the two phases [41]. By this strategy it is possible to inject a higher amount of sample without loss of resolution. In order to choose the injection time most adequate for this purpose, a study of the variation of the enantiomeric resolution with the injection time (from 3 to 20 s) at a pressure of 25 mbar was carried out. From 3 to 10 s the chiral resolution achieved is almost constant, however, from 10 s a clear loss of resolution occurs (from approximately 4 to 2.8), so a hydrodynamic injection by pressure 25 mbar \times 10 s with the standard dissolved in the BGE diluted to 50% with water was selected for the determination of the enantiomeric impurity of commercial fungicide formulations.

The analytical characteristics of the new method were evaluated in the same terms as before achieving appropriate values for every parameter. It has to be highlighted that with this in-capillary preconcentration strategy the sensitivity of the method was improved and the LODs obtained were approximately three times lower than before (from around 4 mg/L for each enantiomer of metalaxyl to 1.2 mg/L) (see Fig. 5a). This approach enabled the detection of impurities of S-metalaxyl up to 1.2% referred to the main enantiomer.

Finally, the quantitation of the enantiomeric impurity of metalaxyl-M in two commercial fungicide formulations was performed. Fig. 5b shows the electropherograms obtained for the two commercial formulations containing only metalaxyl-M according to their label (samples 1 and 2), under the experimental conditions selected (BGE: 15 mM succ- γ -CD dissolved in 50 mM MES buffer (pH 6.5) with 2 M urea; uncoated fused-silica capillary: 50 μ m i.d. \times 50 cm (58.5 cm t.l.); injection by pressure: 25 mbar \times 10 s; applied voltage: 30 kV; temperature: 15 $^{\circ}$ C; λ : 210 \pm 2 nm, [metalaxyl-M]: 100 mg/L approximately dissolved in BGE:H₂O 50:50 (v/v)). The percentages obtained for each sample have been calculated according to the equation shown in Section 2. Impurities of 5% and 4% of S-metalaxyl were determined for samples 1 and 2, respectively.

4. Concluding remarks

A method enabling the chiral separation of benalaxyl enantiomers by CE has been proposed for first time achieving the chiral separation of the compound in 7.5 min and with a resolution near 15. These results were achieved employing a 5 mM succ- β -CD dissolved in 50 mM MES buffer (pH 6.5). On the other hand, the method proposed for the chiral separation of metalaxyl by this technique involves a clear improvement in both the analysis times and the resolutions achieved compared with the two works appeared in the literature. In this case, a 15 mM succ- γ -CD in 50 mM MES buffer (pH 6.5) was employed for the chiral separation that was achieved in 11.5 min and with a chiral resolution of 3.1. Due to the fact that these two amide fungicides are employed in commercial products mixed with other fungicides, the two chiral methods were applied to the simultaneous separation of metalaxyl or benalaxyl in binary combinations with folpet. Furthermore, the performance of the method was established in terms of precision, linearity, selectivity,

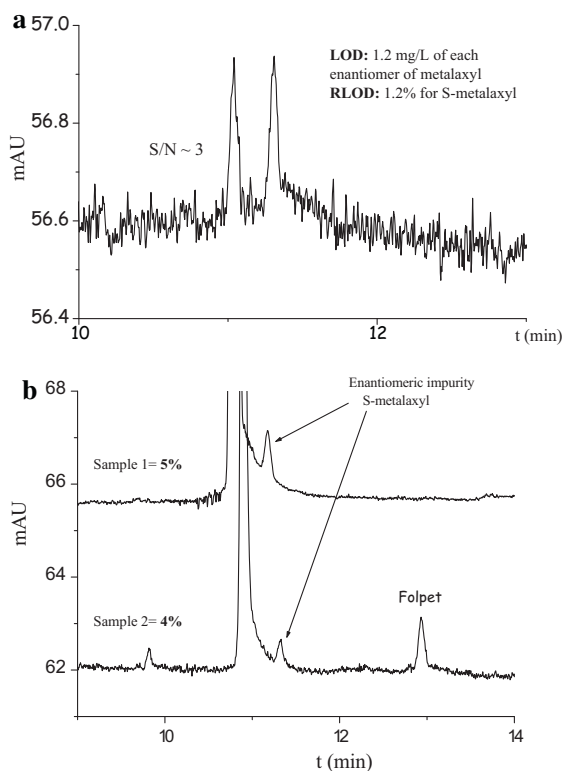


Fig. 5. Electropherograms corresponding to (a) the LOD obtained when employing normal stacking mode with the standard (1.2 mg/L) dissolved in BGE:H₂O 50:50 (v/v) for the enantiomeric separation of metalaxyl and (b) to enantiomeric impurity of S-metalaxyl in commercial fungicide formulations labeled as enantiomerically pure in metalaxyl-M. Experimental conditions: Injection by pressure: 25 mbar \times 10 s; [metalaxyl-M] \sim 100 mg/L. Other experimental conditions as in Fig. 2.

LODs and LOQs showing their suitability for their application to the determination of these three compounds in commercial fungicide formulations. Finally, an in-capillary preconcentration strategy was developed in order to improve the detection limits of the method developed for metalaxyl and applying it to the determination of enantiomeric impurity (S-metalaxyl) of metalaxyl-M in commercial products. This new method was able to detect enantiomeric impurities up to 1.2% of S-metalaxyl.

Acknowledgements

Authors thank the Ministry of Science and Innovation and the Comunidad Autónoma of Madrid (Spain) for research projects CTQ2009-09022/BQU and S-2009/AGR-1464, respectively. Virginia Pérez-Fernández thanks the Gobierno Vasco for her research grant.

References

- [1] B.S. Sekhon, J. Pestic. Sci. 34 (2009) 1.
- [2] D.W. Armstrong, G.L. Reid III, M.L. Hilton, C.D. Chang, Environ. Pollut. 79 (1992) 51.
- [3] A.W. Garrison, Environ. Sci. Technol. (2006) 16.
- [4] C.S. Wong, Anal. Bioanal. Chem. 286 (2006) 544.
- [5] H.P.E. Kohler, K. Nickel, C. Zipper, Adv. Microb. Ecol. 16 (2000) 201.
- [6] I. Ali, V.K. Gupta, H.Y. Aboul-Enein, Curr. Sci. 84 (2003) 152.
- [7] A. Williams, Pestic. Sci. 46 (1996) 3.
- [8] www.marm.es.
- [9] C. Marucchini, C. Zadra, Chirality 14 (2002) 32.
- [10] D.J. Fischer, A.L. Hayes, Pestic. Sci. 13 (1982) 330.
- [11] K. Vishunavat, N.I. Nashaat, A. Heran, S.J. Kolte, Crop Prot. 17 (1998) 543.
- [12] N. Kurihara, J. Miyamoto, G.D. Paulson, B. Zeeh, M.W. Skidmore, R.M. Hollingworth, H.A. Kuiper, Pure Appl. Chem. 69 (1997) 2007.
- [13] C. Zadra, C. Marucchini, A. Zazzeini, J. Agric. Food. Chem. 50 (2002) 5373.
- [14] S. Chen, W. Liu, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 81 (2008) 531.
- [15] M.D. Müller, H.R. Buser, Environ. Sci. Technol. 29 (1995) 2031.
- [16] J.L. Jarman, W.L. Jones, L.A. Howell, A.W. Garrison, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 6175.
- [17] H.R. Buser, M.D. Müller, T. Poiger, M.E. Balmer, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 221.
- [18] I.J. Buerge, T. Poiger, M. Müller, A.R. Buser, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 2668.
- [19] P. Sukul, M. Spiteller, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 164 (2000) 1.
- [20] J. Qiu, Q. Wang, P. Wang, G. Jia, J. Li, Z. Zhou, Pestic. Biochem. Physiol. 83 (2005) 1.
- [21] D. Liu, P. Wang, W. Zhou, X. Gu, Z. Chen, Z. Zhou, Anal. Chim. Acta 555 (2006) 210.
- [22] J. Qiu, Q. Wang, W. Zhu, G. Jia, X. Wang, Z. Zhou, Chirality 19 (2007) 51.
- [23] F. Gozzo, G. Garavaglia, A. Zagni, Proc. Br. Crop Prot. Conf. Pests Dis. 3 (1984) 923.
- [24] X. Gu, P. Wang, D. Liu, C. Lv, Y. Lu, Z. Zhou, Chirality 20 (2008) 125.
- [25] X. Wang, G. Jia, J. Qiu, J. Diao, W. Zhu, C. Lv, Z. Zhou, Chirality 19 (2007) 300.
- [26] P. Xu, D. Liu, J. Diao, D. Lu, Z. Zhou, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 8545.
- [27] A. Monkiedje, M. Spiteller, K. Bester, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 707.
- [28] www.codexalimentarius.net.
- [29] A. Santilio, R. Dommarco, J. Capillary Electrop. Microchip. Technol. 9 (2006) 79.
- [30] S. Fanali, J. Chromatogr. A 875 (2000) 89.
- [31] S. Fanali, J. Chromatogr. A 792 (1997) 227.
- [32] S. Fanali, Electrophoresis 30 (2009) S203.
- [33] G.K.E. Scriba, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1991.
- [34] B. Chankvetadze, J. Chromatogr. A 1168 (2007) 45.
- [35] J.P. Scaheper, K.J. Sepaniak, Electrophoresis 21 (2000) 1421.
- [36] Q2: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. Published in the Federal Register 62, 1997, p. 27463.
- [37] M. Blanco, J. Gonzalez, E. Torras, I. Valverde, Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 157.
- [38] B. Chankvetadze, Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis, John Wiley & Sons, Chichester, England, 1997.
- [39] Z. Juvancz, R.B. Kendrovics, R. Iványi, L. Szenté, Electrophoresis 29 (2008) 1701.
- [40] M.L. Marina, A. Rios, M. Valcarcel, Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis in Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [41] J.P. Quirino, S. Terabe, J. Chromatogr. A 856 (1999) 465.

CAPÍTULO V

**EVALUACIÓN DE NUEVAS FASES ESTACIONARIAS
QUIRALES PARA LA SEPARACIÓN ENANTIOMÉRICA DE
PESTICIDAS POR NANO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA Y
ELECTROCROMATOGRAFÍA CAPILAR**

V. 1 INTRODUCCIÓN

Tanto la CEC como la nano-LC con columnas capilares rellenas con fases estacionarias quirales se consideran técnicas con un gran potencial en el campo de las separaciones quirales, que además, al igual que la CE ofrecen las ventajas inherentes de las técnicas de separación miniaturizadas. Su mayor limitación es la falta de columnas capilares quirales que se encuentran disponibles comercialmente, por lo que el desarrollo de nuevas fases estacionarias quirales que puedan ser empleadas como rellenos de columnas capilares, es uno de los retos más importantes en este campo.

En general, las fases estacionarias que se emplean en nano-LC y CEC son aquellas que ya han sido empleadas en HPLC y que han demostrado su validez en esta técnica de separación. De este modo, podemos encontrar fases estacionarias modificadas con proteínas [294], ciclodextrinas [295], antibióticos macrocíclicos [296], selectores tipo Pirkle [297], acrilamidas quirales y polisacáridos [128]. De todas ellas, las derivadas de polisacáridos son de las más empleadas, en concreto las de celulosa y las de amilosa. Estos tipos de fases estacionarias aunque son capaces de discriminar quiralmente diferentes tipos de analitos, tienen una capacidad de enantioresolución muy limitada debido a que su estructura es muy densa y no permiten la correcta inclusión del analito en la misma. Sin embargo, presentan una gran facilidad de derivatización a través de los grupos hidroxilo, aumentando en gran medida su capacidad de resolución enantiomérica ya que la estructura tridimensional que se forma permite una mejor interacción entre el analito y el selector quiral. Además, la posibilidad de llevar a cabo multitud de reacciones de derivatización distintas da lugar a un gran número de fases estacionarias diferentes que permiten fijar grandes cantidades de selector quiral sobre la superficie inerte y que son compatibles con fases móviles tanto acuosas como orgánicas [298].

En este trabajo se han investigado fases estacionarias quirales de reciente desarrollo que pertenecen al grupo de las fases estacionarias derivadas de polisacáridos, denominadas Sepapak-2 (celulosa tris (3-cloro-4-metilfenilcarbamato)) y Sepapak-4

(celulosa tris (4-cloro-3-metilfenilcarbamato)). Ambas están derivatizadas con grupos fenilcarbamato que han demostrado un gran reconocimiento quiral en HPLC y son muy empleadas hoy en día en dicha técnica [299, 300]. Esta enantioselectividad depende, en gran medida, del tipo de sustituyente y su posición dentro del grupo fenilo [301]. Así, la introducción de sustituyentes electrodonadores (metilo) y electroaceptores (cloruro) simultáneamente, como sucede en las dos fases estacionarias evaluadas en este trabajo, mejora considerablemente la capacidad de resolución quiral de este tipo de fases estacionarias [302, 303].

Debido al reciente desarrollo de las fases Sepapak-2 y Sepapak-4, su empleo ha sido muy limitado habiéndose descrito su aplicación a la separación quiral de fármacos [304] [300, 305-307] y flavanonas [308] por HPLC y de aminoácidos por CEC y nano-LC (fase Sepapak-2) en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación [309].

En este capítulo se ha llevado a cabo la evaluación de las fases estacionarias Sepapak-2 y Sepapak-4 en la separación enantiomérica de un grupo de dieciséis pesticidas quirales que incluyen insecticidas, herbicidas y fungicidas. Para ello, se han preparado las columnas quirales rellenándolas en nuestro propio laboratorio y evaluándolas tanto en nano-LC como en CEC con el fin de comparar las eficacias y resoluciones obtenidas por cada una de ellas y demostrar el potencial que ofrece la CEC. Además, se ha desarrollado un método de separación quiral por CEC para uno de los compuestos estudiados en este trabajo (el fungicida metalaxil) con el fin de aplicarlo a su determinación en diversas muestras medioambientales y al control de la pureza enantiomérica en un producto comercial etiquetado como enantioméricamente puro.

V.2 OBJETIVOS

El objetivo del trabajo de investigación recogido en este capítulo ha sido la evaluación de las fases estacionarias quirales Sepapak-2 y Sepapak-4 para la separación enantiomérica de una serie de pesticidas quirales que incluyen seis insecticidas

piretroides, cinco fungicidas conazol, dos fungicidas tipo amida, un fungicida triazol y dos herbicidas fenoxipropiónicos.

Con este fin se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Implementar un protocolo experimental para rellenar columnas capilares empaquetadas con las nuevas fases estacionarias, Sepapak-2 y Sepapak-4, para su empleo en nano-LC y CEC.
2. Evaluar el poder de enantioresolución de ambas fases estacionarias en nano-LC para la separación quiral de los pesticidas estudiados.
3. Comparar los resultados obtenidos mediante nano-LC con los obtenidos en CEC en términos de eficacia y resolución quiral para todos los pesticidas estudiados.
4. Desarrollar un método analítico por CEC para la separación y determinación enantiomérica del fungicida metalaxil.
5. Aplicar el método quiral desarrollado por CEC a la determinación de metalaxil-M en una formulación fungicida comercial etiquetada como enantioméricamente pura.
6. Determinar el porcentaje de impureza enantiomérica de metalaxil (*S*-metalaxil) en el producto fungicida comercial estudiado.
7. Aplicar el método desarrollado por CEC a la determinación enantiomérica de metalaxil en muestras de agua y suelo tratadas con el producto fungicida comercial.

V.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se ha llevado a cabo la evaluación de dos fases estacionarias quirales de reciente desarrollo conocidas como Sepapak-2 y Sepapak-4 para la separación quiral de un grupo de 16 pesticidas (seis insecticidas piretroides, cinco fungicidas conazol, dos fungicidas tipo amida, un fungicida triazol y dos herbicidas fenoxipropiónicos) por nano-LC y CEC.

La primera etapa de este trabajo de investigación consistió en el empaquetamiento de las fases estacionarias en las columnas capilares para su posterior evaluación en nano-LC y CEC, para lo que se empleó un método de llenado descrito previamente en la bibliografía y que se implementó en nuestro laboratorio [276]. Las fases estacionarias Sepapak-2 y Sepapak-4 fueron preparadas por el grupo del profesor Bezhan Chankvetadze (Universidad de Tbilisi, Georgia) y se rellenaron en capilares de diámetro interno de 100 μm .

Posteriormente y con el fin de evaluar la capacidad de resolución quiral de las dos fases estacionarias en nano-LC, se procedió a la optimización de la fase móvil. Se estudiaron diferentes composiciones de fase móvil, todas ellas con un 80% de ACN y el otro 20 % compuesto por agua (19 %) y un 1 % de un tampón a diferentes pHs (entre 2.5 y 8.0). Debido a que ninguno de los pesticidas estudiados era ionizable, se observó que el pH de la fase móvil no ejercía una gran influencia en la separación quiral obtenida para cada uno de ellos, aunque se pudo constatar un ligero aumento en la enantioresolución alcanzada cuando se trabajaba a pH más elevado. Sin embargo, considerando que el soporte de la fase estacionaria era de aminopropil sílice y que por lo tanto las separaciones en CEC se deberían realizar en fase inversa, se decidió emplear un pH más bajo que proporcionaría EOFs más elevados en dichas condiciones. Se estudió también el efecto que tendría el empleo de MeOH en lugar de agua en la fase móvil observándose un menor poder de discriminación quiral para ambas fases estacionarias. Asimismo, se evaluó el efecto del porcentaje de ACN en la separación quiral de los compuestos estudiados observándose que un mayor porcentaje de ACN daba lugar a una mayor

resolución quiral. Así, en las condiciones experimentales seleccionadas como óptimas (ACN/agua/formiato amónico pH 2.5 90:9:1 v:v:v) se obtuvo la separación quiral de siete pesticidas con la fase estacionaria Sepapak-2 y de nueve pesticidas con la fase estacionaria Sepapak-4. Las resoluciones quirales obtenidas se encontraban entre 0.64 y 5.24 y los tiempos de análisis fueron menores de 17 min.

Debido a que la columna Sepapak-4 mostró una mejor enantioselectividad en estos estudios preliminares, se seleccionó ésta columna para comparar los resultados obtenidos por nano-LC (donde la fuerza conductora del flujo es la presión) y CEC (donde la fuerza conductora es el flujo electroosmótico). Dado que, como ya se ha dicho, estas columnas se prepararon empleando aminopropil sílice como soporte, el flujo electroosmótico generado por las mismas a pHs < 6.5 tenía sentido anódico. Por ello, para poder trabajar en estas condiciones fue necesario utilizar polaridad inversa. Se aplicó un voltaje de separación de -10 kV, que era el que proporcionaba tiempos de análisis similares a los obtenidos en los experimentos de nano-LC, con el fin de poder realizar la comparación de los resultados obtenidos por ambas técnicas en las condiciones experimentales más similares posibles. Como era de esperar, tanto las eficacias como las resoluciones quirales obtenidas por CEC fueron mucho mayores que las obtenidas en nano-LC para todos los compuestos estudiados.

El método desarrollado por CEC se aplicó a la determinación del porcentaje de impureza enantiomérica de metalaxil-M en un producto pesticida comercial etiquetado como enantioméricamente puro. En primer lugar, se realizó un barrido de potencial entre -5 y -30 kV con el fin de seleccionar el voltaje de trabajo que diera lugar a la mayor eficacia en la separación quiral, seleccionándose un voltaje de -10 kV como el óptimo. A continuación, se evaluaron las características analíticas del método desarrollado en términos de linealidad, LODs y LOQs, precisión y selectividad, demostrando el potencial del método analítico para este fin y permitiendo determinar mediante el mismo un porcentaje de impureza enantiomérica de hasta un 0.6 %. El método se aplicó a la determinación de la concentración de metalaxil-M en una formulación comercial etiquetada como enantioméricamente pura en este compuesto y a la determinación del

porcentaje de impureza enantiomérica presente en la misma. La concentración de metalaxil-M determinada, fue un 26 % mayor a la etiquetada en el producto comercial y el porcentaje de impureza determinado en dicho producto comercial fue de un 3.7%.

Del mismo modo, también se analizaron muestras de suelo y agua de grifo que habían sido previamente fortificadas con el mismo producto comercial. Se empleó la extracción sólido-líquido para la extracción del analito de interés de las muestras de suelo y SPE con cartuchos C18 para las muestras de agua. En el caso de las muestras de suelo, aparecieron en el electroforegrama picos interferentes que no permitieron la determinación del porcentaje de impureza enantiomérica presente. Sin embargo, en las muestras de agua de grifo se pudo determinar un porcentaje de impureza del 3.6 %, prácticamente igual al determinado en el producto comercial puro.

Los resultados obtenidos en este capítulo se recogen en el siguiente artículo científico:

Artículo 5

“Evaluation of new cellulose-based chiral stationary phases Sepapak-2 and Sepapak-4 for the enantiomeric separation of pesticides by nano liquid chromatography and capillary electrochromatography”

V. Pérez-Fernández, E. Dominguez-Vega, B. Chankvetadze, A.L. Crego, M.A. García, M.L. Marina

Journal of Chromatography A 1234 (2012) 22-31

Artículo Científico 5

“Evaluation of new cellulose-based chiral stationary phases Sepapak-2 and Sepapak-4 for the enantiomeric separation of pesticides by nano liquid chromatography and capillary electrochromatography”

V. Pérez-Fernández, E. Dominguez-Vega, B. Chankvetadze, A.L.

Crego, M.A. García, M.L. Marina

Journal of Chromatography A 1234 (2012) 22-31



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Evaluation of new cellulose-based chiral stationary phases Sepapak-2 and Sepapak-4 for the enantiomeric separation of pesticides by nano liquid chromatography and capillary electrochromatography

Virginia Pérez-Fernández^a, Elena Dominguez-Vega^a, Bezhan Chankvetadze^b, Antonio L. Crego^a, Maria Ángeles García^a, Maria Luisa Marina^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

^b Institute of Physical and Analytical Chemistry, School of Exact and Natural Sciences, Tbilisi, GA, Europe

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 20 January 2012

Keywords:

Pesticides
Metalaxyl
Capillary electrochromatography
Nano-liquid chromatography
Polysaccharide-based chiral stationary phase

ABSTRACT

Two novel polysaccharide-based chiral stationary phases (CSPs), known as Sepapak-2 (cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)) and Sepapak-4 (cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate)), have been evaluated in this work for the chiral separation of a group of 16 pesticides including herbicides, insecticides and fungicides. The optimization of the mobile phase employed in nano-liquid chromatography (nano-LC) enabled the chiral separation of seven pesticides on Sepapak-2 and of nine pesticides on Sepapak-4. Due to the fact that Sepapak-4 gave better results, this column was selected to compare nano-LC and capillary electrochromatography (CEC) under the same conditions that consisted in the use of a 90/9/1 (v/v/v) ACN/H₂O/ammonium formate (pH 2.5) background electrolyte (BGE). As expected, both the efficiency and the chiral resolution obtained in CEC experiments were higher than in nano-LC for all the analyzed compounds. The analytical characteristics of the CEC developed methodology were evaluated in terms of linearity, LODs, LOQs, precision, selectivity, and accuracy allowing its application to the quantitation of metalaxyl and its enantiomeric impurity in a commercial fungicide product marketed as enantiomerically pure (metalaxyl-M) and in soil and tap water samples after solid phase extraction (SPE). The determined amount of metalaxyl-M was found to be a 26% above the labeled content and it contained an enantiomeric impurity of a 3.7% of *S*-metalaxyl was determined.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pesticides are active compounds used in agriculture to control pest being the number of commercially available pesticides very high. Many pesticides are chiral compounds (approximately 25% of them) and in most cases one of the enantiomers presents the pesticide activity while the other can present different activity toward the target organism [1–3]. In these cases, the use of enantiomerically pure pesticides would result in a major effectiveness in controlling insects or weeds in agriculture and reducing environmental risks. Other reason for using enantiomerically pure pesticides is that whereas the active enantiomer has the desired effects on target species, the other enantiomer may have

adverse effects on some non-target organisms [3]. Moreover, biotic processes such as microbiological transformation are commonly enantioselective and the use of racemic pesticides can result in different environmental fates, resulting, from an environmental point of view, one enantiomer safer than the other [4,5]. Therefore, the search for new and effective methods for the separation and determination of pesticide enantiomers is necessary in order to optimize enantioselective production processes, assessing the enantiomeric purity of commercial formulations, and monitoring their presence in the environment or into different types of matrices.

An example of particular interest is the fungicide metalaxyl [(*R/S*)-methyl-N-(2-methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-DL-alaninate], employed to control plant diseases caused by pathogens of the *Oomycota* division [6]. It has been demonstrated that the activity of the *R*-enantiomer (metalaxyl-M) is around 1000 times higher than that of the *S*-enantiomer [7]. In addition, the degradation of metalaxyl enantiomers in environment is also clearly enantioselective. In fact, the *S*-enantiomer has shown a faster degradation in vegetables being this enantiomer active for less time, whereas in the case of soils the first enantiomer being degraded/decomposed is the *R*-enantiomer [8].

* Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 8854935; fax: +34 91 8854971.

E-mail addresses: virginia.perez@uah.es (V. Pérez-Fernández), elena.dominguezv@uah.es (E. Dominguez-Vega), bezhan.chankvetadze@yahoo.com (B. Chankvetadze), antonio.crego@uah.es (A.L. Crego), angeles.garcia@uah.es (M.Á. García), mluisa.marina@uah.es (M.L. Marina).

CEC and nano-LC with packed capillary columns have been considered very promising techniques for chiral separations because of their high efficiency, low sample requirements, low solvent and stationary phase consumption, and improved sensitivity when coupling with mass spectrometer. However, the lack of commercially available chiral columns is the main drawback of these techniques. As a consequence, the preparation of efficient stationary phases for chiral separations is required. The use of polysaccharide derivatives as CSPs offers the advantage of availability and the easy derivatization of the hydroxyl group. This leads to many different derivatives being one of the most effective the phenylcarbamate derivatives [9]. In addition, the introduction of electron-donating (methyl) and electron-withdrawing (chlorine) groups, results in an improved enantiomer recognition [10–12]. Cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate) (Sepapak-2 or Lux Cellulose-2) and cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate) (Sepapak-4 or Lux Cellulose-4) are novel CSPs which combine both electron-donating and electron-withdrawing substituents in the phenylcarbamate group. The enantioresolution ability of these novel CSPs has been tested in different works using commercially available columns. Sepapak-2 CSP has been employed for the enantioseparation of several drugs by normal phase-LC (NP-LC) [13–15], reversed phase-LC (RP-LC) [13,16] and polar organic solvent chromatography (POSC) [17,18], for amino acids using supercritical fluid chromatography (SFC) [19] and for atropisomeric biphenyls using NP-LC [20] with good results. Regarding the enantioresolution ability of Sepapak-4 CSP, it has only been demonstrated for pharmaceutical compounds by NP-LC [13–15,21,22], RP-LC [13,21] and POSC [17,22]. To the best of our knowledge, these new CSPs have never been employed for pesticide enantioseparations.

Using nano-LC and CEC with these packed capillary columns, only two works have been reported employing Sepapak-2 [23,24] and Sepapak-4 [24] for a group of pharmaceutical compounds. Recently, our research group has employed the CSP Sepapak-2 for the chiral separation of a group of Fmoc-amino acids by nano-LC and CEC [25].

The aims of the present work were to study the chiral resolving power of these new polysaccharide-based CSPs, Sepapak-2 and Sepapak-4, for the enantiomeric separation of a group of 16 pesticides including herbicides, insecticides and fungicides and to show the advantages of CEC versus nano-LC in terms of efficiency and resolution. Finally, with the purpose of demonstrating the potential and reliability of this CSP, a CEC method was employed to achieve the chiral determination of the fungicide metalaxyl in a commercial formulation as well as in environmental samples (soil and tap water).

2. Experimental

2.1. Chemicals and samples

All reagents employed for the preparation of buffers, capillary columns, and samples were of analytical grade. Acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) and hexane were from Scharlau (Barcelona, Spain), formic acid and acetic acid were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany), boric acid was from Fluka (Buchs, Switzerland), ammonium hydroxide and sodium hydroxide were from Merck (Darmstadt, Germany) and ethyl acetate from Panreac (Barcelona, Spain). Water used to prepare all solutions was purified in a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

Standards of racemic pesticides resmethrin, diniconazole, and fenprothrin were from Chem Service (West Chester, PA, USA) and λ -cyhalothrin, β -cyfluthrin, *cis*-bifenthrin, metalaxyl, benalaxyl, hexaconazole, myclobutanil, tebuconazole, dichlorprop, mecoprop, α -cypermethrin, and flutriafol from Fluka. Uniconazole was

acquired as uniconazole-P (*R*-isomer) from Chem Service (West Chester, PA, USA). The structure of all the studied pesticides is shown in Fig. 1.

The commercial formulation analyzed, containing only metalaxyl-M was acquired in an agrochemical shop in Fuenlabrada (Madrid, Spain). According to the labeled data, this product contained 465 mg/L of metalaxyl-M.

2.2. Instrumentation

A HP^{3D}CE system from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) with a diode array detector (DAD) was employed for all the experiments. The CE system was equipped with an external pressure device able to apply up to 12 bar. Instrument control and data acquisition were performed with the HP^{3D}CE ChemStation software. Injections were made by pressure (10 bar \times 0.2 min) and immediately after the sample injection a plug of the mobile phase was injected (10 bar \times 0.2 min). In nano-LC experiments a pressure of 12 bar was used for the separation and for CEC experiments a voltage of -10 kV was employed in order to obtain analysis times similar to those obtained in nano-LC experiments and an external pressure of 12 bar was applied in both buffer reservoirs to avoid bubble formation. UV detection was performed at 210 ± 2 nm and all the experiments were performed at a working temperature of 25 °C.

Separations were performed in a fused-silica capillary from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) of 100 μ m inner diameter (ID) with a total length of 32.5 cm in which the length of the packed bed was 24.0 cm. For the preparation of the packed columns a LC-10AS Shimadzu HPLC pump was used (Duisburg, Germany) and an ultrasonic bath Ultrasons-H from J.P. Selecta (Barcelona, Spain) was employed for submerging the capillary during the packing procedure to assure a homogenized packing.

A pH-meter model 744 from Metrohm (Herisau, Switzerland) was used to adjust the pH of the separation buffers.

The cartridges employed for SPE were silica cartridges supplied by Varian (Middelburg, The Netherlands) for soil samples and C-18 (Discovery DSC-18, Discovery DSC-18 LT and LC-18) cartridges supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA) for tap water samples.

2.3. Preparation of chiral stationary phases

The chemical structures of the chiral selectors used in these experiments are shown in Fig. 2. Cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate) and cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate) were synthesized as described previously [10,11]. The polysaccharide derivatives were dissolved in tetrahydrofuran and coated in the amount of 25% (w/w) onto aminopropylsilylated spherical silica particles with 5 μ m nominal particle size and 100 nm nominal pore size.

2.4. Preparation of capillary columns

The capillary columns were packed by using the slurry packing method previously described by Chankvetadze [26]. Briefly, the inlet end of a 100 μ m ID capillary was connected to an HPLC column, which was used as reservoir for the slurry of the packing material. First, the capillary was flushed with MeOH during 30 min for cleaning the capillary wall. After this, the outlet end of the column was connected to a commercial HPLC mechanical frit in order to retain the stationary phase. Meanwhile the stationary phase (20 mg) was suspended in approximately 2.5 mL of 80/20 (v/v) MeOH/H₂O, sonicated during 30 min and transferred into the reservoir. The capillary was packed at 350 bar for a length of about 30 cm while the capillary is submerged in the ultrasonic bath. Following, the column was flushed with 50:50 (v/v) MeOH/H₂O for around 1 h and the frits

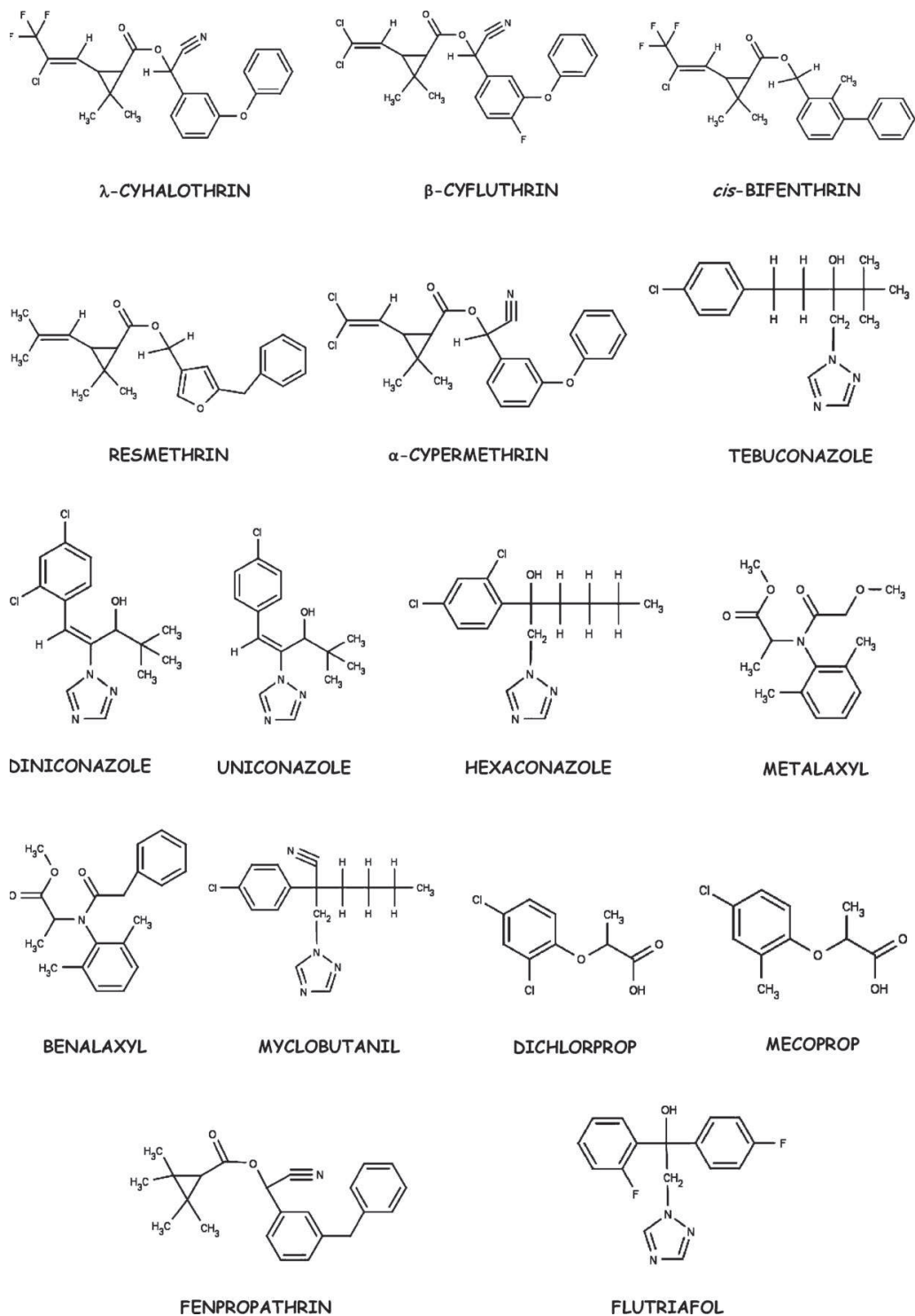


Fig. 1. Structure of the chiral pesticides selected for the evaluation of novel chiral stationary phases.

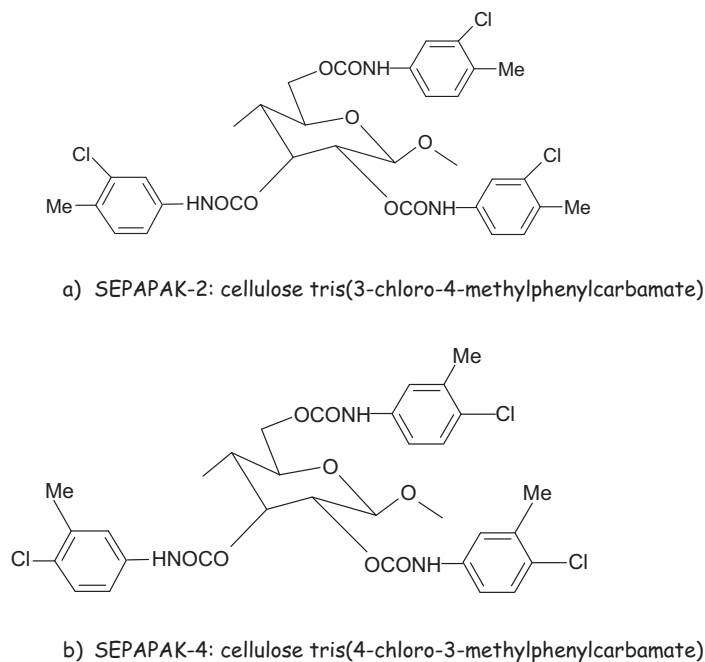


Fig. 2. Structure of chiral selectors (a) Sepapak-2 (cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)) and (b) Sepapak-4 (cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate)).

were prepared by heating the two ends of the packed area with a home-made electrical wire filament heater (700 °C, 4–5 s) resulting in a packed length of 24 cm. Finally, the capillary was turned over and the excess of stationary phase was removed by flushing the capillary with the separation buffer. The same capillary was employed for all the experiments both in CEC and in nano-LC. The detection window was prepared just next to the outlet frit by removing the polyimide coating on the capillary with the same heater that was employed to make the frits.

2.5. Procedures

Buffers were prepared by dissolving the appropriate amount of formic acid, acetic acid or boric acid in Milli-Q water and adjusting the pH to the desired value with 1 M or 0.1 M NaOH. The separation media (mobile phases or BGEs) were prepared by mixing the buffers with ACN and MeOH or water in the selected proportions. Stock standard solutions of pesticides were prepared by dissolving the appropriate amount of the compound in ACN up to a final concentration of 2000 mg/L. To prepare the working solutions, different aliquots were diluted in 80/20 (v/v) ACN/H₂O to obtain concentrations of 200 mg/L of racemate (only *R*-isomer in the case of uniconazole-*P*) for column evaluation and between 3 mg/L and 500 mg/L for the calibration by the external standard method.

Before first use, the capillary was rinsed with the corresponding separation medium during approximately 1 h and 15 min between runs. At the end of each day the capillary was rinsed with 80/20 (v/v) ACN/H₂O for 15 min.

2.6. Sample treatment

Soil [8] and tap water samples [27] were extracted employing previously described methods with slight modifications. Briefly, 100 g of dried soil were spiked with the commercial pesticide product and mechanically shaken for 1 h. 50 g of the spiked soil was

twice extracted with MeOH (2 × 50 mL) and the extract was evaporated to 5 mL. 20 mL of distilled water was added to the residue and then reextracted with ethylacetate (3 × 40 mL). The organic phases were collected and anhydrous sodium sulfate was added to remove all the remaining water. The extract was filtered and evaporated until just to dryness and it was redissolved in 2 mL hexane. It was purified by SPE with a silica column conditioned with hexane. After sample loading the column was rinsed with 5 mL of hexane, 5 mL of 5/95 (v/v) ethylacetate/hexane, 5 mL of 10/90 (v/v) ethylacetate/hexane, and 5 mL of 15/85 (v/v) ethylacetate/hexane and finally the analytes were eluted with 25 mL of 20/80 (v/v) ethylacetate/hexane. The eluate was evaporated, redissolved in 500 μL 80/20 (v/v) ACN/H₂O, and injected in the CE system.

For tap water samples 50 mL were spiked with the commercial product and they were passed through a C-18 SPE cartridge. The cartridge was previously conditioned with 3 mL MeOH and 3 mL water and after sample loading, the analyte was eluted with 5 mL MeOH. The extract was evaporated to dryness, redissolved in 500 μL of 80/20 (v/v) ACN/H₂O, and injected in the CE system.

To prepare the commercial formulation for its analysis, an appropriate volume of product was diluted in 80/20 (v/v) ACN/H₂O to obtain a concentration of approximately 75 mg/L of metalaxyl-*M* considering the labeled amount.

2.7. Data treatment

The values of areas, migration or retention times and resolution were obtained using the ChemStation software. Corrected peak areas were used for data treatment in order to obtain better precision.

The presence of matrix interferences was investigated by employing the *t*-test for comparison of two calibration lines. If the *p*-value was up to 0.05 (for a confidence level of 95%) it was considered that there were no significant differences between calibration lines.

Finally, the percentage of enantiomeric impurity in commercial formulations was determined as the corrected area of the peak of the impurity divided by the sum of the corrected areas of both enantiomers ($(\text{corrected area}_{\text{Min}}/\text{corrected area}_{\text{Min}} + \text{corrected area}_{\text{Maj}}) \times 100$).

Experimental data analysis and composition of graphs were carried out using Excel Microsoft Office 2007, Statgraphics Plus 5.1 and Origin 6.0 software.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of the enantioselectivity of Sepapak-2 and Sepapak-4 toward pesticides by nano-LC and optimization of the mobile phase

The evaluation of the enantioselectivity of Sepapak-2 and Sepapak-4 as chiral stationary phases in nano-LC was performed by the injection of the selected 16 pesticides. These chiral stationary phases may be used both in normal [13] and reversed phase mode [23] and there are even some works in which POSC has been used [18,22].

First, the CSP Sepapak-2 was tested in both RP-LC and NP-LC. Different mobile phases were tested in reversed phase mode, all of them containing ACN as organic modifier at a percentage of 80%. ACN was chosen as organic modifier due to its low viscosity and low UV-cut-off, although other solvents such as methanol, ethanol or 2-propanol could be added [13]. The other 20% was composed of water and a percentage of buffer at different pHs. Table 1 shows the results obtained for Sepapak-2 column using mobile phases at different pHs from 2.5 to 8.0. Due to the fact that the studied compounds are not ionizable (λ -cyhalothrin, resmethrin, *cis*-bifenthrin, β -cyfluthrin, metalaxyl, benalaxyl, α -cypermethrin, and fenprothrin; all of them pyrethroids pesticides) or only partially ionizable, the change in the mobile phase pH did not show notable influence on the enantioselectivity and similar results were obtained at different pH values. However, a slight separation was obtained for the enantiomers of myclobutanil at higher pHs while at lower pHs no separation was observed for this compound. The best resolutions were found at the highest pH (80/19/1, v/v/v, ACN/H₂O/sodium borate; pH 8.0), which allowed the chiral separation of six of the pesticides tested. In the normal phase mode, ethanol and 2-propanol are the most suitable mobile phase modifiers due to their miscibility with hexane or heptane. However, 2-propanol usually provides better selectivities because it interacts less with the stationary phase through hydrogen bonding and thus it does not compete for the active sites with the analytes [21]. For this reason, a 75/25 (v/v) 2-propanol/hexane mobile phase was evaluated with Sepapak-2 chiral stationary phase. However, only dichlorprop ($t_2 = 17.42$ min and R_s 1.39) was enantiomerically separated under these conditions. Surprisingly this pesticide was not enantiomerically resolved in any of the tested reversed phase conditions. In conclusion, reversed phase mode was selected to perform the following experiments because apart from the negative results obtained in normal phase mode it gave poor conductivities and thus it cannot be employed in CEC.

The same experiments were performed for Sepapak-4 column in reversed phase mode and the results obtained are summarized in Table 1. In this case, as with Sepapak-2, the change in the mobile phase pH did not offer significant differences for the pesticides studied. Thus, since the objective was to conduct experiments in CEC, the lowest pH was selected because for aminopropyl silica it will result in a high EOF [23] and consequently, shorter analysis time.

It has to be remarked that despite the similarities in the structures of the two CSPs evaluated, their resolution power was quite

different and Sepapak-4 enabled separating three or two more compounds (depending on the pH selected) and with higher resolutions than Sepapak-2, allowing the separation of 9 out of the 16 pesticides studied. As it can be observed, Sepapak-2 allowed to the separation of all studied compounds containing an azole group, as well as both containing a tertiary amine (metalaxyl and benalaxyl) being indicative of the potential of this CSP for the enantioseparation of this type of compounds.

Both CSPs were also evaluated using MeOH instead of water in the mobile phase. As it can be observed in Table 2, the employ of MeOH resulted in the decrease of the retention times, as well as a decrease in R_s on both for Sepapak-2 and Sepapak-4.

Due to the fact that Sepapak-4 provided the chiral resolution of a high number of compounds and the values of resolutions achieved were better, this column was selected for further experiments in nano-LC. The influence of ACN percentage in the mobile phase was studied. Since the compounds studied were highly hydrophobic, the decrease in ACN content may lead to their precipitation. To avoid these problems the following experiments were performed with a mobile phase containing MeOH instead of water although the presence of MeOH, as explained above, resulted in a decrease of resolution. The content of MeOH added was less than 40% in all the experiments because it has been previously reported in the literature that mobile phases containing 50–100% MeOH in mixtures with ACN were not successful due to unstable current during analysis [23]. Table 3 represents the results obtained for Sepapak-4 when employing different ACN proportions in the mobile phase. As it can be observed the resolving power of this column increased when increasing the percentage of ACN. The increase in the MeOH amount in the mobile phase negatively affects the enantioseparation because MeOH appears to be strong competitor for hydrogen bonding in the chiral sites of the stationary phase [22].

3.2. Comparison between nano-LC and CEC

The use of EOF as driving force in separation techniques supposes important advantages such as a plug-like flow profile, independence of the EOF of the particle size and geometry, etc. [29]. Furthermore, it is supposed that CEC experiments provide better efficiencies and resolution values. However, there is no reason to perform CEC experiments instead of nano-LC experiments unless this improvement is observed [30]. In addition, good reproducibility on retention times, areas and selectivities must also be obtained.

Due to the use of aminopropyl silica as support of the CSP, the anodic EOF is generated on the surface of silica particles. Thus, reversed polarity was used in order to obtain an adequate mobility of the studied compounds. With the aim of comparing the results obtained by nano-LC and CEC, a separation voltage of -10 kV was selected because with this voltage the retention times obtained by both techniques were quite similar.

Considering all the results described in the previous section, a 90/9/1 (v/v/v) ACN/water/ammonium formate pH 2.5 mobile phase was selected to carry out the comparison between nano-LC and CEC experiments. Fig. 3 shows as an example the separation obtained by nano-LC and CEC for the pesticides resolved under these conditions. With this mobile phase the enantiomers of eight compounds were resolved with resolutions above 0.6 and in less than 28 min (see Table 4).

Regarding the number of theoretical plates per meter, as it can be observed in Table 4, the values drastically increased with CEC (53,899–278,301 plates m^{-1}) compared with nano-LC (37,818–58,878 plates m^{-1}). This improved efficiency translates into an increase in the chiral resolution for most compounds showing the benefits of the use of the EOF as driving force compared with the use of pressure.

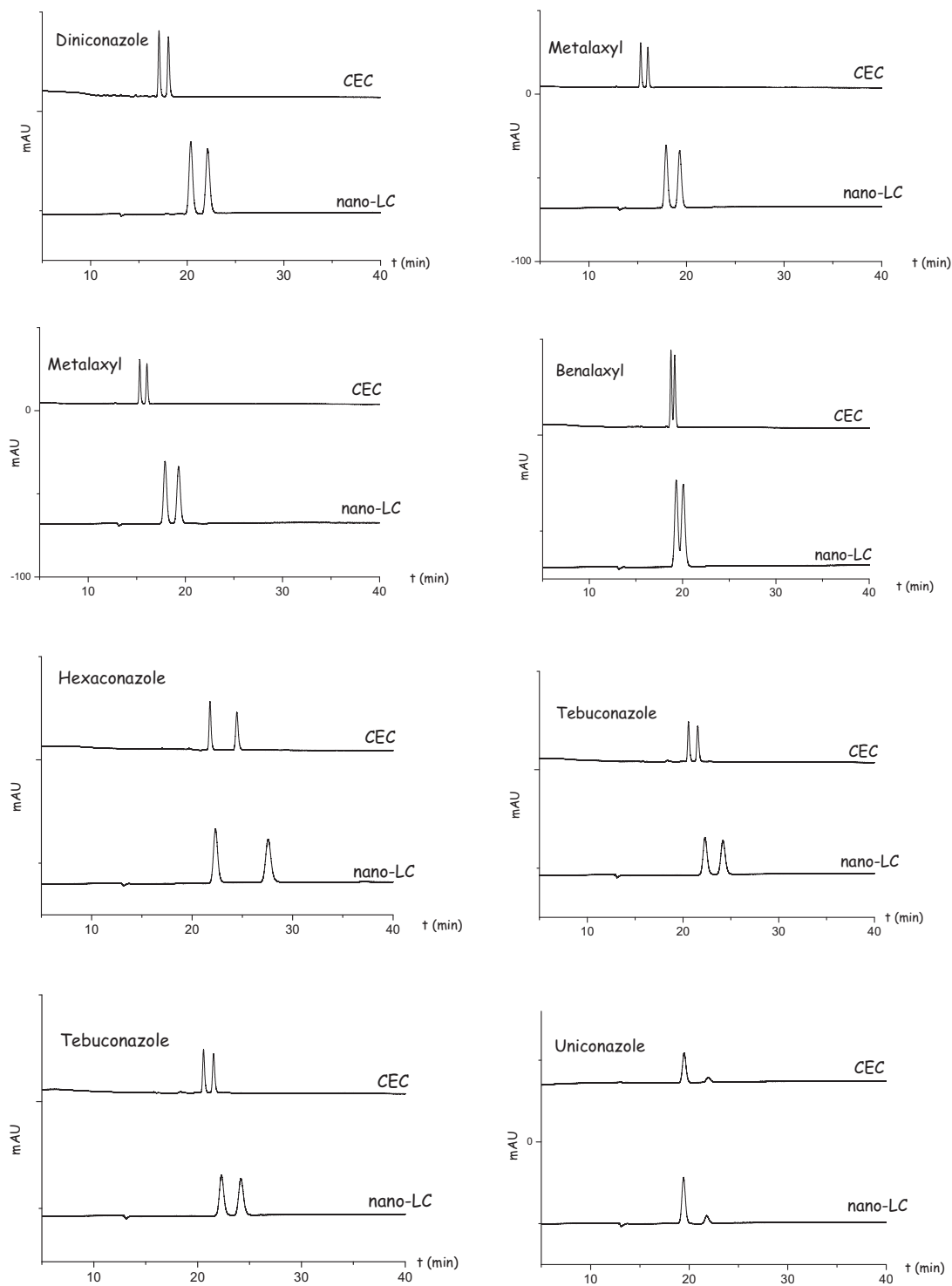


Fig. 3. Comparison of nano-LC chromatograms and CEC electrochromatograms of the enantiomerically resolved pesticides when employing Sepapak-4 chiral stationary phase. Experimental conditions: capillary, 100 μm ID with 24 cm packed and 32.5 cm total length; mobile phase or BGE, 90/9/1 (v/v/v) ACN/H₂O/500 mM Ammonium formate (pH 2.5); temperature, 25 °C; separation voltage in CEC, –10 kV with a 12 bar pressure in both inlet and outlet vials; separation pressure in nano-LC, 12 bar; injection, 10 bar \times 0.2 min of sample followed by a plug of mobile phase at 10 bar \times 0.2 min.

Table 1
Retention time and enantioresolution of selected pesticides by nano-LC using different mobile phases and with two different chiral stationary phases (Sepapak-2 and Sepapak-4).

Pesticide	AcN/H ₂ O/500 mM Ammonium formate pH 2.5 80/19/1 (v/v/v)			AcN/H ₂ O/500 mM Ammonium acetate pH 4.5 80/19/1 (v/v/v)			AcN/H ₂ O/500 mM Ammonium acetate pH 6.5 80/19/1 (v/v/v)			AcN/H ₂ O/500 mM Sodium borate pH 8.0 80/19/1 (v/v/v)		
	t ₁ (min)	t ₂ (min)	Rs	t ₁ (min)	t ₂ (min)	Rs	t ₁ (min)	t ₂ (min)	Rs	t ₁ (min)	t ₂ (min)	Rs
Sepapak-2												
λ-Cyhalothrin	19.17	–	–	17.24	–	–	17.24	–	–	17.48	–	–
β-Cyfluthrin	21.59	–	–	19.18	–	–	19.11	–	–	19.45	–	–
Cis-bifenthrin	25.62	–	–	22.51	–	–	22.44	–	–	22.95	–	–
Resmethrin	25.04	–	–	22.47	–	–	22.39	–	–	22.85	–	–
Diniconazole	21.14	22.72	1.57	20.40	22.10	1.73	20.38	22.11	1.80	20.69	22.48	1.80
Metalaxyl	16.32	17.20	1.23	16.20	17.16	1.35	16.20	17.17	1.36	16.45	47.49	1.42
Benalaxyl	19.22	–	–	19.66	–	–	19.72	–	–	20.08	–	–
Hexaconazole	21.53	25.10	3.35	23.06	27.07	3.47	23.95	28.22	3.53	24.56	29.04	3.62
Myclobutanil	21.64	–	–	23.33	–	–	24.17	24.36	0.19	25.00	25.37	0.35
Tebuconazole	21.77	22.53	0.66	23.26	24.08	0.64	24.34	25.25	0.67	25.31	26.27	0.68
Dichlorprop	41.27	–	–	21.43	–	–	12.75	–	–	11.29	–	–
Mecoprop	31.01	–	–	21.59	–	–	12.65	–	–	11.24	–	–
α-Cypermethrin	20.82	–	–	22.90	–	–	24.68	–	–	26.26	–	–
Uniconazole	18.28	20.68	2.82	19.36	22.11	2.98	20.15	23.13	3.07	20.84	24.00	3.14
Flutriafof	15.99	–	–	16.70	–	–	17.27	–	–	17.71	–	–
Fenproprathrin	19.30	–	–	21.12	–	–	22.55	–	–	23.88	–	–
Sepapak-4												
λ-Cyhalothrin	25.51	–	–	27.91	–	–	31.48	–	–	26.14	–	–
β-Cyfluthrin	28.10	–	–	30.79	–	–	35.05	–	–	28.84	–	–
Cis-bifenthrin	32.80	–	–	36.50	–	–	42.51	–	–	33.87	–	–
Resmethrin	32.94	–	–	36.51	–	–	42.24	–	–	35.00	–	–
Diniconazole	28.02	30.44	2.30	29.60	32.38	2.50	32.42	35.70	2.67	28.48	31.21	2.52
Metalaxyl	23.55	25.17	1.86	24.38	26.15	2.00	26.20	28.26	2.19	23.77	25.52	2.03
Benalaxyl	29.16	30.11	0.82	30.85	32.01	1.00	33.92	35.33	1.11	29.55	30.73	1.06
Hexaconazole	29.85	35.65	4.84	31.33	37.81	5.14	33.88	41.29	5.38	30.35	36.79	5.27
Myclobutanil	29.32	30.26	0.82	31.63	32.62	0.90	34.26	35.52	1.00	30.23	31.27	0.93
Tebuconazole	30.38	32.54	1.91	32.84	35.36	2.04	35.26	38.05	2.11	31.20	33.64	2.08
Dichlorprop	n.d.	n.d.	n.d.	60.75	61.90	0.53	24.60	25.02	0.50	15.101	–	–
Mecoprop	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	24.42	–	–	15.127	–	–
α-Cypermethrin	31.13	–	–	36.08	–	–	40.28	–	–	32.50	–	–
Uniconazole	26.04	29.27	3.19	27.96	31.69	3.42	29.39	33.44	3.56	24.47	29.94	3.57
Flutriafof	22.62	23.24	0.67	24.03	24.75	0.69	25.00	25.77	0.75	22.96	23.65	0.69
Fenproprathrin	29.48	–	–	33.28	–	–	36.45	–	–	30.125	–	–

n.d., not detected in 60 min; Rs = 1.18 (t₂ – t₁)/(w_{1/2,1} + w_{1/2,2}).

Table 2
Retention times and enantioresolutions of selected pesticides by nano-LC using AcN/MeOH/ammonium formate pH 2.5 mobile phase with Sepapak-2 and Sepapak-4 chiral stationary phases.

Pesticide	Sepapak-2			Sepapak-4				
	AcN/MeOH/ammonium formate pH 2.5 80/19/1 (v/v/v)	t ₁ (min)	t ₂ (min)	Rs	AcN/MeOH/ammonium formate pH 2.5 80/19/1 (v/v/v)	t ₁ (min)	t ₂ (min)	Rs
λ-Cyhalothrin	8.63	–	–	–	12.51	–	–	–
β-Cyfluthrin	8.74	–	–	–	12.71	–	–	–
Cis-bifenthrin	8.92	–	–	–	13.10	–	–	–
Resmethrin	9.31	–	–	–	13.67	–	–	–
Diniconazole	11.24	11.75	1.00	1.00	15.93	16.67	1.31	1.31
Metalaxyl	10.00	10.21	0.50	0.50	14.34	14.93	1.19	1.19
Benalaxyl	10.00	–	–	–	14.70	–	–	–
Hexaconazole	12.37	14.74	3.79	3.79	17.26	20.76	5.24	5.24
Myclobutanil	11.90	12.10	0.37	0.37	16.39	16.79	0.64	0.64
Tebuconazole	12.38	13.03	1.10	1.10	17.13	18.56	2.31	2.31
Dichlorprop	28.83	–	–	–	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mecoprop	21.95	–	–	–	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α-Cypermethrin	8.95	–	–	–	13.10	–	–	–
Uniconazole	10.81	11.62	1.59	1.59	15.42	16.40	1.81	1.81
Flutriafof	10.28	10.36	0.19	0.19	14.64	15.04	0.67	0.67
Fenproprathrin	8.89	–	–	–	13.01	–	–	–

3.3. Quantitative analysis of metalaxyl enantiomers in commercial agrochemical formulations by CEC

Aimed to show the potential of Sepapak-4 in CEC, metalaxyl was selected as model compound to carry out its quantification and the

determination of its enantiomeric purity in a commercial pesticide product. In order to choose the separation voltage providing the best efficiency for metalaxyl chiral separation, the Van Deemter curve for this compound was constructed in the range from –5 kV to –30 kV, employing a 90/9/1 (v/v/v) ACN/H₂O/ammonium

Table 3

Retention times and enantioresolutions of selected pesticides by nano-LC using AcN/MeOH/Ammonium formate pH 2.5 mobile phase with different proportions of AcN/MeOH in Sepapak-4 chiral stationary phase.

Pesticide	AcN/MeOH/Ammonium formate pH 2.5 60/39/1 (v/v/v)			AcN/MeOH/Ammonium formate pH 2.5 80/19/1 (v/v/v)			AcN/MeOH/Ammonium formate pH 2.5 90/9/1 (v/v/v)		
	t_1 (min)	t_2 (min)	R_s	t_1 (min)	t_2 (min)	R_s	t_1 (min)	t_2 (min)	R_s
λ -Cyhalothrin	13.08	–	–	12.51	–	–	12.39	–	–
β -Cyfluthrin	13.56	–	–	12.71	–	–	12.65	–	–
Cis-bifenthrin	14.00	–	–	13.10	–	–	12.91	–	–
Resmethrin	15.52	–	–	13.67	–	–	13.53	–	–
Diniconazole	15.34	15.75	0.67	15.93	16.67	1.31	16.91	17.95	1.71
Metalaxyl	14.75	15.03	0.56	14.34	14.93	1.19	14.65	15.59	1.83
Benalaxyl	15.24	–	–	14.70	–	–	14.70	14.90	0.44
Hexaconazole	15.87	17.58	3.03	17.26	20.76	5.24	19.02	24.39	6.77
Myclobutanil	15.94	16.31	0.62	16.39	16.79	0.64	17.37	17.83	0.66
Tebuconazole	16.01	16.83	1.49	17.13	18.56	2.31	18.83	21.03	3.03
Dichlorprop	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Mecoprop	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
α -Cypermethrin	14.12	–	–	13.10	–	–	12.94	–	–
Uniconazole	14.90	15.44	0.99	15.42	16.40	1.81	16.61	18.00	2.34
Flutriafol	14.36	14.48	0.30	14.64	15.04	0.67	15.83	16.44	1.02
Fenpropathrin	14.10	–	–	13.01	–	–	12.89	–	–

n.d., not detected in 60 min.

Table 4

Comparison of chiral separation of selected pesticides and efficiency by nano-LC and CEC in Sepapak-4 chiral stationary phase. Mobile phase: 90/9/1 (v/v/v) AcN/H₂O/ammonium formate pH 2.5.

	Nano-LC (12 bar)					CEC (–10 kV)				
	t_1	t_2	N_1/m	N_2/m	R_s	t_1	t_2	N_1/m	N_2/m	R_s
Diniconazole	20.37	22.12	53858	54562	2.38	17.08	18.05	171247	155400	2.72
Metalaxyl	17.92	19.30	57969	56278	2.17	13.78	14.67	278301	260804	2.48
Benalaxyl	19.32	20.07	58878	54420	1.07	18.75	19.15	270169	249601	1.31
Hexaconazole	22.33	27.56	53428	50800	5.81	21.78	24.45	236849	183583	6.42
Myclobutanil	21.25	21.78	37818	50454	0.63	19.97	20.27	202275	176680	0.79
Tebuconazole	22.30	24.17	53441	53029	2.27	20.57	21.54	223214	199426	2.57
Uniconazole	19.43	21.79	56336	56299	3.39	19.50	21.90	59502	58236	3.31
Flutriafol	17.86	18.46	52129	49575	0.92	17.83	18.45	56116	53899	0.94

$N/m = 5.54 (t/w_{1/2})^2 \times 100/L_c$.

formate BGE at pH 2.5, at a temperature of 25 °C, and an injection of 10 bar \times 0.2 min of sample with a plug of BGE at 10 bar \times 0.2 min. From these experiments (see supplementary material), it could be concluded that the optimum voltage, in which the number of theoretical plates was the maximum one and thus the efficiency of the separation was the best, was –10 kV so this value was chosen for the analysis.

Before carrying out the quantitative determination of metalaxyl in commercial fungicide products, the analytical characteristics of the developed method were evaluated. The results obtained are shown in Table 5.

Linearity was determined by plotting the corrected peak area as a function of the concentration of each compound in the range 5–500 mg/L referred to each enantiomer during three different days and injected by triplicate each day. Satisfactory results were obtained in terms of linearity with $R^2 > 0.99$, the intercept not different from zero, and ANOVA confirming that data fit to a linear model (p -values > 0.05).

LODs and LOQs for the two enantiomers of metalaxyl were experimentally determined using a S/N ratio equal to 3 and 10, respectively. LODs values were of 1.4 and 1.6 mg/L and LOQs were 4.6 and 5.3 mg/L for the first and the second enantiomer, respectively. RLOD calculated considering the maximum concentration of metalaxyl tested without loss on resolution (250 mg/L) and the LOD for *S*-metalaxyl (1.4 mg/L) was 0.56%. Therefore, ~0.56% *S*-metalaxyl could be detected.

Precision of the method was evaluated as instrumental repeatability and intermediate precision. Instrumental repeatability was determined from six repeated injections of two standard solutions

(5 and 100 mg/L of each enantiomer). RSD values (%) obtained for metalaxyl enantiomers were lower than 0.2% for migration times and lower than 2.8% for corrected peak areas. Intermediate precision was assessed at the same concentration levels for three consecutive days injecting each sample by triplicate. As it can be observed in Table 5 the RSD values achieved for the enantiomers of metalaxyl were from 1.8 to 2.2% and from 4.7 to 7.0% for analysis times and corrected peak areas, respectively.

The effect of matrix interferences was investigated by comparing the calibration slopes obtained by the external standard and the standard addition calibration methods. The standard additions calibration curve was obtained by spiking the commercial sample with known concentrations of racemic metalaxyl (40, 70, 100 and 130 mg/L). p -Value of t -test for comparison of two calibration lines was determined and as it can be observed in Table 5, the p -values obtained for every commercial sample were > 0.05 at a confidence level of 95%. These results demonstrated the absence of matrix interferences. Accuracy was determined as the recoveries achieved for metalaxyl. For this purpose the commercial formulation was spiked with different known concentrations of racemic metalaxyl standard solution (40, 70, 100 and 130 mg/L). The mean recoveries obtained were between 85.8 and 101.7% with average values of 94.0% for the first migrating enantiomer and 96.1% for the second migrating enantiomer with RSDs of 3.2 and 5.4%, respectively.

Finally, the method was applied to the determination of metalaxyl-M (*R*-metalaxyl) and its enantiomeric impurity in a commercial fungicide product. The determined amount of metalaxyl-M was 585 ± 4 mg/L that supposes an amount of 26% above the labeled content, which can be consequence of a non controlled

Table 5
Analytical characteristics of the CEC developed method.

Analytical characteristics	Metalaxyl							
	First enantiomer (impurity) (<i>S</i> -metalaxyl)				Second enantiomer (<i>R</i> -metalaxyl)			
Precision (RSD)								
Concentration (mg/L)	5	100		5	100		100	
Instrumental repeatability ($n=6$)								
Ac, RSD (%)	1.6	1.6		2.8	1.9		1.9	
t , RSD (%)	0.2	0.1		0.1	0.1		0.1	
Intermediate precision ($n=9$)								
Ac, RSD (%)	7.0	4.7		5.9	5.8		5.8	
t , RSD (%)	1.8	2.2		1.8	2.2		2.2	
Linearity								
Linear range (mg/L)	5–250				5–250			
Linear equation	$-0.488 + 0.488x$				$-0.717 + 0.455x$			
Standard errors	$S_a = 0.929, S_b = 0.007$				$S_a = 0.887, S_b = 0.007$			
Determination coefficient (R^2)	0.998				0.998			
p -Value of ANOVA	0.127				0.132			
Accuracy								
Concentration (mg/L)	+40	+70	+100	+130	+40	+70	+100	+130
Recovery (%)	93.4	86.5	97.8	100.2	94.0	93.3	97.3	101.5
Median Recovery (%)	94.0 ± 5.4				96.1 ± 3.2			
LOD (mg/L)	1.4				1.6			
LOQ (mg/L)	4.6				5.3			
RLOD (%)	1.4				1.6			
Study of matrix interferences								
p -Value of t -tests								
Sample 1	0.055				0.119			

$RLOD = 100 \times LOD_{min}/C_{maj}$ [28].

manufacture of the commercial product. In fact, our research group found the same results in the quantification of metalaxyl in the same samples by MEKC [31]. With respect to the enantiomeric impurity, a percentage of 3.7% of *S*-metalaxyl was found.

3.4. Analysis of tap water and soil samples

The proposed CEC method was also applied to the analysis of metalaxyl in tap water and soil samples. The samples were spiked with the commercial formulation containing metalaxyl-M at concentration of approximately 150 mg/L (in the final extract) and submitted to their corresponding sample treatment described in the experimental section. For water and soil samples three different C-18 based SPE cartridges were tested but no difference was observed among them. Fig. 4 shows the electrochromatograms corresponding to soil and tap water samples spiked with the

commercial product quantified above. As it can be observed, for the soil sample the main enantiomer (*R*-metalaxyl) is clearly identified but an interfering peak appeared close to the enantiomeric impurity (*S*-metalaxyl). On the other hand, for the tap water sample the extraction method employed was quite selective and the peaks appearing in the electrochromatogram corresponded only to the enantiomers of metalaxyl enabling to determine a concentration of 161 ± 2 mg/L for metalaxyl-M (in the final extract) and a percentage of 3.6% for *S*-metalaxyl.

4. Concluding remarks

Two novel polysaccharide-based chiral stationary phases, known as Sepapak-2 and Sepapak-4, have been evaluated for the separation of enantiomers of a group of 16 pesticides including herbicides, insecticides and fungicides. Each chiral stationary phase gave optimal results under different separation conditions reaching the chiral separation of seven pesticides on Sepapak-2 and nine pesticides on Sepapak-4. The comparison between the results obtained by CEC and nano-LC showed a clear advantage of CEC in terms of efficiency and enantioresolution power. The CEC method was applied to the determination of metalaxyl enantiomers in a commercial pesticide formulation allowing the detection of impurities up to 0.56% of *S*-metalaxyl in less than 15 min. Finally, soil and tap water samples were also analyzed previous sample treatment by SPE. Enantiomeric impurities may be easily detected in tap water samples spiked with the commercial product but an interfering peak appeared in the case of soil samples.

Acknowledgments

Authors thank the Ministry of Science and Innovation (Spain) for research project CTQ2009-09022. Authors also thank the Comunidad Autónoma de Madrid (Spain) and European funding from FEDER programme (project S2009/AGR-1464, ANALISYC-II). Virginia Pérez-Fernández thanks the Gobierno Vasco for her pre-doctoral grant.

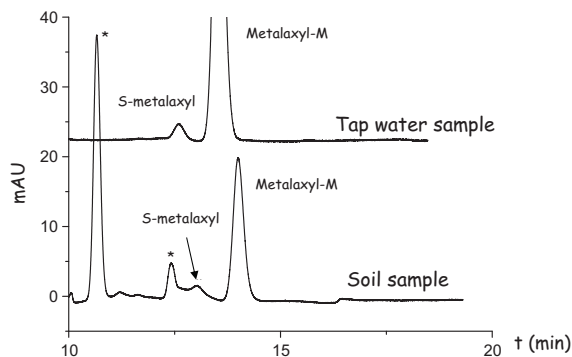


Fig. 4. Electrochromatograms obtained for tap water and soil samples spiked with the commercial product containing only metalaxyl-M at a concentration of approximately 75 mg/L (according to its label). Experimental conditions as in Fig. 3 for CEC experiments. *Unknown peaks.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chroma.2012.01.035.

References

- [1] B.S. Sekhon, *J. Pestic. Sci.* 34 (2009) 1.
- [2] J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 26 (2005) 3799.
- [3] J. Ye, M. Zhao, J. Liu, W. Liu, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 2371.
- [4] C.S. Wong, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 544.
- [5] S. Kodama, Y. Saito, S. Chinaka, A. Yamamoto, K. Hayakawa, *J. Health Sci.* 52 (2006) 489.
- [6] D.J. Fischer, A.L. Hayes, *Pestic. Sci.* 13 (1982) 330.
- [7] C. Zadra, C. Marucchini, A. Zazzeini, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5373.
- [8] C. Marucchini, C. Zadra, *Chirality* 14 (2002) 32.
- [9] E. Yashima, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 105.
- [10] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *Chem. Lett.* 4 (1993) 617.
- [11] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A* 670 (1994) 39.
- [12] B.L. He, Y. Shi, B. Kleintop, T. Raglione, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 122.
- [13] L. Zhou, C. Welch, C. Lee, X. Gong, V. Antonucci, Z. Ge, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 964.
- [14] A.A. Younes, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 414.
- [15] A.A. Younes, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 521.
- [16] L. Peng, S. Jayapalan, B. Chankvetadze, T. Farkas, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6942.
- [17] K.S.S. Dossou, P. Chiap, A.C. Servais, M. Fillet, J. Crommen, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 617.
- [18] H. Ates, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 57.
- [19] C. West, A. Bouet, I. Gillaizeau, G. Coudert, M. Lafosse, E. Lesellier, *Chirality* 22 (2010) 242.
- [20] P. Peluso, D. Fabbri, M.A. Dettori, G. Delogu, *Curr. Org. Chem.* 15 (2011) 1208.
- [21] L. Zhou, V. Antonucci, M. Biba, X. Gong, Z. Ge, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 153.
- [22] K.S.S. Dossou, P. Chiap, B. Chankvetadze, A.C. Servais, M. Fillet, J. Crommen, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1699; K.S.S. Dossou, P. Chiap, B. Chankvetadze, A.C. Servais, M. Fillet, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7450.
- [23] S. Fanali, G. D'Orazio, K. Lomsadze, B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 296.
- [24] A. Hendrickx, D. Mangelings, B. Chankvetadze, Y. Vander Heyden, *Electrophoresis* 31 (2010) 3207.
- [25] E. Domínguez-Vega, A.L. Crego, K. Lomsadze, B. Chankvetadze, M.L. Marina, *Electrophoresis* 32 (2011) 2700.
- [26] B. Chankvetadze, *Methods Mol. Biol.* 243 (2004) 387.
- [27] D. Liu, P. Wang, W. Zhou, X. Gu, Z. Chen, Z. Zhou, *Anal. Chim. Acta* 555 (2006) 210.
- [28] M. Blanco, J.M. González, E. Torras, I. Valverde, *Anal. Bioanal. Chem.* 357 (2003) 157.
- [29] B. Chankvetadze, *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, Chichester, 1997.
- [30] S. Fanali, G. DiOrazio, K. Lomsadze, S. Samakshvili, B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1166.
- [31] V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4877–4885.

CAPÍTULO VI

**SEPARACIÓN ENANTIOMÉRICA SIMULTÁNEA DE PCBs
Y SUS METABOLITOS METILSULFONADOS MEDIANTE
CROMATOGRFÍA DE GASES MULTIDIMENSIONAL
PARA LA DETERMINACIÓN DE FRACCIONES
ENANTIOMÉRICAS**

VI.1 INTRODUCCIÓN

En la Introducción de esta memoria se han descrito las características de los PCBs y de sus metabolitos metilsulfonados así como los métodos analíticos desarrollados para su determinación. En efecto, ambos tipos de compuestos son altamente persistentes y además son quirales pudiendo sus estereoisómeros poseer distinta toxicidad por lo que su determinación enantiomérica presenta un elevado interés tanto a la hora de evaluar la toxicidad real de las muestras ambientales como para investigar su metabolismo o su degradación enantioselectiva.

Existen en la bibliografía diversos trabajos que describen la separación quiral de PCBs por distintas técnicas de separación aunque la más empleada ha sido sin duda la GC (ver capítulo I de esta memoria). La gran mayoría de ellos emplean columnas derivadas de β -CDs, aunque también se ha estudiado el uso de columnas derivadas de γ -CDs o incluso la combinación de ambas [310]. Con respecto a la separación quiral de MeSO₂-PCBs, la primera separación atropisomérica para estos compuestos se llevó a cabo en el año 1998 por GC [311] y posteriormente se ha estudiado el empleo de diversas columnas derivadas de β -CDs con este fin [177]. Sin embargo, en el momento de la realización de este trabajo de investigación no existía en la bibliografía ninguna referencia relacionada con la separación quiral simultánea de estas dos familias de compuestos, lo que ha constituido uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral por el interés que presenta para entender el metabolismo de estos compuestos.

Por estas razones, en este trabajo se ha empleado la MDGC en su modo *heart-cut* para desarrollar un método analítico que permita la separación simultánea de PCBs y MeSO₂-PCBs y la posterior determinación de sus fracciones enantioméricas en muestras alimentarias. Este modo de GC, supone tal y como se ha explicado en la Introducción de esta memoria, una interesante alternativa a la GC convencional, especialmente para este tipo de compuestos en los que el número de congéneres es muy elevado y poseen una gran similitud química, lo que hace que las coeluciones entre los mismos sean

prácticamente inevitables. En este caso, en la primera dimensión se separarían todos los analitos en una columna no quiral y solo aquellas fracciones en las que estén presentes los congéneres quirales serían transferidas a la segunda columna de naturaleza quiral, de manera que por un lado se resuelvan quiralmente los analitos de interés y además, al transferir solamente pequeñas fracciones a la segunda dimensión se eviten en gran medida las interferencias y coeluciones con otros analitos. Si además, los dos sistemas cromatográficos están equipados con dos hornos independientes se puede llevar a cabo la separación en cada una de las dimensiones con distintos programas de temperatura, de manera que se mejore la capacidad de pico y se puedan emplear columnas de características muy diferentes.

VI.2 OBJETIVOS

El objetivo del trabajo de investigación recogido en este capítulo ha sido el desarrollo de una metodología analítica por MDGC en su modo *heart-cut* para la separación quiral simultánea de PCBs y sus metabolitos MeSO₂-PCBs y su posterior determinación en aceites de pescado e hígado de ternera.

Con este fin se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Optimizar las condiciones experimentales del sistema DEANS para la correcta transferencia de las fracciones separadas en la primera dimensión a la segunda.
2. Evaluar distintas columnas cromatográficas quirales derivadas de β -CDs para la separación enantiomérica de PCBs y MeSO₂-PCBs.
3. Investigar el efecto de la longitud de la columna quiral empleada en la segunda dimensión del sistema *heart-cut* MDGC sobre la separación enantiomérica obtenida para los distintos PCBs y MeSO₂-PCBs.

4. Optimizar los programas de temperatura utilizados en las dos dimensiones cromatográficas para reducir al máximo posible el tiempo de análisis sin perder la resolución obtenida en la separación enantiomérica de estos compuestos.
5. Estudiar las características analíticas del método optimizado con el fin de aplicarlo al análisis de muestras reales.
6. Aplicar el método desarrollado a la determinación de las fracciones enantioméricas de los PCBs y MeSO₂-PCBs estudiados en muestras de aceites de pescado y de hígado de ternera.

VI.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha explicado en la Introducción de esta memoria, el primer paso a la hora de trabajar en *heart-cut* MDGC es la optimización de las presiones que se deben aplicar en el dispositivo DEANS. La presión que se debe aplicar en uno u otro sentido para dirigir los analitos hacia la segunda columna o hacia el detector de la primera dimensión, depende de algunas variables experimentales como es la longitud de las columnas empleadas. Por ello, en primer lugar se determinó (mediante la inyección de isooctano) que la presión necesaria para llevar a cabo la correcta transferencia de las fracciones desde la primera a la segunda dimensión, empleando para ello una columna VF-5 de 30 m de longitud en la primera dimensión y diferentes columnas quirales en la segunda dimensión, todas ellas de 30 m de longitud, era de 30 psi.

Una vez fijado este valor, se pasó a evaluar distintas columnas quirales (Chirasil-Dex (2,3,6-tri-*O*-metil- β -CD), BGB-176 SE (20% 2,3-di-*O*-metil-6-*O*-*tert*-butildimetilsililo- β -CD) y BGB-172 (25% 2,3,6-*tert*-butildimetilsililo- β -CD)), todas ellas de 30 m de longitud, con el fin de evaluar su poder de separación quiral y obtener la separación enantiomérica del mayor número de PCBs y MeSO₂-PCBs posible. Los experimentos se realizaron empleando la misma columna VF-5 con un programa de temperatura que consistió en:

80°C (2 min), a 30°C/min hasta 185°C (3 min), a 1.9°C/min hasta 234°C (10 min), a 2.0°C/min hasta 270°C (10 min) en la primera dimensión y diferentes gradientes de temperatura, seleccionados en base a la experiencia previa del grupo de investigación en el campo de las separaciones quirales de PCBs, en la segunda dimensión [171, 312]. En las condiciones de temperatura seleccionadas como óptimas para cada una de las columnas quirales, la BGB-176SE proporcionó los mejores resultados permitiendo la separación simultánea de 6 MeSO₂-PCBs (4-MeSO₂-CB91, 5-MeSO₂-CB149, 4-MeSO₂-CB149, 5'-MeSO₂-CB132, 4'-MeSO₂-CB132 y 5'-MeSO₂-CB174) y 6 PCBs (CB45, CB91, CB95, CB136, CB149 y CB176). La columna Chirasil-Dex no resolvió quiralmente ningún metabolito aunque resolvió enantioméricamente 9 PCBs y con la columna BGB-172 únicamente se obtuvo la resolución parcial de tres de los metabolitos y de 12 PCBs. A la vista de estos resultados, y dado que la gran novedad de este trabajo es la separación quiral simultánea de PCBs y MeSO₂-PCBs, se seleccionó la combinación de columnas VF-5 en la primera dimensión y BGB-176 SE en la segunda dimensión, que es aquella que proporcionó mejores resultados para los MeSO₂-PCBs. Sin embargo, y debido al elevado punto de ebullición de los metabolitos y el relativamente bajo límite de temperatura de trabajo de las columnas quirales (< 250°C), uno de los principales inconvenientes de la configuración de columnas seleccionada era sin duda los largos tiempos de análisis obtenidos que se situaban en torno a los 600 min.

Con el fin de reducir los tiempos de análisis obtenidos en la separación quiral de los doce analitos separados, se emplearon las mismas columnas en ambas dimensiones pero de 15 m de longitud. En esas condiciones, la presión que había que aplicar al dispositivo DEANS fue de 19 psi y aunque se reducían los tiempos de análisis, se observaba que los PCBs y los MeSO₂-PCBs eluían en la segunda dimensión en dos grupos muy separados con un gran tiempo muerto entre ambos. Por ello, se cambió la parte final del programa de temperatura empleado hasta el momento en la segunda dimensión, de forma que se produjese una subida de temperatura más rápida en la parte final del cromatograma y los MeSO₂-PCBs eluyesen lo antes posible de la columna. El programa final seleccionado fue: 100°C (1 min), a 5°C/min hasta 150°C (30 min), a 0.5°C/min hasta 160°C (10 min), a

0.5°C/min hasta 172°C y a 20°C/min hasta 200°C (20 min) y con él se obtuvieron resoluciones entre 0.5 y 1.3 para los PCBs y entre 0.6 y 2.4 para los MeSO₂-PCBs, disminuyendo el tiempo de análisis de 600 min iniciales a 250 min.

Se evaluaron las características analíticas del método desarrollado en términos de LODs, repetibilidad y precisión, mostrando el potencial del mismo para su aplicación a la determinación de las fracciones enantioméricas de los doce analitos estudiados en muestras de aceites de pescado e hígado de ternera.

Finalmente, el método desarrollado se aplicó a la determinación de las fracciones enantioméricas de los doce analitos estudiados en dos muestras de aceite de pescado y una muestra de hígado de ternera. En el caso de los aceites de pescado, se detectaron al menos cuatro de los seis PCBs quirales estudiados mientras que para el hígado de ternera únicamente se detectó el CB95. Con respecto a la composición enantiomérica, los PCBs 91 y 176 mostraron un claro enriquecimiento del enantiómero que eluía en segundo lugar en el aceite de bacalao mientras que para el otro aceite, para el cual no se especificaba el tipo de pescado en el envase, se observó un ligero enriquecimiento del primer enantiómero del CB45 y del segundo enantiómero del CB136. Por su parte, los MeSO₂-PCBs se detectaron en una de las muestras de aceite de pescado y en el hígado de ternera si bien no se pudieron determinar porque se encontraban por debajo del LOD establecido para el método.

El trabajo descrito en este capítulo se realizó durante una estancia de cuatro meses en el Instituto de Química Orgánica General Manuel Lora Tamayo del CSIC (Madrid) bajo la dirección de las Doctoras María José González y Belén Gómara.

Los resultados obtenidos en este capítulo se recogen en el siguiente artículo científico:

Artículo 6

“Simultaneous enantioselective separation of polychlorinated biphenyls and their methyl sulfone metabolites by heart-cut MDGC: Determination of enantiomeric fractions in fish oils and cow liver samples”

V. Pérez-Fernández, M. Castro-Puyana, M.J. González, M.L. Marina, M.A. García, B. Gómara

Chirality 24 (2012) 577-583

Artículo Científico 6

“Simultaneous enantioselective separation of polychlorinated biphenyls and their methyl sulfone metabolites by heart-cut MDGC: Determination of enantiomeric fractions in fish oils and cow liver samples”

V. Pérez-Fernández, M. Castro-Puyana, M.J. González, M.L. Marina, M.A. García, B. Gómara

Chirality 24 (2012) 577-583

Simultaneous Enantioselective Separation of Polychlorinated Biphenyls and Their Methyl Sulfone Metabolites by Heart-Cut MDGC: Determination of Enantiomeric Fractions in Fish Oils and Cow Liver Samples

VIRGINIA PÉREZ-FERNÁNDEZ,^{1,2} MARÍA CASTRO-PUYANA,¹ MARÍA JOSÉ GONZÁLEZ,¹ MARÍA LUISA MARINA,²
MARÍA ÁNGELES GARCÍA,² AND BELÉN GÓMARA^{1*}

¹Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of General Organic Chemistry, CSIC, Madrid, Spain

²Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Alcalá, Madrid, Spain

ABSTRACT The potential of three capillary columns based on β -cyclodextrin (i.e., Chirasil-Dex, BGB-172, and BGB-176SE) has been studied for the simultaneous enantiomeric separation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and methylsulfonyl metabolites of PCBs (MeSO₂-PCBs) employing a heart-cut multidimensional gas chromatographic system (heart-cut MDGC). Among the columns studied, the BGB-176SE capillary column provided the best results, allowing the simultaneous enantioselective resolution of six MeSO₂-PCBs and six chiral PCBs; the Chirasil-Dex column did not resolve any of the studied MeSO₂-PCBs; and a poor resolution was obtained for three MeSO₂-PCBs when the BGB-172 column was employed. The developed method was successfully applied to two fish oil and one cow liver samples commercially available, which showed different enantioselective pattern. PCBs 91 and 176 presented a clear enrichment of the second eluted atropisomer in codfish oil, whereas in fish oil sample, slight enrichment of the first eluted atropisomer of CB45 and the second eluted atropisomer of CB136 were observed. *Chirality* 24:577–583, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: PCBs; MeSO₂-PCBs; metabolites; multidimensional GC; food samples

INTRODUCTION

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are synthetic organochlorinated compounds that have been commercially available since 1929.¹ Their high thermal stability and low flammability made these compounds very appropriate to be employed in transformers and capacitors. Because of their high toxicity, PCBs were banned in most countries since 1970. However, measurable levels of PCB can be found in the environment nowadays because of their high persistence and bioaccumulation through the food chain.

When xenobiotics enter a living organism, they usually form metabolites by insertion of oxygen or sulfur into their molecules.² The rate of PCB metabolism is dependent on several factors: (i) the degree of chlorination, (ii) the substitution pattern, and (iii) the levels of P-450 isozymes and other drug metabolizing enzymes in the target organism.³ Although, the metabolic products are usually more water soluble than the parent compounds and, therefore, they are supposed to be more easily excreted, sometimes these products are still very lipophilic, and they could be retained and found in some tissues.

The metabolism of PCBs results in the formation of hydroxyl PCBs (OH-PCBs) and methylsulfonyl PCBs (MeSO₂-PCBs).² The presence of methylsulfonyl metabolites in a large number of species such as humans⁴ or cetaceans^{5,6} has been reported, and in some cases, their levels are comparable with the levels of PCBs because they bind strongly to some proteins such as uteroglobin and some lung-binding proteins.³ The interest of these metabolites not only resides in their persistence but also cause several biological effects, such as induction of pulmonary distress, perturbation of the catalytic activity of xenobiotic-metabolizing enzymes, cytotoxicity, or negative effects on

reproduction.² MeSO₂-PCBs have been found in several biological samples such as maternal and cord serum samples,⁷ human liver and adipose tissues,⁸ cerebrospinal fluid and cerebellum gray matter in dolphins,⁹ blubber of whales,¹⁰ human milk,^{11,12} and human brain and lung.¹³

Only 78 PCBs, among the 209 possible congeners, exhibit axial chirality in their non-planar configurations, but only 19 of them present stable atropisomers at room temperature.¹⁴ As their parent PCBs, MeSO₂-PCBs also exhibit axial chirality if the phenyl rings have an asymmetric chlorine substitution pattern.

Whereas environmental physical and chemical processes generally affect the two enantiomers of a known compound at the same rate, biological processes may result in the enrichment of one of the enantiomers because biological macromolecules interact enantioselectively with them.¹⁵ In this sense, different biological and toxicological effects may also be induced by the different atropisomers of PCBs and MeSO₂-PCBs.^{16,17} Thus, the enantiomeric analysis of chiral PCBs and MeSO₂-PCBs may provide information about the degradation or accumulation patterns of each atropisomer through the food chains, the enzymatic degradation, and the preferential membrane transport. Moreover, taking into

Contract grant sponsor: MICINN. Contract grant number: AGL2009-09733. Contract grant sponsor: Comunidad Autónoma de Madrid (Spain) and FEDER Programme. Contract grant number: S2009/AGR-1464. ANALISYCH-II.

*Correspondence to: Belén Gómara, Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of General Organic Chemistry, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain. E-mail: bgomara@iqog.csic.es

Received for publication 18 January 2012; Accepted 28 March 2012

DOI: 10.1002/chir.22062

Published online 22 May 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

account the formation of metabolites from PCBs, it would be of great interest to determine the atropisomers of both families simultaneously.

The enantioselective analysis of PCBs and MeSO₂-PCBs may be performed using different chromatographic techniques being GC-ECD and GC-MS the most employed. The main drawback when analyzing these compounds by GC-ECD is the possible coelution between the atropisomers of interest and other compounds present in the samples or even between two or more PCBs and MeSO₂-PCBs (chiral or achiral). An alternative to solve the coelutions is the use of multidimensional techniques, such as heart-cut multidimensional gas chromatography (heart-cut MDGC), where the components are subjected to two independent separation mechanisms.¹⁸ In heart-cut MDGC, the first dimension is employed to separate all the analytes present in the sample and to select only those object of study (i.e., the chiral ones), which are transferred to the second dimension for the enantiomeric separation.¹⁹ In the second dimension, not only the enantioselective separation is performed but also possible interferences are avoided because it is very difficult that the achiral coeluting compounds in the first dimension also coelute with the chiral analytes in the second dimension.

The enantiomeric separation of chiral PCBs has been presented in several works employing cyclodextrin-modified chiral stationary phases (CSPs). Most of the papers concerning the enantioselective separation of PCBs employ CSPs based on β -cyclodextrins (β -CDs), although some works have also compared the results obtained with γ -CD-based CSPs.²⁰ The combination of CDs to improve the enantioselective resolution was also demonstrated by Magnusson *et al.*²¹ who carried out the enantioseparation of 11 PCBs by using columns containing mixed CDs.

On the other hand, the first enantioselective separation of MeSO₂-PCBs was performed in 1998 by Ellerichmann *et al.*²² At the same time, Wiberg *et al.*²³ evaluated the applicability of several CD-based capillary columns in GC for the enantioselective analysis of some methylsulfonyl metabolites. However, to our knowledge, the simultaneous enantioselective separation of PCBs and MeSO₂-PCBs by heart-cut MDGC has not been reported yet.

The aim of this work was to develop a multidimensional chromatographic method using the heart-cut technique with chiral columns as second dimension to separate the atropisomers of chiral PCBs and MeSO₂-PCBs simultaneously. The method is applied to the determination of enantiomeric fractions (EFs) of the target chiral compounds in fish oil and cow liver samples. For this purpose, the potential of several chiral columns in the second dimension of the MDGC has been studied, and the most adequate temperature program has been fixed in order to reduce the analysis times as much as possible without losing enantiomeric resolution.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Samples

The standards of PCBs (numbers 45, 91, 95, 136, 149, and 176) and MeSO₂-PCBs were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) and Accustandard (New Haven, CT, USA), respectively. Table 1 summarizes the different MeSO₂-PCB congeners determined, the abbreviations employed in this article, and their chemical structure. The names

TABLE 1. Abbreviation and chemical structure of the different MeSO₂-metabolites investigated in this study

Abbreviation	Structure
5-MeSO ₂ -CB91	3-Methylsulfonyl-2,2,4,5,6-pentachlorobiphenyl
4-MeSO ₂ -CB91	4-Methylsulfonyl-2,2,3,4,6-pentachlorobiphenyl
3'-MeSO ₂ -CB95	3-Methylsulfonyl-2,2,3,5,6-pentachlorobiphenyl
4'-MeSO ₂ -CB95	4-Methylsulfonyl-2,2,3,5,6-pentachlorobiphenyl
5'-MeSO ₂ -CB132	3-Methylsulfonyl-2,2,3,4,5,6-hexachlorobiphenyl
4'-MeSO ₂ -CB132	4-Methylsulfonyl-2,2,3,3,4,6-hexachlorobiphenyl
5-MeSO ₂ -CB149	3-Methylsulfonyl-2,2,4,4,5,6-hexachlorobiphenyl
4-MeSO ₂ -CB149	4-Methylsulfonyl-2,2,3,4,5,6-hexachlorobiphenyl
5'-MeSO ₂ -CB174	3-Methylsulfonyl-2,2,3,4,5,5,6-heptachlorobiphenyl
4'-MeSO ₂ -CB174	4-Methylsulfonyl-2,2,3,3,4,4,5,6-heptachlorobiphenyl

employed for the metabolites are according to Letcher *et al.*,² which are an extension of the system applied for PCBs by Ballschmitter and Zell.²⁴

All the solvents used for sample preparation were of trace analysis grade. Isooctane, acetone, and dichloromethane (Pestipur[®] grade) were provided by SDS (Peypin, France) and hexane (SupraSol[®]), silica gel, and sulfuric acid by MERCK (Darmstadt, Germany). Anhydrous sodium sulfate was purchased from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands) and dimethyl sulfoxide (DMSO) from Sharlau (Barcelona, Spain).

Commercial samples of fish oil pills (enriched with omega 3), one of them of cod fish oil and the other not specified fish oil, and one liver sample were acquired in herbariums and local supermarket in Madrid (Spain), respectively.

Sample Preparation

Samples were extracted employing a method previously described²⁵ with slight modifications. Approximately 0.5 g of fish oil was dissolved in 5 ml of hexane, mixed with anhydrous DMSO (1 ml), vortexed (10 min), and centrifuged (6 min, 3000 rpm). The DMSO fraction was re-extracted with hexane (2 ml), vortexed (3 min), and centrifuged (6 min, 3000 rpm). The resulting hexane fractions were combined. With this process, PCBs were extracted from the oil sample in the hexane fraction, and MeSO₂-PCBs remained in the DMSO fraction. To re-extract the metabolites from the DMSO fraction, 1.5 ml of cold water were carefully added and the tube was submerged in an ice bath to avoid warming. This mixture was extracted with hexane (4 ml), vortexed (5 min), and centrifuged (6 min, 3000 rpm). The DMSO fraction was re-extracted with hexane (3 ml).

The fraction containing PCBs was purified in a column containing 10 g of activated silica gel modified with sulfuric acid (44% H₂SO₄). The column was conditioned with 30 ml of hexane, and after sample loading, PCBs were eluted with 30 ml hexane.

The fraction containing MeSO₂-PCBs was subjected to a multilayer column that consisted of 0.1 g of activated silica gel, 0.4 g of activated silica gel modified with potassium hydroxide (56% KOH), and 0.8 g of activated silica gel modified with H₂SO₄ (44%). This column was conditioned with 8 ml of hexane/dichloromethane (2:1, v/v). After sample loading, the column was first washed with 8 ml hexane/dichloromethane (2:1, v/v); this fraction was discarded; and finally, the MeSO₂-PCBs were eluted with dichloromethane (25 ml).

Both PCBs and MeSO₂-PCBs fractions were combined, and the solvent was changed to isooctane and reduced to 50 μ l prior to analysis by heart-cut MDGC.

For the liver sample analysis, a previous extraction of the lipids from the sample was performed by matrix solid phase dispersion. Briefly, 3 g of freeze-dried sample was homogenized with 25 g anhydrous sodium sulfate. The mixture was ground until a fine powder was obtained, and then it was loaded in a column and extracted with acetone/hexane (1:1, v/v). The extract was evaporated to dryness and reconstituted in 5 ml of hexane. Afterwards, this fraction was subjected to the same protocol explained earlier.

Simultaneously, and because MeSO₂-PCBs are present in real samples at very low concentrations, a replicate of each sample was prepared, spiking the samples with a mixture containing the six chiral MeSO₂-PCBs in order to obtain a final concentration of ca. 10 µg µl⁻¹.

Blank samples were analyzed to identify possible contamination throughout the analytical procedure, and no background interference was found. The recovery of the sample preparation procedure was evaluated with a standard solution (containing 26 PCBs and 21 MeSO₂-PCBs) that was subjected to the whole process. The recovery values obtained for PCBs ranged from 70% (for CB126) to 101% (for CB153), except for PCBs 28 and 77 for which the values were around 55%. Regarding MeSO₂-PCBs, the recoveries were slightly lower, with values from 46% to 107%.

Apparatus

Capillary columns. For heart-cut MDGC analyses, two VF-5 columns of 15 and 30 m (5% phenyl methylpolysiloxane, 0.25 mm ID, 0.25 µm film thicknesses, Varian Middelburg, The Netherlands) were employed as achiral column in the first dimension. Several CSPs based on β-CD were used for the enantioselective separation in the second dimension, namely, BGB-176SE (20% 2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-β-CD diluted in SE-52, 5% phenyl methylpolysiloxane) (15 m and 30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness, BGB Analytic, Schlossböckelheim, Germany), BGB-172 (25% 2,3,6-*tert*-butyldimethylsilyl-β-CD diluted in PS086, 15% phenyl methylpolysiloxane) (30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness, BGB Analytic), and Chirasil-Dex (2,3,6-tri-*O*-methyl-β-CD chemically bonded to polysiloxane) (30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness, Astec, NJ, USA). Using these columns, we tested different column length combinations: 15–15 m (being a 15-m column in the first and second dimensions) and 30–30 m (having both columns of 30 m length).

Heart-cut MDGC. The chromatographic configuration employed consisted of two GC systems (CP3800, Varian, CA, USA), each one equipped with an independent oven and an ECD. The two chromatographs were connected by an in-house pneumatically controlled three-piece valve (DEANS switching system, composed of three Valco T-valves), placed in the first oven, and a transfer line that connected the DEANS system with the second dimension column located in the second chromatograph. Two independent electronic pressure control units regulated the pressure at the column inlet and the DEANS system. These pressures were carefully set to allow the correct transfer of the selected fractions and the adequate peak shape in the first column. In this work, the appropriate pressure applied to the DEANS valve was found to be 19 psi, when a 15–15 m configuration was employed and 30 psi when a 30–30 m configuration was selected. Nitrogen was used as carrier gas at 25 psi (head pressure) in the first configuration and at 40 psi in the second configuration. The transfer line temperature was set at 300 °C.

Injections of 4 µl were performed in programmable temperature vaporization mode (100 °C hold 0.2 min, 300 °C at 200 °C min⁻¹ and hold 20 min; splitless time 2.0 min) employing an automatic injector (CP-8410 Autosampler, Varian).

Regarding the ECDs, the temperatures were 300 °C for the achiral (first) dimension and 250 °C for the chiral (second) dimension, and nitrogen was used as make-up gas at a flow of 30 ml min⁻¹.

Data Treatment

The values of areas and retention times were acquired using Workstation 5.52 software (Varian). Enantioselective resolutions were determined according to eq. 1.

$$R_s = 1.18 \frac{t_2 - t_1}{W_{1/2(1)} + W_{1/2(2)}} \quad (1)$$

where t_1 and t_2 correspond to the retention time of the first and second eluting enantiomers, respectively, and $W_{1/2}$ to the peak width at the half height.

The enantiomeric enrichment may be expressed by three different parameters: the enantiomeric ratio (ER), the EF, and the enantiomeric excess (EE). However, EF is preferred because whereas for ER the values can go from zero to infinity and for EE from 0% to 100%, EF can only range from 0 to 1.0, being 0.5 the value corresponding to a racemic mixture.²⁶ The EF values were calculated according to eq. 2.

$$EF = \frac{A_1}{A_1 + A_2} \quad (2)$$

where A_1 and A_2 correspond to the area of the first and second eluting enantiomer, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection of the Capillary Columns: Simultaneous Enantiomeric Separation of PCBs and MeSO₂-PCBs in β-CD-Based Columns

As mentioned earlier, β-CD-based capillary columns have shown a powerful capacity for resolving the atropisomers of chiral PCBs. In a previous work,²⁷ the usefulness of several chiral columns was demonstrated for the enantiomeric separation of PCBs. The Chirasil-Dex column provided the separation of nine chiral congeners (PCBs 84, 91, 95, 132, 135, 136, 149, 174, and 176), the BGB-176SE column was found to resolve the atropisomers of six PCB congeners (PCBs 45, 91, 95, 136, 149, and 176), and the BGB-172 column allowed the enantioselective separation of 12 congeners (PCBs 45, 84, 91, 131, 132, 135, 144, 149, 171, 174, 175, and 183). In the present study, the potential of these three capillary columns was evaluated for the simultaneous separation of chiral PCBs and 10 chiral MeSO₂-PCB metabolites (5-MeSO₂-CB91, 3'-MeSO₂-CB95, 5'-MeSO₂-CB132, 5-MeSO₂-CB149, 5'-MeSO₂-CB174, 4-MeSO₂-CB91, 4'-MeSO₂-CB95, 4'-MeSO₂-CB132, 4-MeSO₂-CB149, and 4'-MeSO₂-CB174) by using a VF-5 column in the first dimension. The length of all columns in the preliminary assays was 30 m, and the temperature program for the first dimension was always the same, selected according to the results obtained in previous works for PCBs²⁸: 80 °C (2 min), at 30 °C min⁻¹ to 185 °C (3 min), at 1.9 °C min⁻¹ to 234 °C (25 min), and at 2.0 °C min⁻¹ to 270 °C (10 min).

Using this kind of columns, the initial temperature programs employed in the second dimension were selected following the conditions described previously for the enantioselective separation of PCBs.^{27,28} In order to maintain the enantioselective resolution for PCBs and to achieve the best resolution for MeSO₂-PCB metabolites, different temperature programs were tested. Finally, for the Chirasil-Dex column, the temperature program chosen was as follows: 100 °C (1 min), at 5 °C min⁻¹ to 160 °C (30 min), at 1 °C min⁻¹ to 170 °C (10 min), at 1 °C min⁻¹ to 180 °C (70 min), and at 5 °C min⁻¹ to 225 °C (5 min). For the BGB-172 column, the most adequate temperature program was as follows: 100 °C (1 min), at 5 °C min⁻¹ to 200 (30 min) and at 0.5 °C min⁻¹ to 230 °C (30 min). For the BGB-176SE column, the second oven was ramped from 100 °C (1 min), at 5 °C min⁻¹ to 150 °C (30 min), at 0.5 °C min⁻¹ to 160 °C (10 min), at 1 °C min⁻¹ to 180 °C (70 min), and at 5 °C min⁻¹ to 225 °C (5 min). The best results were achieved using the BGB-176SE column, which enabled the enantiomeric separation of six MeSO₂-PCB metabolites (4-MeSO₂-CB91, 5-MeSO₂-CB149, 4-MeSO₂-CB149, 5'-MeSO₂-CB132, 4'-MeSO₂-CB132, and 5'-MeSO₂-CB174) as well as the separation of six chiral PCBs (PCBs 45, 91, 95, 136, 149, and 176) whose separation using this column has been previously reported.^{27,28} Using this column, we achieved the total separation of the enantiomers of all PCBs and MeSO₂-CBs,

except for CB149, CB176, and 5'-MeSO₂-CB132, for which only partial resolution was obtained, as can be observed in Table 2. On the other hand, using the Chirasil-Dex column, a really poor separation was obtained of all the metabolites studied and using the BGB-172 column only 4'-MeSO₂-CB132, 5-MeSO₂-CB149 and 4'-MeSO₂-CB174 were partially resolved. Therefore, BGB-176SE was selected as the most adequate quiral column for the simultaneous enantiomeric separation of PCBs and MeSO₂-PCBs.

Because of the high boiling points of MeSO₂-PCBs and the limited maximum temperature of chiral columns (lower than 250 °C), the total analysis times were quite long. For this reason, shorter columns (15 m) were tested in both dimensions with the aim of reducing the analysis times without losing enantioselective resolution. The reduction in the dimension of the BGB-176SE column resulted in a 2.3-fold decrease of the analysis times (from 600 min, approximately, to 250 min using the final conditions). In conclusion, a VF-5-BGB-176SE (15–15 m) configuration was selected as the optimum.

Using the 15–15-m configuration, the temperature program in the second dimension were re-optimized in order to achieve the best resolution and shorter analysis time for both PCBs and MeSO₂-PCBs. Because of the differences in the boiling points of PCBs and the MeSO₂-PCBs, the two families elute clearly separated in the second dimension existing an important time gap between both families. In order to maintain the enantioselective resolution achieved for PCBs and reduce the retention time of MeSO₂-PCBs, the final part of the temperature program was modified by employing a faster temperature ramp at the end of the second oven program. Thus, the final temperature program in second dimension was as follows: 100 °C (1 min), at 5 °C min⁻¹ to 150 °C (30 min), at 0.5 °C min⁻¹ to 160 °C (10 min), at 0.5 °C min⁻¹ to 172 °C, and at 20 °C min⁻¹ to 200 °C (20 min). Higher final temperature results in an increase of the background level for the last eluted atropisomers, and for this reason, a maximum temperature of 200 °C was set. Under these conditions, the analysis time was reduced in ca. 30 min, and the resolutions values were maintained as it can be observed in Table 2 (values ranging from 0.5 to 1.3 for PCBs and from 0.6 to 2.4 for MeSO₂-PCBs, being these values of 0.5–1.2 and 0.6–2.6 for PCBs and MeSO₂-PCBs, respectively, when initial conditions were employed). Figure 1 shows the chromatogram corresponding to the enantioselective separation of six PCBs and six MeSO₂-PCBs using the final conditions described earlier.

Analytical Characterization of the Heart-Cut MDGC System for the Simultaneous Determination of PCBs and MeSO₂-PCBs

After optimizing the separation conditions, the repeatability of the developed method (VF-5/BGB-176SE 15–15-m column configuration) was studied considering areas and retention times for both first and second dimensions as well as the EFs in the second dimension. The results obtained have been summarized in Table 2. The relative standard deviation (RSD, %) was calculated from the data of three consecutive injections of a sample containing 10 pg μl⁻¹ of each chiral PCB congener and MeSO₂-PCB metabolite. As it can be observed in Table 2, the RSD values, in both dimensions, were lower than 0.06% and 9.2% for retention times and areas, respectively. Besides, the RSD obtained for EF in the second dimension range between 0.1% and 2.4%.

Chirality DOI 10.1002/chir

TABLE 2. Analytical characteristics of the developed heart-cut MDGC method in terms of repeatability (RSD, %, *n* = 3), intermediate precision (RSD, %, *n* = 4), and limits of detection (LOD)

	Repeatability (RSD, %, <i>n</i> = 3)						Intermediate precision (RSD, %, <i>n</i> = 4)						LOD (pg μl ⁻¹)		Rs	
	1st dimension			2nd dimension			1st dimension			2nd dimension			1st dimension	2nd dimension		
	Area	<i>t_R</i>	EF	1st enantiomer		2nd enantiomer		Area	<i>t_R</i>	EF	1st enantiomer		2nd enantiomer			
				Area	<i>t_R</i>	Area	<i>t_R</i>				Area	<i>t_R</i>	Area	<i>t_R</i>		
CB45	3.8	0.03	0.6	5.4	0.03	0.6	5.2	0.09	3.9	0.07	9.0	0.08	0.56	1.30	1.08	1.28
CB91	3.5	0.01	0.7	5.4	0.02	0.7	5.3	0.10	9.4	0.06	8.9	0.06	0.053	1.38	1.43	1.15
CB95	3.8	0.04	1.2	3.8	0.04	1.2	2.4	0.09	8.5	0.05	9.4	0.08	0.044	1.25	1.20	1.28
CB136	2.0	0.06	0.8	4.6	0.03	0.8	6.7	0.07	9.2	0.05	7.1	0.09	0.054	1.47	1.45	1.05
CB149	3.8	0.03	1.0	4.0	0.01	1.0	4.8	0.10	7.6	0.07	6.3	0.03	0.048	1.20	1.03	0.64
CB176	3.4	0.06	0.7	2.7	0.02	0.7	3.8	0.06	8.6	0.06	9.8	0.04	0.044	0.87	0.85	0.50
4-MeSO ₂ -CB91	4.7	0.02	0.7	5.0	0.04	0.7	5.8	0.09	7.3	0.03	7.2	0.06	0.040	3.30	3.28	1.88
5-MeSO ₂ -CB149	4.3	0.01	0.6	5.8	0.02	0.6	6.3	0.11	4.5	0.05	3.5	0.04	0.085	1.39	1.34	1.58
4-MeSO ₂ -CB149	4.1	0.03	2.4	7.5	0.02	2.4	5.4	0.13	4.8	0.07	4.3	0.03	0.077	1.61	1.57	2.39
5'-MeSO ₂ -CB132	3.9	0.06	1.4	8.3	0.06	1.4	6.6	0.14	4.8	0.08	4.2	0.06	1.29	1.29	1.41	0.57
4'-MeSO ₂ -CB132	2.7	0.05	0.1	8.3	0.04	0.1	7.8	0.12	12.0	0.06	2.5	0.10	0.085	1.86	1.46	1.52
5'-MeSO ₂ -CB174	3.9	0.06	0.8	2.6	0.02	0.8	5.6	0.11	6.1	0.10	4.5	0.11	0.066	1.18	1.07	2.35

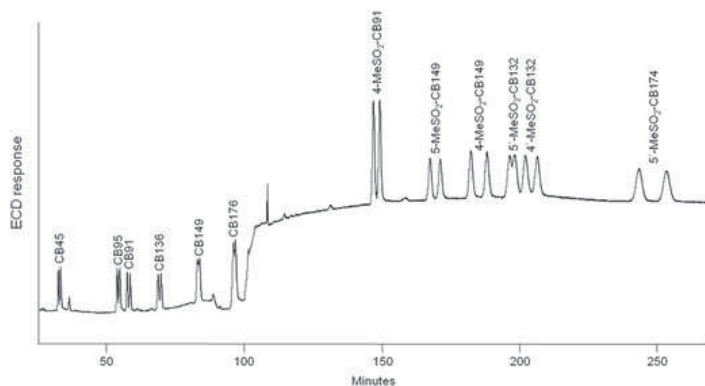


Fig. 1. Second-dimension chromatogram corresponding to the chiral separation of a standard solution containing 100 $\mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$ of each selected chiral PCBs and MeSO₂-PCBs by heart-cut MDGC, employing a VF-5/BGB-176SE column configuration. Temperature programs employed are as follows. First dimension: 80 °C (2 min), at 30 °C min^{-1} to 185 °C (3 min), at 1.9 °C min^{-1} to 234 °C (25 min), and at 2.0 °C min^{-1} to 270 °C (10 min). Second dimension: 100 °C (1 min), at 5 °C min^{-1} to 150 °C (30 min), at 0.5 °C min^{-1} to 160 °C (10 min), at 0.5 °C min^{-1} to 172 °C, and at 20 °C min^{-1} to 200 °C (20 min).

The intermediate precision was also determined by analyzing the same solution on 4 days over two different weeks ($n = 4$). RSD values were lower than 0.14% and 9.8% for retention times and areas, respectively, with the exception of 4-MeSO₂-CB132 for which the RSD value was 12% for areas. For EF, the RSD values obtained were lower than 5.4%.

Finally, the method sensitivity was evaluated as the limit of detection (LOD), which was calculated as a signal-to-noise ratio equal to 3. The LOD of the studied congeners in the first dimension ranged between 0.040 and 0.085 $\mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$ and varied from 0.85 to 3.30 $\mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$ for the atropisomers in the second dimension. The values for each analyte are shown in Table 2.

In addition, possible cross-coelutions were checked in order to evaluate that no coeluting compounds, from different cuts, were affecting the resolution of the enantiomers and compromising the EF values when multiple transfers per run were carried out. As it can be observed in Figure 1, there was no cross-coelution among the chiral compounds investigated when they were transferred to the second dimension in the same chromatographic run. Besides, other possible cross-coelutions were checked (results not shown) by using standards solutions containing the chiral analytes among with the most abundant PCB congeners and several MeSO₂-PCBs that used to be present in real samples, and no coelutions were found in this sense.

Enantiomeric Separation of Chiral PCBs and MeSO₂-PCBs by Heart-Cut MDGC in Fish Oil and Cow Liver Samples: Determination of EFs

The applicability of the developed method was evaluated by analyzing the six chiral PCBs and the six chiral MeSO₂-PCBs in two fish oils and in a cow liver sample. The samples were extracted according to the protocol described in Sample preparation.

Figure 2 represents the EF values determined for PCBs in standard solutions (containing 10 $\mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$ of each compound) and in the real samples analyzed. As it can be observed in this graphic, all the PCB congeners studied, except CB45, are present in codfish oil in which PCBs 95, 136, and 149 showed a racemic composition (EF equal to the standard) whereas a clear enrichment of the second eluted atropisomer (EF < 0.5) was observed for PCBs 91 and 176. In the case of fish oil, the congeners detected were PCBs 45, 95, 136, and 149. Whereas

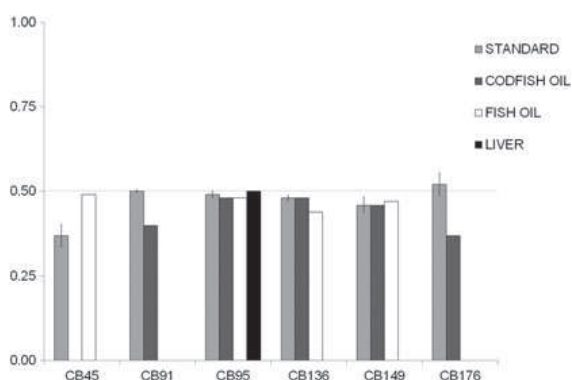


Fig. 2. Profile of the enantiomeric fractions determined for PCBs in standard solution, codfish oil, fish oil, and cow liver samples.

the EF for CB95 and CB149 is similar to the standard, for CB45, a slight enrichment of the first eluting atropisomer is observed ($\text{EF}_{\text{sample}} > \text{EF}_{\text{standard}}$), and for CB136, the opposite behavior was found. Finally, for cow liver, only the racemic presence of CB95 can be assured. Figure 3 shows the chromatograms corresponding to the second dimension after the heart-cuts realized for each sample in order to determine the EF of CB95. As the individual atropisomers were not commercially available, it was not possible to assign the two peaks so that "a" is used to appoint the least retained atropisomer and "b" the most retained one.

The MeSO₂-PCBs could only be observed in the codfish oil, for which some of the atropisomers could be observed providing signals below the limit of quantification (LOQ). For this reason, the real samples were spiked with a standard solution containing the six chiral MeSO₂-PCBs to prove that the sample preparation method and the chromatographic method were suitable for the determination of these chiral compounds when a real matrix is present. Figure 4 represents the second dimension chromatograms obtained for a codfish oil sample spiked with 10 $\mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$ of each chiral MeSO₂-PCBs and for the same sample without spiking. Those atropisomers that can be observed in the codfish oil below the LOQ have been pointed with an asterisk.

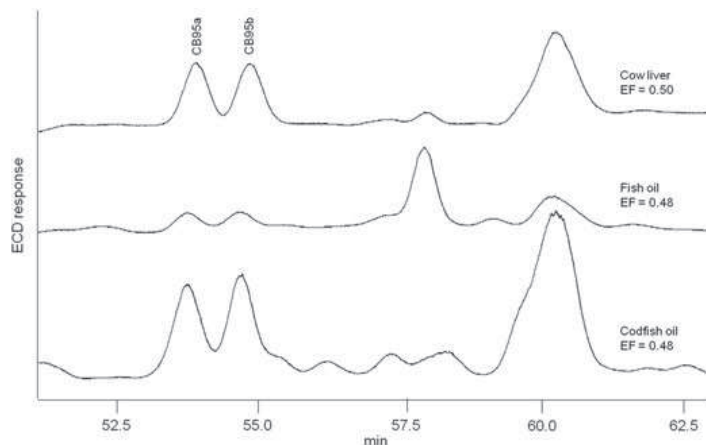


Fig. 3. Chromatogram obtained for the enantiomeric separation of CB95 in cow liver, fish oil, and codfish oil in the second dimension.

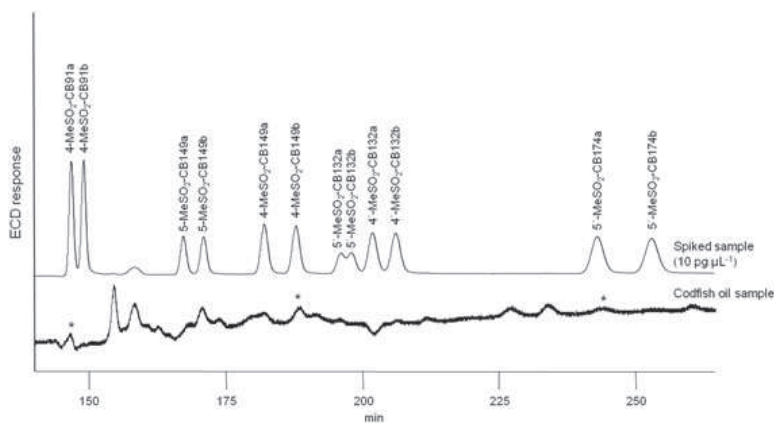


Fig. 4. Chromatogram corresponding to the MeSO₂-PCB extracted from codfish oil spiked with 10 µg µL⁻¹ and without spiking.

CONCLUSIONS

An enantioselective method for the simultaneous separation of PCBs and their methyl sulfone metabolites by heart-cut MDGC is presented for the first time. After testing different chiral columns and temperature programs, we achieved the simultaneous enantioseparation of six PCBs the simultaneous enantioseparation of six PCBs and six MeSO₂-PCBs was achieved by employing a column configuration consisting of a VF-5 column in the first dimension and a BGB-176SE chiral column in the second dimension. The method was characterized in terms of repeatability, intermediate precision, and limits of detection, and satisfactory results were obtained for areas, retention times, and EFs. The developed methodology was successfully applied to the determination of EFs of the 12 selected analytes in two fish oils and a cow liver sample. CB95 was the main chiral congener in the studied samples, and no enantioselective enrichment was observed for it in the analyzed samples. Other chiral PCBs were found in oils but not in liver samples. The low MeSO₂-PCB concentrations in real samples did not allow the calculation of the EFs.

Chirality DOI 10.1002/chir

ACKNOWLEDGMENTS

V. Pérez-Fernández thanks the Gobierno Vasco for her research grant. The authors also thank the Unidad Asociada University of Alcalá-CSIC.

LITERATURE CITED

- Schechter A, Stanley J, Boggess K, Masuda Y, Mes J, Wolff M, Fürst P, Fürst C, Wilson-Yang K, Chisholm B. Polychlorinated biphenyl levels in the tissues of exposed and nonexposed humans. *Environ Health Perspect Suppl* 1994;102:149–158.
- Letcher RJ, Klasson-Wehler E, Bergman A. *The handbook of environmental chemistry*. Berlin: Springer; 2000. p 315–359.
- Safe S. Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: progress and problems. *Health Perspect* 1992;100:259–268.
- Norén K, Weistrand C, Karpe F. Distribution of PCB congeners, DDE, hexachlorobenzene, and methylsulfonyl metabolites of PCB and DDE among various fractions of human blood plasma. *Arch Environ Contam Toxicol* 1999;37:408–414.

5. Troisi GM, Haraguchi K, Simmonds MP, Mason CF. Methyl sulphone metabolites of polychlorinated biphenyls (PCBs) in cetaceans from the Irish and the Aegean Seas. *Arch Environ Contam Toxicol* 1998;35:121–128.
6. Chu S, Covaci A, Haraguchi K, Voorspoels S, Van De Vijver K, Das K, Bouqueneau JM, De Coen W, Blust R, Schepens P. Levels and enantiomeric signatures of methyl sulfonyl PCB and DDE metabolites in livers of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) from the southern North Sea. *Environ Sci Technol* 2003;37:4573–4578.
7. Linderholm L, Park JS, Kocan A, Trnovec T, Athanasiadou M, Bergman Å, Hertz-Picciotto I. Maternal and cord serum exposure to PCB and DDE methyl sulfone metabolites in eastern Slovakia. *Chemosphere* 2007;69:403–410.
8. Guvenius DM, Hassanzadeh P, Bergman Å, Norén K. Metabolites of polychlorinated biphenyls in human liver and adipose tissue. *Environ Toxicol Chem* 2002;21:2264–2269.
9. Montie EW, Reddy CM, Gebbink WA, Touhey KE, Hahn ME, Letcher RJ. Organohalogen contaminants and metabolites in cerebrospinal fluid and cerebellum gray matter in short-beaked common dolphins and Atlantic white-sided dolphins from the western North Atlantic. *Environ Pollut* 2009;157:2345–2358.
10. Hoekstra P, Letcher RJ, O'Hara TM, Backus SM, Soloman KR, Muir DCG. Hydroxylated and methylsulfone-containing metabolites of polychlorinated biphenyls in the plasma and blubber of bowhead whales (*Balaena mysticetus*). *Environ Toxicol Chem* 2003;22:2650–2658.
11. Lundén K, Pettersson Å, Bergman Å. Methylsulfonyl metabolites of PCBs and DDE in human milk in Sweden, 1972–1992. *Environ Health Perspect* 1996;104:766–772.
12. Newsome WH, Davies D. Determination of PCB metabolites in Canadian human milk. *Chemosphere* 1996;33:559–565.
13. Chu S, Covaci A, Jacobs W, Haraguchi K, Schepens P. Distribution of methyl sulfone metabolites of polychlorinated biphenyls and *p,p*-DDE in human tissues. *Environ Health Perspect* 2003;111:1222–1227.
14. Kaiser KLE. Optical-activity of polychlorinated biphenyls. *Environ Pollut* 1974;7:93–101.
15. Buser HR, Muller MD, Rappe C. Enantioselective determination of chlordanes components using chiral high-resolution gas-chromatography mass-spectrometry with application to environmental-samples. *Environ Sci Technol* 1992;26:1533–1540.
16. Pittmann M, Mannschreck A, Oesch F, Robertson L. Chiral effects in the induction of drug-metabolizing-enzymes using synthetic atropisomers of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Biochem Pharmacol* 1989;38:1345–1352.
17. Lehmler HJ, Harrad SJ, Hühnerfuss H, Kania-Korwel I, Lee CM, Lu Z, Wong CS. Chiral polychlorinated biphenyl transport, metabolism, and distribution: a review. *Environ Sci Technol* 2010;44:2757–2766.
18. Marriott PJ, Haglund P, Ong RCY. A review of environmental toxicant analysis by using multidimensional gas chromatography and comprehensive GC. *Clin Chim Acta* 2003;328:1–19.
19. Deans DR. Use of heart cutting in gas-chromatography—a review. *J Chromatogr* 1981;203:19–28.
20. Wong CS, Garrison AW. Enantiomer separation of polychlorinated biphenyl atropisomers and polychlorinated biphenyl retention behavior on modified cyclodextrin capillary gas chromatography columns. *J Chromatogr A* 2000;866:213–220.
21. Magnusson J, Blomberg LG, Claude S, Tabacchi R, Saxer A, Schürch S. Gas chromatographic enantiomer separation of atropisomeric PCBs using modified cyclodextrins as chiral phases. *J High Resolut Chrom* 2000;23:619–627.
22. Ellerichmann T, Bergman Å, Franke S, Hühnerfuss H, Jakobsson E, Knig W, Larsson C. Gas chromatographic enantiomer separations of chiral PCB methyl sulfons and identification of selectively retained enantiomers in human liver. *Fresenius Environ Bull* 1998;7:244–257.
23. Wiberg K, Letcher R, Sandau C, Duffe J, Norstrom R, Haglund P, Bidleman T. Enantioselective gas chromatography mass spectrometry of methylsulfonyl PCBs with application to arctic marine mammals. *Anal Chem* 1998;70:3845–3852.
24. Ballschmiter K, Zell AM. Analysis of polychlorinated-biphenyls (PCB) by glass-capillary gas-chromatography—composition of technical arochlor-PCB and clophen-PCB mixtures. *Fresenius Z Anal Chem* 1980;302:20–31.
25. Hovander L, Linderholm L, Athanasiadou M, Athanassiadis I, Bignert A, Fångström B, Kocan A, Petrik J, Trnovec T, Bergman Å. Levels of PCBs and their metabolites in the serum of residents of a highly contaminated area in eastern Slovakia. *Environ Sci Technol* 2006;40:3696–3703.
26. Harner T, Wiberg K, Norstrom R. Enantiomer fractions are preferred to enantiomer ratios for describing chiral signatures in environmental analysis. *Environ Sci Technol* 2000;34:218–220.
27. Bordajandi LR, Korytár P, De Boer J, González MJ. Enantiomeric separation of chiral polychlorinated biphenyls on beta-cyclodextrin capillary columns by means of heart-cut multidimensional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography. Application to food samples. *J Sep Sci* 2005;28:163–171.
28. Gómara B, González MJ. Enantiomeric fractions and congener specific determination of polychlorinated biphenyls in eggs of predatory birds from Donana National Park (Spain). *Chemosphere* 2006;63:662–669.

CAPÍTULO VII

SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE FTALATOS PARENTALES POR CROMATOGRFÍA ELECTROKINÉTICA

VII.1 INTRODUCCIÓN

En las sociedades industrializadas, el ser humano está expuesto a un amplio abanico de compuestos químicos sintéticos que llegan al cuerpo humano a través del aire, agua, alimentos y también a través de los productos de cuidado personal. Este es el caso de los ftalatos cuyas características y antecedentes bibliográficos se han descrito en la Introducción de esta memoria.

Como ya se ha mencionado, los ftalatos son compuestos químicos que se emplean en la fabricación de todo tipo de materiales, especialmente plásticos. Sin embargo, existe otro uso menos conocido pero realmente preocupante como es la adición de los mismos en muchos productos de cuidado personal. En cosmética los ftalatos se añaden como aditivos a todo tipo de productos [197]. Sin embargo, en los últimos años se ha prestado especial atención a estos compuestos por los indicios que ponen en evidencia su toxicidad [79, 187], su comportamiento como disruptores endocrinos [188] y como compuestos carcinogénicos [189], teratogénicos y mutagénicos [190] (ver Capítulo I de esta memoria). Hay que considerar que todos estos productos están en contacto continuo con la piel y que los ftalatos se absorben fácilmente y pasan al torrente sanguíneo.

A pesar de que el uso de ftalatos en los productos cosméticos está cada vez más controlado y existen ciertas normativas que prohíben totalmente el empleo de algunos de ellos (DEHP, DBP, BBP), cabe destacar que existe una gran variedad de ftalatos que pueden ser añadidos a los mismos y que aun no han sido sometidos a regulación alguna. Es por ello que se considera de gran importancia desarrollar nuevos métodos analíticos que permitan la determinación de ftalatos en cosméticos con el fin de asegurar la seguridad de los mismos para el consumidor.

La determinación de ftalatos parentales clásicamente se ha realizado por GC [198, 313, 314] ya que son suficientemente volátiles y térmicamente estables. Sin embargo, en los últimos años se han utilizado también las técnicas de HPLC y CE. El empleo de CE ha

sido limitado y en la mayoría de los escasos trabajos publicados los ftalatos estudiados han sido los más hidrofóbicos [211, 212]. Además, a pesar de la destacada presencia de estos compuestos en todo tipo de matrices, las muestras analizadas se limitan a suero, suelos y pólvora, no existiendo ningún trabajo relacionado con la determinación de ftalatos en productos cosméticos por CE.

Por este motivo, el propósito de este trabajo de investigación fue desarrollar un método por CE que permitiera la separación simultánea de diez ftalatos parentales comúnmente empleados en la fabricación de productos de uso cotidiano y su aplicación al análisis de cosméticos. Con el fin de conseguir la separación de los diez analitos de interés y teniendo en cuenta el carácter neutro de estos compuestos en todo el intervalo de pH y la elevada hidrofobicidad de alguno de ellos, se eligió el modo de separación CD-MEKC empleando como pseudofases estacionarias tensioactivos aniónicos (sales biliares) en combinación con CDs neutras.

VII.2 OBJETIVOS

El objetivo del trabajo de investigación presentado en este capítulo ha sido el desarrollo de un método por EKC para la separación simultánea de diez ftalatos parentales (DMP, DEP, DBP, DAP, DPP, DNPP, BBP, DCP, DEHP y DNOP) comúnmente empleados en la elaboración de productos cosméticos.

Con este fin se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Investigar el potencial de distintas sales biliares (SC, SDC, STC y SDTC) como fase pseudoestacionaria en EKC para la separación simultánea de los diez ftalatos parentales estudiados.
2. Estudiar el efecto de utilizar distintas CDs de carácter neutro (β -CD, γ -CD, Me- β -CD, DM- β -CD, TM- β -CD, HP- β -CD y Ac- β -CD) en combinación con las sales

biliares como medio para obtener la separación completa de los diez ftalatos parentales.

3. Desarrollar un método analítico por CD-MEKC que permita la separación simultánea de los diez ftalatos parentales con la mayor resolución posible y en el menor tiempo de análisis.
4. Evaluar las características del método analítico desarrollado en términos de linealidad, LODs y LOQs, precisión y selectividad con el fin de aplicarlo a la determinación simultánea de estos compuestos en perfumes.
5. Determinar los contenidos de los ftalatos presentes en una serie de quince perfumes disponibles comercialmente.

VII.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ftalatos son compuestos neutros y para poder obtener su separación por CE es necesario añadir al BGE una pseudofase cargada que interaccione de forma selectiva con los analitos. En los trabajos descritos en la bibliografía en los que se emplea MEKC como modo de CE para la separación de ftalatos se añade SDS como tensioactivo aniónico al medio de separación; sin embargo, se sabe que las sales biliares ofrecen ciertas ventajas con respecto al SDS [315] y es por ello, que en este trabajo se decidió evaluar el empleo de las mismas como pseudofases estacionarias de naturaleza aniónica. Así, se evaluaron cuatro sales biliares (SC, SDC, STC y STDC) todas ellas a una concentración de 50 mM en un tampón borato 100 mM (pH 8.5) con un capilar de 50 μm x 50 cm (58.5 cm l.t.), una inyección hidrodinámica de 50 mbar x 2 s, a temperatura de 25°C, voltaje de separación de 25 kV y a tres longitudes de onda de detección UV: 210 \pm 2 nm, 240 \pm 2 nm y 325 \pm 2 nm (sin referencia). En estas condiciones, únicamente STDC y SDC ofrecieron resultados positivos, ya que con las otras dos sales biliares (SC y STC) solamente se pudieron detectar los ftalatos más hidrofílicos, no pudiéndose detectar los demás ni en un tiempo de 60 min.

Con STDC los tiempos de análisis obtenidos estuvieron en torno a los 55 min y con SDC fueron de tan solo 9 min. Por este motivo, se seleccionó la sal biliar SDC como la pseudofase más adecuada para la separación de los diez ftalatos estudiados. A pesar de ello, el empleo de esta sal biliar únicamente permitió la separación total de cuatro ftalatos, los más hidrofílicos (DMP, DEP, DAP y DPP), mientras que aquellos que eran más hidrofóbicos y por lo tanto interaccionaban más fuertemente con la micela, coeluían todos juntos en un solo pico al final del electroforegrama.

Con el fin de mejorar los resultados obtenidos, se estudió el efecto de la concentración de SDC en el intervalo 25-100 mM sobre la resolución obtenida para los diez ftalatos seleccionados. El aumento en la concentración de sal biliar, dio lugar a un aumento de los tiempos de retención, pero también, a la obtención de picos electroforéticos más estrechos y mejor resueltos, en parte debido al efecto solubilizador de las sales biliares. Por este motivo, se seleccionó la concentración más elevada de SDC de 100 mM.

Posteriormente, se estudió el efecto de la adición de distintos modificadores orgánicos al medio de separación. Para ello, se probaron dos modificadores orgánicos, MeOH y ACN, a un porcentaje del 10 % v:v. En este caso, la resolución obtenida con ambos modificadores fue muy similar pero los tiempos de análisis obtenidos fueron menores con ACN (45 min) que con MeOH (60 min), por lo que se seleccionó ACN como modificador orgánico. En las condiciones optimizadas hasta el momento (SDC 100 mM en tampón borato 100 mM (pH 8.5) con un 10 % v:v de ACN) se obtuvo la completa resolución de nueve de los diez ftalatos estudiados ya que los dos ftalatos que eluían en último lugar (DEHP y DNOP) lo hacían en un solo pico. Por ello y con el fin de obtener la separación de estos dos analitos se estudió la adición de diferentes CDs como segunda pseudofase estacionaria al medio de separación.

El empleo de distintas CDs neutras (β -CD, γ -CD, Me- β -CD, DM- β -CD, TM- β -CD, HP- β -CD y Ac- β -CD) en combinación con SDC demostró que un sistema con dos fases pseudoestacionarias era capaz de proporcionar la separación simultánea de los diez ftalatos seleccionados, al menos parcialmente. De todas las CDs neutras que se probaron

en combinación con el tensioactivo, solamente la β -CD, Me- β -CD, HP- β -CD y Ac- β -CD proporcionaron resultados positivos y además similares, obteniéndose la resolución total de ocho ftalatos y la resolución parcial de DNOP y DEHP. Sin embargo, con la β -CD las resoluciones obtenidas eran en general mucho mejores en tiempos de análisis similares, por lo que se seleccionó esta CD y se estudió el efecto de su concentración en el intervalo 5-25 mM. Así, al aumentar la concentración de β -CD aumentaban las resoluciones obtenidas, consiguiéndose a una concentración de 25 mM de β -CD resoluciones entre 3.1 y 25.6 para todos los compuestos, excepto para DEHP y DNOP para los cuales se obtuvo una resolución de 0.8, en tiempos de análisis de aproximadamente 17 min.

El siguiente paso consistió en la optimización de otras variables experimentales como son el porcentaje de ACN en el BGE, el voltaje de separación aplicado y la naturaleza del tampón de separación. El efecto del porcentaje de ACN en el medio de separación se estudió en el intervalo 5-15 % v:v con el fin de mejorar la resolución obtenida. Mientras que un porcentaje de ACN inferior al empleado hasta el momento daba lugar a la pérdida casi completa de la separación obtenida para los compuestos más hidrofóbicos, un aumento del porcentaje de ACN no proporcionó ningún beneficio evidente por lo que se decidió mantener el 10 % v:v de ACN empleado hasta el momento. A continuación, se estudió el efecto del voltaje de separación y con el fin de reducir los tiempos de análisis se decidió aumentar el voltaje aplicado a 30 kV. Este cambio no influyó para nada en la resolución obtenida para los diez ftalatos pero redujo los tiempos de análisis a tan solo 12 min. Por último, se estudió el efecto de la naturaleza del tampón de separación y para ello se probó el empleo de un tampón de naturaleza orgánica (CHES 100 mM (pH 10.0)) esperando que ayudase a la solubilización de los compuestos y ofreciese una mejor resolución de los analitos. Sin embargo, el tampón orgánico CHES no proporcionó ninguna mejora en la resolución obtenida, siendo los tiempos de análisis superiores a los obtenidos anteriormente, por lo que se decidió seleccionar el tampón borato 100 mM (pH 8.5) como el medio óptimo.

Las condiciones experimentales finales seleccionadas como óptimas (capilar 50 μ m x 58.5 cm (50.0 cm l.t), BGE: SDC 100 mM β -CD 25 mM en tampón borato 100 mM (pH 8.5)

con un 10 % v:v de ACN, 25°C, 30 kV, inyección hidrodinámica 50 mbar x 2 s, longitud de onda de detección: 210±2 nm, 240±2 nm y 325±2 nm (sin referencia)) permitieron llevar a cabo la separación de los diez ftalatos parentales estudiados en un tiempo de análisis inferior a 12 min y con resoluciones mayores a 3.1 para todos los compuestos excepto para DEHP y DNOP, para los que se obtuvo solo la resolución parcial (0.8) pero suficiente para poder diferenciarlos en el análisis de muestras reales. En comparación con otros trabajos presentes en la bibliografía para la separación de ftalatos parentales mediante CE, este trabajo supone una mejora considerable en los resultados obtenidos especialmente desde el punto de vista del tiempo de análisis alcanzado que es de tan solo 12 min con respecto a los 40-58 min obtenidos por otros autores [215, 216], así como, desde el punto de vista del número de compuestos separados simultáneamente siendo ésta la primera vez que se describe la separación simultánea de 10 ftalatos parentales por CE.

Posteriormente y con el fin de aplicar el método desarrollado a la determinación y cuantificación de los ftalatos estudiados en perfumes y aguas de colonia, se evaluaron las características del método en términos de linealidad, LODs y LOQs, precisión y selectividad, demostrando su validez para este fin.

El método desarrollado se aplicó a la determinación de los ftalatos en perfumes y aguas de colonia tanto para adultos como infantiles. De las quince muestras analizadas, solamente en cuatro de ellas no se detectó ninguno de los ftalatos estudiados mientras que las once muestras restantes contenían al menos, uno de los ftalatos estudiados. De todos ellos, los ftalatos que pudieron ser determinados en las muestras analizadas fueron DMP, DEP, DAP, DNPP o DCP, siendo el DEP el que se encontró en un mayor número de productos. Este compuesto se detectó en diez de las muestras analizadas a concentraciones entre 76 y 3115 mg/L. Con respecto a DAP y DNPP, se pudieron determinar en un perfume cada uno mientras que DMP y DCP estaban presentes en tres perfumes cada uno. Decir que de las cinco muestras de aguas de colonia infantiles analizadas, en tres de ellas se detectó el DEP y en dos de ellas no se detectó ninguno de los analitos estudiados. Por último destacar, que ninguno de los ftalatos prohibidos en

productos cosméticos (DEHP, DBP y BBP) se encontró ni en los perfumes ni en las aguas de colonia analizadas en este trabajo.

Los resultados obtenidos en este capítulo se recogen en el siguiente artículo científico:

Artículo 7

“Separation of phthalates by cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography. Quantitation in perfumes.”

V. Pérez-Fernández, M.J. González, M.A. García, M.L. Marina

Analytica Chimica Acta, en prensa.

Artículo Científico 7

“Separation of phthalates by cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography. Quantitation in perfumes”

V. Pérez-Fernández, M.J. González, M.A. García, M.L. Marina

Analytica Chimica Acta, en prensa

**SEPARATION OF PHTHALATES BY CYCLODEXTRIN MODIFIED MICELLAR
ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY. QUANTITATION IN PERFUMES.**

**Virginia Pérez-Fernández¹, Maria José González², Maria Ángeles García¹, Maria Luisa
Marina^{1*}**

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Alcalá, Spain.

²Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of General Organic Chemistry, CSIC, Spain.

Correspondence: Professor Maria Luisa Marina, Department of Analytical Chemistry,

E-mail: mluisa.marina@uah.es

Tel: + 34-91-8854935

Abbreviations:

Ac, Corrected peak areas; Ac- β -CD, acetyl- β -CD; BGE, background electrolyte; BBP, benzyl butyl phthalate; CD, cyclodextrin; CD-MEKC, cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography; CHES, n-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid; DAD, diode array detector; DAP, diallyl phthalate; DCP, dicyclohexyl phthalate; DBP, di-n-butyl phthalate, DEHP, diethyl hexyl phthalate; DEP, diethyl phthalate; DiBP, diisobutyl phthalate; DM- β -CD, dimethyl- β -CD; DMP, dimethyl phthalate; DNPP, di-n-pentyl phthalate; DNOP, di-n-octyl phthalate; DPP, di-n-propyl phthalate; DPhP, diphenyl phthalate; EOF, electroosmotic flow; HP- β -CD, hydroxypropyl- β -CD; *k*, capacity factor; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantitation; Me- β -CD, methyl- β -CD; PVC, polyvinyl chloride plastics; SC, sodium cholate; SDC, sodium deoxycholate; SDS, sodium dodecyl sulfate; STDC, sodium taurodeoxycholate; STC, sodium taurocholate; SPE, solid phase extraction; TM- β -CD, trimethyl- β -CD.

Abstract

A new CE method has been developed for the simultaneous separation of a group of parent phthalates. Due to the neutral character of these compounds, the addition of several bile salts as surfactants (sodium cholate (SC), sodium deoxycholate (SDC), sodium taurodeoxycholate (STDC), sodium taurocholate (STC)) to the separation buffer was explored showing the high potential of SDC as pseudostationary phase. However, the resolution of all the phthalates was not achieved when employing only this bile salt as additive, being necessary the addition of neutral cyclodextrins (CD) and organic modifiers to the separation media. The optimized cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography (CD-MEKC) method consisted of the employ of a background electrolyte (BGE) containing 25 mM β -CD-100 mM SDC in a 100 mM borate buffer (pH 8.5) with a 10 % (v/v) of acetonitrile, employing a voltage of 30 kV and a temperature of 25°C. This separation medium enabled the total resolution of eight compounds and the partial resolution of two of the analytes, di-n-octyl phthalate (DNOP) and diethyl hexyl phthalate (DEHP) ($R_s \sim 0.8$), in only 12 min. The analytical characteristics of the developed method were studied showing their suitability for the determination of these compounds in commercial perfumes. In all the analyzed perfumes the most common phthalate was diethyl phthalate (DEP) that appeared in ten of the fifteen analyzed products. Also dimethyl phthalate (DMP), diallyl phthalate (DAP), dicyclohexyl phthalate (DCP), and di-n-pentyl phthalate (DNPP) were found in some of the analyzed samples.

Keywords: Phthalate; micellar electrokinetic chromatography; Bile salt, Cyclodextrin; Perfume.

1. Introduction

Phthalates are man-made chemicals produced worldwide in more than 1 million tons each year since 1920's [1]. The term phthalate is referred to a class of chemicals derived from 1,2-benzenedicarboxylic acid that are dialkyl or alkylarylester substituted. The length of the alkyl chain determines the application field of the phthalate.

Phthalates with higher molecular weights, such as diethyl hexyl phthalate (DEHP) are commonly used as additives and plasticizers in polyvinyl chloride plastics (PVC). Approximately 93 % of all plasticizers employed in the world are phthalates and the remaining percentage corresponds to esters and polyesters based on adipate, phosphoric acid, sebacic acid, etc. [2]. Those phthalates with lower molecular weights such as diethyl phthalate (DEP) and dimethyl phthalate (DMP) are commonly used as solvents and odorless diluents in cosmetic products such as deodorants, hair products and perfumes [3, 4] and they are also used as additives in the textile industry and in pesticide formulation [5].

Phthalates have received special attention in the last years due to their ubiquitous presence in the environment [6], the clear evidences of their reproductive toxicity [7, 8], and their estrogenic activity [9]. The European Union has published a list of priority substances with a potential endocrine disrupting action, which includes di-n-butyl phthalate (DBP) and DEHP [10]. Moreover, they are also suspected of being carcinogenic, teratogenic, and mutagenic [11] being these evidences more strong for DEHP [12, 13]. Due to the fact that phthalates when employed in polymers, are not chemically bounded to the polymer, they can leach or outgas into the surrounding media and they are present in the environment in great amounts. On the other hand, although the toxicological information of phthalates is huge, there is little information about the pathways of human exposure to phthalates. However, their presence in milk and urine demonstrates the human exposure to these compounds [14]. Humans are exposed to phthalates in numerous ways, i.e., by migration of phthalates into foodstuff, by dermal adsorption of phthalates from cosmetics, or by inhaling air containing them [15]. According to the US Environmental Protection Agency (EPA) phthalates such as DMP, DEP, DBP, benzyl butyl phthalate (BBP), DEHP,

and di-n-octyl phthalate (DNOP) are listed as the priority pollutants among the phthalate esters [16].

In the field of their use in cosmetic products, the article 4 of the European directive 76/768/EEC, modified by the European directive 2004/93/CE, specifies the substances that due to their classification as carcinogenic, mutagenic or toxic to reproduction are forbidden in cosmetic products [17]. In this situation phthalates like DEHP, DBP, and BBP have been prohibited in cosmetics [17].

For all these reasons, there is a great interest in the development of new and rapid methods for the determination of parent phthalates in several matrices. The analysis of phthalates is mostly performed by GC because they are enough volatile and thermostable. The works reported in the literature concerning the separation and determination of phthalates by GC involve in general mass spectrometry detection as it has been reported by LaFleur and Schug [18]. Moreover the determination of phthalates by GC could involve a previous derivatization step that makes the sample preparation more tedious [19, 20]. However, the development of miniaturized approaches for the extraction, that can be easily coupled to GC, have resulted in more efficient sample enrichment. This is for example the case of solid phase microextraction (SPME) [21], dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) [22], etc. that have been successfully coupled to GC for the determination of phthalates. In recent years there is an increasing attention on the analysis of phthalic esters by HPLC and CE. HPLC is an especially interesting alternative for the analysis of isomeric mixtures of phthalates [23], and the employ of UPLC systems gives opportunities to improve chromatography in terms of separation, efficiency and detection limits due to the lower dilution of the sample [24]. Ultraviolet detection has been used for phthalate determination in several works [25] however, the use of MS has increased in recent years [26, 27]. On the other hand, CE offers lower analysis times, lower consumption of reagents, higher efficiency and simplest methodology. There are several works concerning the separation of phthalates by CE in the literature [16, 28-33]. In all of them, due to the neutral character of these analytes, a charged pseudostationary phase is added to the separation buffer. In most works sodium dodecyl sulfate (SDS) is the added surfactant in order to give mobility to the analytes [16, 28, 29, 31-33]. However, in most of

these works only the most hydrophilic phthalates were analyzed or no effective separation was achieved for those phthalates with higher octanol-water partition coefficients (i.e. DEHP and DNOP) [16]. Moreover in almost all the works reported the number of phthalates separated is lower than six. On the other hand bile salt monomers are more polar than SDS, and lead to a general reduction of capacity factor (k) values of hydrophobic compounds. Also bile salt micelles can tolerate a higher concentration of organic solvents that usually helps the separation [34]. In this sense Guo *et al.* [35] employed for the first time a bile salt as pseudostationary phase for the separation of six parent phthalates. In this work the employ of sodium cholate (SC) as pseudostationary phase allowed the separation of six phthalates but the analysis time achieved was around 40 min. Finally Sirimanne *et al.* [30] employed a C18 capillary column for capillary electrochromatography experiments achieving the separation of seven phthalates (DMP, DEP, diallyl phthalate (DAP), diphenyl phthalate (DPhP), BBP, DBP, and diisobutyl phthalate (DiBP)) in only 6.3 min. Furthermore it has to be noticed that the samples analyzed by CE were soil, serum and gunshot samples and that there is no work in the literature for the analysis of cosmetic samples by this separation technique.

The main problem when analyzing phthalates is the contamination that may result in false positive results. Due to the fact that phthalates are present in the whole analytical environment (gloves, adsorbed on glass, water, air, analytical equipment, etc.) all the material employed needs to be very carefully cleaned and all type of plastic materials must be avoided [36].

The aim of this work was to evaluate different pseudostationary phases (including bile salts and cyclodextrins) for the development of a rapid and simple CE method for the simultaneous separation of ten phthalates and their determination in perfume samples.

2. Materials and methods

2.1 Reagents and Samples

All reagents employed for the preparation of background electrolytes (BGEs) and samples were of analytical grade. Boric acid was supplied from Fluka (Buchs, Switzerland), sodium hydroxide from Merck (Darmstadt, Germany), methanol and acetonitrile were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain), and n-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid (CHES) was from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

β -CD, methyl- β -CD (Me- β -CD) (DS \sim 12), and trimethyl- β -CD (TM- β -CD) were supplied by Fluka, γ -CD, hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD) (DS \sim 3), and acetyl- β -CD (Ac- β -CD) (DS \sim 7) by Cyclolab (Budapest, Hungary) and dimethyl- β -CD (DM- β -CD) (DS \sim 14-17) was supplied from Sigma Aldrich. Bile salts SC, sodium deoxycholate (SDC), sodium taurodeoxycholate (STDC) and sodium taurocholate (STC) were from Sigma Aldrich.

Standards of the phthalates, which structure is presented in **Figure 1**, DMP, DEP, DAP, DPP, DBP, DNPP, DCP, BBP, DEHP, and DNOP were supplied from Sigma. The perfumes were acquired in cosmetic shops in Alcalá de Henares (Madrid, Spain). A total amount of 15 perfume samples was analyzed.

The LC-C18 cartridges employed for clean-up of the samples were from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Water used to prepare all solutions was purified in a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

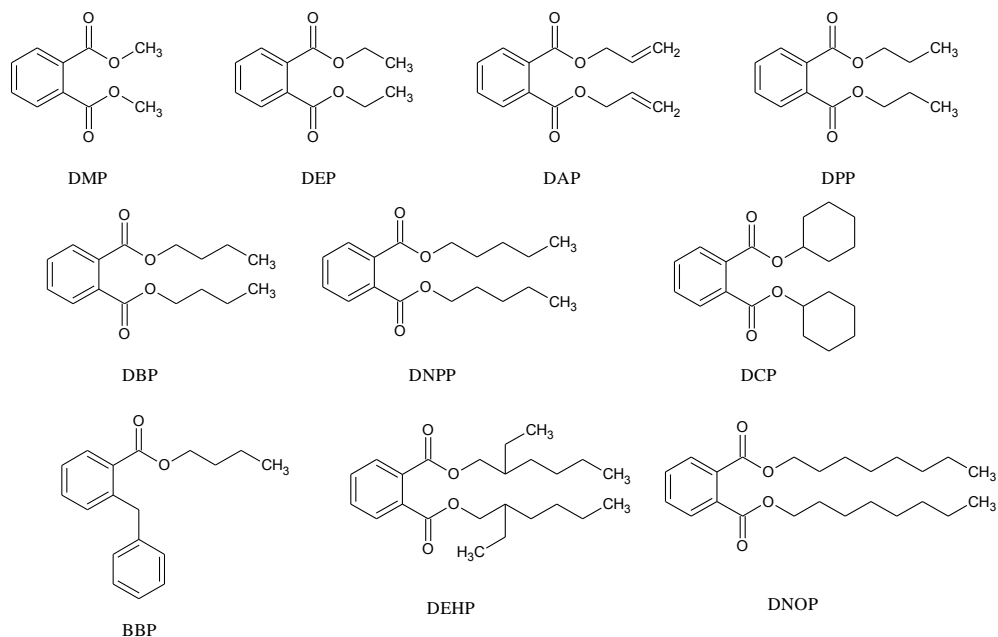


Figure 1: Structures of the selected parent phthalates.

2.2 Apparatus

A HP³DCE system from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) with a diode array detector (DAD) was employed for the experiments. Instrument control and data acquisition were performed with the HP³DCE ChemStation software. Separations were performed in an uncoated fused-silica capillary of 50 μm i.d. (375 μm o.d.) with a total length of 58.5 cm (50.0 cm to the detector) purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). UV detection was performed at 210 ± 2 nm, 240 ± 2 nm and 325 ± 2 nm. The UV detection wavelength selected for quantitation was 240 ± 2 nm, because although at this wavelength the absorption of phthalates is lower, there are less interferences than at 210 ± 2 nm and the signal to noise ratio (S/N) is higher. The wavelength 325 ± 2 nm was employed to identify interferences because at this wavelength phthalates do not absorb. A pH-meter model 744 from Metrohm (Herisau, Switzerland) was used to adjust the pH of the separation buffers. All the solutions were degassed in an ultrasonic bath Ultrasons-H from J.P. Selecta (Barcelona, Spain).

2.3 Glassware cleaning

Special care was taken to avoid the contact of reagents and solvents with plastic materials. All glassware was cleaned prior to the analysis according to the recommendations specified in the section 4.1.2 of U.S. EPA Method 506 [37]. All glassware was cleaned as soon as possible after its use by rinsing with the same solvent of the solution that was stored in the recipient. Next it was washed with hot water and detergent and rinsed with Milli-Q water. It was dried and heated in a muffle furnace at 400°C for one hour. After cooling, the glassware was sealed with aluminum foil and stored in a clean environment to prevent accumulation of dust and other contaminants.

2.4 Procedure

Before first use, the new capillary was rinsed with 1 M NaOH for 30 min, followed by 5 min with water and finally 60 min with the separation buffer at 25°C. The capillary was rinsed between runs with 0.1 M NaOH for 2 min, water for 2 min, and BGE for 5 min. At the end of each day the capillary was rinsed with 5 min water, 5 min 0.1 M NaOH and 5 min water. The capillary ends were maintained during the night in Milli-Q water.

Running buffers were prepared by dissolving the appropriate amount of boric acid or CHES in Milli-Q water and adjusting the pH to the desired value with 1 M or 0.1 M NaOH. The final volume was adjusted by adding Milli-Q water to get the desired buffer concentration. BGEs were prepared by dissolving the appropriate amount of different CDs and bile salts in the running buffer containing the organic modifier selected in each experiment.

Stock standard solutions of parent phthalates were prepared by dissolving the appropriate amount of the compound in methanol up to a final concentration of 1000 mg L⁻¹ and 10000 mg L⁻¹. To prepare the working solutions, different aliquots were diluted in methanol to obtain concentrations of each phthalate between 30 and 500 mg L⁻¹ for the calibration by the external standard method. When standard addition calibration method was employed different amounts of standard solutions of phthalates were added to a

commercial sample in the range 50-250 mg L⁻¹. For the optimization of the separation of the selected phthalates a standard solution containing each phthalate at 100 mg L⁻¹ was employed.

All the standard solutions and BGEs were stored at 4°C in the dark and they were filtered with a Nylon 0.45 µm pore size filter from Titan (Eatontown, NJ, USA) before their injection in the CE system.

To prepare the commercial formulations for their analysis, the method developed by Shen *et al.* [4] was followed. Briefly, 500 µL of perfume were transferred in a glass tube and 10 mL of methanol were added following by sonication during 30 min. After that, the sample was evaporated to dryness and redissolved in 25 mL 40 % (v/v) methanol. For clean-up of the sample solid phase extraction (SPE) with a C18 cartridge was employed. The C18 cartridge was conditioned with 5 mL methanol, 5 mL water and 5 mL 40 % (v/v) methanol. The sample was loaded onto the column at a slow flow and after loading, the column was washed with 5 mL 40 % (v/v) methanol. Finally, phthalates were eluted with 5 mL of methanol and injected into the CE system.

2.5 Data treatment

The values of areas, migration times and resolution were obtained using the ChemStation software. For data treatment corrected peak areas (A_c) were used to compensate the differences in the electrophoretic conditions of each analyte and to obtain better reproducibility of data [38]. Limits of detection (LODs) and limits of quantitation (LOQs) were experimentally determined using the S/N ratio equal to 3 and 10, respectively [39].

The presence of matrix interferences was investigated by the comparison of the confidence interval of the slopes obtained when using the external standard calibration method and the standard additions calibration method. If the overlapping of the confidence intervals of the slopes of both calibration methods was demonstrated, no statistically significant differences between the slopes were obtained; hence the matrix did not produce systematic errors. The second method consisted on the employ of t-test for

comparison of two calibration curves. If the p-value was up to 0.05 (for a confidence level of 95 %) it was considered that there were no significant differences between calibration curves.

Experimental data analysis and composition of graphs were carried out using Microsoft Office Excel 2007 and Origin 6.0 software.

3. Results and discussion

3.1 Evaluation of different bile salts as pseudostationary phases

Due to the fact that phthalates are neutral compounds, the addition of a pseudostationary phase that may interact with them is necessary in order to achieve their separation by CE. With the addition of an anionic surfactant, the phthalates can be separated on the basis of their relative affinity to the micellar environment. In this situation, the most hydrophobic compounds would be strongly associated to the micelles and will elute later while the most hydrophilic phthalates would elute earlier. As it has been mentioned into the introduction of this manuscript, bile salts offer several advantages over the most usual surfactants (i.e. SDS). These monomers are more polar than SDS, and lead to a general reduction of k values of hydrophobic compounds so they use to be more efficient in the separation of hydrophobic compounds as phthalates.

In this work, four bile salts were tested: SC, SDC, STC, and STDC at an initial concentration of 50 mM in 100 mM borate buffer (pH 8.5). A buffer at high pH was selected in order to obtain a high electroosmotic flow (EOF) that could move to the detector also the analytes that interact more strongly with the micelle. The other initial experimental conditions were as follows: uncoated fused-silica capillary, 50 μm \times 58.5 cm (50.0 cm to the detector); temperature, 25°C; voltage, 25 kV; injection by pressure, 50 mbar \times 2 s. When SC or STC were employed only the peaks corresponding to the less hydrophobic compounds were detected, thus DMP and DEP, and the other phthalates did not appear in the electropherogram in even 60 min of analysis. Thus, the interaction between the analytes and the bile salt was so strong that it was not possible to move the

analytes towards the detector. These results could fit with those reported in the literature for bile salt SC [35], in which the analysis time was also quite long, although a less concentrated buffer was employed. For STDC bile salt, the first migrating peak was as expected DMP, that appeared at approximately 12 min and the last eluting peak, DNPP, migrated at 55 min, so a really long analysis time was achieved with this pseudostationary phase. Finally, when SDC was added to the separation media, the ten phthalates were analyzed in only 9 min, although as expected the separation of all of them was not achieved and all the compounds that migrated in the last part of the electropherogram, thus those which interacted strongly with the surfactant, eluted together. With an initial concentration of 50 mM SDC added to the BGE it was achieved the complete separation of DMP, DEP, DAP, and DPP but the other six phthalates coeluted in only three peaks that were not completely resolved. As a consequence of the observed results, SDC was selected for further experiments.

To optimize the separation conditions for the selected phthalates, the concentration of SDC was varied from 25 to 100 mM in 100 mM borate buffer (pH 8.5). An increase in the SDC concentration resulted in a decrease of the EOF and thus all the phthalates migrated later. However, the increase in the concentration of the surfactant, resulted in less broadened peaks due to the fact that this additive increases the solubility of the analyzed compounds and the resolution between all the compounds was also improved (see supplementary material). Therefore a concentration of 100 mM SDC was chosen as the most adequate for further experiments. However, it has to be noticed that with an increasing concentration of SDC the situation of the separation achieved was quite similar to that obtained with 50 mM of SDC and only four of the phthalates were completely separated. The last eluting six compounds coeluted in only three peaks as it has been previously reported for 50 mM SDC.

3.2 Effect of the addition of different organic modifiers

Organic solvents such as methanol, acetonitrile or isopropanol, can be used as additives in the running buffer to improve the solubility of some analytes and also to cause a decrease in the EOF and thus an increase in the elution range. This influence has

been studied in the literature and it has been proven that this is due to the changes in the dielectric properties of the electric double layer and of the charge generation on the fused-silica surface [40]. However, the concentration of organic modifier that can be added to the separation media in micellar electrokinetic chromatography (MEKC) is limited because it can affect the formation of micelles. For this reason percentages below 20 % are usually employed, although bile salts can tolerate a higher concentration of organic solvents [34]. In this study, methanol and acetonitrile were added as organic modifiers to a separation media consisting of 100 mM SDC in 100 mM borate buffer (pH 8.5). At a percentage of 10 % (v/v) for both modifiers, similar resolution was achieved with them but longer migration times were obtained with methanol (~60 min) than with acetonitrile (~45 min) and this resulted in the broadening of the last eluting peaks (DBP, BBP, DCP, DNPP, DNOP and DEHP). For this reason, acetonitrile was selected as the most adequate organic modifier for the separation of the phthalates. However, the addition of acetonitrile to the BGE did not produce the total resolution of the ten phthalates and only nine peaks were observed.

3.3. Study of the addition of several neutral CDs to the BGE

In order to increase the selectivity against the studied compounds, the possibility of adding another pseudostationary phase to the BGE was explored. Due to the ionic character of the surfactants employed, the addition of several neutral CDs was tested. First of all, the addition of native β -CD and γ -CD at an initial concentration of 10 mM was investigated. Thus the separation media consisted of a 100 mM borate buffer (pH 8.5) containing 100 mM SDC, 10 mM of the CD and a 10 % (v/v) of acetonitrile. Under these conditions, phthalates can interact selectively with both pseudostationary phases and the separation could be improved. Only β -CD showed clear advantages in the separation of the selected compounds. With the addition of this CD to the BGE, the peaks eluting in positions seven and eight (DCP and DNPP) were slightly separated while till this moment they coeluted in a single peak and the total analysis time was around 15 min. When the surfactant was employed alone the analysis time was around 45 min and now with β -CD in the separation media the analysis time decreased drastically to only 15 min. The

influence of the concentration of β -CD was then investigated. **Figure 2** shows the effect of the concentration of β -CD added to the BGE in a range from 5 to 25 mM. As it can be observed, an increase in the concentration of β -CD resulted in a great increase in resolution, especially for the last six peaks (DBP, BBP, DCP, DNPP, DNOP and DEHP). With a concentration of 25 mM of β -CD all the studied phthalates were separated with resolutions between 3.1 and 25.6, except for the last peaks, corresponding to DNOP and DEHP, respectively, for which a resolution of 0.8 was achieved.

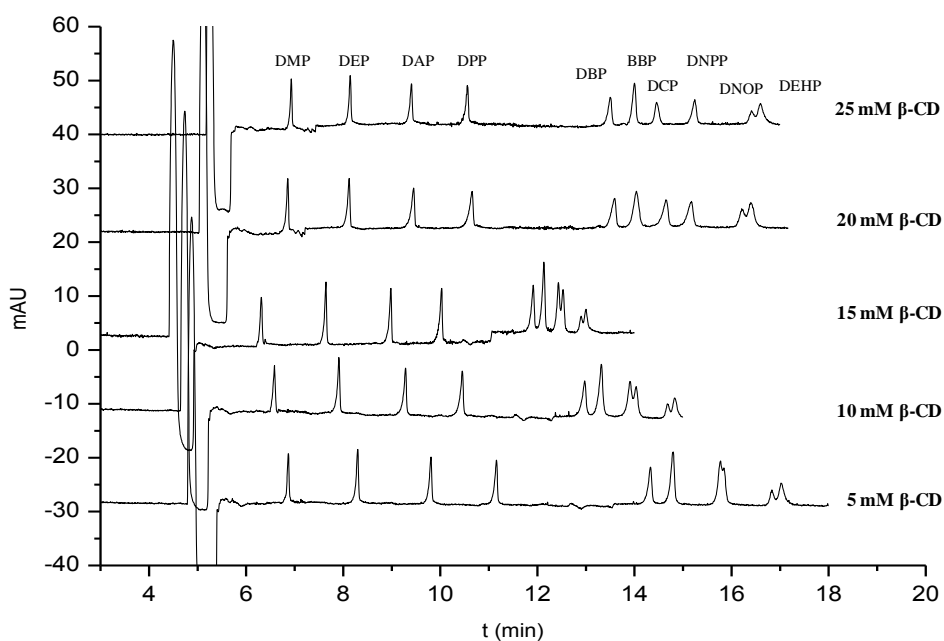


Figure 2: Separation by CD-MEKC of the selected phthalates using concentrations of β -CD between 5 and 25 mM. Other experimental conditions: uncoated fused-silica capillary, 50 μm \times 58.5 cm (50.0 cm to the detector); BGE: 100 mM SDC in 100 mM borate buffer (pH 8.5) containing a 10 % (v/v) of acetonitrile; temperature, 25°C; voltage, 25 kV; injection by pressure, 50 mbar \times 2 s.

The employ of some derivatives from β -CD was also explored. The cyclodextrins Me- β -CD, DM- β -CD, HP- β -CD, TM- β -CD and Ac- β -CD were individually added at a concentration of 25 mM to the BGE containing 100 mM SDC dissolved in 100 mM borate buffer (pH 8.5) with 10 % (v/v) of acetonitrile. **Figure 3** shows the electropherograms obtained when each CD was added to the separation media. As it can be observed, with Me- β -CD, HP- β -CD, and Ac- β -CD the separation achieved was very similar to that obtained with the native CD, thus all the peaks were resolved except DNOP and DEHP. TM- β -CD did not offer any advantage over the others because with this CD the separation of the peaks corresponding to DBP and BBP was lost. Finally, with DM- β -CD the separation was not good in general but it was able to baseline separate DNOP and DEHP. For this reason it was thought that maybe the mixture of β -CD and DM- β -CD could be the solution to achieve a baseline resolution for all the analytes. Thus, the simultaneous addition of both CDs to the BGE at a concentration of 25 mM for each one was evaluated. However, in this proportion the total resolution of DNOP and DEHP was achieved but for the peaks corresponding to DBP, BBP, DCP and DNPP the resolution was completely lost. If the concentration of DM- β -CD was decreased to 30 mM, the resolution of DNOP and DEHP was lost so no advantage was observed compared with the employ of β -CD alone and if the concentration of DM- β -CD was increased the resolution of DBP, BBP, DCP and DNPP was completely lost. Finally when the concentration of DM- β -CD was decreased to 15 mM maintaining the concentration of β -CD constant at 25 mM, it was observed also a lost on resolution for DBP and BBP that coeluted in one peak. For this reason, only β -CD was employed in the separation buffer although it did not enable the complete resolution of DNOP and DEHP. In conclusion, β -CD was selected as the second pseudostationary phase at a concentration of 25 mM added to the BGE containing 100 mM SDC in 100 mM borate buffer (pH 8.5) with 10 % (v/v) of acetonitrile.

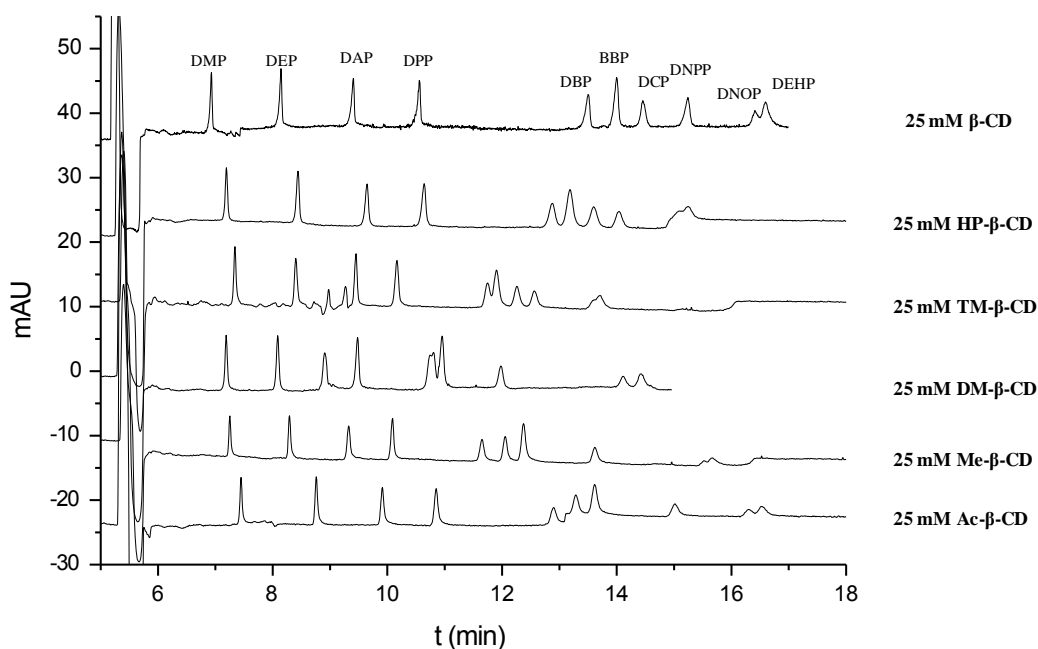


Figure 3: Separation by CD-MEKC of the selected phthalates using different neutral cyclodextrins (β -CD, Ac- β -CD, Me- β -CD, DM- β -CD, TM- β -CD and HP- β -CD) at a concentration of 25 mM. Other experimental conditions as in Figure 2.

The addition of different percentages of acetonitrile to the BGE was next investigated from 5 to 15 % (v/v) in order to observe its influence at higher and lower proportions of organic modifier than 10 % (v/v). While a lower percentage resulted in the complete loss of baseline resolution for all compounds except for those migrating in the first four positions (DMP, DEP, DAP, DPP), an increase of acetonitrile from 10 to 15 % (v/v) did not have any benefit in terms of resolution and moreover longer analysis times were achieved. For this reason, a percentage of 10 % (v/v) of acetonitrile was chosen.

3.4 Effect of the separation voltage and buffer nature

Some further experiments were performed in order to decrease the analysis time. The first attempt consisted of increasing the voltage applied for the separation from 25 kV to 30 kV. This change resulted in very similar resolutions than those obtained with 25 kV but the analysis time was shortened in more than 5 min. For this reason a separation voltage of 30 kV was selected. Finally, the employ of an organic buffer instead of 100 mM borate (pH 8.5) was studied. A 100 mM CHES buffer (pH 10.0) was selected because on one hand an organic buffer may help to dissolve better the analytes and consequently better resolution could be obtained and in the other hand a higher pH is supposed to reduce the migration time of analytes. Surprisingly this buffer did not improve the resolution of the studied phthalates and the analysis times were longer than with borate (20 and 12 min, respectively).

In conclusion, the final conditions selected for the simultaneous separation of DMP, DEP, DAP, DPP, DBP, BBP, DCP, DNPP, DNOP, and DEHP were: uncoated fused-silica capillary, 50 μm x 50.0 cm (t.l. 58.5 cm); BGE: 25 mM β -CD 100 mM SDC in 100 mM borate buffer (pH 8.5) containing a 10 % (v/v) of acetonitrile; temperature, 25°C; voltage, 30 kV; injection by pressure, 50 mbar x 2 s. Under these conditions, the baseline separation of all compounds except DNOP and DEHP, that were only resolved with a resolution of 0.8, was possible. However, since DNOP is not usually present in cosmetic samples, the developed method was applied to the determination of the other nine phthalates in commercial perfume samples.

3.5 Quantitative analysis of selected phthalates in commercial perfumes

Before carrying out the quantitative determination of DMP, DEP, DAP, DPP, DBP, BBP, DCP, DNPP, and DEHP in perfume samples, the analytical characteristics of the method were evaluated in terms of linearity, LODs, LOQs, precision, accuracy and selectivity. The results obtained are grouped in **Table 1**.

Table 1: Analytical characteristics of the developed method for the separation of parent phthalates

Analytical characteristics	DMP		DEP		DAP		DPP		DBP		DNPP		DCP		BBP		DEHP	
Precision (RSD)																		
Concentration level (mg L ⁻¹)	50	200	50	200	50	200	50	200	50	200	50	200	50	200	50	200	50	200
Instrumental repeatability																		
Ac. RSD (%)	7.91	3.67	8.04	6.36	5.52	5.74	6.44	3.44	9.73	3.83	9.21	6.59	3.15	4.94	8.64	5.70	2.59	5.83
t. RSD (%)	0.56	0.36	0.57	0.40	0.60	0.37	0.64	0.39	0.76	0.38	1.05	1.11	0.81	0.92	0.76	0.70	1.34	1.56
Intermediate precision																		
Ac. RSD (%)	8.94	9.19	10.0	9.52	11.6	10.7	7.30	8.65	8.70	10.3	11.3	6.43	10.1	8.28	7.96	9.48	8.60	11.2
t. RSD (%)	1.35	1.37	1.53	1.87	1.58	2.28	1.58	2.51	1.47	2.34	1.68	1.72	1.52	2.33	1.47	2.47	1.78	1.29
Linearity																		
Linear range (mg L ⁻¹)	50-300		50-300		50-300		50-300		50-300		50-300		50-300		50-300		50-300	
Linear equation (bx + a)	0.0129x + 0.0107		0.0097x + 0.1668		0.0077x + 0.2207		0.0072x + 0.2297		0.0059x + 0.1119		0.0047x + 0.0898		0.0033x + 0.1131		0.0051x + 0.1006		0.0026x + 0.0352	
Standard errors	Sb=0.0003		Sb=0.0003		Sb=0.0005		Sb=0.0006		Sb=0.0003		Sb=0.0002		Sb=0.0003		Sb=0.0003		Sb=0.0001	
	Sa=0.0606		Sa=0.0561		Sa=0.0874		Sa=0.1010		Sa=0.0564		Sa=0.0448		Sa=0.0532		Sa=0.0568		Sa=0.0264	
Determination coefficient (R ²)	0.9978		0.9966		0.9871		0.9803		0.9907		0.9946		0.9852		0.9874		0.9942	
Accuracy (50 mg L⁻¹)																		
Median Recovery (%)	68 ± 6		88 ± 6		114 ± 10		105 ± 6		113 ± 9		100 ± 8		104 ± 2		110 ± 13		91 ± 8	
LOD (mg L⁻¹)	8.6		8.6		7.6		7.8		11.4		7.1		15.6		10		19.2	
LOQ (mg L⁻¹)	25.9		25.9		22.7		23.4		34.2		21.4		46.8		30		57.7	
Study of matrix																		
(b ± t· Sb/√n)																		
External calibration	0.0129 ± 0.0006		0.0097 ± 0.0005		0.0077 ± 0.0008		0.0072 ± 0.0009		0.0059 ± 0.0005		0.0047 ± 0.0004		0.0033 ± 0.0005		0.0051 ± 0.0005		0.0026 ± 0.0002	
Standard addition	0.0142 ± 0.0023		0.0140 ± 0.0026		0.0089 ± 0.0017		0.0074 ± 0.0006		0.0046 ± 0.0006		0.0048 ± 0.0005		0.0034 ± 0.00006		0.0047 ± 0.0028		0.0029 ± 0.0003	
p-value	0.09035		0.0653		0.0699		0.0616		0.1381		0.1531		0.0802		0.1194		0.2363	

Linearity was determined by plotting Ac as a function of the concentration of each compound in the range 30-500 mg L⁻¹. A total number of seven standard solutions were individually prepared and injected by triplicate. This process was repeated during three different days in order to check the repeatability of the method and to fix the linear range for each compound. **Table 1** presents this interval, the linear equation obtained in the selected range as well as the standard errors for the intercept (S_a) and the slope (S_b), and the determination coefficient (R²). Satisfactory results were obtained in terms of linearity with R² > 0.98.

LODs and LOQs for the nine compounds were experimentally determined using a S/N ratio equal to 3 and 10, respectively. LODs values were between 7.1 and 19.2 mg L⁻¹ and LOQs between 21.4 and 57.7 mg L⁻¹ for the nine analyzed phthalates, as it can be observed in **Table 1**.

Precision of the methods was evaluated as *instrumental repeatability* and *intermediate precision*. Instrumental repeatability was determined from six repeated injections of a standard solution at two different concentration values of each compound (50 and 200 mg L⁻¹). The RSD values (%) obtained (**Table 1**) were lower than 1.6 % for migration times and lower than 9.7 % for Ac for both concentration levels. Intermediate precision was assessed at the same concentration levels for three consecutive days injecting each sample by triplicate each day. As it can be observed in **Table 1** the RSD values achieved were under 2.5 % and 11.6 % for analysis times and Ac respectively.

The selectivity of the method was demonstrated due to the absence of matrix interferences. For this purpose the slopes of the calibration lines obtained by the external calibration method and the standard additions calibration method were compared for two selected perfume samples (perfumes H and L). These two samples were selected for the study of matrix interferences because they showed the most complex matrix in preliminary experiments. The standard additions calibration line was obtained by spiking the diluted perfumes with known concentrations of a mixture of nine phthalates in the linear interval established for them (+0 mg L⁻¹, +50 mg L⁻¹, +100 mg L⁻¹, +200 mg L⁻¹, +250 mg L⁻¹). The comparison of the confidence limits of the slopes obtained by each calibration

method for each compound showed that there were no statistically significant differences between the slopes obtained by each calibration method for every compound. The results were confirmed by p-value of t-test and as it can be observed in **Table 1** the p-values obtained for all the compounds were above 0.05 at a confidence level of 95 %, demonstrating again the suitability of external calibration method for the quantitation of all the phthalates in the selected samples.

Accuracy of the method was evaluated as the recovery percentage obtained for all the analytes when a commercial perfume was spiked with known concentrations of each compound and subjected to the extraction procedure. For this purpose a perfume (one of those that did not present phthalates, perfume J) was selected and it was spiked with the standards of each phthalate in order to obtain a concentration of 200 mg L⁻¹ and 50 mg L⁻¹ in the final extract. Mean recovery values obtained were between 68 and 114 % as it is presented in **Table 1**.

The developed method was applied to the determination of these phthalates in fifteen perfumes. **Figure 4** shows the electropherograms obtained for a standard solution containing each phthalate at a concentration of 100 mg L⁻¹ and several perfume samples after SPE with C18 cartridges. The experimental conditions consisted of uncoated fused-silica capillary, 50 µm x 58.5 cm (50.0 cm to the detector); BGE: 25 mM β-CD-100 mM SDC in 100 mM borate buffer (pH 8.5) containing a 10 % (v/v) of acetonitrile; temperature, 25°C; voltage, 30 kV; injection by pressure, 50 mbar x 2 s. As it can be observed in this figure, the perfumes A and I contained two phthalates each one. The phthalates present in perfume A were found to be DMP and DAP and for perfume I the phthalates found were DEP and DCP. On the other hand the perfumes M and H presented three phthalates each one which corresponded to DMP, DEP and DCP for perfume M and to DMP, DEP and DNPP for perfume H. Finally the perfume J did not show any of the studied phthalates.

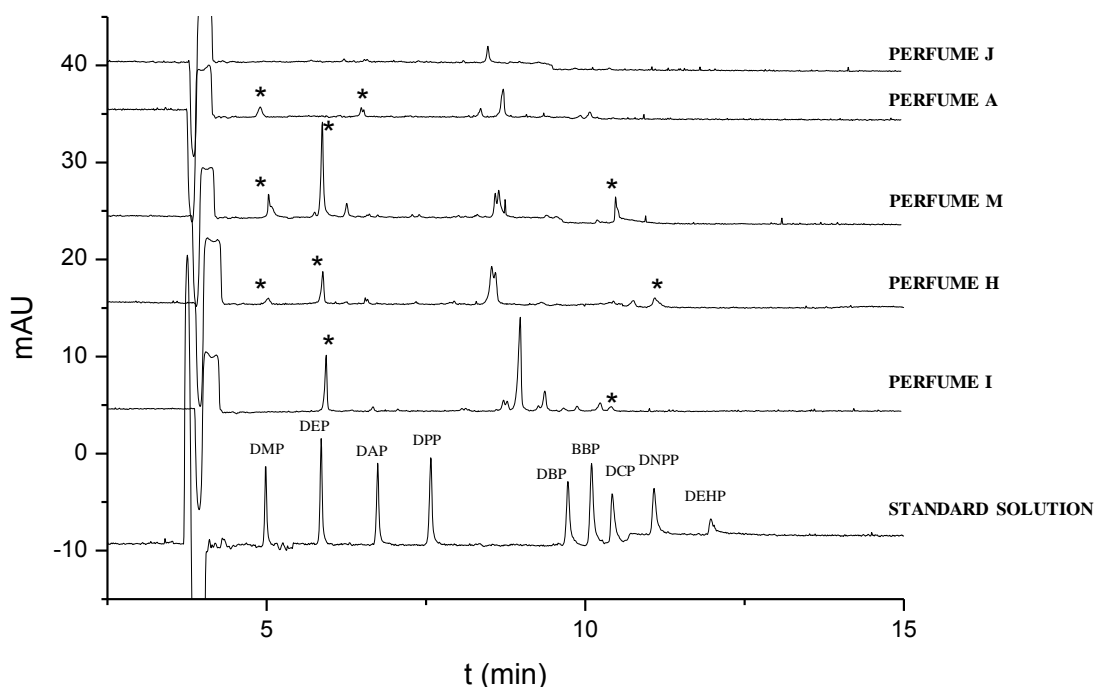


Figure 4: Electropherograms corresponding to the separation of selected phthalates by CD-MEKC for an standard solution of 100 mg L⁻¹ and five perfumes extracted by SPE according to the procedure explained in 2.4 section. Experimental conditions: BGE: 25 mM β -CD-100 mM SDC in 100 mM borate buffer (pH 8.5) containing a 10 % (v/v) of acetonitrile; voltage, 30 kV. Other experimental conditions as in Figure 2.

The determined amounts in the analyzed perfumes are specified in **Table 2**. As it can be observed in **Table 2**, eleven of the analyzed perfumes presented at least one of the studied phthalates and only four of the samples did not contain any of the selected analytes. The founded phthalates corresponded to DMP, DEP, DAP, DNPP and DCP. It has to be highlighted that in none of the samples the phthalates prohibited in cosmetic products were found, that is DEHP, DBP and BBP [17]. The most frequently found phthalate in these cosmetic products was DEP, as it has already been proved in previous

works [4, 41]. This phthalate appeared in ten of the analyzed perfumes, that is in all the perfumes containing phthalates except of one (perfume A), in the concentration range between 76 and 3115 mg L⁻¹. Regarding DAP and DNPP, each of these phthalates was only found in one perfume (perfume A and perfume H, respectively) while DMP and DCP were detected in three perfumes each one.

Table 2: Determined contents (mg L⁻¹) of analyzed phthalates in commercial perfumes (average value ± SD) (n=3). DPP, DBP, BBP and DEHP were not detected in any perfume.

Perfume Sample	DMP	DEP	DAP	DNPP	DCP
A	787 ± 54	n.d.	520 ± 67	n.d.	n.d.
B	n.d.	1665 ± 186	n.d.	n.d.	n.d.
C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D	n.d.	1536 ± 73	n.d.	n.d.	n.d.
E	n.d.	769 ± 58	n.d.	n.d.	n.d.
F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H	446 ± 21	1655 ± 98	n.d.	331 ± 15	n.d.
I	n.d.	1721 ± 145	n.d.	n.d.	<LOQ
J	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
K	n.d.	1210 ± 38	n.d.	n.d.	n.d.
L	n.d.	477 ± 36	n.d.	n.d.	557 ± 49
M	1207 ± 43	3115 ± 167	n.d.	n.d.	1496 ± 89
N	n.d.	2021 ± 228	n.d.	n.d.	n.d.
O	n.d.	76 ± 13	n.d.	n.d.	n.d.

4. Concluding remarks

A new CD-MEKC methodology employing SDC and β -CD as pseudostationary phases has been developed in this work. The new method is able to separate ten phthalates (DMP, DEP, DAP, DPP, DBP, DNPP, DCP, BBP, DNOP, and DEHP) in only 12 min with resolutions above 3.1 for all the compounds, except of DEHP and DNOP for which a resolution of 0.8 was achieved.

Compared with the scarce methodologies previously reported in the literature concerning the simultaneous separation of phthalates by CE, this method employs for the first time SDC as pseudostationary phase. As commented before, there is only one work in the literature employing a bile salt as pseudostationary phase (SC) but the analysis times achieved were around 40 min, quite long compared with that obtained in the present work and considering that it presented only the separation of six parent phthalates. In general, it can be assessed that the present work improves the total analysis time (is of only 12 min) of all the previous works in the literature by this separation technique. In fact, there is only one work that separates as many analytes as presented here, the analysis time is around 58 min and it is not achieved the separation of DNOP and DEHP that coelute in a single peak. However, the present work achieves the separation of the most hydrophobic phthalates DEHP and DNOP, and although it is not achieved their baseline separation, it is achieved a resolution of 0.8 that is enough to distinguish between the two compounds in the real samples.

The developed method was validated in terms of linearity, precision, accuracy, LODs, and LOQs and after assessing its suitability it was applied to the quantitation of selected phthalates in perfume samples. The most common phthalate in the analyzed perfumes was DEP that appeared in ten of the selected perfumes. From the other phthalates only DMP, DAP, DCP, and DNPP were found in some of the analyzed samples.

5. Acknowledgements

Authors thank financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation (project CTQ2009-09022) and from the Comunidad Autónoma of Madrid (Spain) and European funding from FEDER programme (project S2009/AGR-1464, ANALISYC-II). Virginia Pérez-Fernández thanks the Gobierno Vasco for her research contract.

6. References

- [1] H.M. Koch, A.M. Calafat, *Phil. Trans. Royal Soc. B-Biol. Sci.* 364 (2009) 2063-2078.
- [2] H.M. Koch, L.M. Gonzalez-Reche, J. Angerer, *J. Chromatogr. B-Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 784 (2003) 169-182.
- [3] X. Cao, *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9 (2010) 21-43.
- [4] H. Shen, H. Jiang, H. Mao, G. Pan, L. Zhou, Y. Cao, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 48-54.
- [5] H.M. Koch, B. Rossbach, H. Drexler, J. Angerer, *Environ. Res.* 93 (2003) 177-185.
- [6] K. Wille, H.F. De Brabander, E. De Wulf, P. Van Caeter, C.R. Janssen, L. Vanhaecke, *Trac-Trends Anal. Chem.* 35 (2012) 87-108.
- [7] A.J. Martino-Andrade, I. Chahoud, *Mol. Nutr. Food Res.* 54 (2010) 148-157.
- [8] T. Lovekamp-Swan, B.J. Davis, *Environ. Health Perspect.* 111 (2003) 139-145.
- [9] Y. Okamoto, K. Ueda, N. Kojima, *J. Health Sci.* 57 (2011) 497-503.
- [10] C. Chafer-Pericas, P. Campins-Falco, M.C. Prieto-Blanco, *Anal. Chim. Acta* 610 (2008) 268-273.
- [11] M. Castillo, D. Barcelo, *Trac-Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 574-583.
- [12] F.A. Arcadi, C. Costa, C. Imperatore, A. Marchese, A. Rapisarda, M. Salemi, G.R. Trimarchi, G. Costa, *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 963-970.
- [13] J.D. Park, S.S.M. Habeebu, C.D. Klaassen, *Toxicology* 171 (2002) 105-115.
- [14] Y. Feng, J. Zhu, *Electrophoresis* 29 (2008) 1965-1973.
- [15] M. Wittassek, H.M. Koch, J. Angerer, T. Bruening, *Mol. Nutr. Food Res.* 55 (2011) 7-31.
- [16] S. Takeda, S. Wakida, M. Yamane, A. Kawahara, K. Higashi, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2489-2492.
- [17] European Commission, 76/768/EEC (1976).
- [18] A.D. LaFleur, K.A. Schug, *Anal. Chim. Acta* 696 (2011) 6-26.
- [19] M.P. Fernandez, M.G. Ikonou, I. Buchanan, *Sci. Total Environ.* 373 (2007) 250-269.
- [20] O. Ballesteros, A. Zafra, A. Navalon, J.L. Vilchez, *J. Chromatogr. A* 1121 (2006) 154-162.
- [21] R. Barro, S. Ares, C. Garcia-Jares, M. Llompart, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 189-196 .

- [22] M. Rezaee, Y. Assadi, M.M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, J. Chromatogr. A 1116 (2006) 1-9.
- [23] C.A. Staples, Phthalate esters, The Handbook of Environmental Chemistry, Springer, Germany, 2003.
- [24] W. Li, J. Duan, Anal. Meth. 3 (2011) 314-321.
- [25] J. Li, Y. Cai, Y. Shi, S. Mou, G. Jiang, Talanta 74 (2008) 498-504.
- [26] K. Kato, M.J. Silva, L.L. Needham, A.M. Calafat, J. Chromatogr. B-Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 814 (2005) 355-360.
- [27] C. Perez Feas, M.C. Barciela Alonso, E. Pena-Vazquez, P. Herbello Hermelo, P. Bermejo-Barrera, Talanta 75 (2008) 1184-1189.
- [28] C.P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, J. Chromatogr. 542 (1991) 473-481.
- [29] D.M. Northrop, J. Forensic Sci. 46 (2001) 549-559.
- [30] S.R. Sirimanne, J.R. Barr, D.G. Patterson, J. Microcol. Sep. 11 (1999) 109-116.
- [31] E.B. Morales, A.L.R. Vazquez, J. Chromatogr. A 1061 (2004) 225-229.
- [32] K. Isoo, K. Otsuka, S. Terabe, Electrophoresis 22 (2001) 3426-3432.
- [33] Y.F. Yik, C.L. Ng, C.P. Ong, S.B. Khoo, H.K. Lee, S.F.Y. Li, Bull. Sing. Nat. Inst. Chem. 18 (1990) 91-100.
- [34] L.G. Song, Z.H. Xu, J.W. Kang, J.K. Cheng, J. Chromatogr. A 780 (1997) 297-328.
- [35] B.Y. Guo, B. Wen, X.Q. Shan, S.Z. Zhang, J.M. Lin, J. Chromatogr. A 1095 (2005) 189-192.
- [36] A. Fankhauser-Noti, K. Grob, Anal. Chim. Acta 582 (2007) 353-360.
- [37] Method 506 of Environmental Protection Agency (EPA) (1995).
- [38] J.P. Schaeper, M.J. Sepaniak, Electrophoresis 21 (2000) 1421-1429.
- [39] ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) (2005) International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2005).
- [40] C. Schwer, E. Kenndler, Anal. Chem. 63 (1991) 1801-1807.
- [41] D. Koniacki, R. Wang, R.P. Moody, J. Zhu, Environ. Res. 111 (2011) 329-336.

CAPÍTULO VIII

SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS
TIREOSTÁTICOS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS
ACOMPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

VIII.1 INTRODUCCIÓN

La determinación de fármacos tireostáticos en diferentes matrices ha despertado en los últimos años un interés creciente debido al riesgo que para la salud supone su presencia en alimentos, pero también, por el fraude al consumidor que supone la comercialización de carne de ganado tratado con estos agentes ya que la ganancia de peso obtenida mediante su uso no es debida a un aumento en la producción de carne sino que tiene su origen en una retención hídrica [221] (ver Capítulo I de esta memoria). Dado que los agentes tireostáticos se metabolizan parcialmente formando el glucurónido correspondiente y excretándose esta fracción junto con la fracción libre en la orina y por la bilis, es de esperar que estos compuestos lleguen al medioambiente y puedan encontrarse en las aguas naturales.

Como se ha indicado en la Introducción de esta memoria, la técnica de HPLC ha sido la más empleada con el fin de desarrollar métodos analíticos para la determinación de tireostáticos. En general, la determinación en carne [229], leche [236, 316] y muestras biológicas [234, 235, 254, 237-239] ha centrado la atención de la mayoría de los estudios realizados. Sin embargo, no se había descrito en la bibliografía ningún método analítico para la determinación de estos compuestos en agua, aunque tal y como se ha dicho, es de esperar que al igual que muchos otros fármacos y debido a su empleo tanto en humanos como para el ganado, dichos compuestos puedan estar presentes en el medioambiente.

En este capítulo se ha desarrollado un método analítico por HPLC-MS para la separación y determinación de fármacos tireostáticos en aguas naturales. Es conocido que este tipo de aguas se caracterizan por las bajas concentraciones a las que los contaminantes químicos pueden encontrarse presentes.

El trabajo descrito en este capítulo se realizó durante una estancia de cuatro meses en el Departamento de Química de la Universidad de la Sapienza (Roma, Italia) bajo la dirección de la Profesora Alessandra Gentili.

VIII.2 OBJETIVOS

El objetivo del trabajo de investigación presentado en este capítulo ha sido el desarrollo de un método por HPLC-ESI-MS para la determinación de cinco fármacos tireostáticos (metil tiouracilo (MeTU), mercaptobencimidazol (MBI), propil tiouracilo (PTU), fenil tiouracilo (PhTU) y tapazol (TAP)) en muestras de aguas naturales de la provincia de Lazio (Italia).

Con este fin se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Desarrollar un método cromatográfico por HPLC-ESI-MS que permita la separación simultánea de los cinco fármacos tireostáticos sintéticos estudiados.
2. Seleccionar un tratamiento de muestra que permita la extracción y/o preconcentración de los analitos en las muestras de agua.
3. Evaluar las características analíticas del método desarrollado en términos de linealidad, LLOQs y precisión con el fin de aplicarlo a la determinación de los fármacos en las muestras de agua natural.
4. Determinar los contenidos de fármacos tireostáticos presentes en las muestras de aguas naturales analizadas.

VIII.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.3.1 Optimización de los potenciales eléctricos del espectrómetro de masas para cada uno de los fármacos tireostáticos estudiados

La primera etapa de este trabajo de investigación y dado que la detección se llevó a cabo empleando un triple cuadrupolo (QqQ) y trabajando en polaridad dual, consistió en

la optimización de los potenciales eléctricos del equipo de espectrometría de masas (*declustering potential* (DP), *entrance potential* (EP), *collision energy* (Ce) y *cell exit potential* (CXP)) que van a afectar a la señal obtenida por el sistema ESI-QqQ en los experimentos MS². Para ello, se realizó la infusión directa de patrones individuales de cada tireostático en MeOH, introduciéndolos en continuo al MS a un flujo de 10 µL/min mediante una bomba de jeringa. En la **Figura VIII.1** se indican los puntos del equipo ESI-QqQ en los que se aplican cada uno de los potenciales citados. Brevemente, decir que el DP controla el grado de fragmentación que experimentará un compuesto en la fuente de ionización (ESI), el EP es el potencial que hace que los iones formados en dicha fuente lleguen hasta el primer cuadrupolo, el Ce es el potencial responsable de la fragmentación de los iones precursores en la celda de colisión situada entre el primer y el segundo cuadrupolo y el CXP se encarga de focalizar y acelerar los iones hacia el exterior de la celda de colisión de tal forma que pasen al segundo analizador. En este sentido, la adecuada optimización de cada uno de estos parámetros es muy importante para obtener la máxima transmisión de iones en su camino hacia el detector y para asegurar la correcta fragmentación de los compuestos analizados.

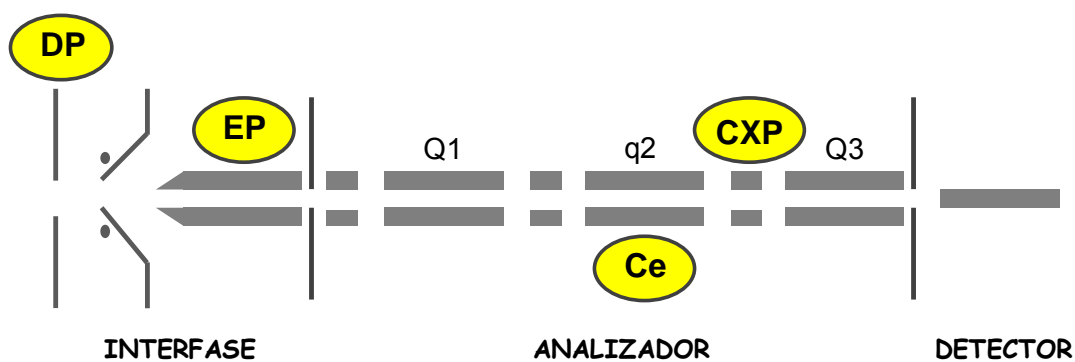


Figura VIII.1. Representación de los puntos del sistema ESI-QqQ donde se aplican cada uno de los potenciales optimizados.

Por otro lado y como se ha comentado en la Introducción de esta memoria, para la identificación inequívoca de los fármacos tireostáticos estudiados en este trabajo se ha seguido la directiva 2002/657/CE que establece que son necesarios un mínimo de cuatro puntos de identificación para cada uno de los compuestos, dos de los cuales corresponden a dos transiciones para cada analito. Con este fin, se llevó a cabo el espectro de fragmentación de cada uno de los fármacos y a partir de los espectros de iones producto (PIS) obtenidos, se seleccionaron dos iones hijo para cada uno de ellos. Las dos transiciones seleccionadas fueron las más intensas, es decir, aquellas que proporcionaban una mayor relación S/N. Indicar que la fragmentación del ion pseudomolecular de cada uno de los compuestos se estudió tanto en modo negativo (a partir de iones pseudomoleculares cargados negativamente) como en modo positivo (a partir de iones pseudomoleculares cargados positivamente) ya que el carácter anfótero de los tireostáticos hace posible la ionización del mismo en los dos modos. De las dos transiciones seleccionadas para cada analito, se estableció que la más abundante sería empleada como ion cuantificador (Q) y la menos abundante como ion cualificador (q).

La **Tabla VIII.1** agrupa los valores seleccionados como óptimos para los potenciales de cada uno de los analitos objeto de estudio, así como, las dos transiciones seleccionadas para cada uno de ellos. Indicar, que con el fin de compensar tanto las pérdidas que se pudieran producir en el procedimiento de extracción de las muestras reales como posibles problemas en la ionización de los analitos, se empleó un estándar interno (IS) que fue mercaptobencimidazol deuterado (MBI-d4), para el cual se llevó a cabo también la optimización de cada uno de los potenciales del MS, así como, la selección de las dos transiciones que mostraban una mejor relación S/N (**Tabla VIII.1**).

Tabla VIII.1. Potenciales óptimos y transiciones MS/MS seleccionadas para los cinco tireostáticos estudiados y el estándar interno empleado (MBI-d4).

Analito	Transiciones MS/MS (m/z)	Tipo	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
MeTU	141.0 → 58.0 (-)	Q	-50	-11	-27	-9
	143.0 → 125.8 (+)	q	64	10	23	6
MBI	151.0 → 118.0 (+)	Q	61	9	35	10
	149.0 → 117.0 (+)	q	-79	-11	-30	-6
PTU	169.1 → 58.0 (-)	Q	-57	-9	-32	-9
	171.0 → 112.0 (+)	q	81	11	28	11
PhTU	203.0 → 58.0 (-)	Q	-61	-7	-46	-9
	205.0 → 85.9 (+)	q	89	11	39	14
TAP	115.1 → 88.0 (+)	Q	69	9	25	8
	115.1 → 81.1 (+)	q	69	9	40	6
MBI-d4	152.9 → 120.9 (-)	Q	-71	-9	-32	-6
(IS)	155.0 → 122.0 (+)	q	45	5	35	5

Q: transición cuantificadora; q: transición cualificadora

La **Figura VIII.2** muestra el patrón de fragmentación de los iones pseudomoleculares de cada analito.

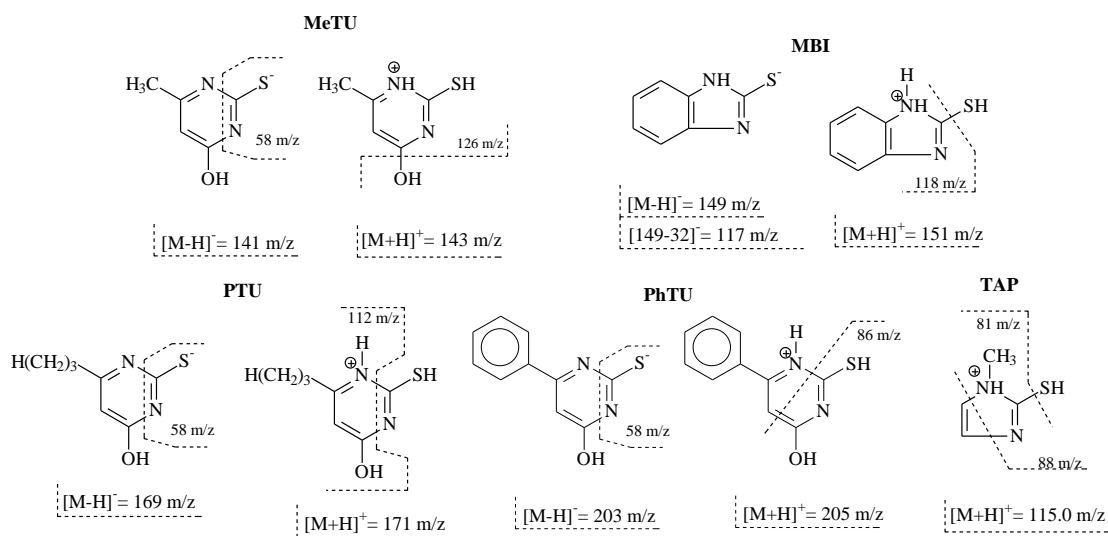


Figura VIII.2. Fragmentación de los iones pseudomoleculares de los tireostáticos estudiados.

VIII.3.2 Separación de los fármacos tireostáticos estudiados por HPLC

La segunda etapa de este trabajo de investigación consistió en el desarrollo de un método cromatográfico por HPLC-ESI-MS para la separación simultánea de los cinco fármacos tireostáticos estudiados. Los tireostáticos son compuestos polares y anfóteros de bajo peso molecular, características que hacen especialmente complicada su separación y determinación por HPLC-MS. En efecto, a pesar de que su carácter anfótero hace que sea posible que puedan ser detectados tanto mediante ionización positiva como negativa, su bajo peso molecular no favorece su detección por MS, ya que las señales correspondientes a los analitos se van a encontrar en un intervalo de m/z con un gran ruido de fondo. Por otro lado, al tratarse de compuestos altamente polares su retención cromatográfica en fase inversa es bastante pobre, por lo que es difícil resolver las coeluciones que se producen y lograr su separación.

En este trabajo se empleó una columna X-TERRA RP-18, cuya fase estacionaria está basada en partículas híbridas que permiten trabajar en unas condiciones experimentales más extremas y una fase móvil con un elevado porcentaje de agua que consistió en una disolución (A) de agua:ACN (50:50 v:v) con 6 mM de ácido fórmico y una disolución (B) únicamente acuosa. El gradiente de elución empleado consistió en un porcentaje inicial del 100 % de la fase B que se fue disminuyendo linealmente desde t=0 min hasta t=5 min hasta llegar a un 100 % de la fase A. Esta composición se mantuvo hasta t=10 min constante y finalmente se recuperaron las condiciones iniciales en 5 min.

En estas condiciones cromatográficas se consiguió la separación total de tres de los tireostáticos estudiados mientras que dos de ellos coelúan en un único pico cromatográfico, en un tiempo de análisis inferior a los 6 min. La **Figura VIII.3** muestra a modo de ejemplo, el *total ion chromatogram* (TIC) para una disolución patrón que contiene los cinco tireostáticos estudiados a una concentración de 3 µg/mL en MeOH. Aunque la resolución de todos los analitos no fue completa, ya que como se observa coeluyen TAP y MeTU, el acoplamiento del HPLC con la MS hace posible que se pueda llevar a cabo una determinación selectiva y sensible de los analitos en estas condiciones.

VIII.3.3 Preparación de la muestra para la preconcentración de los fármacos tireostáticos en muestras de agua

Uno de los principales inconvenientes que presenta el análisis de muestras medioambientales son las bajas concentraciones a las que se suelen encontrar los contaminantes químicos presentes en ellas. Con el fin de extraer y preconcentrar los fármacos tireostáticos estudiados en las muestras de agua analizadas, se probaron dos procedimientos de tratamiento de muestra diferentes.

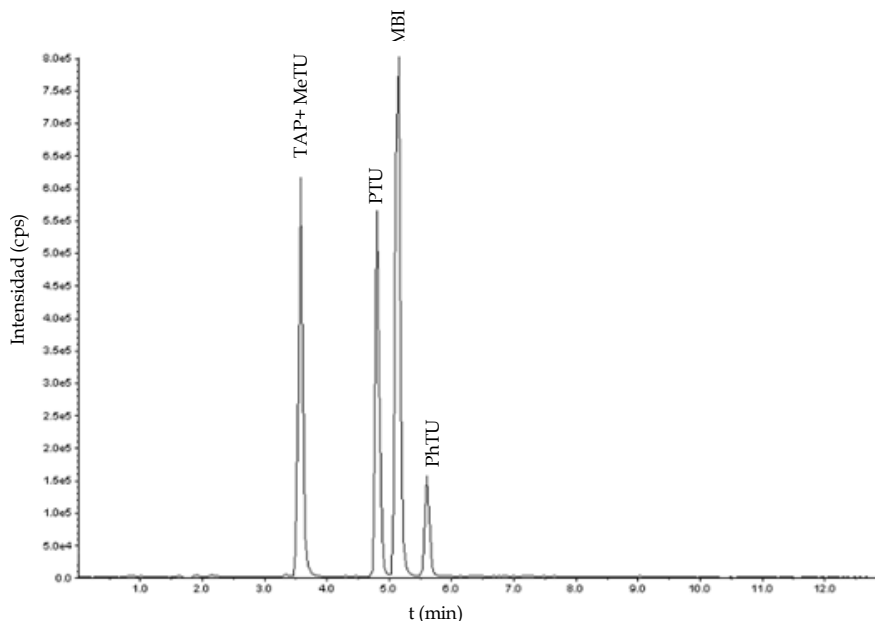


Figura VIII.3. Total ion chromatogram (TIC) de una disolución patrón que contiene los cinco tireostáticos estudiados a una concentración de 3 $\mu\text{g/L}$ en MeOH. Condiciones experimentales: volumen inyectado: 5 μL , flujo: 200 $\mu\text{L/min}$. Resto de condiciones experimentales en el texto.

En primer lugar, se empleó SPE y se probaron diversos cartuchos de extracción de distinta naturaleza: Oasis HLB, Envicarb, Sampli-Q Evidex, SCX y Discovery DPA-6S. El procedimiento de extracción utilizado en cada caso se estableció en base al mecanismo de retención que presentaba cada una de las fases estacionarias. La **Figura VIII.4** agrupa los procedimientos de SPE empleados para la extracción y preconcentración de los cinco tireostáticos estudiados en muestras de agua.

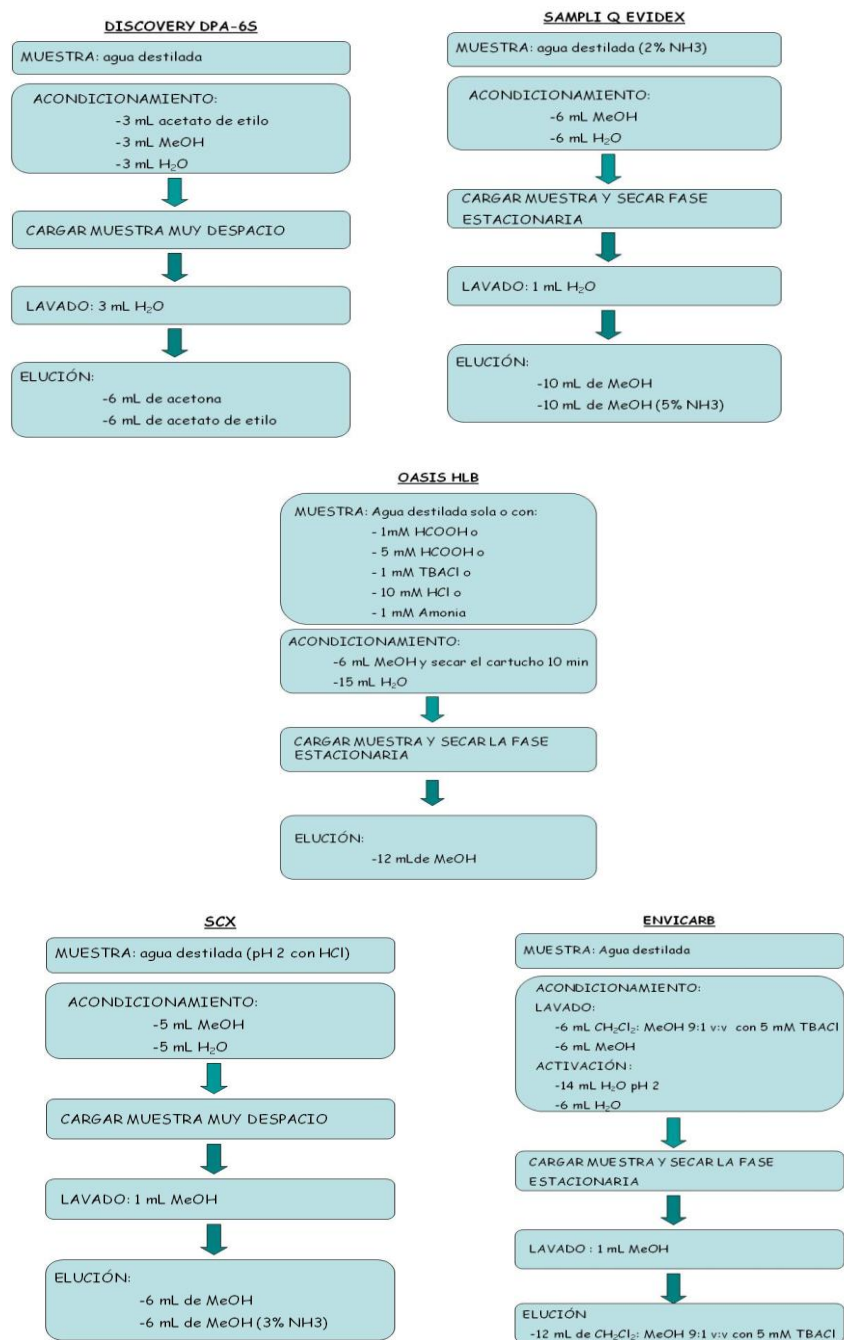


Figura VIII.4. Procedimientos de SPE empleados para la extracción y preconcentración de los cinco tireostáticos estudiados en muestras de agua.

En todos los experimentos realizados se emplearon 250 mL de agua destilada enriquecida con todos los analitos y el IS, a una concentración de 0.8 ng/mL de cada uno de ellos. El extracto final obtenido se evaporó hasta 200 μ L y se inyectaron 20 μ L de la muestra en el sistema cromatográfico. Para determinar los porcentajes de recuperación, se preparó simultáneamente una muestra de agua destilada de 250 mL sin fortificar que se sometió al mismo proceso de extracción y posteriormente se fortificó con los cinco analitos y el IS a la misma concentración que las muestras anteriores justo antes de evaporar hasta 200 μ L (muestra simulada). Por comparación de las muestras “reales” y la muestra simulada se determinaron los porcentajes de recuperación de los procedimientos SPE para cada tireostático.

La **Tabla VIII.2** agrupa los porcentajes de recuperación obtenidos con cada uno de los procedimientos SPE empleados. De todos ellos, únicamente el método de SPE desarrollado con el cartucho Oasis HLB fue capaz de retener al menos parcialmente estos compuestos, aunque con porcentajes de recuperación muy bajos (entre 2.2 y 55.8 %). Con el fin de mejorar la retención de los tireostáticos en la fase estacionaria se probaron diferentes modificaciones de la muestra inicial (ácido fórmico, HCl, TBACl o amoníaco) a distintas concentraciones. La adición de ácido fórmico proporcionó los mejores resultados pero ni siquiera en esas condiciones se obtuvieron recuperaciones por encima del 56 %. Indicar que el cartucho Oasis-HLB había sido empleado previamente en el grupo de investigación para la extracción de fármacos tireostáticos en muestras cárnicas obteniéndose porcentajes de recuperación por encima del 90 %, lo que demuestra que en nuestro caso, todos los analitos eran arrastrados por la propia matriz y apenas experimentaban retención en la fase estacionaria, debido a que son compuestos altamente hidrofílicos, se trata de una matriz acuosa y se emplean elevados volúmenes de muestra donde las concentraciones de los analitos son muy bajas.

Tabla VIII.2. Recuperaciones obtenidas para cada uno de los procedimientos SPE utilizados.

	MeTU	MBI	PTU	PhTU	TAP
OASIS HLB*	3.3-15.1 %	10.5-25.8 %	21.5-45.3 %	46.8-55.8 %	2.2-5.1 %
ENVICARB	12.2 %	-	10.0 %	-	-
SCX	-	-	-	-	5.2 %
DISCOVERY DPA-6S	-	-	-	9.1 %	-
SAMPLI-Q EVIDEX	-	-	-	-	-

* *Intervalo de valores obtenido con los distintos modificadores añadidos a la muestra (ácido fórmico, HCl, TBACl o amoniaco) antes de su extracción mediante SPE.*

A la vista de los resultados poco satisfactorios obtenidos y debido a que además el menor porcentaje de recuperación (5.1 %) se obtuvo para TAP, que es probablemente el compuesto de mayor interés estudiado por su empleo en el tratamiento del hipotiroidismo, se decidió buscar otra alternativa a la SPE para la extracción y preconcentración de los analitos de interés.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la bibliografía por Hirsch *y col.* [317], los cuales compararon la SPE y la liofilización y posterior reconstitución de los analitos en un disolvente orgánico para la preconcentración de antibióticos muy hidrofílicos en muestras acuosas y que mostraron que la liofilización permitía la preconcentración simultánea con porcentajes de recuperación muy uniformes para todos los compuestos estudiados por ellos, mientras que con la SPE las recuperaciones obtenidas para estos compuestos altamente hidrofílicos eran muy diversas (o muy elevadas o muy bajas), se pensó en la posibilidad de realizar una simple evaporación de las muestras de agua hasta sequedad, seguida de la posterior redisolución de los analitos en un disolvente orgánico como alternativa al empleo de la SPE. Este método, podría tener como principal desventaja que al tratarse solamente de un método de preconcentración no se eliminarían

los posibles interferentes de la muestra. Sin embargo, el acoplamiento con la MS y su empleo en el modo MRM ofrece la posibilidad de obtener una elevada selectividad, aun a pesar de no tratarse de una muestra completamente purificada.

Con este fin, se fortificaron 250 mL de agua destilada con una concentración de 0.8 µg/L de cada uno de los tireostáticos y del IS. A continuación, se evaporó la muestra acuosa a una temperatura de unos 70°C en un rotavapor hasta sequedad y se reconstituyó el extracto en MeOH hasta obtener un volumen final de 5 mL que se recogió en un tubo cónico y se evaporó hasta 500 µL que se inyectaron en el sistema cromatográfico. Las muestras reales de agua se compararon de nuevo con una muestra simulada, que se preparó exactamente igual que las anteriores pero que se fortificó justo antes de la evaporación final del disolvente. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron entre el 59 y el 105 % obteniéndose las mejores recuperaciones para el TAP y las peores para el PhTU por lo que se decidió emplear este último método de tratamiento de muestra por su eficacia y su sencillez.

VIII.3.4. Determinación de la abundancia relativa entre las dos transiciones MS/MS seleccionadas para cada analito

Una vez establecidos el método cromatográfico y el tratamiento de muestra, el siguiente paso consistió en la determinación de la abundancia relativa entre las dos transiciones seleccionadas para cada compuesto. Este dato es de especial importancia porque las abundancias relativas nos ayudan a la identificación inequívoca de los analitos en las muestras reales. En este sentido y según la directiva 2002/657/CE [228], tanto en las muestras fortificadas con los patrones preparados en disolvente como en las muestras reales, se debe mantener el mismo valor de abundancia relativa con un margen inferior al 25 %. Con el fin de determinar las abundancias relativas en disolvente, se seleccionó una muestra de agua en la que no se había detectado ninguno de los tireostáticos objeto de estudio (agua del Lago Vico) y se prepararon cinco alícuotas de la misma de 250 ml que se fortificaron con una disolución estándar de los cinco analitos a una concentración de 1

µg/L en MeOH. Después, se realizó el tratamiento de muestra descrito previamente y se inyectaron los extractos por duplicado en el sistema HPLC-ESI-MS. Las abundancias relativas obtenidas para esta muestra se indican en la **Tabla VIII.3** junto con la desviación estándar (n=10) para cada una de ellas.

La comparación de estos valores y de los que se obtendrían posteriormente en las muestras reales analizadas supuso un dato más para la identificación inequívoca de los compuestos estudiados.

Tabla VIII.3. Abundancias relativas obtenidas para una muestra de agua (Lago Vico) enriquecida con los cinco analitos estudiados a una concentración de 1 µg/L.

Analito	Transiciones MS/MS (m/z)	Abundancia relativa ±SD
MeTU	141.0 → 58.0 (-) 143.0 → 125.8 (+)	0.35 ± 0.05
MBI	151.0 → 118.0 (+) 149.0 → 117.0 (+)	0.42 ± 0.06
PTU	169.1 → 58.0 (-) 171.0 → 112.0 (+)	0.55 ± 0.07
PhTU	203.0 → 58.0 (-) 205.0 → 85.9 (+)	0.26 ± 0.03
TAP	115.1 → 88.0 (+) 115.1 → 81.1 (+)	0.44 ± 0.02

VIII.3.5 Características analíticas del método HPLC-ESI-QqQ desarrollado para el análisis de aguas naturales

Con el fin de aplicar el método desarrollado a la determinación de fármacos tireostáticos en muestras de aguas de ríos y lagos de la provincia de Lazio (Italia) se procedió a la validación del método en términos de linealidad, precisión, recuperaciones y LLOQs. El intervalo lineal obtenido para cada analito, los valores de la ordenada en el

origen y de la pendiente de las rectas de calibrado, los RSD obtenidos para precisión, las recuperaciones obtenidas y los LLOQ se han agrupado en la **Tabla VIII.4.**

Los analitos se cuantificaron mediante el método de calibrado del patrón interno empleando MBI-d4 como estándar interno. Con el fin de establecer el intervalo lineal de la recta de calibrado, se prepararon varias alícuotas de un agua natural (250 mL) que no contenían ninguno de los analitos objeto de estudio (agua del Lago Vico) y se fortificaron a distintos niveles de concentración con cada uno de ellos y también con el IS (entre 0 y 25 µg/L, siete niveles en total). Los datos obtenidos permitieron establecer que el intervalo lineal para todos los analitos y para el IS se encontraba entre 0 y 10 µg/L.

Tabla VIII.4. Características analíticas del método desarrollado para la determinación de fármacos tireostáticos en aguas naturales por HPLC-ESI-MS.

Tireostático	Recuperación (%)	Parámetros de la regresión lineal			Precisión <i>intra-day</i> (RSD %)	Precisión <i>inter-day</i> (RSD %)	LLOQ (µg/L)
		Ordenada	Pendiente	Coficiente de determinación R ²			
TAP	75.9	-0.0247	0.1050	0.996	11.1	20.2	1.0
MeTU	95.9	0.2854	0.4850	0.988	4.4	19.1	1.0
PhTU	79.4	0.0712	0.2300	0.992	6.4	6.9	0.5
PTU	107.6	0.3665	0.5510	0.988	4.0	15.2	0.5
MBI	90.1	0.0915	0.3290	0.994	2.5	14.0	0.5

La rectas de calibrado se realizaron por tanto en este intervalo de concentraciones para los cinco analitos objeto de estudio. Para ello, se prepararon cinco alícuotas de 250 mL de un agua natural que no contenía ninguno de los analitos objeto de estudio (agua del Lago Vico). A estas alícuotas se les adicionaron los cinco compuestos estudiados de tal forma que se obtuviesen cinco muestras a concentraciones de 0.5, 1, 3, 5 y 10 µg/L. Además, a todas ellas se les añadió el IS a una concentración de 1 µg/L. A continuación, se sometió cada muestra acuosa al proceso de preconcentración explicado anteriormente y se

inyectaron los extractos obtenidos en el sistema HPLC-MS. Finalmente, se representó la relación entre el área de cada analito y el área del IS con respecto a la concentración de analito empleando los valores de la transición más intensa (transición cuantificadora, Q).

Las rectas de calibrado se repitieron durante tres días consecutivos con el fin de estudiar la repetibilidad del método. Destacar, que considerando que las rectas de calibrado se prepararon a partir de muestras acuosas reales sometidas a la totalidad del proceso de preconcentración y no a partir de patrones en disolvente, los valores obtenidos para el coeficiente de determinación de cada recta se pueden considerar adecuados.

Para estudiar la precisión del método se evaluaron tanto la precisión *intra-day* como la precisión *inter-day*. Para evaluar la precisión *intra-day*, se prepararon tres muestras de agua natural de 250 mL fortificadas con los cinco tireostáticos estudiados a una concentración de 1 µg/L. Cada una de las muestras se sometió al proceso de preconcentración y el extracto obtenido se inyectó por duplicado en el sistema HPLC-MS. Se calculó el valor de RSD (n=6) correspondiente al área de cada analito obteniéndose valores entre 2.5 y 11.1 %. Para evaluar la precisión *inter-day*, se preparó una muestra de agua de 250 mL fortificada con los cinco tireostáticos estudiados a una concentración de 1 µg/L de cada uno de ellos. La muestra acuosa se sometió al proceso de preconcentración de los analitos y se inyectó el extracto obtenido por duplicado. Este proceso se repitió a lo largo de tres días consecutivos y se calculó el valor de RSD correspondiente al área de cada analito obteniéndose valores entre 6.9 y 20.2 %.

Para la determinación de los porcentajes de recuperación de los compuestos estudiados en este método, se prepararon cinco muestras de agua natural de 250 mL que se fortificaron con cada uno de los tireostáticos a un nivel de concentración de 0.5 µg/L. Estas muestras se sometieron al proceso de preconcentración y se inyectaron los extractos obtenidos por duplicado en el sistema HPLC-MS. Simultáneamente se preparó una muestra de agua natural de 250 mL que fue fortificada con los cinco analitos después del proceso de preconcentración (muestra simulada). La comparación de las cinco muestras

acuosas reales con la muestra simulada, permitió establecer que el porcentaje de recuperación obtenido para cada analito se encontraba entre 75.9 y 107.6 %

Por último, se determinaron los LLOQ para cada tireostático. Se define el LLOQ del método como la concentración mínima a la que la relación señal/ruido (S/N) es superior a cinco y la medida es reproducible con un error ± 20 %. Para poder determinar el LLOQ para cada analito, en primer lugar se estimó el LLOQ teórico como la concentración a la que se tiene una relación S/N=5, a partir de los cromatogramas obtenidos para la concentración más baja utilizada en la realización de la recta de calibrado (0.5 $\mu\text{g/L}$) y empleando los valores encontrados para la transición menos intensa de las seleccionadas para cada analito. Los valores teóricos obtenidos se encontraban en torno a 0.5 $\mu\text{g/L}$ para TAP, MeTU y PhTU y de 0.25 $\mu\text{g/L}$ para MBI y PTU. A continuación, y con el fin de confirmar los valores teóricos obtenidos para los LLOQs y ver si cumplían la segunda condición establecida, que es que la medida sea reproducible con un error máximo del 20 %, se prepararon cinco réplicas de agua natural fortificadas a cada una de las concentraciones estimadas para cada analito (0.5 $\mu\text{g/L}$ para TAP, MeTU y PhTU y 0.25 $\mu\text{g/L}$ para MBI y PTU). Estas muestras acuosas fueron sometidas al proceso de preconcentración y posteriormente se inyectaron por duplicado en el sistema HPLC-MS. Simultáneamente se preparó una muestra simulada que después de ser sometida al proceso de preconcentración se fortificó con los cinco analitos a la misma concentración que las muestras reales. Por comparación de los resultados encontrados para las muestras reales y para la muestra simulada, se determinaron los porcentajes de recuperación obteniéndose valores de RSD (n=10) mayores del 20 % para TAP, MTU y que para MBI y PTU las relaciones S/N eran menores de 5. Esto confirmó que el LLOQ para estos analitos no era el estimado teóricamente, por ello a continuación se repitió todo el proceso aumentando ligeramente la concentración de estos cuatro compuestos en las cinco muestras (1 $\mu\text{g/L}$ para TAP y MeTU, 0.5 $\mu\text{g/L}$ para PhTU, MBI y PTU). Para estos valores de concentración se obtuvieron relaciones S/N superiores a 5 para todos los compuestos estudiados (siempre empleando la transición menos intensa) y además los RSD obtenidos para la recuperación fueron menores del 20 % en todos los casos. De este modo, se

estableció que los LLOQ eran de 1 µg/L para TAP y MeTU y de 0.5 µg/L para PhTU, MBI y PTU.

VIII.3.6 Determinación de los fármacos tireostáticos estudiados en muestras de agua de la provincia de Lazio

El método desarrollado se aplicó a la determinación de los cinco fármacos tireostáticos estudiados en muestras de aguas de lagos y ríos de la provincia de Lazio en Italia.

Los puntos de muestreo se seleccionaron de tal manera que se pudieran tener muestras de agua de áreas donde la actividad humana y ganadera fuese abundante y de áreas completamente exentas de actividad. En la **Figura VIII.5** se muestran de forma aproximada los diferentes puntos en los que se recogieron las diez muestras de agua que se analizaron.



Figura VIII.5. Puntos de muestreo en los que se han tomado las muestras de las aguas naturales analizadas.

La **Tabla VIII.5** agrupa las concentraciones medias obtenidas para cada una de las diez muestras analizadas. Con el fin de llevar a cabo la determinación inequívoca de los analitos se emplearon como datos el tiempo de retención, las dos transiciones MRM de cada analito y la abundancia relativa de dichas transiciones. Se observa que de todos los analitos estudiados en este trabajo únicamente se detectaron dos (TAP y MBI) en algunas de las zonas estudiadas (en siete de las diez muestras de aguas analizadas) y solamente se pudo cuantificar el TAP también en alguna de ellas (en cuatro muestras). Para TAP, la abundancia relativa determinada en las muestras reales que contenían este analito (E=0.42, G=0.44, H=0.46, I=0.48), coincidía con los valores determinados para el mismo en disolvente (0.44, **Tabla VIII.3**)

Tabla VIII.5. Concentraciones obtenidas para cada uno de los tireostáticos analizados en las muestras de agua.

Muestra	MeTU ($\mu\text{g/L}$)	MBI ($\mu\text{g/L}$)	PTU ($\mu\text{g/L}$)	PhTU ($\mu\text{g/L}$)	TAP ($\mu\text{g/L}$)
A. Lago Vico	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
B. Lago Magtignano	n.d	n.d	n.d	n.d	< LLOQ
C. Agua subterránea (Vico)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
D. Río Tiber (Isla Tiberina)	n.d	<LLOQ	n.d	n.d	< LLOQ
E. Río Tiber (Fiumicino)	n.d	<LLOQ	n.d	n.d	1.494
F. Río Tiber (Magliana)	n.d	<LLOQ	n.d	n.d	< LLOQ
G. Lago Bracciano (Bracciano)	n.d	n.d	n.d	n.d	2.897
H. Lago Bracciano (Anguillara)	n.d	n.d	n.d	n.d	1.640
I. Lago Bracciano (Trevignano)	n.d	n.d	n.d	n.d	1.442
J. Farfa	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

La **Figura VIII.6** muestra a modo de ejemplo un cromatograma ESI-QqQ en el modo MRM para la muestra de agua recogida en el río Tiber a su paso por Fiumicino donde se detectaron dos fármacos (MBI y TAP).

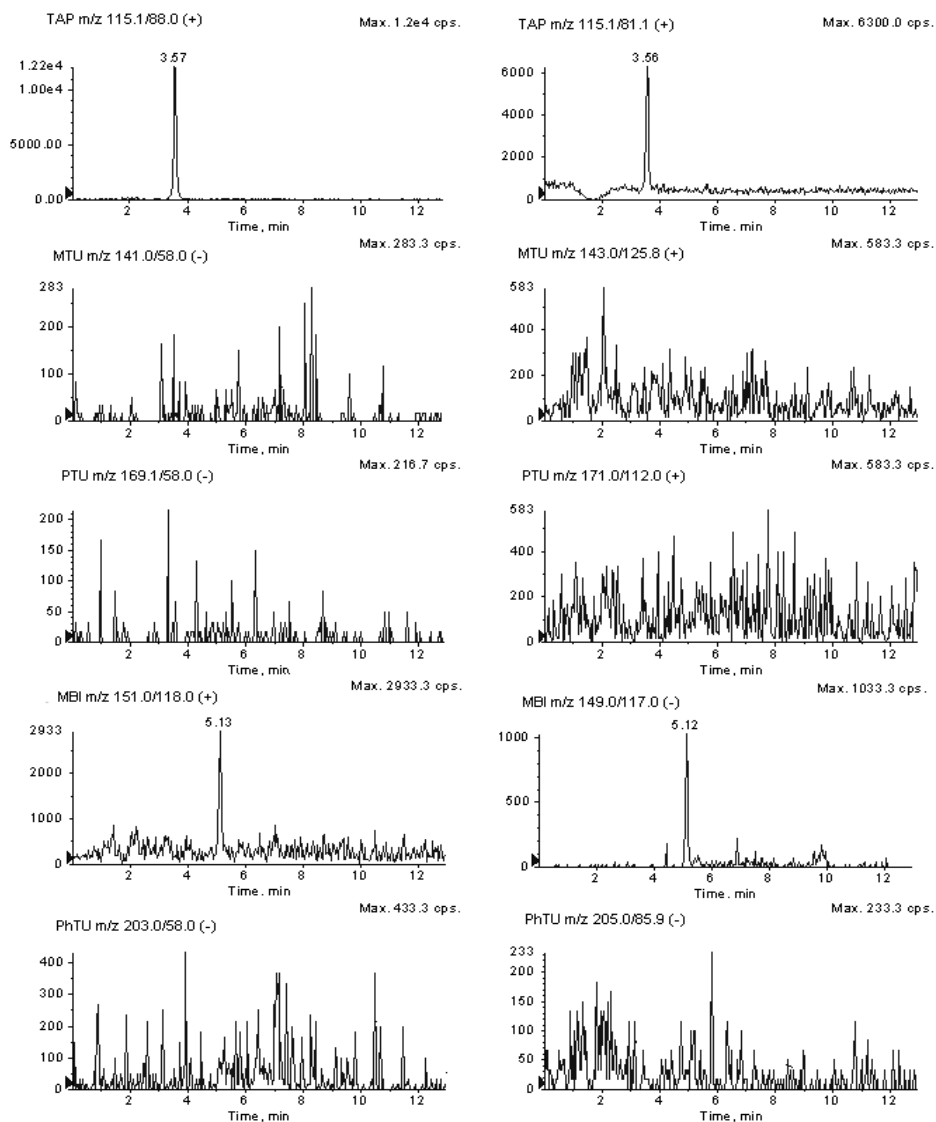


Figura VIII.6. Cromatograma HPLC-ESI-QqQ correspondiente a las dos transiciones seleccionadas para cada uno de los cinco analitos estudiados en una muestra de agua recogida en el río Tiber a su paso por Fiumicino.

De los resultados obtenidos se puede concluir que se observa un claro efecto antropogénico. En efecto, el TAP fue detectado en todas las aguas cercanas a pueblos o grandes ciudades, tal como se puede observar en el mapa superior, sin embargo, en aquellas zonas de muestreo donde no existe ninguna actividad humana o ganadera, no se detectó ni TAP ni ninguno de los fármacos tireostáticos estudiados.

VIII.4 CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se ha desarrollado una nueva metodología analítica por HPLC-ESI-MS que permite la separación y determinación simultánea de cinco fármacos tireostáticos sintéticos en muestras de aguas naturales. Con el fin de extraer los analitos estudiados en las muestras analizadas se probaron dos posibles estrategias de extracción. En la primera se evaluaron diferentes cartuchos de SPE, pero ninguno de ellos permitió la recuperación de los analitos objeto de estudio de forma cuantitativa. La segunda estrategia consistió en la evaporación a sequedad de las muestras acuosas y la posterior redisolución de los analitos en un disolvente orgánico que permitió obtener recuperaciones superiores al 76 %. El método desarrollado se aplicó a la determinación de los cinco fármacos tireostáticos estudiados en muestras de agua recogidas en distintos ríos y lagos de la provincia de Lazio en Italia. De todos los analitos incluidos en este trabajo, únicamente se detectaron dos (TAP y MBI) en algunas de las zonas estudiadas y solamente se pudo cuantificar el TAP también en alguna de ellas. De los resultados obtenidos se puede concluir que se observa un claro efecto antropogénico. En efecto, el TAP fue detectado en aquellas muestras recogidas cerca de pueblos con actividad ganadera o grandes ciudades, mientras que en aquellas zonas de muestreo donde no existe ninguna actividad humana o ganadera, no se detectó ninguno de los fármacos tireostáticos estudiados. El método analítico desarrollado en este trabajo de investigación constituye la primera aportación para la determinación de fármacos tireostáticos en aguas por HPLC-ESI-MS.

CAPÍTULO IX

**EVALUACIÓN DE SÍLICES MESOPOROSAS
FUNCIONALIZADAS CON GRUPOS C18 COMO FASES
ESTACIONARIAS PARA LA EXTRACCIÓN DE
HORMONAS ESTEROIDEAS MEDIANTE SPE**

IX.1 INTRODUCCIÓN

En la Introducción de esta memoria se ha puesto de manifiesto la problemática asociada a las hormonas esteroideas. A pesar de que muchas de ellas son naturales y vitales para el correcto funcionamiento del organismo, el consumo de concentraciones elevadas de las mismas o el de otras hormonas esteroideas no naturales a través de los alimentos supone un claro riesgo para la salud. En este sentido, el consumo de carnes y de productos de origen animal es una importante fuente de ingesta de hormonas. Este es el caso de la leche, un producto de gran valor nutricional que sin embargo, en los últimos años ha creado cierta controversia debido a las elevadas concentraciones de hormonas que contiene. Las hormonas presentes en la leche pueden ser tanto naturales (la mayoría de la leche se extrae de vacas en estado de gestación y por tanto contiene unos niveles muy elevados de hormonas naturales) como sintéticas (son administradas al ganado para obtener el engorde rápido del animal) por lo que la determinación de ambos tipos de hormonas esteroideas en esta matriz es de gran importancia.

Existen en la bibliografía diversos trabajos en los que se ha llevado a cabo la separación y determinación de hormonas esteroideas en muestras de leche. La GC, especialmente acoplada a MS, es una técnica que goza de gran popularidad en este campo [262, 263] pero presenta el gran inconveniente de incluir una etapa previa de derivatización de los analitos que supone un gran consumo de tiempo, por lo que la HPLC se presenta como una alternativa a la GC. En este sentido, podemos encontrar algunos trabajos que emplean ya esta técnica para la determinación de hormonas esteroideas en leches [264-266]. La mayoría de estos trabajos emplean la HPLC acoplada a MS.

Por otra parte, una de las etapas más críticas en el planteamiento de nuevas metodologías analíticas, se centra en el desarrollo de nuevos y efectivos procedimientos de preparación de muestra que permitan determinar los analitos de interés a niveles de concentración muy bajos. En general, la mayoría de los trabajos disponibles en la

bibliografía dedicados a la extracción y preconcentración de hormonas esteroideas emplean la SPE para este fin [267,269], por lo que se trabaja cada vez más en el desarrollo de nuevos materiales que sirvan de rellenos para SPE y que permitan la extracción y preconcentración de las hormonas esteroideas de diferentes matrices de una forma rápida, económica y eficaz. En este sentido, los materiales mesoporosos suponen una gran alternativa a las clásicas sílices amorfas empleadas tradicionalmente en SPE.

Según la IUPAC, los materiales mesoporosos o mesoestructurados son aquellos con un tamaño de poro intermedio entre los materiales microporosos y los macroporosos (20-500 Å), de elevada superficie específica y con una distribución de poro regular.

Desde el descubrimiento en el año 1992 del material mesoporoso M41S, las sílices mesoporosas con diversas morfologías y tamaño controlado de poro han recibido especial atención [318]. Estas sílices presentan una elevada superficie específica y poros de gran volumen, lo que les permite alojar moléculas de gran tamaño en su interior. Además, el volumen de poro se puede ajustar mediante el empleo de distintos tensioactivos y el control de las condiciones de síntesis [319].

Una característica importante de los materiales mesoporosos, es su esqueleto estructural, ya que los poros presentan un mismo diámetro y una misma morfología, por lo que se mantiene un sistema de translación geométrica. Las propiedades más importantes de este tipo de materiales son [277]:

- ✓ Tamaño de poro homogéneo
- ✓ Elevado volumen de poro
- ✓ Elevada área superficial
- ✓ Presencia de grupos silanoles en la superficie, susceptibles de ser funcionalizados fácilmente con distintos tipos de ligandos con una elevada dispersión y accesibilidad a los centros activos de la sílice.

Las sílices mesoporosas se han empleado en áreas tan diversas como son la catálisis [320], como adsorbentes [321], en separaciones cromatográficas [322], en sensores electroquímicos [323], etc.

Estas sílices se suelen sintetizar a partir de tensioactivos que tienen la función de ser agentes directores de estructura para el autoensamblaje y la condensación de precursores inorgánicos. De esta manera, se forma una estructura tridimensional y mediante la eliminación (calcinación) posterior del tensioactivo empleado como plantilla durante la síntesis, se obtienen las sílices con las propiedades texturales mencionadas anteriormente. Con el fin de obtener tamaños de poro relativamente grandes se pueden introducir agentes que expandan los poros durante el tratamiento térmico, como por ejemplo el N,N-dimetildecilamina [324] o bien realizar la síntesis con copolímeros de masa molecular mayor a 2000 como por ejemplo el P123, que es el empleado en este trabajo [325].

Una vez obtenido el soporte mesoestructurado se procede a la funcionalización del mismo que nos va a permitir controlar algunas propiedades de la superficie, así como, proporcionar a estos materiales una mayor estabilidad térmica, mecánica o estructural.

En este trabajo de investigación se han evaluado dos sílices mesoporosas de distinta morfología funcionalizadas con grupos C18, para su empleo como relleno en cartuchos de SPE para la extracción y preconcentración de hormonas esteroideas en leches, y se han comparado los resultados obtenidos con estos materiales y los obtenidos con cartuchos de SPE disponibles comercialmente con el fin de demostrar las posibles ventajas que pueden ofrecer estos materiales.

El trabajo de investigación descrito en este capítulo se realizó durante una estancia de cuatro meses en el Departamento de Química Inorgánica y Analítica de la Universidad Rey Juan Carlos (URJC) (Móstoles, España) bajo la dirección de los Dres. Isabel Sierra Alonso, Sonia Morante Zarcero y Damián Pérez Quintanilla.

IX.2 OBJETIVOS

El objetivo del trabajo de investigación presentado en este capítulo ha sido la evaluación de dos sílices mesoporosas funcionalizadas con grupos C18 para su empleo como relleno en cartuchos de SPE para la extracción de siete hormonas esteroideas (estrone (E1), estradiol (E2), estriol (E3), dietilestilbestrol (DES), etinil estradiol (EE2), testosterona (T) y progesterona (P)) en muestras de leche. Además, y con el fin de realizar el seguimiento de los procedimientos de extracción realizados con estas nuevas fases, se ha desarrollado un método de separación para las siete hormonas estudiadas por HPLC-UV.

Con este fin se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Sintetizar dos sílices mesoporosas distintas (SBA15 y SM) funcionalizadas con grupos C18.
2. Caracterizar las sílices mesoporosas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), isothermas de adsorción-desorción mediante el método BET, análisis elemental (AE) y análisis termogravimétrico (TG).
3. Desarrollar un método cromatográfico por HPLC-UV para la separación simultánea de las siete hormonas esteroideas estudiadas.
4. Evaluar las sílices mesoporosas sintetizadas empleadas como rellenos de cartuchos de SPE para la extracción de las siete hormonas esteroideas estudiadas en muestras de leche.

5. Comparar los resultados obtenidos con las sílices mesoporosas y los obtenidos con otras fases estacionarias comerciales de SPE empleadas en la bibliografía para la extracción de hormonas esteroideas en leche.

IX.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IX.3.1 Síntesis y caracterización de sílices mesoestructuradas

En este trabajo de investigación se han sintetizado dos sílices mesoporosas diferentes: SBA15 y SM. La síntesis de ambos materiales y su funcionalización con cadenas C18 se realizó según el procedimiento que se ha explicado en el apartado III.3.5 de esta memoria.

Con el fin de caracterizar ambos sólidos mesoporosos, antes y después de su funcionalización, se realizaron diversos estudios: isotermas de adsorción-desorción de gases en sólidos realizados mediante el método BET, SEM, TEM, AE y TG. Los ensayos BET y TG se realizaron en el Departamento de Química Inorgánica y Analítica y en el Departamento de Ciencia e Ingeniería de Materiales de la URJC, respectivamente, las microscopías SEM y TEM se realizaron en el Centro de Apoyo Tecnológico de la URJC y los análisis elementales se realizaron en la Universidad Complutense de Madrid. A continuación, se explicará muy brevemente el fundamento de cada una de estas técnicas de caracterización, así como, los resultados obtenidos con ellas para cada una de las sílices mesoporosas estudiadas.

El AE es una técnica que aporta información del contenido de C, H y N presentes en un material. Se trata de una técnica destructiva en la que tras pesar una determinada cantidad de la muestra, ésta se somete a una oxidación térmica (1600-1800 °C), de forma que se consigue la conversión de los componentes de la muestra en CO₂, H₂O y N₂. A través de la adsorción selectiva de cada uno de estos gases se puede determinar la cantidad de los mismos, y de esta manera en nuestro caso establecer el porcentaje de cadenas C18 presente en cada una de las sílices sintetizadas, que están funcionalizadas con grupos C18.

La **Tabla IX.1** agrupa los porcentajes de C e H y el grado de funcionalización obtenido para las dos sílices mesoporosas sintetizadas en este trabajo y para una sílice amorfa comercial, todas ellas funcionalizadas con grupos C18. Se observa que el grado de funcionalización (expresado como milimoles de ligando por gramo de material) en la sílice amorfa comercial es algo inferior al de las sílices mesoporosas, lo cual puede atribuirse a su menor área superficial. En el caso de las sílices mesoporosas funcionalizadas, el grado de funcionalización conseguido fue ligeramente superior para la sílice SBA15, al ser ésta la que presenta mayor superficie de las dos. También indicar que en el caso de las sílices mesoporosas la síntesis se había realizado adicionando un 15% en masa de C18, y el contenido real de C18 anclado sobre la superficie de estos materiales se determinó a través del AE obteniéndose un valor de 0.28 mmol C18/g sílice para la SBA15-C18 y de 0.26 mmol C18/g sílice para la SM-C18.

Tabla IX.1. Porcentajes de C e H obtenidos por AE en las sílices empleadas en este trabajo.

COMPUESTO	% C	% H	Grado de funcionalización con grupos C18 (mmol C18 / g sílice)
SBA15-C18	6.62	2.07	0.28
SM-C18	6.22	1.97	0.26
C18 COMERCIAL	5.59	2.06	0.23

La TG es una técnica en la que se mide el peso de la muestra frente al tiempo o a la temperatura mientras ésta se somete a un programa de temperatura controlado en una atmósfera específica e inerte en la mayoría de los casos. Esta técnica permite por tanto estudiar procesos como descomposiciones, sublimaciones, reducciones, desorciones o absorciones. En el caso de las sílices funcionalizadas con grupos C18, esta prueba permite estimar el grado de funcionalización a partir de la pérdida de masa que se produce durante del proceso de calcinación del material, lo que nos da una idea de su estabilidad térmica y, además, nos permite confirmar los resultados obtenidos en el AE.

La **Figura IX.1** muestra las curvas termogravimétricas obtenidas para los materiales SBA15-C18 y SM-C18. Se puede observar en ambos casos una primera pérdida de masa entre la temperatura de partida (T^a ambiente) y aproximadamente 150°C que se corresponde con la pérdida de moléculas de agua fisisorbidas al material, así como, de algunos otros compuestos volátiles que hayan podido quedar tras la síntesis del material. Entre los 150 y 200°C no se observa pérdida significativa de masa, pero a partir de esta temperatura y hasta los 600°C se produce otro descenso de masa acusado, debido a la pérdida de las cadenas de C18 mediante un proceso exotérmico en varias etapas. La pérdida de masa observada en ambos casos confirma los resultados de grado de funcionalización obtenidos mediante AE, comprobándose que la sílice SBA15-C18 es la que presenta un grado de funcionalización ligeramente superior.

La SEM es una técnica que permite la observación y caracterización superficial de las partículas de un sólido y proporciona información morfológica de las mismas. La **Figura IX.2** muestra las imágenes SEM correspondientes a las tres sílices empleadas en este trabajo (**a** y **b**: sílice amorfa comercial, **c** y **d**: sílice mesoporosa SM-C18, **e** y **f**: sílice mesoporosa SBA15-C18). Se puede observar que para la sílice comercial las partículas poseen morfologías muy diversas, mientras que para la SBA15-C18 las partículas tienen forma alargada (cilíndrica) y para la SM-C18 son esféricas. Además, existe una gran diferencia de tamaño entre las partículas de las tres sílices, siendo la sílice comercial la que presenta el mayor tamaño de partícula ($> 20\ \mu\text{m}$), mucho mayor que las mesoporosas (entre 2 y $5\ \mu\text{m}$).

La TEM es una técnica que permite determinar el tipo y el tamaño de poro de los materiales. La **Figura IX.3** muestra las imágenes TEM correspondientes a la sílice comercial (**a**) y a las dos sílices mesoporosas (**b**: SM-C18, **c** y **d**: SMA15-C18 en dos ejes distintos). Se puede observar que la sílice amorfa comercial (**a**) muestra poros de tamaño muy heterogéneo y con una distribución desordenada, que la sílice mesoporosa SM-C18 (**b**) presenta poros tipo "agujero de gusano" de tamaño homogéneo pero con una distribución poco ordenada y que la sílice mesoporosa SMA15-C18 presenta poros con una distribución muy ordenada (**c**) y muy homogéneos con forma hexagonal (**d**). De esta

forma mientras que en la sílice comercial los poros no atraviesan la partícula, en la sílice SM-C18 la distribución de los poros es tridimensional y en la sílice SMA15-C18 la distribución de los poros es monodimensional (canales paralelos en una dimensión).

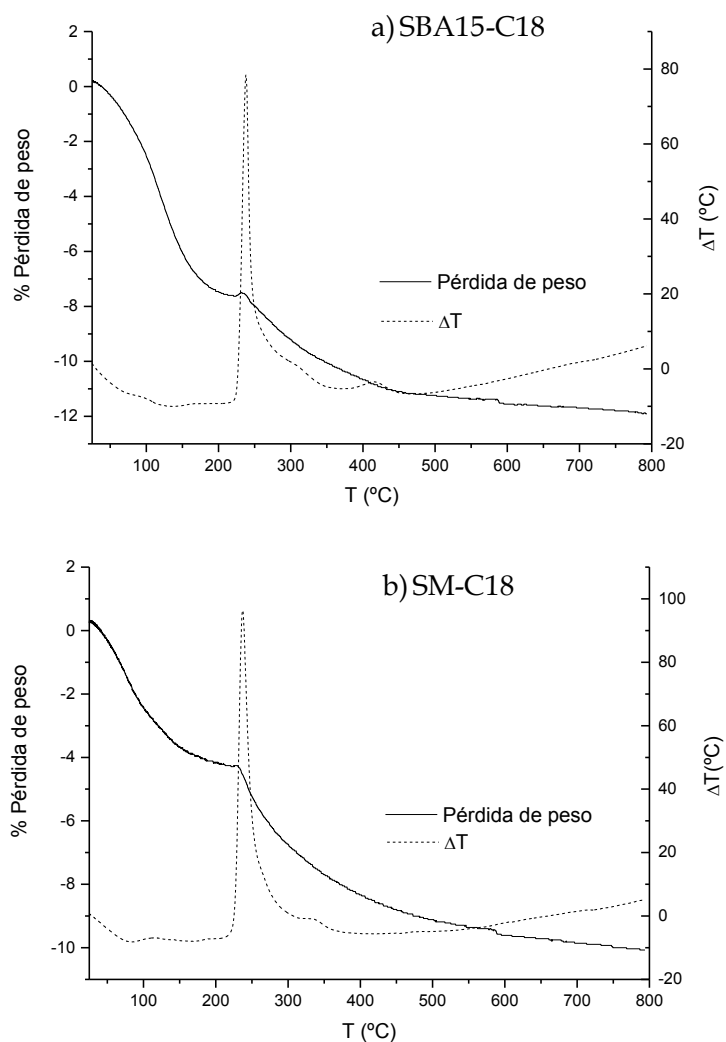


Figura IX.1. Análisis termogravimétricos: a) SBA15-C18 y b) SM-C18.

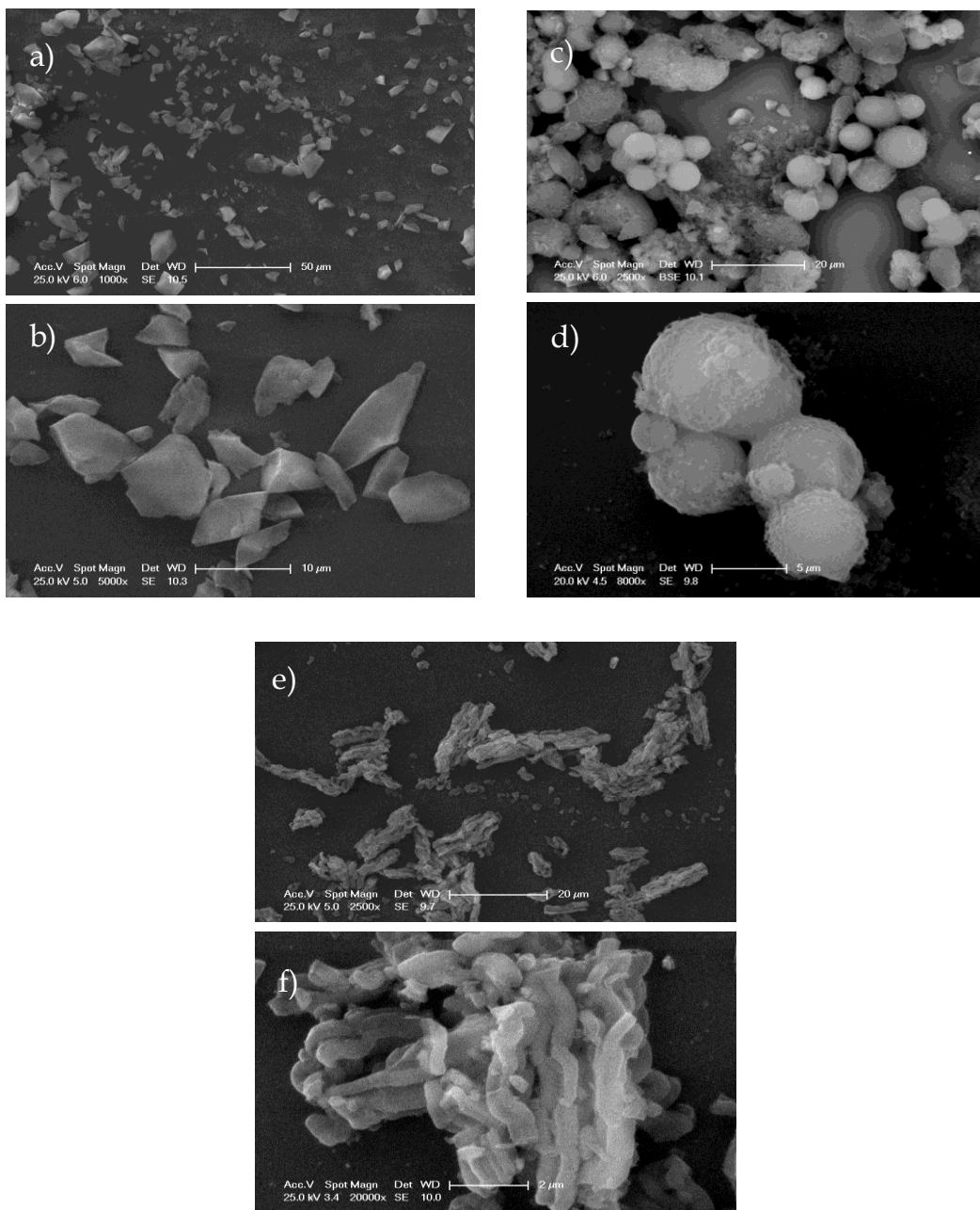


Figura IX.2. Imágenes SEM: a y b) Sílice comercial funcionalizada con C18; c y d) SM-C18; e y f) SBA15-C18.

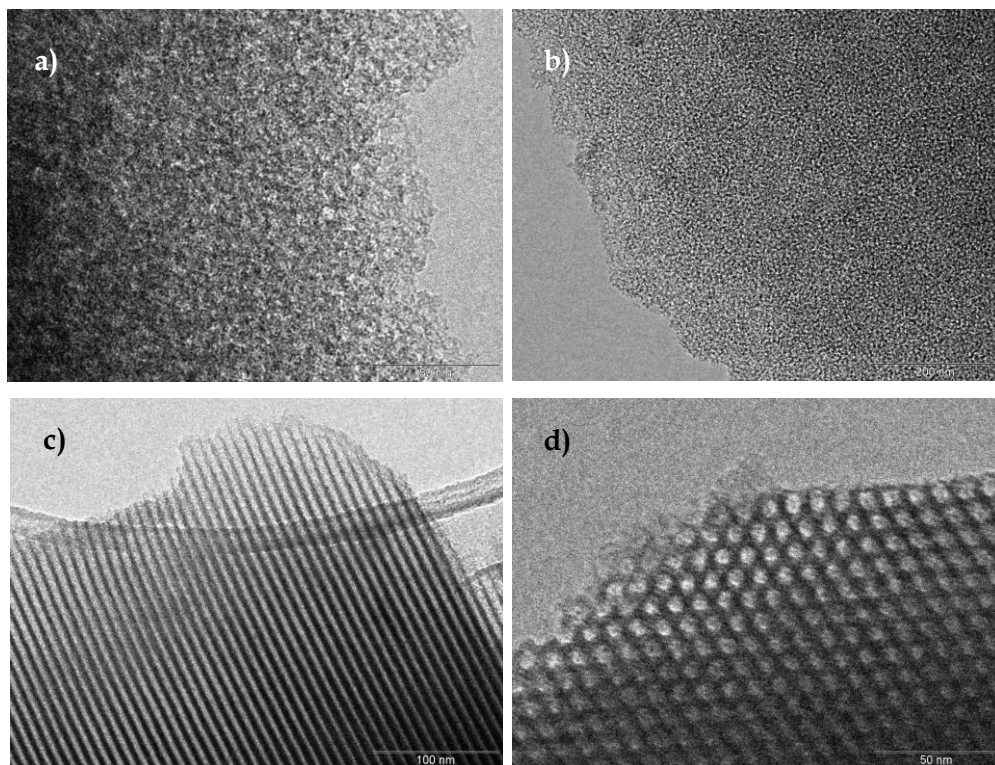


Figura IX.3. Imágenes TEM: a) Sílice comercial funcionalizada con C18; b) SM-C18; c y d) SBA15-C18.

Finalmente, el ensayo de fisisorción de gases en sólidos es una técnica empleada para el estudio de la caracterización de la textura porosa del mismo. Consiste en la adhesión de un adsorbato (gas N_2) en la sílice, mediante fuerzas de interacción dipolares sin enlace químico. El método BET es el más empleado para llevar a cabo estos experimentos, en el que se emplea N_2 como gas y se obtiene la isoterma de adsorción a $77^\circ K$. Así, se pueden distinguir hasta 6 tipos de isotermas diferentes en función del tipo de material, que se muestran en la **Figura IX.4**. En el caso concreto de los materiales mesoporosos, se producen dos tipos de isotermas características que son la isoterma IV y la V.

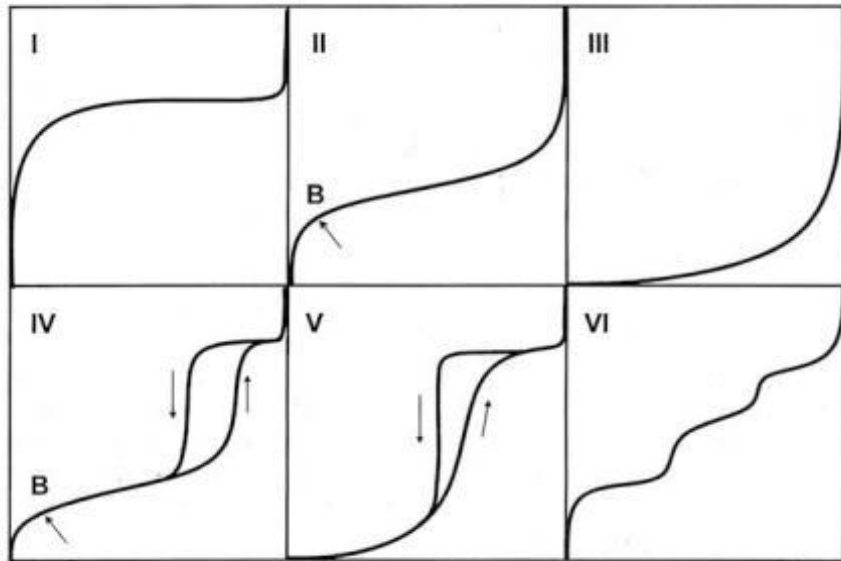


Figura IX.4. Tipos de isothermas de adsorción-desorción

En la **Figura IX.5** se muestran las isothermas obtenidas para las dos sílices mesoporosas sintetizadas en este trabajo. Se observa que ambas se corresponden con isothermas tipo IV, características de los materiales mesoporosos, donde la adsorción y la desorción de gas en el material no se produce por el mismo mecanismo y por ello, se puede ver un ciclo de histéresis.

Como se puede observar, si comparamos las isothermas de los materiales preparados antes y después de la funcionalización, el cambio más significativo es un descenso en el volumen de gas adsorbido en las sílices funcionalizadas, lo que se atribuye al descenso en el volumen de poro que se produce en estos materiales como consecuencia de la incorporación de las cadenas de C18 al interior de los mismos.

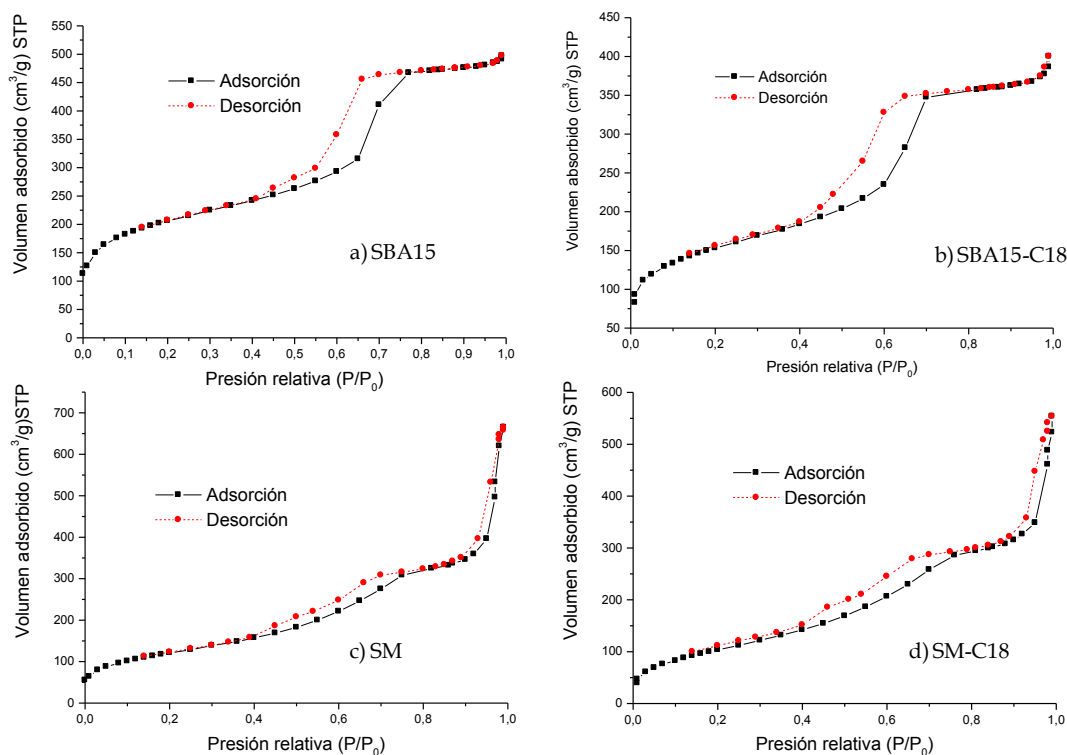


Figura IX.5. Isothermas de adsorción y desorción de N₂ a 77°K: a) SBA15 sin funcionalizar; b) SBA15-C18; c) SM sin funcionalizar y d) SM-C18.

Finalmente, mediante el método BET se obtuvo el diámetro y el volumen medio de poro. La **Figura IX.6** muestra la distribución del tamaño de poro de cada una de las sílices mesoporosas sintetizadas. Como se puede comprobar tras observar las gráficas mostradas en esta figura, la dispersión en el diámetro de poro fue bastante superior en las sílices SM y SM-C18, en comparación con las sílices SBA15 y SBA15-C18, hecho que ya se había puesto de manifiesto con las imágenes obtenidas por TEM.

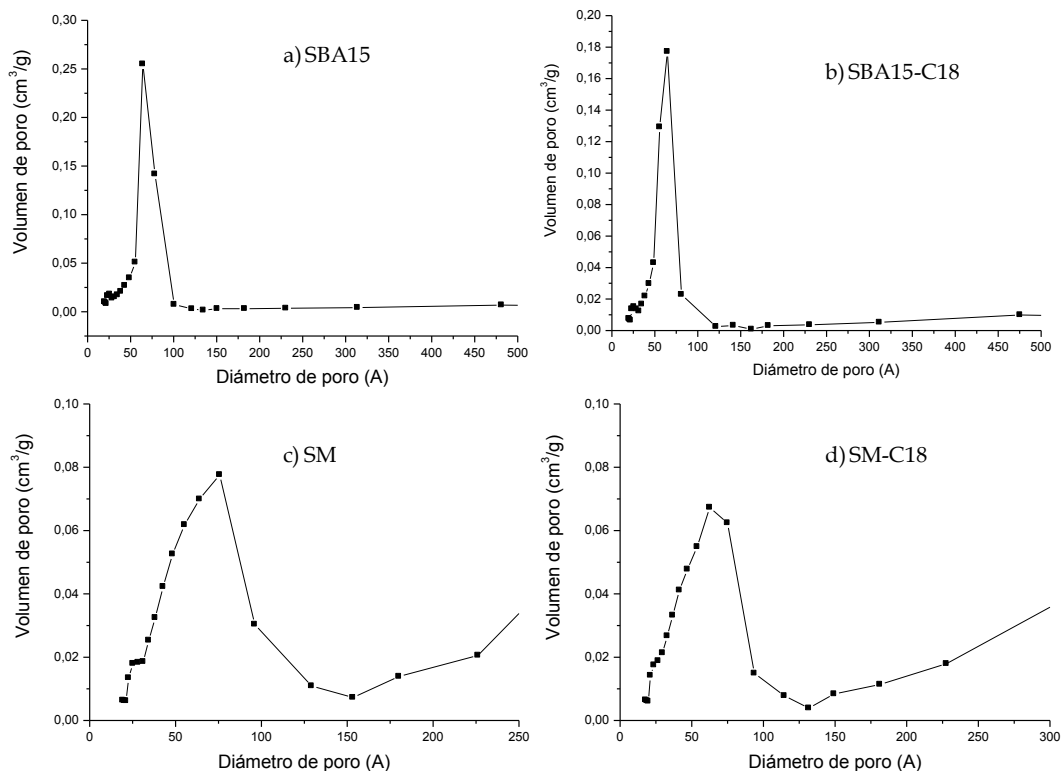


Figura IX.6. Distribución del tamaño de poro de los materiales mesoporosos: a) SBA15 sin funcionalizar; b) SBA15-C18; c) SM sin funcionalizar y d) SM-C18.

La **Tabla IX.2** agrupa los valores obtenidos para las dos sílices mesoporosas, funcionalizadas y sin funcionalizar, de superficie, diámetro medio de poro y volumen medio de poro.

Como se puede observar en la **Tabla IX.2**, las sílices funcionalizadas poseen una superficie, volumen de poro y diámetro medio de poro menor que los materiales sin funcionalizar ya que los grupos C18 se introducen en los poros de la sílice reduciendo el tamaño de los mismos y la superficie del material.

Tabla IX.2. Características de las sílices mesoporosas funcionalizadas y sin funcionalizar.

MATERIAL	Superficie (m²/g)	Volumen medio de poro (cm³/g)	Diámetro medio de poro (Å)
SBA15	729	0.75	64.2
SBA15-C18	533	0.58	64.6
SM	441	0.77	75.7
SM-C18	388	0.71	62.5

IX.3.2 Separación de las hormonas esteroideas estudiadas por HPLC

La segunda etapa de este trabajo de investigación consistió en el desarrollo de un método cromatográfico por HPLC empleando un detector UV de diodos en serie (DAD) para la separación simultánea de las hormonas esteroideas E1, E2, E3, EE2, DES, T y P.

Para ello, se utilizó una columna Ascentis C18 y se emplearon dos fases móviles (Fase A: agua, Fase B: ACN). Debido a la similitud estructural de las siete hormonas esteroideas estudiadas y con el fin de obtener la separación simultánea a línea base de las mismas por HPLC, se tuvo que optimizar un gradiente de elución que se muestra en la **Tabla IX.3**.

Tabla IX.3. Gradiente de fase móvil empleado para la separación simultánea de las siete hormonas esteroideas estudiadas.

t (min)	%A	%B
0	65	35
5	55	45
13	55	45
14	0	100
20	0	100

Con el fin de obtener la mayor sensibilidad posible y como cada uno de los analitos estudiados presentaba el máximo de absorción en el UV a una longitud de onda diferente, se seleccionó como longitud de onda de detección 200 nm para E1, E2, E3, EE2 y DES y 242 nm para T y P. De este modo y considerando los tiempos de retención de cada analito se establecieron diferentes intervalos de longitud de onda de medida que se han agrupado en la **Tabla IX.4**.

Tabla IX.4. Intervalos de longitud de onda establecidos durante la separación cromatográfica de los siete analitos estudiados.

t (min)	Longitud de onda (nm)
0	200
10.1	242
10.8	200
15.7	242
20.0	242

En estas condiciones cromatográficas se obtuvo la separación simultánea y total de todas las hormonas esteroideas estudiadas en un tiempo inferior a los 18 min. La **Figura IX.7** muestra a modo de ejemplo, el cromatograma obtenido para una disolución patrón preparada en MeOH que contiene las siete hormonas a una concentración de 10 mg/L de cada una de ellas y en la que se observa que los siete picos están perfectamente resueltos a línea base.

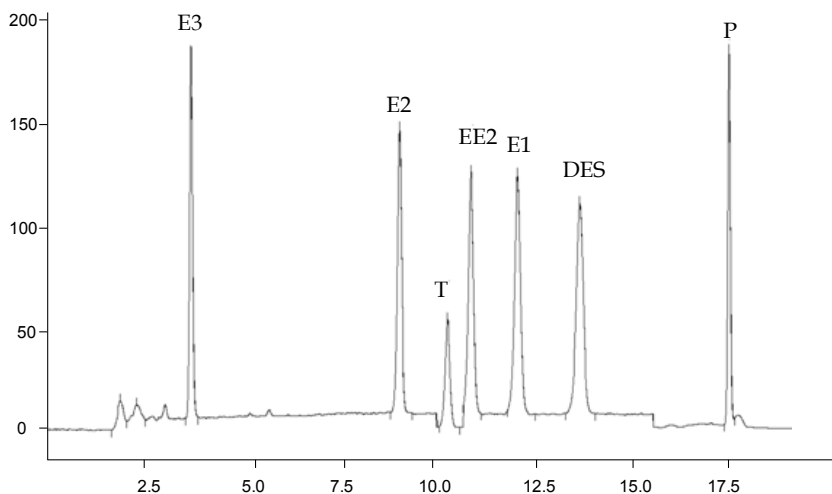


Figura IX.7. Cromatograma correspondiente a la separación de una disolución patrón de las siete hormonas esteroideas estudiadas a una concentración de 10 mg/L de cada una de ellas. Condiciones experimentales: temperatura: 45°C, volumen inyectado: 20 µL, flujo: 1 mL/min. Resto de condiciones experimentales en el texto.

IX.3.3 Extracción de las hormonas esteroideas en leche mediante el empleo de cartuchos comerciales de SPE

Con el fin de extraer de manera adecuada las siete hormonas esteroideas estudiadas en este trabajo de investigación y comparar su eficacia con las nuevas fases mesoporosas sintetizadas en el mismo, se evaluaron una serie de cartuchos SPE comerciales, así como, distintas combinaciones de los mismos.

Las hormonas esteroideas presentes en la leche se pueden encontrar en su forma libre o en su forma conjugada como metabolitos glucuronados o sulfatados. En este sentido, algunos métodos descritos en la bibliografía realizan una hidrólisis previa de los analitos con *Helix Pomatia* para obtener la forma libre de las hormonas presentes en la muestra, procedimiento que no solo hace el trabajo más tedioso, sino que además incrementa el

tiempo de análisis en gran medida puesto que en este caso hay que dejar la muestra toda la noche incubando con la enzima. Por otro lado, también hay cada vez más autores que aseguran que la proporción de las formas conjugadas es realmente baja en comparación con las formas libres y que por ello no es necesario incluir esta etapa [265]. Como en este trabajo todos los estudios se llevaron a cabo con muestras fortificadas se pudo eliminar la etapa de hidrólisis, ya que en este caso todos los analitos se van a encontrar en su forma libre.

Dado que existen en la bibliografía varios trabajos que emplean cartuchos tipo HLB [265, 267, 269] y C18 [267] para la extracción de hormonas esteroideas en muestras de leche y que además en ellos, se emplea el acoplamiento de estos cartuchos con cartuchos NH₂ para mejorar los porcentajes de recuperación, en este trabajo se ha evaluado el empleo de los cartuchos HLB, C18 y las combinaciones HLB + NH₂ y C18 + NH₂ para la extracción de las siete hormonas estudiadas en el mismo.

El procedimiento experimental utilizado en la realización de estas extracciones se ha descrito en el apartado III.3.2.2 de esta memoria de investigación. En este caso y mediante la comparación de los resultados obtenidos para las muestras reales de leche y la muestra simulada se determinaron los porcentajes de recuperación para las siete hormonas esteroideas con cada uno de los cartuchos de extracción empleados y las combinaciones de los mismos que se agrupan en la **Tabla IX.5**.

Tabla IX.5. Porcentajes de recuperación obtenidos para las siete hormonas esteroideas estudiadas con los diferentes procedimientos SPE utilizados.

CARTUCHOS	E3	E2	EE2	E1	DES	T	P
C18	40.3	69.8	69.8	69.9	52.4	73.5	87.4
HLB	99.7	79.5	76.9	75.8	75.9	79.9	91
C18 + NH ₂	52.7	88.5	88.8	86.4	67.9	84.9	83.9
HLB + NH ₂	92.6	79.8	82.2	80.3	77.3	86.1	83.4

De todas las combinaciones de cartuchos SPE comerciales estudiadas, el empleo de cartuchos HLB en combinación con uno tipo NH₂, dio lugar a los mejores porcentajes de recuperación para prácticamente todos los analitos estudiados. Sin embargo, cuando se empleaban únicamente cartuchos HLB, las recuperaciones obtenidas eran muy similares y el proceso de extracción resultaba mucho más simple al tener un único cartucho de extracción.

En definitiva, se puede concluir que el empleo de cartuchos HLB supone un método rápido y eficaz para la extracción y preconcentración de las hormonas esteroideas estudiadas en este trabajo en muestras de leche, obteniéndose recuperaciones entre el 76 y 100 % aproximadamente.

IX.3.4 Empleo de las sílices mesoporosas funcionalizadas con C18 para la extracción de hormonas esteroideas en leche. Ensayos en discontinuo

A continuación, se pasó a evaluar el empleo de las sílices mesoporosas como adsorbentes para la extracción de las siete hormonas esteroideas estudiadas en muestras de leche.

En primer lugar se realizó un ensayo de adsorción en discontinuo. Para ello y con el fin de simular las condiciones experimentales de los estudios realizados por SPE mencionados anteriormente, se prepararon dos disoluciones patrón de 25 mL en agua:MeOH (80:20 v:v) que contenían las siete hormonas a una concentración de 5 mg/L y 10 mg/L, respectivamente. Estas disoluciones se pusieron en contacto con 100 mg de cada una de las sílices mesoporosas y se agitó de manera continua. Posteriormente, se recogieron cuatro alícuotas del sobrenadante a distintos tiempos (30, 60, 180 min y 3 días) y se determinó cómo se adsorbían los diferentes analitos en el sólido mesoporoso en función del tiempo de contacto.

La **Tabla IX.6** agrupa los porcentajes de adsorción determinados en función del tiempo de contacto entre las hormonas esteroideas y el material mesoporoso para las dos disoluciones de distinta concentración.

Tabla IX.6. Porcentajes de adsorción obtenidos para las dos disoluciones de diferente concentración (5 y 10 mg/L) de las siete hormonas esteroideas estudiadas en los ensayos de adsorción en discontinuo con las sílices mesoporosas SBA15-C18 y SM-C18.

			E3	E2	EE2	E1	DES	T	P
SBA15-C18	30 min	5 mg/L	7.5	20.1	31.3	27.4	1.4	66.7	92.7
	60 min		6.9	18.2	31.4	27.2	3.8	64.8	90.7
	180 min		7.3	16.3	30.3	22.4	8.3	59.2	88.5
	3 días		16.8	63.2	76.0	42.5	100.2	49.5	83.6
	30 min	10 mg/L	5.6	11.9	25.8	16.3	0.0	39.9	73.7
	60 min		6.6	10.0	29.1	15.3	0.0	41.0	71.1
	180 min		6.2	36.7	24.3	12.7	0.0	34.2	68.2
	3 días		9.9	31.8	43.4	24.0	67.7	29.1	58.9
SM-C18	30 min	5 mg/L	10.5	34.7	48.2	40.8	35.2	71.0	94.1
	60 min		10.3	33.3	47.6	39.2	35.5	68.6	91.9
	180 min		10.5	32.5	44.0	38.2	45.1	66.7	92.8
	3 días		19.0	72.1	83.0	53.7	102.5	65.4	91.8
	30 min	10 mg/L	4.1	18.8	30.9	19.9	6.5	44.4	79.4
	60 min		5.2	17.2	32.6	21.4	8.8	44.6	78.7
	180 min		6.1	15.8	30.4	18.7	17.9	41.0	75.0
	3 días		9.5	39.9	53.9	29.0	83.9	40.4	72.7

Los resultados obtenidos en los estudios de adsorción en discontinuo muestran que las hormonas esteroideas T y P experimentan una gran adsorción tanto en SBA15-C18 como en SM-C18 en tan solo 30 min y que a medida que pasa el tiempo, los analitos sufren una ligera desorción y los porcentajes de adsorción disminuyen después de pasar tres días.

Para el compuesto DES ocurre lo contrario, y a pesar de que en tiempos cortos se observa una adsorción muy baja, sobre todo con SBA15-C18, una vez que han pasado tres días la adsorción del analito es completa para la concentración más baja de las disoluciones metanólicas (5 mg/L) y en las dos sílices mesoporosas. Para los compuestos E2 y EE2 se alcanzan porcentajes de adsorción moderados en tiempos cortos, pero aumenta hasta un 83 % después de tres días. Por último, para el compuesto E1 y especialmente para el compuesto E3 los porcentajes de adsorción obtenidos son los más bajos, llegando como mucho a un valor máximo aproximado de 54 % y 19 % respectivamente.

Estos resultados permiten concluir que existe para todas las hormonas esteroideas estudiadas algún tipo de afinidad hacia las sílices mesoporosas sintetizadas en este trabajo, por lo que se puede considerar que son materiales adecuados para ser empleados como rellenos en cartuchos de SPE, al menos para este tipo de compuestos. Además, los resultados obtenidos mostraron que en los estudios de adsorción en discontinuo, la sílice mesoporosa SM-C18 fue la que proporcionó una mayor adsorción para todos los analitos.

IX.3.5 Empleo de las sílices mesoporosas funcionalizadas con C18 para la extracción de hormonas esteroideas en leche. Comparación con partículas de sílice C18 comerciales en estudios de SPE

A la vista de los resultados obtenidos en los estudios realizados en discontinuo, se procedió a utilizar las dos sílices mesoporosas como rellenos de cartuchos de SPE para la extracción de las siete hormonas esteroideas en las muestras de leche.

El método de extracción empleado fue el descrito por Yang *y col.* [267], es decir, el mismo que se había utilizado en los estudios realizados con cartuchos comerciales de SPE en el apartado IX.3.3 de este capítulo. En este caso, se emplearon 100 mg de fase estacionaria y un 1 g de leche de vaca en lugar de los 500 mg de fase estacionaria y los 5 g de muestra empleados en los estudios realizados con los cartuchos comerciales.

Primero se llevó a cabo el tratamiento de muestra completo empleando las dos sílices mesoporosas y utilizando en cada caso una muestra de leche fortificada con los analitos a un nivel de concentración de 2 mg/kg y una muestra simulada que fue fortificada con los analitos a la misma concentración, antes de la evaporación final del disolvente. Por comparación de los resultados obtenidos para cada muestra real de leche y su correspondiente muestra simulada, se determinaron los porcentajes de recuperación para cada uno de los compuestos con cada una de las sílices, y cuyos valores se agrupan en la **Tabla IX.7**. Decir, que estos estudios se realizaron empleando cartuchos de SPE de un volumen de 3 mL (con 100 mg de fase estacionaria) y que la disolución eluyente utilizada en todos los casos fueron 2 mL de MeOH.

Tabla IX.7. Porcentajes de recuperación obtenidos en leches fortificadas con las siete hormonas esteroideas a una concentración de 2 mg/kg de cada una de ellas utilizando cartuchos de SPE de 3 mL rellenos con 100 mg de fase estacionaria y empleando como disolución eluyente 2 mL de MeOH.

CARTUCHOS	E3	E2	EE2	E1	DES	T	P
SBA15-C18	17.8	48.5	74.6	53.9	61.8	64.1	55.4
SM-C18	6.2	25.1	54.3	16.3	33.8	38.7	53.2

Los resultados obtenidos mostraron que a pesar de que en los estudios de adsorción en discontinuo, la sílice mesoporosa SM-C18 fue la que proporcionó una mayor adsorción para todos los analitos, en este caso con cartuchos SPE fue la sílice mesoporosa SBA15-C18 la que proporcionó mejores resultados. Teniendo en cuenta que el grado de funcionalización en ambas sílices fue muy similar, la diferencia observada en cuanto al porcentaje de recuperación entre los ensayos realizados en continuo y en discontinuo podría atribuirse, principalmente, a la diferente distribución de poro en ambos materiales, siendo la distribución ordenada en forma de canales paralelos presente en la SBA15-C18 la más adecuada para la extracción en continuo. Por este motivo, a partir de este momento las experiencias se centraron en mejorar la recuperación obtenida con la sílice SBA15-C18.

Con este fin, se realizó el mismo estudio descrito anteriormente pero empleando cartuchos de extracción de volumen de 6 mL rellenos con 100 mg de fase estacionaria, de manera que al aumentar la superficie de contacto las recuperaciones obtenidas fuesen mayores que las alcanzadas con los cartuchos de menor volumen que habían sido empleados. Además, la altura de lecho alcanzada con los materiales mesoporosos también es importante a la hora de mejorar el paso de la disolución de la muestra a través del cartucho por lo que una mayor superficie y una menor altura puede ayudar en este sentido. Al igual que anteriormente, se prepararon tres cartuchos de 6 mL rellenos con 100 mg de SBA15-C18 y también tres cartuchos de 6 mL rellenos con 100 mg de C18 comercial con el fin de comparar los resultados obtenidos con ambas fases en las mismas condiciones experimentales y se realizaron todas las medidas para cada una de las fases estacionarias en dos muestras reales y una simulada. Los resultados obtenidos para los porcentajes de recuperación se agrupan en la **Tabla IV.8**.

Tabla IX.8. Porcentajes de recuperación medios obtenidos en leches fortificadas con las siete hormonas esteroideas a concentraciones de 2 mg/kg empleando cartuchos de SPE de 6 mL rellenos con 100 mg de fase estacionaria y utilizando como disolvente de elución 2 mL de MeOH.

CARTUCHOS	E3	E2	EE2	E1	DES	T	P
SBA15-C18	35.6	95.2	100.9	99.3	87.3	99.6	96.6
C18 comercial	58.4	76.9	74.4	53.0	58.6	101.1	81.6

Si se comparan los valores de porcentajes de recuperación de las **Tablas IX.7** y **IX.8**, se observa que los resultados obtenidos empleando cartuchos de 6 mL fueron bastante mejores que los obtenidos con cartuchos de 3 mL para la sílice mesoporosa SBA15-C18, lo que confirma que la altura del lecho es un factor importante en el proceso de SPE con este tipo de materiales, por lo que las siguientes experiencias se realizaron empleando en todo momento los cartuchos de mayor volumen. Además, los porcentajes de recuperación

obtenidos con el material mesoporoso (entre 87 y 101 %) fueron siempre superiores a los obtenidos con la fase estacionaria C18 comercial, excepto para la hormona E3. Este hecho podría ser atribuido al mayor grado de funcionalización de la sílice SBA15-C18, lo cual la convierte en un material más apolar en comparación con la sílice comercial, siendo la hormona E3 la que presenta mayor polaridad de las estudiadas y, por tanto, la que presenta menores porcentajes de recuperación en este tipo de cartuchos de fase inversa (ver Tabla IX.5).

La **Figura IX.8** muestra a modo de ejemplo, el cromatograma obtenido para un extracto de leche de vaca fortificado con las siete hormonas a una concentración de 2 mg/kg de cada una de ellas empleando como eluyente 2 mL de MeOH y 100 mg de la sílice mesoporosa SBA15-C18 en cartuchos de 6 mL.

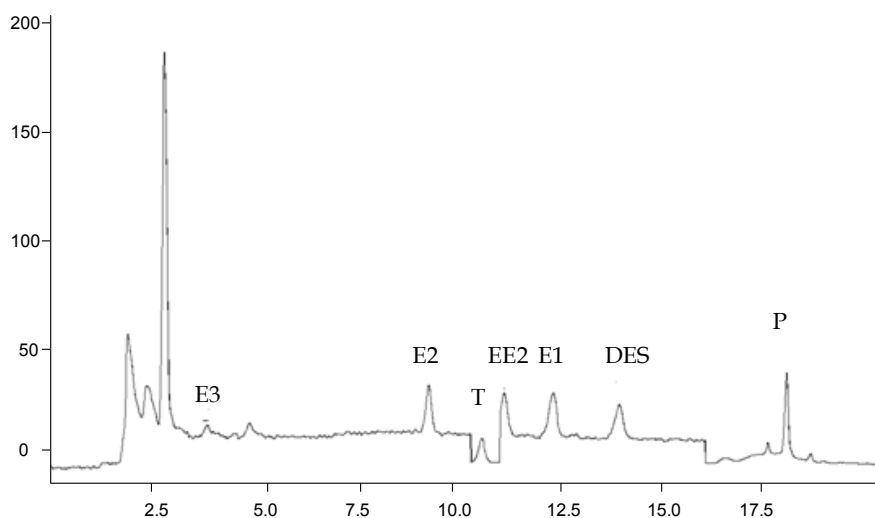


Figura IX.8. Cromatograma correspondiente a la separación de un extracto de leche fortificado con las siete hormonas esteroideas estudiadas a una concentración de 2 mg/kg de cada una de ellas. Condiciones experimentales: temperatura: 45°C, volumen inyectado: 20 μ L, flujo: 1 mL/min. Resto de condiciones experimentales en el texto.

Finalmente, y con el fin de mejorar los porcentajes de recuperación obtenidos con la sílice mesoporosa SBA15-C18, se empleó ACN como eluyente en lugar de MeOH. Se prepararon tres cartuchos de 6 mL rellenos con 100 mg de la sílice SBA15-C18 y se extrajeron dos muestras reales de leche y una simulada. La **Tabla IX.9** agrupa los valores medios de porcentaje de recuperación obtenidos para cada una de las hormonas esteroideas en las muestras de leche de vaca. En este caso, el empleo de acetonitrilo como disolución eluyente proporcionó aun mejores resultados (entre 61.5 y 108 %) que el empleo de metanol para todas las hormonas estudiadas.

Tabla IX.9. Porcentajes de recuperación medios obtenidos en leches fortificadas con las siete hormonas esteroideas a una concentración de 2 mg/kg empleando cartuchos de SPE de 6 mL rellenos con 100 mg de fase estacionaria y empleando como disolvente de elución 2 mL de acetonitrilo.

ELUYENTE	CARTUCHOS	E3	E2	EE2	E1	DES	T	P
ACN	SBA15-C18	61.5	87.9	98.9	93.6	96.6	105.4	108.1
MeOH	SBA15-C18	35.6	95.2	100.9	99.3	87.3	99.6	96.6

Decir, que estos resultados demuestran el gran potencial que presenta el material mesoporoso SBA15-C18 como fase estacionaria para el relleno de cartuchos de SPE para la extracción de hormonas esteroideas en muestras de leche. En efecto, los porcentajes de recuperación obtenidos con esta nueva fase estacionaria fueron mucho mejores a los obtenidos con los demás rellenos, excepto para la hormona E3, para la que se obtuvieron porcentajes de recuperación inferiores a los obtenidos con cartuchos tipo HLB, HLB + NH₂ e incluso el material C18 comercial.

IX.4 CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se han sintetizados dos nuevas sílices mesoporosas funcionalizadas con grupos C18 que han sido caracterizadas empleando técnicas como SEM, TEM, BET, AE y TG. Posteriormente estas sílices fueron evaluadas como fases estacionarias en cartuchos de SPE para la extracción de siete hormonas esteroideas en muestras de leche de vaca pasteurizada. Además, se ha desarrollado un método de HPLC con detección UV para la separación de las siete hormonas esteroideas que supone el primer método que existe en la bibliografía que permite separar estas siete hormonas de manera simultánea. Dicho método, se ha empleado para determinar los porcentajes de recuperación obtenidos para todos los analitos estudiados con cada uno de los diferentes protocolos de extracción empleados.

De las dos sílices mesoporosas sintetizadas, la sílice SBA15-C18 ha mostrado un gran potencial como fase estacionaria para la extracción de las hormonas esteroideas estudiadas mediante SPE. La comparación de los resultados obtenidos con rellenos comerciales C18, HLB, HLC + NH₂ y C18 + NH₂ y las sílices mesoporosas, ha demostrado que la sílice mesoporosa SBA15-C18 proporciona los mejores porcentajes de recuperación para todos los compuestos excepto para el compuestos E3. De hecho, en las condiciones experimentales seleccionadas como óptimas se han alcanzado porcentajes de recuperación entre 88 y 108 % aproximadamente excepto para la hormona E3, para el que se obtuvo un valor del 61.5 %. Se puede afirmar, que el empleo de la sílice mesoporosa SBA15-C18 como fase estacionaria en SPE, supone una alternativa eficiente a los materiales de sílice amorfa disponibles comercialmente y da lugar a unos porcentajes de recuperación bastante homogéneos para todos los compuestos analizados. Por último, decir que estos porcentajes de recuperación se refieren a 100 mg de fase estacionaria en los cartuchos SPE, mientras que en los cartuchos comerciales se emplea una cantidad de relleno cinco veces mayor. Por tanto con este material se reduce la cantidad de fase estacionaria empleada y se minimizan los costes del procedimiento de tratamiento de muestra.

CAPÍTULO X

CONCLUSIONES

Del conjunto de resultados presentados en esta memoria, es posible extraer las siguientes conclusiones generales:

- ✓ Se ha llevado a cabo por primera vez en el formato de la CE, la separación enantiomérica del insecticida piretroide *cis*-bifentrina empleando CD-MEKC con detección UV. El método desarrollado ha permitido la separación de los dos enantiómeros de *cis*-bifentrina mediante el empleo de un sistema dual que combina una CD neutra (TM- β -CD) con un tensioactivo quirral aniónico (SC). La optimización de las variables experimentales (concentración de CD y tensioactivo, temperatura de trabajo y voltaje de separación), ha permitido obtener la separación de los enantiómeros de la *cis*-bifentrina en un tiempo de análisis de 9.2 min y con una resolución enantiomérica de 2.8, mejorando los resultados que se habían obtenido por otras técnicas de separación como HPLC o GC.
- ✓ Se han desarrollado dos metodologías analíticas quirales por CD-EKC que han permitido obtener la separación enantiomérica de metalaxil y benalaxil. Este es el primer método desarrollado para la separación de los enantiómeros de benalaxil por CE. Asimismo, se ha mejorado la separación quirral de metalaxil con respecto a los trabajos existentes en la bibliografía por CE. En las condiciones seleccionadas como óptimas después del estudio de la influencia de cada una de las variables que afectan a la resolución quirral, y mediante el empleo de CDs de carácter aniónico, se ha obtenido la separación de los enantiómeros de metalaxil en un tiempo de análisis de 11.5 min con una resolución quirral de 3.1 y de los enantiómeros de benalaxil en un tiempo de 7.5 min y una resolución enantiomérica de 15. Además, los enantiómeros de cada uno de estos dos fungicidas se han separado simultáneamente del fungicida folpet en tiempos de análisis similares a los correspondientes a la separación enantiomérica.

- ✓ Las metodologías de separación desarrolladas empleando CE en el modo EKC se han aplicado a la determinación enantiomérica de *cis*-bifentrina, metalaxil y benalaxil en productos pesticidas comerciales y al control de la pureza enantiomérica en formulaciones agroquímicas comerciales etiquetadas como enantioméricamente puras en metalaxil-M.
- ✓ Se ha puesto de manifiesto el potencial de dos nuevas fases estacionarias quirales, Sepapak-2 y Sepapak-4, en la separación enantiomérica de 16 pesticidas quirales que incluyen insecticidas, fungicidas y herbicidas por nano-LC y CEC. En las condiciones experimentales seleccionadas como óptimas, que incluyen el empleo de la fase estacionaria Sepapak-4, se ha conseguido la separación de 9 de los 16 pesticidas analizados con resoluciones entre 0.6 y 5.2. La comparación de las separaciones enantioméricas obtenidas con la fase estacionaria Sepapak-4 en nano-LC y CEC, ha permitido confirmar la mejora en la eficacia y en la resolución quiral obtenida por CEC, demostrando el gran potencial de esta técnica en el campo de las separaciones quirales.
- ✓ Se ha desarrollado una metodología analítica por CEC que ha permitido la separación enantiomérica del fungicida metalaxil y que ha sido aplicada con éxito a la determinación de la pureza enantiomérica de un producto comercial que según su etiquetado contenía únicamente el enantiómero activo de metalaxil (metalaxil-M). Los resultados obtenidos para el porcentaje de impureza enantiomérica (3.7 %) por esta técnica son comparables a los obtenidos para dicho compuesto por CD-MECK (3.6 %) en el mismo producto comercial. Además, el método desarrollado también ha sido aplicado a la determinación de metalaxil en suelos y aguas tratadas con dicho producto comercial.
- ✓ Se ha estudiado el potencial de tres columnas capilares quirales (Chirasil-Dex, BGB-172 y BGB-176SE) en MDGC en su modo *heart-cut* para la separación enantiomérica simultánea de PCBs y sus metabolitos MeSO₂-PCBs. Los estudios realizados han demostrado que mientras que para los PCBs las fases

estacionarias eran capaces de discriminar quiralmemente un gran número de PCBs, solamente la columna BGB-176SE dio lugar a resultados satisfactorios en la separación de los enantiómeros de los metabolitos metilsulfonados. La optimización de la longitud de las columnas y de los programas de temperatura empleados en MDGC en su modo *heart-cut* en la segunda dimensión con la columna quiral BGB-176SE ha permitido obtener la separación enantiomérica simultánea de 6 PCBs y 6 MeSO₂-PCBs en menos de 250 min, reduciéndose de esta manera el tiempo de análisis prácticamente tres veces con respecto a los resultados iniciales. El método desarrollado se ha aplicado a la determinación de las fracciones enantioméricas de PCBs y sus metabolitos metilsulfonados en muestras de aceites de pescado e hígado de ternera demostrando un claro enriquecimiento de uno de los enantiómeros de algunos PCBs en las muestras estudiadas.

- ✓ Se ha desarrollado un método por CD-MEKC para la separación simultánea de una serie de diez ftalatos parentales: DMP, DEP, DAP, DPP, DNPP, DCP, DNOP, BBP, DBP y DEHP. Con este fin se ha realizado el estudio de la adición de diferentes sales biliares (SC, SDC, STDC y STC) y CDs de carácter neutro (β -CD, Me- β -CD, DM- β -CD, TM- β -CD, HP- β -CD, Ac- β -CD y γ -CD), así como, de modificadores orgánicos (MeOH o ACN) al medio de separación. En las condiciones seleccionadas como óptimas se obtuvo la separación total de ocho ftalatos con resoluciones superiores a 3.1 y la resolución parcial de dos de ellos (DNOP y DEHP) ($R_s \sim 0.8$), aunque suficiente para poder diferenciarlos en muestras reales, en un tiempo de análisis de tan solo 12 min.
- ✓ El método desarrollado se ha aplicado a la determinación de estos diez compuestos en perfumes y aguas de colonia. De las 15 muestras analizadas se encontró al menos un ftalato en once de ellas, siendo el DEP el ftalato que se pudo determinar en la mayoría de las muestras en concentraciones entre 76 y 3115 mg/L. Además, también se determinaron DMP, DAP, DCP y DNPP en

- algunas de las muestras analizadas. Destacar que no se encontró ninguno de los ftalatos prohibidos en las muestras analizadas.
- ✓ Se ha desarrollado una metodología analítica por HPLC acoplada a MS que ha permitido la separación y determinación de cinco fármacos tireostáticos (TAP, MBI, MTU, PTU y PrTU) en un tiempo de análisis de aproximadamente 6 min. Se ha estudiado el potencial de diversos cartuchos SPE para extraer y preconcentrar los cinco fármacos tireostáticos estudiados presentes en aguas naturales. El carácter altamente hidrofílico de estos compuestos no ha permitido la recuperación cuantitativa de los mismos mediante SPE por lo que se ha desarrollado un tratamiento de muestra basado en la evaporación de la de la misma a sequedad y su posterior redisolución en un disolvente orgánico que ha permitido la obtención de porcentajes de recuperación adecuados entre el 76 y el 108 % para los cinco fármacos estudiados.
 - ✓ El método desarrollado se ha aplicado por primera vez a la determinación de los cinco fármacos tireostáticos en aguas naturales procedentes de la provincia de Lazio (Italia). Los resultados obtenidos han permitido poner de manifiesto la relación que existe entre la presencia de dichos compuestos en las aguas y las áreas donde existe algún tipo de actividad humana y/o ganadera. De todos los analitos estudiados en este trabajo, únicamente se detectaron dos (TAP y MBI) en siete de las diez muestras analizadas y solamente se pudo cuantificar el TAP en cuatro de ellas.
 - ✓ Se han sintetizado dos sílices mesoporosas (SBA15 y SM) de distinta morfología funcionalizadas con grupos C18 para su empleo como rellenos en cartuchos de SPE para la extracción y preconcentración de siete hormonas esteroideas (E1, E2, E3, EE2, DES, P y T) en muestras de leche de vaca.
 - ✓ Se han caracterizado las dos sílices mesoporosas mediante el empleo de TEM, SEM, AE e isothermas de adsorción-desorción con el fin de estudiar la morfología, composición y distribución de poro de las mismas.

- ✓ Se ha desarrollado por primera vez un método HPLC-UV que ha permitido la separación de las siete hormonas esteroideas en un tiempo de análisis inferior a los 18 min.
- ✓ El método desarrollado se ha aplicado al análisis de los extractos obtenidos empleando las sílices mesoporosas como rellenos en cartuchos de SPE. Los estudios realizados han demostrado el gran potencial de la sílice mesoporosa SBA15-C18 para la extracción de las siete hormonas estudiadas obteniéndose recuperaciones entre el 88 y 108 % excepto para E3 para la que se obtuvo un 62 %. La comparación de estos resultados con los obtenidos con algunos cartuchos comerciales (HLB, HLB + NH₂, C18 y C18+ NH₂) ha demostrado que el empleo de la sílice SBA15-C18 como fase estacionaria en SPE, supone una buena alternativa al empleo de los materiales convencionales de sílice amorfa disponibles comercialmente.
- ✓ El trabajo de investigación recogido en esta memoria constituye un conjunto de nuevas metodologías analíticas completamente innovadoras que resuelven de manera satisfactoria diversos problemas relacionados con la determinación de contaminantes químicos en formulaciones agroquímicas comerciales y muestras alimenticias, cosméticas y medioambientales. Para ello, se han empleado las principales técnicas analíticas de separación como son la CE en diferentes modos, HPLC y GC acopladas o no a la MS.

CAPÍTULO XI

BIBLIOGRAFÍA

- [1] S.E. Manahan; *Introducción a la Química Ambiental*, Editorial Reverté, 2007
- [2] R. Barro, J. Regueiro, M. Llompарт; *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 540-566
- [3] P. Aragón, J. Atienza; *Critical Rev. Anal. Chem.* 30 (2000) 121-151
- [4] FIFRA, 25 de Junio de 1947
- [5] J.P. Foley, M. Hong, M.A. Polinko, R.J. Pascoe, E.S. Ahuja; *Electrophoresis* 29 (2008) 1180-1188
- [6] Real Decreto 3349/1983 del 30 de Noviembre de 1983
- [7] M.S. Díaz-Cruz, M.J. López de Alda, D. Barceló; *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 340-351
- [8] B.G. Wei, L.S. Yang; *Microchem. J.* 94 (2010) 99-107
- [9] M. Yurong, Q. Limin, M. Jiming, W. Yongqing, L. Ou, C. Huming; *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects* 229 (2003) 1-8
- [10] L.D. Barceló, M.J. López de Alda; *Contaminación y Calidad Química del Agua*, Fundación Nueva Cultura del Agua, 2011
- [11] C. Orozco-Barrenetxea, A. Pérez Serrano, M^a Nieves González-Delgado, F.J. Rodríguez Vidal, J.M. Alfayate Blanco; *Contaminación ambiental: Una Visión Desde la Química*, Thomson, 2003
- [12] Ley de Aguas 29/1985 del 2 de Agosto de 1985
- [13] Directiva 2000/60/CE del 23 de Octubre del 2000
- [14] M. La Farré, S. Pérez, L. Kantiani, D. Barceló; *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 991-1007
- [15] K. Ridgway, S.P.D. Lalljie, R.M. Smith; *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 1-2
- [16] *Cumbre Mundial sobre la Alimentación*, 1996
- [17] L. Kantiani, M. Llorca, J. Sanchís, M. Farré, D. Barceló; *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 2413-2427
- [18] I. Ali, V.K. Gupta, H.Y. Aboul-Enein; *Current Sci.* 84 (2003) 152-156
- [19] S. Fujita; *Tetrahedron* 65 (2009) 1581-1592
- [20] M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel, Eds.; *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, in *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. XLV, Elsevier, 2005
- [21] A. Williams; *Pestic. Sci.* 46 (1996) 3-9
- [22] Premio Nobel de Química 2001, <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/2001>
- [23] H.R. Buser, M.D. Muller, C. Rappe; *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 1533-1540
- [24] C.S. Wong; *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 544-558
- [25] S. Qin, W. Liu, J. Gan; *Chiral Selectivity in the Environmental Fate of Pyrethroids*, in *Synthetic Pyrethroids: Occurrence and Behaviour in Aquatic Environments*, Chapter 12, ACS Symposium Series, 2008
- [26] A.W. Garrison; *Environ. Sci. Technol.* January (2006) 16-23
- [27] H.J. Lehmler, S.J. Harrad, H. Hühnerfuss, I. Kania-Korwel, C.M. Lee, Z. Lu, C.S. Wong; *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 2757-2766

- [28] USEPA, Fed. Reg. 64 (1999) 22863-22865
- [29] USEPA, Fed. Reg. 65 (2000) 8925-8927
- [30] W.A. Korfmacher, E.L. Wehry, G. Mamantov, D.F.S. Natusch; *Environ. Sci. Technol.* 14 (1980) 1094-1099
- [31] P. Lichtenstein, N. Holm, P.K. Verkasalo, A. Iliadou, J. Kaprio, M. Koskenvuo, E. Pukkala, A. Skytthe, K. Hemminki; *New Eng. J. Med.* 343 (2000) 78-85
- [32] C.G. Daughton; *American Soc. Mass Spectr.* 12 (2001) 1067-1076
- [33] ATC Index with DDDs 2003, Guidelines for ATC Classification and DDD Assignment, OMS, 2003
- [34] L.D. Barceló, M.J. López de Alda; Panel Científico Técnico de Seguimiento de la Política de Aguas
- [35] D. Fatta-Kassinos, S. Meric, A. Nikolaou; *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2001) 251-275
- [36] A.M. Jacobsen, B. Halling-Sorensen, F. Ingerslev, S.H. Hansen; *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 157-174
- [37] M. Gros, M. Petrovic, D. Barceló; *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 941-952
- [38] E. Botitsi, C. Frosyni, D. Tsiipi; *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1317-1327
- [39] M.D. Hernando, M. Mezcua, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló; *Talanta* 69 (2006) 334-342
- [40] M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló; *Trend. Anal. Chem* 24 (2005) 645-657
- [41] Directiva 2377/90/CE del 18 de Agosto de 1990
- [42] M.P. Castenedo-Tardán, K.A. Zug; *Dermatol. Clin.* 27 (2009) 265-280
- [43] B. Ferreira da Silva, A. Jelic, R. López-Serna, A.A. Mozeto, M. Petrovic, D. Barceló; *Chemosphere* 85 (2011) 1331-1339
- [44] Directiva 2008/42/EC del 3 de Abril de 2008
- [45] P.Y. Kunz, K. Fent; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217 (2006) 86-99
- [46] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton; *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1202-1211
- [47] C. Schmitt, M. Oetken, O. Dittberner, M. Wagner, J. Oehlmann; *Environ. Pollut.* 152 (2008) 322-329
- [48] R.E. Dodson, M. Nishioka, L.J. Standley; *Environ. Health Persp.* 120 (2012) 935-943
- [49] M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, F. Ventura; *Anal. Chem.* 79 (2007) 3821-3829
- [50] C. Postigo, M.J. de Alda, D. Barceló; *Anal. Chem.* 80 (2008) 3123-3134
- [51] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy; *J. Water Res.* 42 (2008) 3498-3518
- [52] E. Zuccato, S. Castiglioni; *Phil. Trans. R. Soc.* 367 (2009) 3965-3978
- [53] A. Jurado, N. Mastroianni, D. Barceló; *Sci. Total Environ.* 424 (2012) 280-288
- [54] M.J. López de Alda, D. Barceló; *Fres. J. Anal. Chem.* 371 (2001) 437-447
- [55] R. Lafont, M. Mathieu; *Ecotoxicology* 16 (2007) 109-130

- [56] E.J. Routledge, D. Sheahan, C. Desbrow; *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 1559-1565
- [57] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. Alda, D. Barceló; *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 23-51
- [58] A.M. Andersson, N.E. Skakkebæk; *Eur. J. Endocrinol.* 140 (1999) 477-485
- [59] S.D. Haigh; *Sci. Total. Environ.* 185 (1996) 161-170
- [60] M. Wagner, H.J. Pöpel; *Water Sci. Technol.* 34 (1996) 249-256
- [61] M. Petrovic, D. Barceló; *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 762-771
- [62] N. Mohd Hanif, S. Nurul Nadiah Adnan, M. Talib Latif, Z. Zakaria, M. Pauzi Abdullahand; M. Rozali Othman; *World Appl.Sci. J.* 17 (2012) 970-975
- [63] M. Clara, C. Scheffknecht, S. Scharf, S. Weiss, O. Gans; *Water Sci. Technol.* 58 (2008) 59-66
- [64] N. Carmosini, L.S. Lee; *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 6559-6565
- [65] C. Liu, Y. Du, B. Zhou; *Aquat. Toxicol.* 85 (2007) 267-277
- [66] R. Loos, G. Locoro, S. Comero; *Water Res.* 44 (2010) 4115-4126
- [67] I. Ericson, R. Martí-Cid, M. Nadal, B. Van Bavel, G. Lindström, J.L. Domingo; *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 1787-1794
- [68] L.S. Birnbaum, D.F. Staskal; *Environ. Health Persp.* 112 (2004) 9-17
- [69] E.L. Gregoraszczyk, A. Rak, K. Kawalec, E. Ropstad; *Toxicol. Lett.* 178 (2008) 103-109
- [70] M. Alaei, R.J. Wening; *Chemosphere* 46 (2002) 579-582
- [71] E. Mariussen, F. Fonnum; *Neurochem. Int.* 43 (2003) 533-542
- [72] S. Pullen, R. Boecker, G. Tiegs; *Toxicology* 184 (2003) 11-22
- [73] I.A.T.M. Meerts, R.J. Letcher, S. Hoving, G. Marsh, A. Bergman, J.G. Lemmen, B. Van der Burg, A. Brouwer; *Environ. Health Persp.* 109 (2001) 399-407
- [74] J.M. Fu, G.Y. Sheng, G. Zhang, X.M. Wang, P.A. Peng, X.M. Xiao, R. Ran, F. Cheng, X. Peng, Z. Wang, U.W. Tang; *Chemosphere* 52 (2003) 1411-1422
- [75] I. Tolosa, J.M. Bayona, J. Albaiges; *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2519-2566
- [76] MOPTA, Dioxinas y furanos: Problemática Ambiental y Metodología Analítica, Centro de Publicaciones de Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente, 1996
- [77] A. Sanches-Silva, R. Sedón-García, I. Cooper, R. Franz, P. Paseiro-Losada; *Trends Food Sci. Technol.* 17 (2006) 535-546
- [78] Directiva 2002/72/CE del 6 de Agosto de 2002
- [79] A.J. Martino-Andrade, I. Chahoud; *Mol. Nut. Food Res.* 54 (2010) 148-157
- [80] Y. Okamoto, K. Ueda, N. Kojima; *J. Health Sci.* 57 (2011) 497-503
- [81] Directiva 2005/84/CE del 14 de Diciembre de 2005
- [82] Directiva 2004/93/CE del 21 de Septiembre de 2004
- [83] K. Ravindra, R. Sokhi, R.V. Griekren; *Atm. Environ.* 42 (2008) 2895-2921

- [84] IARC (International Agency for Research on Cancer) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. Polynuclear Aromatic Compounds, Part I, Chemical, Environmental, and Experimental Data. OMS, 1983
- [85] K. Srogi; *Environ. Chem. Lett.* 5 (2007) 169-195
- [86] M. Maier, D. Maier, B.J. Lloyd; *J. Wat. Res.* 34 (2000) 773-786
- [87] N. Grova, G. Rychen, F. Monteau, B. LeBizec, C. Feidit; *Agron. Sustain. Dev.* 26 (2006) 195-199
- [88] A. Stolyhwo, Z.E. Sikorski; *Food Chem.* 91 (2005) 303-311
- [89] M. Ciecierska, M.W. Obiedzinski; *Food Control* 30 (2013) 556-562
- [90] L. Samsøe-Petersen, E.H. Larsen, P.B. Larsen, P. Bruun; *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3057-3063
- [91] Directiva 2011/85/CE del 19 de Agosto de 2011
- [92] Directiva 76/769/CE del 27 de Julio de 1976
- [93] J.A. Ramírez, M. Lacasaña; *Arch. Prev. Riesgos Labor* 4 (2001) 67-75
- [94] www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros
- [95] A.W. Garrison, P. Schmitt, D. Martens, A. Kettrup; *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 2249-2455
- [96] M.A. Loos, P.C. Kearney, D.D. Kaufman; *Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action, Vol I*, Marcel Dekker, New York, 1975
- [97] R. Furuta, T. Doi; *J. Chromatogr. A* 676 (1994) 431-436
- [98] D.W. Armstrong, G.L. Reid III, M.L. Hilton, C.D. Chang; *Environ. Pol.* 79 (1993) 51-58
- [99] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman; *Principios de Análisis Instrumental*, McGraw Hill, 2001
- [100] J.C. Giddings; *Anal. Chem.* 56 (1984) 1258-1270
- [101] D.R. Deans; *J. Chromatogr.* 203 (1981) 19-28
- [102] H.H. Willard, L.L. Merritt, J.A. Dean, F.A. Settle; *Métodos Instrumentales de Análisis*, Grupo Editorial Iberoamérica, 1991
- [103] F. Settle; *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall, 1997
- [104] L.G. Hu, S.Y. Xu, C.S. Pan, C.G. Yuan, H.F. Zou, G.B. Jiang; *Env. Sci. Technol.* 39 (2005) 8442-8447
- [105] E. Rosenberg; *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 841-889
- [106] S. Hann, G. Koellensperger, Z. Stefanka, G. Stinger, M. Furhacker, W. Buchberger, R.M. Mader; *J. Anal. Atom. Spectr.* 18 (2003) 1391-1395
- [107] I.C Beck, R. Bruhn, J. Grandass, W. Ruck; *J. Chromatogr. A* 1090 (2005) 98-106
- [108] M.J.L. de Alda, S. Díaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barceló; *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 503-526

- [109] V. Andreu, Y. Picó; *Curr. Anal. Chem.* 1 (2005) 241-265
- [110] A.C. Hogenboom, J.A. van Leerdam, P. de Voogt; *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 510-519
- [111] Y. Picó, C. Blasco, G. Font; *Mass Spectr. Rev.* 23 (2004) 45-85
- [112] S.J. Gaskell; *J. Mass. Spectr.* 32 (1997) 677-688
- [113] E.C. Huang, T. Wachs, J.J. Conboy, J.D. Henion; *Anal. Chem.* 62 (1990) 713-725
- [114] <http://www.chem.pitt.edu/facilities/mass-spectrometry/introduction>
- [115] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs; *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298-1302
- [116] A.S. Cohen, B.L. Karger; *J. Chromatogr.* 397 (1987) 409-417
- [117] F.M. Evaerts, V. Sustacek, Th.T.E.M. Verheggen; *Isotacophoresis: Theory, Instrumentation and Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1976
- [118] S. Terabe; *Trends Anal. Chem.* 8 (1989) 129-134
- [119] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando; *Anal. Chem.* 56 (1984) 111-113
- [120] J.J. Szejtli; *Chem. Rev.* 98 (1998) 1743-1753
- [121] K.A. Kahle, J.P. Foley; *Electrophoresis* 28 (2007) 2503-2526
- [122] Y. Tanaka, S. Terabe; *J. Biochem. Biophys. Met.* 48 (2001) 103-116
- [123] H. Nishi, Y. Kuwahara; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 577-585
- [124] P.G.H.M. Muijselaar, H.A. Claessens, C.A. Cramers, J.F.G.A. Jansen, E.W. Meijer, E.M.M. DeBrabandervandenberg, S. Vanderwal; *J. High Res. Chrom.* 18 (1995) 121-123
- [125] M. Blanco, I. Valverde; *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 428-439
- [126] H. Nishi, T. Fukuyama, S. Terabe; *J. Chromatogr.* 553 (1991) 503-516
- [127] G. Gubitz, M.G. Schmid; *Electrophoresis* 21 (2000) 4112-4135
- [128] B. Chankvetadze, G. Blaschke; *J. Chromatogr. A* 90 (2001) 309-363
- [129] A.L. Crego, M.A. García, M.L. Marina; *J. Microcol. Sep.* 12 (2000) 33-40
- [130] G. Vanhoenacker, T. Van den Bosch, G. Rozing, P. Sandra; *Electrophoresis* 22 (2001) 4064-4103
- [131] S. Fanali, P. Catarcini, G. Blaschke, B. Chankvetadze; *Electrophoresis* 22 (2001) 3131-3151
- [132] S.A. Barker; *J. Biochem. Biophys. Met.* 70 (2007) 151-162
- [133] B. Lozowicka, M. Jankowska, E. Rutkowska, P. Kaczyński, I. Hrynko; *Pol. J. Environ. Stu.* 21 (2012) 973-992 A. Molina-Díaz; *Talanta* 79 (2009) 109-128
- [134] B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz; *Talanta* 79 (2009) 109-128
- [135] S.L. Simpson, J.P. Quirino, S. Terabe; *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 504-541
- [136] S. Hjerten, S. Jerstedt, A. Tiselius; *Anal. Biochem.* 11 (1965) 219-223
- [137] T. O'Mahony, S. Moore, B. Brosnan, J.D. Glennon; *Intern. J. Anal. Chem.* 83 (2003) 681-691
- [138] I.R. Hill; *Pestic. Sci.* 27 (1989) 429-465

- [139] A. Mekebri, D.B. Crane, G.J. Blondina, D.R. Oros, J.L. Rocca; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80 (2008) 455-460
- [140] W. Liu, J. Gan, S. Lee, I. Werner; *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 1861-1866
- [141] W.P. Liu, J.J. Gan; *J. Agric. Food. Chem.* 52 (2004) 755-761
- [142] P.E. Burt, M. Elliott, A.W. Farnham, N.F. Janes, P.H. Needham, D.A. Pulman; *Pestic. Sci.* 5 (1974) 791-799
- [143] M. Elliott, A.W. Farnham, N.F. Janes, D.M. Soderlund; *Pestic. Sci.* 9 (1978) 112-116
- [144] A. Karcher, Z. El Rassi; *Electrophoresis* 18 (1997) 1173-1179
- [145] A. Karcher, Z. El Rassi; *Electrophoresis* 21 (2000) 2043-2050
- [146] D. Shea, K.V. Penmetsa, R.B. Leidy; *J. AOAC Intern.* 82 (1999) 1550-1561
- [147] J. Ševčík, K. Lemr, Z. Stránský, T. Večeřa, J. Hlaváč; *Chirality* 9 (1997) 162-166
- [148] R. Ivanyi, L. Jicsinzy, Z. Juvancz; *Electrophoresis* 22 (2001) 3232-3236
- [149] W. Liu, J.J. Gan, S. Qin; *Chirality* 17 (2005) S127-133
- [150] W. Liu, J. Gan, D. Schlenk, W.A. Jury; *PNAS* 102 (2005) 701-706
- [151] T.L. Liu, Y.S. Wang, J.H. Yen; *J. Food Drug Anal.* 13 (2005) 357-360
- [152] M. Dondi, M. Flieger, J. Olsovska, C.M. Polcaro, M. Sinibaldi; *J. Chromatogr. A.* 859 (1999) 133-142
- [153] A.M. Girelli, A. Messina, M. Sinibaldi; *Anna. di Chim.* 92 (2001) 417-424
- [154] S. Qin, R. Budd, S. Bondarenko, W. Liu, J. Gan; *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5040-5045
- [155] W. Liu, S. Qin, J. Gan; *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3814-3820
- [156] W. Liu, J.J. Gan; *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 736-741
- [157] J.L. Jarman, W.L. Jones, L.A. Howell, A.W. Garrison; *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 6175-6182
- [158] A. Santilio, R. Dommarco; *J. Capillary Electrophor. Microchip Technol.* 9 (2006) 79-84
- [159] J. Qiu, Q. Wang, P. Wang, G. Jia, J. Li, Z. Zhou; *Pest. Biochem. Physiol.* 83 (2005) 1-8
- [160] P. Wang, D. Liu, S. Jiang, Y. Xu, X. Gu, Z. Zhou; *Chirality* 20 (2008) 40-46
- [161] P. Wang, D. Liu, X. Lei, S. Jiang, Z. Zhou; *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 265-271
- [162] P. Wang, D. Liu, S. Jiang, X. Gu, Z. Zhou; *Chirality* 19 (2007) 114-119
- [163] A. Schecter, J. Stanley, K. Boggess, Y. Masuda, J. Mes, M. Wolff, P. Fürst, C. Fürst, K. Wilson-Yang, B. Chisholm; *Environ. Health Persp. Suppl.* 102 (1994) 149-158
- [164] S. Jensen; *New Sci.* 32 (1966) 612-620
- [165] D.C.G. Muir, R. Wagemann, B.T. Hargrave, D.J. Thomas, D.B. Peakall, R.J. Norstrom; *Sci. Tot. Environ.* 122 (1992) 75-134
- [166] Directiva 850/2004/CE del 29 de Abril del 2004
- [167] K.L.E Kaiser; *Environ. Pollut.* 7 (1974) 93-101

- [168] C. Larsson, T. Ellerichmann, H. Hühnerfuss, A. Bergman; *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 2833-2838
- [169] C.S. Wong, A.W. Garrison; *J. Chromatogr. A* 866 (2000) 213-220
- [170] L.R. Bordajandi, L. Ramos, M.J. González; *J. Chromatogr. A* 1078 (2005) 128-135
- [171] L.R. Bordajandi, P. Korytár, J. de Boer, M.J. González; *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 163-171
- [172] L. Bordajandi, M.J. González; *J. Dairy Sci.* 91 (2007) 483-489
- [173] C. S. Wong, A. W. Garrison, W. T. Foreman; *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 33-39
- [174] M. Robson, S. Harrad; *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 1662-1666
- [175] T.D. Bucheli, R.C. Brändli; *J. Chromatogr. A* 1110 (2006) 156-164
- [176] M. Harju, A. Bergman, M. Olsson, A. Roos, P. Haglund; *J. Chromatogr. A* 1019 (2003) 127-142
- [177] K. Wiberg, R. Letcher, C. Sandau, J. Duffe, R. Norstrom, P. Haglund, T. Bidleman; *Anal. Chem.* 70 (1998) 3845-3852
- [178] S. Chu, A. Covaci, K. Haraguchi, S. Voorspoels, K. Van de Vijver, K. Das, J.M. Bouquegneau, W. De Coen, R. Blust, P. Schepens; *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 4573-4578
- [179] C. Larsson, K. Norström, I. Athanasiadis, A. Bignert, W.A. König, A. Bergman; *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 4950-4955
- [180] L. Karásek, J. Hajšlová, J. Rosmus, H. Hühnerfuss; *Chemosphere* 67 (2007) S22-S27
- [181] H. Jörundsdóttira, K. Norströma, M. Olssonb, H. Pham-Tuanc, H. Hühnerfussc, A. Bignertd, A. Bergman; *Environ. Pollut.* 141 (2006) 226-237
- [182] W. Vetter, U. Klobes, B. Luckas, G. Hottinger; *J. Chromatogr. A* 769 (1997) 247-252
- [183] E. Benická, D. Takáčová, J. Krupčík, I. Skačáni, O.K. Terry; *Chirality* 10 (1998) 540-547
- [184] M. Harju, P. Haglund; *J. Microcol. Sep.* 13 (2001) 300-305
- [185] G. Zhai, D. Hu, H.J. Lehmler, J.L. Schnoor; *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 33-39
- [186] C.S. Wong, P.F. Hoekstra, H. Karlsson, S.M. Backus, S.A. Mabury, D.C.G. Muir; *Chemosphere* 49 (2002) 1339-1347
- [187] E.O. Dillingham, J. Autian; *Environ. Health Perspect.* 3 (1973) 81-89
- [188] G. Latini; *Clin. Chim. Acta* 361 (2005) 20-29
- [189] I. Rusyn, J.C. Corton; *Mut. Res. Rev. Mutat. Res.* 750 (2012) 141-158
- [190] A.R. Singh, W.H. Lawrence, J. Autian; *J. Pharm. Sci.* 61 (1972) 51-55
- [191] B.C. Blount, M.J. Silva, S.P. Caudill, L.L. Needham, J.L. Pirkle, E.J. Sampson, G.W. Lucier, R.J. Jackson, J.W. Brock; *Environ. Health Perspect.* 108 (2000) 979-982
- [192] M.J. Silva, D.B. Barr, J.A. Reidy, N.A. Malek, C.C. Hodge, S.P. Caudill, J.W. Brock, L.L. Needham, A.M. Calafat; *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 331-338
- [193] H.M. Koch, A.M. Calafat; *Phil. Trans. R. Soc. B* 364 (2009) 2063-2078

- [194] P. Bustamante-Montes, B. Lizama-Soberanis, G. Olaiz-Fernández, F. Vázquez-Moreno; *Rev. Int. Contam. Ambient.* 17 (2001) 205-215
- [195] X.L. Cao; *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9 (2010) 21-43
- [196] T. Schettler; *Int. J. Androl.* 29 (2006) 134-139
- [197] D. Koniecki, R. Wang, R.P. Moody, J. Zhu; *Environ. Res.* 111 (2011) 329-336
- [198] A.D. LaFleur, K.A. Schug; *Anal. Chim. Acta* 696 (2011) 6-26
- [199] W.N. Wang, Q.H. Wu, X.H. Zang, C. Wang, Z. Wang; *Bull. Korean Chem. Soc.* 33 (2012) 3311-3316
- [200] M.R. Hadmohammadi, E. Ranjbari; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 92 (2012) 1285-1297
- [201] L. Wang, G.B. Jiang, Y.Q. Cai, B. He, Y.W. Wang, D.Z. Shen; *J. Environ. Sci. China* 19 (2007) 874-878
- [202] N. Hata, E. Yuwatini, K. Ando, M. Yamada, I. Kasahara, S. Taguchi; *Anal. Sci.* 20 (2004) 149-152
- [203] Q.H. Wu, M. Liu, X.X. Ma, W.N. Wang, C. Wang, X.H. Zang, Z. Wang; *Microchim. Acta* 177 (2012) 23-30
- [204] P.P. Oi, J.C. Wang, Y. Li, F. Su, J. Jin, J.P. Chen; *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2712-2718
- [205] Y.F. Jin, Y.J. Zhang, Y.P. Zhang, J. Chen, X.M. Zhou, L.Y. Bai; *J. Chem.* 2013 (en prensa)
- [206] Z.K. Li, F. Xue, L.G. Xu, C.F. Peng, H. Kuang, T. Ding, C.L. Xu, C.Y. Sheng, Y.X. Gong, L.B. Wang; *J. Chrom. Sci.* 49 (2011) 338-343
- [207] X. Liu, J.X. Liu, J.J. Yu, S. Li, H. Wang; *Vox. Sanguinis* 103 (2012) 245-245
- [208] D. Sircar, S.J. Albazi, Y. Atallah, W. Pizzi; *J. Chrom. Sci.* 46 (2008) 627-631
- [209] P. Mazzeo, D. Di Pasquale, F. Ruggieri, M. Fanelli, A.A. D'Archivio, G. Carlucci; *Biomed. Chrom.* 21 (2007) 1166-1171
- [210] B.C. Blount, K.E. Milgram, M.J. Silva, N.A. Malek, J.A. Reidy, L.L. Needham, J.W. Brock; *Anal. Chem.* 72 (2000) 4127-4134
- [211] K. Isoo, K. Otsuka, S. Terabe; *Electrophoresis* 22 (2001) 3426-3432
- [212] E.B. Morales, A.L. Revilla Vázquez; *J. Chromatogr. A* 1061 (2004) 225-233
- [213] Y.F. Yik, C.L. Ng, C.P. Ong, S.B. Khoo, H.K. Lee, S.F.Y. Li; *Bull. Sing. Nat. Ins. Chem.* 18 (1990) 91-100
- [214] C.P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li; *J. Chromatogr. A*, 542 (1991) 473-481
- [215] S. Takeda, S-I Wakida, M. Yamane, A. Kawahara, K. Higashi; *Anal. Chem.* 65 (1993) 2489-2492
- [216] B-Y. Guo, B. Wen, X-Q. Shan, S-Z. Zhang, J-M. Lin; *J. Chromatogr. A* 1095 (2005) 189-192
- [217] S.R. Sirimanne, J.R. Barr, D.G. Patterson Jr; *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 109-116
- [218] D. Courtheyn, B. Le Bizec, G. Brambilla, H.F. De Brabander, E. Cobbaert, M. Vand De Wiele, J. Vercammen, K. De Wasch; *Anal. Chim. Acta* 473 (2002) 71-82

- [219] H.F. De Brabander, R. Verbeke; *Trends Anal. Chem.* 3 (1984) 162-165
- [220] R.K. Heany, G.R. Fenwick; *Nat. Toxins* 3 (1995) 233-237
- [221] J.G. Vos, R.W. Stephany, J.W. Caspers; J.T.G. Van Loon, J.W.H. Metzlar, H.B.M. Overhaus; *Vet. Quart.* 4 (1982) 1-4
- [222] G. Pinel, E. Bichon, K. Poupponneau; *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 247-252
- [223] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Some Thyrotropic Agents, International Agency for Research of Cancer, 2001
- [224] Directiva 81/602/CEE del 31 de Julio de 1981
- [225] Directiva 85/358/CEE del 16 de Julio de 1985
- [226] Directiva 96/22/CE del 29 de Abril de 1996
- [227] Directiva 96/23/CE del 29 de Abril de 1996
- [228] Decisión de la Comisión 2002/657/CE del 12 de Agosto de 2002
- [229] K. De Wasch, H.F.B. Brabander; *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 311-317
- [230] G. Vargas, J. Havel, K. Frgalova; *J. Capill. Electrophor.* 5 (1998) 9-12
- [231] L. Krivankova, S. Krasensky, P. Bocek; *Electrophoresis* 17 (1959-1963) 1959-1963
- [232] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz; *Electrophoresis* 26 (2005) 2384-2390
- [233] D. Kong, Y. Chi, L. Chen, Y. Dong, L. Zhang, G. Chen; *Electrophoresis* 30 (2009) 3489-3495
- [234] P.E. Asea, J.D. McNeil, J.O. Boison; *J. AOAC Intern.* 89 (2006) 567-575
- [235] Y. Liu, Q.H. Zou, M.X. Xie, J. Han; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1504-1510
- [236] S. Abuín, R. Companyó, F. Centrich, A. Rúbies, M.D. Prat; *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 184-191
- [237] L. Zhang, Y. Liu, M.X. Xie, Y.M. Qiu; *J. Chromatogr. A* 1074 (2005) 1-7
- [238] G.Y.F. Yu, E.J. Murby, R.J. Wells; *J. Chromatogr. B* 703 (1997) 159-166
- [239] B. LeBizec, F. Monteau, D. Maume, M.P. Montrade, C. Gade, F. Andre; *Anal. Chim. Acta* 340 (1997) 201-208
- [240] P. Batjoens, H.F. DeBrabander, K. DeWasch; *J. Chromatogr. A* 750 (1996) 127-132
- [241] R. Schilt, J.M. Weseman, H. Hooijerink, H.J. Korbee, W.A. Traag, M.J. Van Steenbergen, W. Haasnoot; *J. Chromatogr B* 489 (1989) 127-137
- [242] R. Zakrzewski; *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 32 (2009) 383-398
- [243] R.K. Buick, C. Barry, I.M. Traynor, W.J. McCaughey, C.T. Elliott; *J. Chromatogr. B* 720 (1998) 71-79
- [244] L. Hollosi, A. Kettrup, K.W. Schramm; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 921-924
- [245] P. Mitra, A.T. Riga, K.S. Alexander; *J. Liquid Chrom. Rel. Tech.* 27 (2004) 549-558
- [246] K. Kusmieriek, E. Bald; *Talanta* 71 (2007) 2121-2125
- [247] S. Abuín, R. Companyó, F. Centrich, A. Rúbies, M.D. Prat; *J. Chromatogr. A* 1207 (2008) 17-23

- [248] R. Zakrzewski; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 145-150
- [249] R. Zakrzewski; *J. Chromatogr. B* 869 (2008) 67-74
- [250] M. Lohmus, K. Kallaste, B. Le Bizec; *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8080-8089
- [251] M.S. Chernov'yants, A.O. Dolinkin, E.V. Khokhlov; *J. Anal. Chem.* 64 (2009) 828-831
- [252] M.F. Pan, J.P. Wang, G.Z. Fang, W.W. Tang, S. Wang; *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 1531-1536
- [253] J. Vanden Bussche, L. Vanhaecke, Y. Deceuninck, K. Wille, K. Bekaert, B. Le Bizec, H. De Brabander; *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4285-4293
- [254] B. Wozniak, I. Matraszek-Zuchowska, J. Zmudzki, P. Jedziniak, B. Korycinska, K. Sielska, S. Witek, A. Klopot; *Anal. Chim. Acta* 700 (2011) 155-166
- [255] H. Ebrahimzadeh, A.A. Asgharinezhad, H. Abedi, F. Kamarei; *Talanta* 85 (2011) 1043-1049
- [256] J. Ashby, E. Houthoff, S.J. Kennedy, J. Stevens, R. Bars; *Environ. Health Perspect.* 105 (1997) 164-169
- [257] J. Toppari, J.C. Larsen, P. Christiansen, A. Giwereman; *Environ. Health Perspect.* 104 (1996) 741-803
- [258] A.M. Angersson, N.E.E. Skakkebaek; *J. Endocrinol.* 140 (1999) 477-485
- [259] S. Hartmann, M. Lacorn, H. Steinhart; *Food Chem.* 62 (1998) 7-20
- [260] F. Courant, J. P. Antignac, D. Maume; *Food. Addit. Contam. Part A* 24 (2007) 1358-1366
- [261] W. Yue, R.J. Santen, J.P. Wang, Y. Li; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86 (2003) 477-486
- [262] V. Pacakova, L. Loukotkova, Z. Bosakova; *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 867-882
- [263] B.G. Wolthers, G.P.B. Kraan; *J. Chromatogr. A* 843 (1999) 247-274
- [264] P. Regal, C. Nebot, B.I. Vázquez, A. Cepeda, C. Fente; *J. Sci. Food Agric.* 90 (2010) 1621-1627
- [265] B. Shao, R. Zhao, J. Meng, Y. Xue, G. Wu, J. Hu, X. Tu; *Anal. Chim. Acta* 548 (2005) 41-50
- [266] D.W. Farlow, X. Xu, T.D. Veenstra; *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 1327-1334
- [267] Y. Yang, B. Shao, J. Zhang, Y. Wu, H. Duan; *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 489-496
- [268] W. Yan, Y. Li, L. Zhao, J.M. Lin; *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7539-7545
- [269] J. Tso, D.S. Aga; *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4784-4795
- [270] H. Malekinejad, P. Scherpenisse, A.A. Bergwerff; *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9785-9791
- [271] E.M. Malone, C.T. Elliot, D.G. Kennedy, L. Regan; *J. Chromatography B* 878 (2010) 1077-1084

- [272] Q. Gao, D. Luo, M. Bai, Z.W. Chen, Y.Q. Feng; *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 8543-8549
- [273] C. Farke, E. Rattenberger, S.U. Roiger, H.H.D. Meyer; *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 1423-1427
- [274] F. Caretti, A. Gentili, A. Ambrosi, L. Mainero, M. Delfini, M.E. Di Cocco, G. D'Ascenzo; *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2477-2490
- [275] L. Hovander, L. Linderholm, M. Athanasiadou, I. Athanasiadis, A. Bignert, B. Fängström, A. Kocan, J. Petrik, T. Trnovec, A. Bergman; *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 3696-3703
- [276] B. Chankvetadze; *Methods Mol. Biol.* 243 (2004) 387-399
- [277] Y. Ma, L. Qi, J. Ma, Y. Wu, O. Liu, H. Cheng, *Coll. Surf. A* 229 (2003) 1-8
- [278] S. Fanali, G. D'Orazio, K. Lomsadze, S. Samakashvili, B. Chankvetadze; *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1166-1174
- [279] K.D. Altria; *Chromatographia* 35 (1993) 177-182
- [280] J.P. Schaeper, K.J. Sepaniak; *Electrophoresis* 21 (2000) 1421-1429
- [281] ICH Q2 (R1), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, 2005
- [282] M. Blanco, J.M. González, E. Torrás y Valverde; *Anal. Biomed. Chem.* 357(2003) 157-163
- [283] L.E. Mokry, K.D. Hoagland; *Environ. Toxicol. Chem.* 9 (1990) 1045-1051
- [284] D. Mueller-Beilschmidt; *J. Pest. Reform.* 10 (1990) 32-38
- [285] C. Zadra, C. Marucchini, A. Zazzeini; *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5373-5377
- [286] I.J. Buerge, T. Poiger, M.D. Müller, H.R. Buser; *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5443-5450
- [287] A. Monkiedje, M. Spiteller, K. Bester; *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 707-712
- [288] C. Marucchini, C. Zadra; *Chirality* 14 (2002) 32-38
- [289] M.D. Müller, H.R. Buser; *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2031-2037
- [290] F. Gozzo, G. Garavaglia, A. Zagni; *Proc. Br. Crop Prot. Conf. Pests Dis.* 3 (1984) 923-928
- [291] X. Gu, P. Wang, D. Liu, C. Lv, Y. Lu, Z. Zhou; *Chirality* 20 (2008) 125-129
- [292] X. Wang, G. Jia, J. Qiu, J. Diao, W. Zhu, C. Lv, Z. Zhou; *Chirality* 19 (2007) 300-306
- [293] P. Xu, D. Liu, J. Diao, D. Lu, Z. Zhou; *J. Agri. Food Chem.* 57 (2009) 8545-8549
- [294] S. Li, D.K. Lloyd; *Anal. Chem.* 65 (1993) 3684-3690
- [295] D. Wistuba, H. Czesla, M. Roeder, V. Schurig; *J. Chromatogr. A* 815 (1998) 183-188
- [296] A.S. Carter-Finch, N.W. Smith; *J. Chromatogr. A* 848 (1999) 375-385
- [297] P.J. Vickers, N.W. Smith; *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 1284-1290
- [298] J. Zheng, W. Bragg, J. Hou, N.L.S. Chandrasekaran, S.A. Shamsi; *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 875-872
- [299] Y. Okamoto, Y. Kaida; *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 403-439

- [300] L. Zhou, V. Antonucci, M. Biba, X. Gong, Z. Ge; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 153-157
- [301] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada; *J. Chromatogr.* 363 (1986) 173-186
- [302] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto; *Chem. Lett.* 4 (1993) 617-620
- [303] B.L. He, Y. Shi, B. Kleintop, T. Raglione; *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 122-135
- [304] L. Zhou, C. Welch; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 964-969
- [305] K.S. Dossou, P. Chiap; *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7450-7455
- [306] K.S. Dossou, P. Chiap; *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1699-1707
- [307] A.A. Younes, D. Mangelins; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 521-537
- [308] K. Si-Ahmed, Z. Aturki; *Anal. Chim. Acta* 738 (2012) 85-94
- [309] E. Domínguez-Vega, A.L. Crego, K. Lomsadze, B. Chankvetadze, M.L. Marina; *Electrophoresis* 32 (2011) 2700-2707
- [310] J. Magnusson, L.G. Blomber, S. Claude, R. Tabacchi, A. Saxer, S. Schürch; *J. High Resolut. Chrom.* 23 (2000) 619-627
- [311] T. Ellerichmann, A. Bergman, S. Franke, H. Hhnerfuss, E. Jakobsson, W. Knig, C. Larsson; *Fres. Environ. Bull.* 7 (1998) 244-257
- [312] B. Gómara, M.J. González; *Chemosphere* 63 (2006) 662-669
- [313] M.P. Fernández, M.G. Ikonou, I. Buchanan; *Sci. Tot. Environ.* 373 (2007) 250-269
- [314] O. Ballesteros, A. Zafra, A. Navalón, J.L. Vílchez; *J. Chromatogr. A* 1121 (2006) 154-162
- [315] L.G. Song, Z.H. Xu, J.W. Kang, J.K. Cheng; *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 297-328
- [316] Q.H. Zou, Y. Liu, M.X. Xie; *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 184-191
- [317] R. Hirsch, T.A. Ternes, K. Haberer; *J. Chromatogr. A* 815 (1998) 213-223
- [318] C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli and J.S. Beck; *Nature* 359 (1992) 710-712
- [319] Q. Tang, Y. Xu, D. Wu, Y. Sun; *J. Solid State Chem.* 179 (2006) 1513-1520
- [320] A. Corma; *Chem. Rev.* 97 (1997) 2373-2419
- [321] D. Pérez-Quintanilla, I. del Hierro, M. Fajardo, I. Sierra; *J. Mater. Chem.*, 16 (2006) 1757-1764
- [322] X. Liu, L. Li, Y. Du, Z. Guo, T.T. Ong, Y. Chen, S. Choon Ng, Y. Yang; *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7767-7773
- [323] F. Wang, J. Yang, K. Wu; *Anal. Chim. Acta* 638 (2009) 23-28
- [324] A. Sayari, Y. Yang, M. Kruk, M. Jaroniec; *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 3651-3658
- [325] S. Sujandi, S.E. Park, D.S. Han, S.C. Han, M.J. Jin, T. Ohsuna; *Chem. Commun.* 39 (2006) 4131-4133