

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANÁLITICA

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DE
PLAGUICIDAS MEDIANTE MICROONDAS Y FLUIDOS
PRESURIZADOS

FRANCESC ALBERT ESTEVE TURRILLAS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 15 de
Desembre de 2006 davant un tribunal format per:

- D. Dario Prada Rodríguez
- D. John R. Dean
- D. Edmondo Pramauro
- D. Lluís Puignou García
- D. Ángel Morales Rubio

Va ser dirigida per:
D. Agustín Pastor García

©Copyright: Servei de Publicacions
Francesc Albert Esteve Turrillas

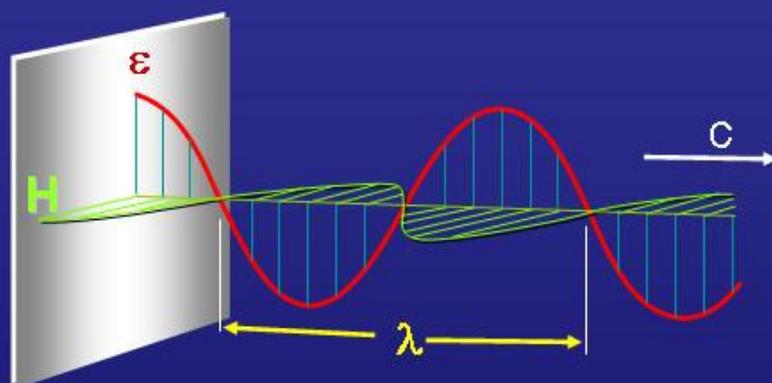
Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6757-5

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

TESIS DOCTORAL

**PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA
EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS MEDIANTE
MICROONDAS Y FLUIDOS PRESURIZADOS**



FRANCESC ALBERT ESTEVE TURRILLAS

Valencia 2006



El **Dr. D. Agustín Pastor García**, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València,

CERTIFICA

que **D. Francesc Albert Esteve Turrillas**, Licenciado en Química y Licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ambas por la Universitat de València, ha realizado bajo mi dirección y supervisión la presente Tesis Doctoral titulada **“Preparación de muestras para el análisis de plaguicidas mediante microondas y fluidos presurizados”**, autorizando su presentación para optar al grado de Doctor, de acuerdo con la legislación vigente.

Para que así conste y a los efectos oportunos, firmo la presente en:

Burjassot, Octubre de 2006.

Fdo.: Dr. D. Agustín Pastor García



Ph.D. Agustín Pastor García, Titular Professor in the Analytical Chemistry Department of the Universitat de València.

CERTIFIES

that **Mr. Francesc Albert Esteve Turrillas**, Master of Science in Chemistry and Master of Science in Food Science and Technology, has performed under my direction and supervision this PhD Thesis entitled “**Sample treatment in pesticide determinations by using microwaves and pressurized fluids**”, approving its presentation in order to obtain the PhD degree, in accordance with the present legislation.

Burjassot, October 2006.

Sig. Dr. Agustín Pastor García

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a la Universitat de València (beca predoctoral "V Segles"), Ministerio de Educación y Ciencia (PPQ2000-0816) y a la Direcció General d'Universitats i Investigació de la Generalitat Valenciana (Proyecto GV04B/247 y Grupos 03-118) por su financiación. Sin su contribución no hubiera podido hacer lo que realmente me gusta sin llegar a pobre, ni poder ver mundo para descubrir que "como en casa no se está en ningún sitio".

Deseo agradecer a todos los miembros del grupo de investigación haberme ayudado a realizar esta tesis doctoral, especialmente a Agustín por su confianza y por su asesoramiento científico; a Miguel por su simpatía y dinamismo; a Boro por hacer de todo esto algo más ameno y entretenido; a Ángel por su proximidad y por su incansable empeño en salvar Porxinos; y a Marisa por estar siempre disponible.

A John Dean por su amistad y apoyo durante los meses que estuve en Newcastle, por guiarme en los placeres de la comida oriental y por enseñarme a apreciar ese noble deporte llamado rugby. A Wolfgang Lindner y Michael Lämmerhofer por su trato amable, comprensivo y por preocuparse de mí en todo momento mientras estuve en Viena. Cómo no, no quisiera olvidarme de mis "temporales" compañeros de laboratorio, de piso y amigos que hice tanto en Newcastle como en Vienna, gracias a vosotros me sentí como en casa. A pesar de mi dejadez y pereza a la hora de escribiros, Vanesa, Blanca, Nina, Jan, Wanda, Kola, Lee, Stefan, Norbert, Wolfgang B., Trixi,..., ¡nunca os olvidaré!

¡Ahora viene lo largo! Resulta difícil concretar en tan pocas líneas todo lo vivido en tanto tiempo, así que empezaré desde el principio. "La tierra era un gran bola de fuego...", bueno abreviaré un poco, jejeje. Quisiera agradecer a Sonia por iniciarme en el mundo de los PCBs, los PAHs y los LODs; también a Lidia, Caroline, Rafa, Romu, Josep, Iman por ser tan peculiares compañeros de

laboratorio. A Paz y Pili por aguantarnos en el Congreso de A Coruña, que fue el inicio de una gran época. A Boa, Gustavo, Nano, Nívia, André, la familia Khanmohammadi,..., que vinieron desde muy lejos y ha sido un placer conocerles. Nunca olvidaré esas cenas de los jueves y esos interminables duritos en el 5º piso y en la rotonda, desde el comienzo con Asun y Carmen Parrilla, hasta ahora con Nini, Meike, Markus, Mariela, Emilie y Marlene, sin olvidar a Jesús, Maite, Katia, Ivonne, Gracia,... Finalmente, a Eva, Bela y el recién llegado Julián, que se merecen lo mejor que les pueda decir, gracias esos cafeses en el despachito, por ser inmejorables compañeros y por ser culpables de que pase más tiempo en el laboratorio que en casa.

Después de compartir seis años de mi vida, pasar más tiempo con ellos que con mi familia, compartir laboratorio, compartir casa, viajar por el mundo, ir de congresos y un largo etc., el Bolsón tiene que agradecer de todo corazón haber encontrado en este mundo a sus amigos Alimaña, Abuelo y Xavalambre. Creo que hemos dejado el pabellón bien alto. ¡Os echaré mucho de menos!

A mis amigos Carol, José, Furby, Esther, Daniele, Marcos, Carlos, Ana, Maribel, Nuria, Eva, Raúl, Simona, Maya, Águeda, Ale, Cris, Ito, David, todos habéis contribuido de alguna forma en esta tesis. Un beso muy gordo para todos.

Moni, gracias por estar siempre ahí, por saber entenderme en este mundo del investigador que es "incomprensible" para mucha gente, por haberme querido tanto estando tan lejos y por quererme tanto estando tan cerca, por hacerme soñar y sobretodo por hacerme comprender que no se pueden tener siempre los pies en el suelo. ☐☐☐☐. TQ.

Quisiera agradecer a toda mi familia y en especial a mis padres, a Edurne y a Javi, por cuidarme tan bien, por estar siempre preocupados por mi felicidad y por haberme apoyado en todas y cada una de mis decisiones. Aunque no os lo diga nunca ¡Os quiero mucho!

El científico que quería "arreglar" el mundo

Un científico, que vivía preocupado con los problemas del mundo, estaba resuelto a encontrar los medios para aminorarlos.

Pasaba días en su laboratorio en busca de respuestas para sus dudas.

Cierta día, su hijo de 7 años invadió su santuario decidido a ayudarlo a trabajar. El científico, nervioso por la interrupción, le pidió al niño que fuese a jugar a otro lado.

Viendo que era imposible sacarlo, el padre pensó en algo que pudiese darle con el objetivo de distraer su atención. De repente se encontró con una revista, en donde había un mapa con el mundo, justo lo que precisaba.

Con unas tijeras recortó el mapa en varios pedazos y junto con un rollo de cinta se lo entregó a su hijo diciendo:

- "Como te gustan los rompecabezas, te voy a dar el mundo todo roto para que lo repares sin ayuda de nadie".

Entonces calculó que al pequeño le llevaría 10 días componer el mapa, pero no fue así. Pasadas algunas horas, escuchó la voz del niño que lo llamaba calmadamente.

- "Papá, papá, ya hice todo, conseguí terminarlo".

Al principio el padre no creyó en el niño. Pensó que sería imposible que a su edad haya conseguido recomponer un mapa que jamás había visto antes.

Desconfiado, el científico levantó la vista de sus anotaciones con la certeza de que vería el trabajo digno de un niño. Para su sorpresa, el mapa estaba completo. Todos los pedazos habían sido colocados en sus debidos lugares. ¿Cómo era posible? ¿Cómo el niño había sido capaz de hacerlo?

De esta manera el padre preguntó con asombro a su hijo:

- "Hijito, tu no sabías como era el mundo, ¿cómo lo lograste?"

- Papa, respondió el niño, yo no sabía como era el mundo, pero cuando sacaste el mapa de la revista para recortarlo vi que del otro lado estaba la figura de un hombre.

Así que di vuelta los recortes y comencé a recomponer al hombre, que sí sabía como era. Cuando conseguí arreglar al hombre, di vuelta la hoja y vi que había arreglado al mundo.

Gabriel García Márquez

ABREVIATURAS

A_p	-	Afinidad protónica
APCI	-	Ionización química a presión atmosférica
API	-	Ionización a presión atmosférica
ASE	-	Extracción acelerada por disolventes
a.u.	-	Unidades arbitrarias
BTEX	-	Benceno, Tolueno, Etil Benceno y Xilenos
CI	-	Ionización química
CRM	-	Material de referencia certificado
DVB	-	Divinilbenceno
ECD	-	Detector de captura electrónica
EI	-	Ionización por impacto de electrones
EPA	-	Agencia de Protección del Medioambiente
ES	-	Ionización por electrospray
EVB	-	Etilvinilbenceno
FAO	-	Organización para la alimentación y la agricultura
FGC	-	Cromatografía rápida de gases
GCB	-	Carbón grafitizado
GPC	-	Cromatografía de permeación en gel
HCB	-	Hexaclorobenceno
HPLC	-	Cromatografía líquida de alta resolución
K_{TW}	-	Coeficiente de partición trioleína-agua
K_{OW}	-	Coeficiente de partición octanol-agua
LMR	-	Límite máximo de residuos
LAH	-	Hidrocarburos lineales alifáticos
LOD	-	Límite de detección
LOQ	-	Límite de cuantificación
MAE	-	Extracción asistida por microondas
MS	-	Espectrometría de masas
MS-MS	-	Espectrometría de masas en tándem

m/z	-	Relación masa-carga de un ión
NCI	-	Ionización química negativa
NIST	-	Instituto nacional de estándares y tecnología
OCP	-	Contaminantes orgánicos clorados
OFN	-	Octafluoronaftaleno
OMS	-	Organización Mundial de la Salud
PAH	-	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
PCB	-	Bifenilos policlorados
PCDD	-	Dibenzodioxinas policloradas
PCDF	-	Dibenzofuranos policlorados
PCNB	-	Pentacloronitrobenceno
PFE	-	Extracción por fluidos presurizados
PS	-	Poliestireno
PSE	-	Extracción con disolventes presurizados
PTFE	-	Politetrafluoretileno (Teflón)
PTV	-	Inyector de vaporización a temperatura programada
RSD	-	Desviación estándar relativa
SEC	-	Cromatografía de exclusión por tamaños
SFE	-	Extracción por fluidos supercríticos
SIM	-	Monitoreo de iones seleccionados
SPE	-	Extracción en fase sólida
SPMD	-	Dispositivos de membrana semipermeable
SPME	-	Microextracción en fase sólida
TCDD	-	Dioxina
TOF	-	Analizador de tiempo de vuelo
uma	-	Unidades de masa atómica

ABBREVIATIONS

A _p	-	Proton affinity
APCI	-	Atmospheric pressure chemical ionization
API	-	Atmospheric pressure ionization
ASE	-	Accelerated solvent extraction
a.u.	-	Arbitrary units
BTEX	-	Benzene, Toluene, Ethyl Benzene and Xylenes
CI	-	Chemical ionization
CRM	-	Certified reference material
DVB	-	Divynilbenzene
ECD	-	Electron capture detector
EI	-	Electron impact ionization
EPA	-	Environmental protection agency
ES	-	Electrospray ionization
EVB	-	Ethylvynilbenzene
FAO	-	Food and agricultural organization
FGC	-	Fast gas chromatography
GCB	-	Graphitized carbon black
GPC	-	Gel permeation chromatography
HCB	-	Hexachlorobenzene
HPLC	-	High performance liquid chromatography
K _{TW}	-	Triolein-water partition coefficient
K _{OW}	-	Octanol-water partition coefficient
LMR	-	Maximum limit of residues
LAH	-	Linear aliphatic hydrocarbon
LOD	-	Limit of detection
LOQ	-	Limit of quantification
MAE	-	Microwave-assisted extraction
MS	-	Mass spectrometry
MS-MS	-	Tandem mass spectrometry

m/z	-	ion mass charge ratio
NCI	-	Negative chemical ionization
NIST	-	National institute of standards and technology
OCP	-	Organochlorined pesticides
OFN	-	Octafluornaphtalene
OMS	-	WHO (World health organization)
PAH	-	Polycyclic aromatic hydrocarbon
PCB	-	Polychlorinated biphenyl
PCDD	-	Polychlorinated dibenzo-dioxin
PCDF	-	Polychlorinated dibenzo-furan
PCNB	-	Pentachloronitrobenzene
PFE	-	Pressurized fluid extraction
PS	-	Polystyrene
PSE	-	Pressurized solvent extraction
PTFE	-	Polytetrafluorethylene (Teflon)
PTV	-	Programmable temperature vaporizing injector
RSD	-	Relative standard deviation
SEC	-	Size exclusion chromatography
SFE	-	Supercritical fluid extraction
SIM	-	Selected ion monitorizing
SPE	-	Solid-phase extraction
SPMD	-	Semi permeable membrane device
SPME	-	Solid-phase micro extraction
TCDD	-	Dioxine
TOF	-	Time of fly analyzer
uma	-	atomic mass units

A mis padres

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1. - Plaguicidas.....	2
1.1. - Aplicaciones.....	2
1.2. - Definiciones.....	3
1.3. - Clasificación.....	4
1.4. - Efecto de los plaguicidas sobre el medioambiente y la salud humana.....	7
1.5. - Determinación de residuos de plaguicidas.....	9
2. - Tipo de muestras.....	12
2.1. - Suelos.....	12
2.2. - Alimentos.....	16
2.3. - Dispositivos de membrana semipermeable (SPMDs).....	17
2.3.1. – Características de un SPMD.....	18
2.3.2. - Variables que afectan a la absorción de contaminantes en SPMDs.....	20
2.3.3. - Métodos de análisis de SPMD.....	22
2.3.4. - Ventajas en el empleo de SPMDs frente a indicadores biológicos.....	23
3. - Métodos de extracción para muestras líquidas.....	25
3.1. - Extracción líquido-líquido.....	25
3.2. - Extracción en fase sólida.....	26
3.3. - Microextracción en fase sólida.....	30
4. - Métodos de extracción para muestras sólidas.....	33
4.1. - Extracción líquido-sólido.....	33
4.1.1. - Agitación.....	33
4.1.2. - Soxhlet.....	33
4.1.3. - Diálisis.....	34
4.2. - Extracción con fluidos supercríticos.....	35
4.3. - Extracción asistida por microondas.....	37
4.3.1. - Calentamiento por microondas.....	37
4.3.2. - Elección del disolvente.....	39
4.3.3. - Volumen de disolvente.....	40
4.3.4. - Temperatura y tiempo de extracción.....	40
4.3.5. - Influencia de otros parámetros en el proceso de extracción.....	42
4.3.6. - Equipos comerciales.....	42

4.4. - Extracción con fluidos presurizados.....	43
4.4.1. - Funcionamiento.....	44
4.4.2. - Principales parámetros en el proceso de extracción.....	45
4.4.3. - Equipos comerciales.....	46
4.5. - Comparación de metodologías de extracción para muestras sólidas.....	47
5. - Limpieza de extractos.....	49
5.1. - Extracción líquido-líquido.....	49
5.2. - Extracción en fase sólida.....	50
5.3. - Cromatografía de permeación en gel.....	51
6. - Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	54
6.1. - Acoplamiento cromatografía de gases y espectrómetro de masas.....	54
6.2. - Tipos de ionización.....	57
6.2.1. - Ionización por impacto electrónico.....	59
6.2.2. - Ionización química.....	60
6.3. - Espectrómetro de masas de trampa iónica.....	61
6.3.1. - Funcionamiento.....	61
6.3.2. - Espectrometría de masas en tándem.....	63
6.4. - Avances en las determinaciones por espectrometría de masas.....	64
CAPÍTULO 2a: OBJETIVOS	67
CAPÍTULO 2b: AIM AND SCOPE	70
CAPÍTULO 3: RESUMEN	73
1. - Determinación por cromatografía gaseosa.....	74
1.1. - Insecticidas piretroides.....	74
1.1.1. - Determinación por ionización química negativa.....	77
1.2. - Insecticidas organoclorados.....	80
1.3. - Determinaciones tándem masas.....	81
1.4. - Determinación de multiresiduos de pesticidas.....	84

2. - Extracción de insecticidas piretroides de suelos por MAE.....	86
2.1. - Limpieza de extractos de suelo.....	86
2.2. - Parámetros de extracción por microondas.....	88
2.3. - Parámetros analíticos del método.....	89
3. - Extracción de insecticidas organoclorados de suelos y lechugas con disolventes presurizados.....	91
3.1. - Extracción de insecticidas organoclorados de suelos.....	91
3.2. - Extracción de Endosulfan de lechugas.....	92
3.3. - Absorción de Endosulfan por lechugas plantadas en suelos contaminados.....	94
4. - Limpieza del extracto de la muestra para el análisis cromatográfico de insecticidas piretroides en muestras grasas.....	97
4.1. - Eficiencia de distintas metodologías para la limpieza del residuo.....	97
4.2. - Parámetros analíticos en la determinación de piretroides en aceites vegetales.....	100
5. - Extracción de plaguicidas de dispositivos de membrana semipermeable (SPMDs).....	102
5.1. - Extracción asistida por microondas de piretroides retenidos en SPMDs.....	102
5.2. - Modificación del procedimiento de extracción para la determinación de plaguicidas retenidos en SPMDs.....	106
5.3. - Absorción de insecticidas piretroides desde aire.....	108
5.4. - Variables que afectan a la absorción de plaguicidas desde agua.....	109
5.5. - Absorción de plaguicidas con SPMDs en acequias.....	112

CAPÍTULO 4: RESULTS **114**

I - "Comparison of different mass spectrometric detection techniques in the gas chromatographic analysis of pyrethroid insecticide residues in soil after microwave-assisted extraction".....	115
II - "Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from soil".....	125
III - "Uptake and bioavailability of persistent organic pollutants by plants grown in contaminated soil".....	132

IV - "Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection".....	139
V - "Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from semi permeable membrane devices (SPMDs) used to indoor air monitoring".....	148
VI - "Screening of neutral pesticides in continental waters using semi permeable membrane devices".....	159
CAPÍTULO 5a: CONCLUSIONES	171
CAPÍTULO 5b: CONCLUSIONS	175
CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA	179

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. - Plaguicidas

1.1. - Introducción

El incremento constante de la población mundial requiere de una producción muy elevada de alimentos, por lo que la protección de cultivos contra el ataque de parásitos y de otros agentes biológicos es más que necesaria. El empleo de plaguicidas en la agricultura es imprescindible para mejorar su potencial económico, permitiendo la protección de los cultivos en áreas en las que no sería posible, aumentando el periodo de desarrollo de las plantas, incrementando el periodo de almacenamiento post-cosecha, reduciendo los costes de producción de los alimentos y disminuyendo el riesgo de aparición de plagas [FAO 2003].

El uso de plaguicidas también está relacionado con el control de plagas que puedan afectar a la salud humana, sobretodo en países con climas tropicales, con el fin de prevenir contagios de enfermedades tales como la malaria, el dengue o el cólera [WHO 1999]. Entre sus múltiples campos de aplicación podemos citar su uso sistemático tanto a nivel agrícola, cómo industrial, doméstico, en jardinería o en veterinaria [Kolaczinski 2004].

Los beneficios obtenidos del uso de pesticidas son sin duda numerosos, pero la difusión de grandes cantidades de estos compuestos al entorno ha dado origen a problemas que afectan tanto al medioambiente, como a la salud humana. Además de la acumulación de estos compuestos persistentes en el medioambiente (aire, agua o suelo), los plaguicidas entran en la cadena alimentaria de animales, llegando en último término a alcanzar la cadena alimenticia humana, donde se acumulan en algunos órganos vitales y provocan el desarrollo de intoxicaciones de distinta gravedad.

La importancia económica del empleo de pesticidas se aprecia en la figura 1.1, donde además se muestra la distribución del consumo de estos

compuestos según áreas geográficas [Pramauro 1990, Iowa University, Pesticide Action Network].

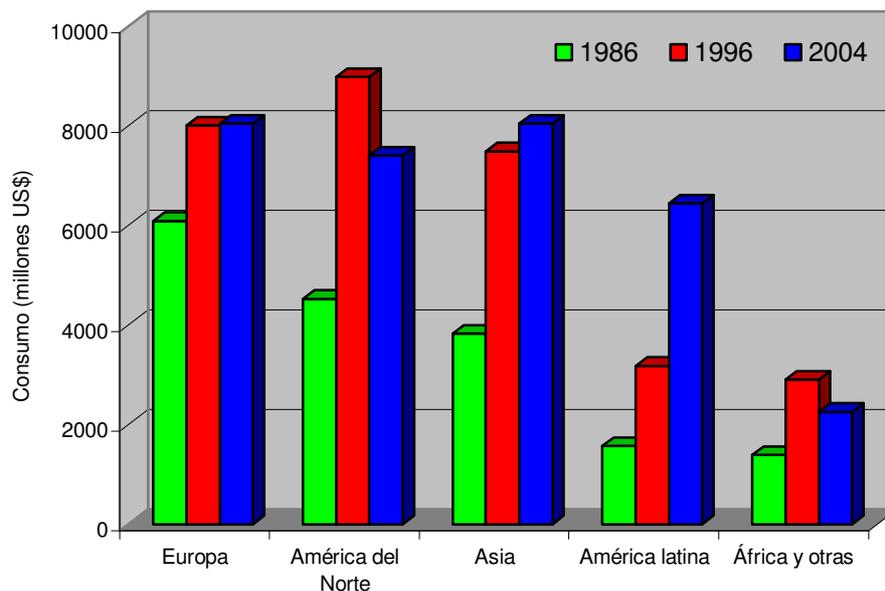


Figura 1.1. Distribución geográfica en el consumo de plaguicidas.

1.2. - Definiciones

La Organización de Naciones Unidas a través de la “*Food and Agricultural Organization*” (FAO) define el término plaguicida como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga [FAO 2002].

El Real Decreto 3349/83 de 30 de noviembre de 1983 sobre “Reglamentación técnico-sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas” define plaguicida o pesticida como aquellas sustancias o ingredientes activos, así como las formulaciones o preparados que contengan uno o varios de ellos, destinados a cualquiera de los fines siguientes [BOE 1983]:

- Combatir los agentes nocivos para los vegetales y productos vegetales o prevenir su acción.

- Favorecer o regular la producción vegetal, con excepción de los nutrientes y los destinados a la enmienda de suelos.
- Conservar los productos vegetales, incluida la protección de maderas.
- Destruir los vegetales indeseables.
- Destruir parte de los vegetales o prevenir un crecimiento indeseable de los mismos.
- Hacer inofensivos, destruir o prevenir la acción de otros organismos nocivos o indeseables distintos de los que atacan a vegetales.

Siendo un ingrediente activo todo producto orgánico o inorgánico; natural, sintético o biológico; con una determinada actividad plaguicida y con un grado de pureza establecido.

Por residuo de plaguicida se entiende cualquier sustancia especificada presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida. El término también incluye cualquier derivado suyo, como productos de conversión, metabolitos, productos de reacción e impurezas consideradas de importancia toxicológica [Codex Alimentarius a].

Límite máximo para residuos (LMR) de plaguicida es la concentración máxima de residuos de un plaguicida en la superficie o la parte interna de productos alimenticios, expresada en mg/kg, recomendada por la Comisión del Codex Alimentarius, para que se permita legalmente el uso de estos productos alimenticios en el consumo humano y para los piensos. Los LMR tienen por objeto lograr que los alimentos derivados de productos básicos sean toxicológicamente aceptables [Codex Alimentarius a].

1.3. - Clasificación

La clasificación de los plaguicidas puede realizarse empleando distintos criterios, como por ejemplo: destino de su aplicación, acción específica, constitución química, grado de toxicidad, origen, tipo de presentación, etc. Las

clasificaciones más comúnmente empleadas se basan en su toxicidad, en su acción específica y en su constitución química.

Según el destino de su aplicación pueden considerarse:

- Productos fitosanitarios: los destinados a su utilización en el ámbito de la sanidad vegetal o el control de los vegetales.
- Pesticidas de uso ganadero: los destinados a su utilización en el entorno de los animales o en actividades relacionadas con su explotación.
- Pesticidas de uso en la industria alimentaria: los destinados a tratamientos de productos o dispositivos relacionados con la industria alimentaria.
- Pesticidas de uso ambiental: los destinados al saneamiento de locales u otros establecimientos públicos o privados.
- Pesticidas de uso en higiene personal: aquellos preparados útiles para la aplicación directa sobre el cuerpo humano.
- Pesticidas de uso doméstico: cualquier preparado destinado para aplicación por personas no especialmente cualificadas, en viviendas o locales habitados.

Atendiendo a su acción específica sobre una plaga los pesticidas pueden clasificarse en:

- Insecticidas
- Acaricidas
- Fungicidas
- Nematocidas, desinfectantes y fumigantes
- Fitorreguladores
- Molusquicidas y rodenticidas
- Específicos post-cosecha y simientes
- Protectores de maderas, fibras y derivados

Considerando su grado de toxicidad para las personas, los plaguicidas se clasifican, dependiendo del riesgo que supone su inhalación, ingestión y/o penetración cutánea, de la siguiente forma:

- De baja peligrosidad: no entrañan riesgos apreciables.
- Nocivos: pueden entrañar riesgos de gravedad limitada.
- Tóxicos: pueden entrañar riesgos graves, agudos o crónicos, incluso la muerte.
- Muy tóxicos: producen riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos, incluso la muerte.

Desde el punto de vista de su constitución química, los pesticidas pueden clasificarse en diversos grupos: arsenicales, carbamatos, derivados de cumarina, derivados de urea, dinitrocompuestos, organoclorados, organofosforados, organometálicos, piretroides, nitroanilinas y triazinas. Siendo los más importantes los siguientes:

- Organofosforados: como su propio nombre indica son derivados del ácido fosfórico y similares. Penetran en el organismo mediante absorción cutánea, inhalación o ingestión. Su mecanismo de acción es una carbamitación reversible de la enzima *acetilcolinesterasa*, que implica una acumulación de acetilcolina en el sistema nervioso central, provocando distintos grados de toxicidad en los humanos [EPA 1999a]. Este tipo de pesticidas es el más usado en la actualidad, empleándose tanto con fines agrícolas como en el hogar, jardinería y veterinaria.
- Carbamatos: son derivados del ácido carbámico, desarrollados más recientemente que los organofosforados, provocan al igual que éstos una carbamitación reversible de la enzima *acetilcolinesterasa*. Estos compuestos tienen un amplio espectro de acción insecticida y pueden ser absorbidos por el hombre por inhalación e ingestión, siendo la absorción cutánea la ruta menos tóxica. Algunos plaguicidas de tipo carbamato están considerados por la *Environmental Protection Agency*

(EPA) como cancerígenos [EPA 1999b]. Estos plaguicidas son muy utilizados en el hogar, jardinería y principalmente en agricultura.

- Organoclorados: estos plaguicidas se caracterizan por tener átomos de cloro en su estructura. Fueron ampliamente utilizados en el siglo XX, pero debido a la elevada acumulación en tejidos grasos, persistencia en el medio ambiente y toxicidad, la mayoría de ellos fueron retirados del mercado y se prohibió su uso en países desarrollados. Según el Reglamento 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 sobre contaminantes orgánicos persistentes, queda prohibida la producción, comercialización y uso de las siguientes sustancias: Aldrin, Chlordane, Dieldrin, Endrin, Heptachlor, Hexachlorobencene, Mirex, Toxafen y DDT, solas, en preparados o como constituyentes de artículos [DOUE 2004]. A pesar de ello, debido a su efectividad y bajo coste, estos compuestos siguen empleándose abundantemente en países en vías de desarrollo.
- Piretroides: son compuestos derivados del ácido crisantémico, cuyo éster cetoalcohólico le proporciona propiedades insecticidas [Ware 1994]. Son muy efectivos para un gran número de plagas y muestran una toxicidad muy selectiva para insectos, siendo poco tóxicos para los mamíferos y las aves [Ray 1997, Gray 1985]. Mantienen abiertos los canales de sodio de las membranas neuronales, despolarizándolas e impidiendo su correcto funcionamiento [ORST].

1.4. - Efecto de los plaguicidas sobre el medioambiente y la salud humana

A pesar de que los pesticidas han sido diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, su uso genera innumerables efectos secundarios como la generación de organismos resistentes, persistencia en el medioambiente o la contaminación de los recursos hídricos. Los pesticidas organoclorados son un ejemplo de persistencia ambiental, ya que algunos de ellos permanecen en los suelos sin degradación significativa hasta 30 años después de ser aplicados. Esa permanencia favorece su incorporación a las cadenas tróficas, la biomagnificación

y la acumulación en los tejidos grasos de humanos y animales. Asimismo, la aplicación sistemática de plaguicidas altera los equilibrios existentes en las cadenas tróficas normales al causar la desaparición o disminución de los enemigos naturales de distintas plagas, de descomponedores de materia orgánica, de incorporadores de nitrógeno y de otras especies vitales para mantener los ciclos biológicos, como por ejemplo los insectos polinizadores. Estos factores mencionados anteriormente forman un ciclo cerrado (ver figura 1.2) de distribución de plaguicidas, que se retroalimenta y refuerza, provocando multitud de efectos malignos para el medioambiente.

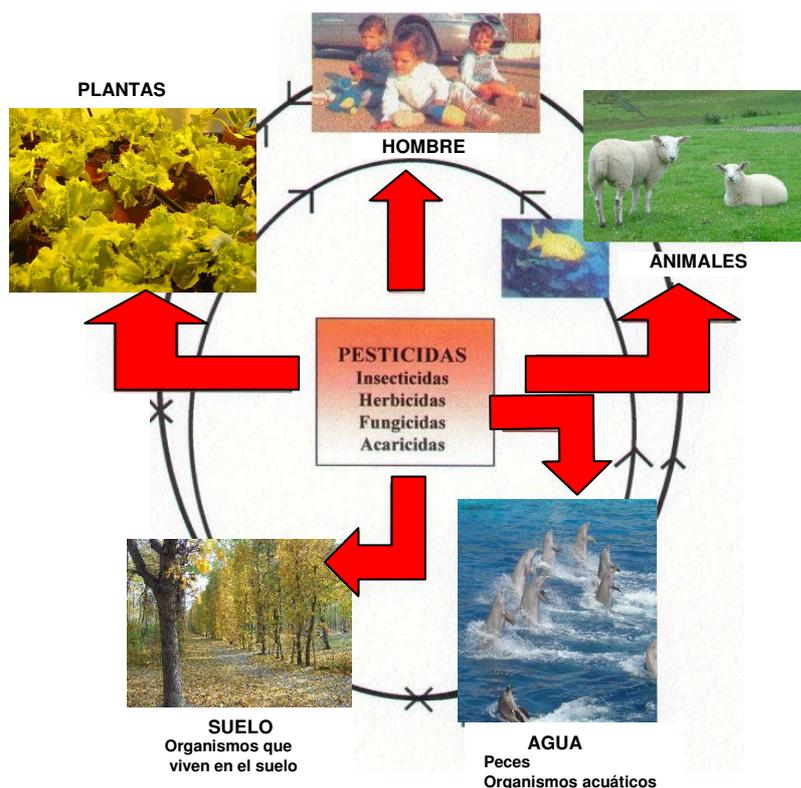


Figura 1.2. Distribución de plaguicidas en el medioambiente.

Respecto al efecto en humanos, las principales fuentes de absorción de plaguicidas en ambientes laborales son debidas a un uso incorrecto, falta de

medidas preventivas y de protección, almacenamiento inadecuado, reutilización de envases y fumigaciones aéreas [Oliveira 2005]. A nivel doméstico los tratamientos contra insectos y las lociones anti-piojos son las principales vías de contaminación. A pesar de ello, también se han detectado residuos de organoclorados y organofosforados en personas, donde la única vía de entrada es a través de la ingestión de alimentos, por lo que el problema de biomagnificación es cada vez más evidente. Los efectos indeseados producidos por un pesticida en humanos dependen fundamentalmente de la dosis, la vía de entrada (cutánea, inhalación y/o ingestión) y el tiempo de exposición. Los efectos agudos (vómitos, diarrea, aborto, cefalea, somnolencia, alteraciones del comportamiento, convulsiones, coma, incluso muerte) están asociados a accidentes donde una única dosis alta es suficiente para provocar los efectos que se manifiestan tempranamente. Los crónicos (cánceres, leucemia, necrosis de hígado, malformaciones congénitas, neuropatías periféricas, malestar general, cefaleas persistentes, dolores vagos, etc.) se deben a exposiciones repetidas y los síntomas aparecen años después del contacto con el pesticida, haciéndose mucho más difícil la identificación de agente causante de estas afecciones.

La degradación de los plaguicidas en el medioambiente es debida a procesos químicos de fotólisis, hidrólisis, oxidación o reducción y por supuesto a la acción de microorganismos, formándose gran variedad de productos de transformación. Pero teniendo en cuenta que la biotransformación de estos compuestos es muy lenta, los pesticidas tienden a acumularse en el tejido graso de los organismos vivos, introduciéndose en la cadena alimentaria y extendiendo su alcance de forma global.

1.5. - Determinación de residuos de plaguicidas

Debido al uso intensivo de plaguicidas, a su toxicidad y a su capacidad de acumulación en el cuerpo humano, es preciso tener un control en los niveles de concentración de estos compuestos, tanto en matrices biológicas (alimentos, tejidos animales, tejidos vegetales), como en medioambientales (agua, suelo,

aire). Este control debe afectar tanto a los restos de plaguicidas, como a sus metabolitos y productos de degradación o de reacción, que estén presentes en la matriz de estudio.

Para evitar las diferencias existentes entre los estados miembros de la Unión Europea (UE), en lo que se refiere a los contenidos máximos permisibles para residuos de plaguicidas, que puedan contribuir a crear barreras para el comercio y, de ese modo, obstaculizar la libre circulación de mercancías dentro de la comunidad, la UE fija en distintas directivas y sucesivas ampliaciones y modificaciones, los niveles en productos destinados a la nutrición humana. Los límites máximos de residuos de plaguicidas se regulan, por el Real Decreto 280/1994, de 18 de febrero, por el que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal, modificado por el Real Decreto 198/2000, de 11 de febrero, y por el Real Decreto 569/1990, de 27 de abril, relativo a la fijación de contenidos máximos de residuos de plaguicidas sobre productos de origen animal. Finalmente, la Orden PRE/753/2004 de 22 de marzo modifican los anexos II de los Reales Decretos 280/1994, de 18 de febrero y 569/1990, de 27 de abril, por los que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal y animal [BOE 1990, BOE 1994, BOE 2000, BOE 2004].

Los plaguicidas suelen encontrarse a niveles traza en multitud de muestras, tanto biológicas como medioambientales, por lo que se requiere metodologías muy sensibles y selectivas para su determinación. El proceso de análisis es a menudo complicado y consta de varias etapas, siendo generalmente la última de ellas una determinación cromatográfica, gaseosa o líquida, con un detector adecuado. La efectividad de este análisis no depende únicamente del instrumento cromatográfico de medida, sino que es el resultado de todas las operaciones intermedias a las que se somete la muestra. El esquema general de las etapas intermedias en un proceso analítico se basa en:

- Estrategia de muestreo
- Almacenamiento y conservación de la muestra
- Pretratamiento de la muestra
- Extracción del analito de la muestra
- Limpieza del extracto
- Preconcentración
- Medida cromatográfica

Todas estas operaciones son fuentes probables de inexactitud e imprecisión que se introducen en el proceso analítico, por lo que es preciso el control de cada una de ellas para asegurar la eficiencia del proceso completo.

2. - Tipo de muestra

2.1. - Suelos

La composición química del suelo es muy variable, está formado por compuestos inorgánicos y orgánicos, aunque más de la mitad de su volumen está formado por poros. En el interior de los poros puede haber tanto aire como agua. La figura 1.3 muestra un diagrama de la composición aproximada de un suelo estándar.

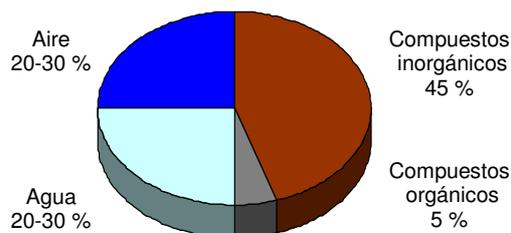


Figura 1.3. Composición aproximada del suelo en volumen.

La materia orgánica presente en el suelo, generalmente unida a arcillas, está formada por ácidos húmicos y fúlvicos, y es la responsable de los fenómenos de adsorción de compuestos no iónicos y no polares. Los contaminantes también pueden estar disueltos, tanto en el agua como en el aire intersticial, o unidos directamente a partículas sólidas por medio de fuerzas capilares [Larson 1993].

Los suelos que se emplean para fines agrícolas se pueden clasificar en tres categorías [Pramauro 1990]:

- Regadíos: son terrenos que reciben una gran cantidad de agua y fertilizantes. La recogida de cosechas suele ser anual, con ciclos de cultivo muy intensivos, empleando grandes cantidades de plaguicidas.
- Cultivos de secano: el cultivo se implanta cada año y se emplean fertilizantes y plaguicidas.

- **Prados:** son terrenos que prácticamente no necesitan preparación antes del cultivo. Siempre están cubiertos de vegetación y no es frecuente el uso de plaguicidas.

Los fenómenos más importantes de acumulación de pesticidas se producen, como es de esperar, en los dos primeros tipos de cultivos, pero si tenemos en cuenta que existe una gran dispersión debida a procesos naturales de transporte, la contaminación del suelo con plaguicidas debemos considerarla desde un punto de vista mucho más general. Conocer la movilidad de un plaguicida, después de su aplicación en el campo, es un factor muy importante para conocer su peligro potencial de contaminación de acuíferos o aguas superficiales. La figura 1.4 muestra los distintos fenómenos de transporte y distribución de los plaguicidas en el medio ambiente.

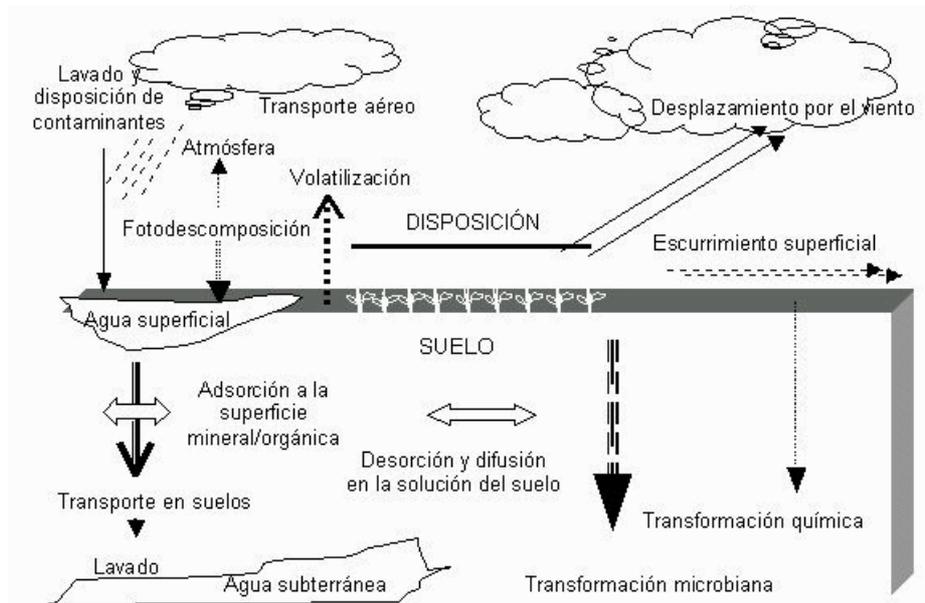


Figura 1.4. Transporte y distribución de plaguicidas en el medio ambiente.

Los factores que condicionan de forma directa el destino de los plaguicidas son, en orden de prioridad [Oliveira 2005]:

- Tipo de suelo: influye sobre el equilibrio de absorción de los plaguicidas, debido a que los complejos de arcilla y materia orgánica presentan propiedades coloidales y de intercambio iónico. La adsorción de plaguicidas puede ocurrir por atracción dipolar, por puentes de hidrógeno o directamente por un enlace iónico.
- Naturaleza del plaguicida: su estructura química influye en su solubilidad en agua y en su afinidad por el suelo. La formulación del plaguicida también es un factor importante a tener en cuenta para evaluar su persistencia en el suelo, ya que las de tipo granular y emulsificables son más persistentes que los polvos humectantes.
- Contenido de humedad: en suelos de tipo arenoso es más probable que un plaguicida se adsorba cuando los suelos estén secos, que cuando estén húmedos.
- pH: la adsorción es más alta en suelos ácidos, ya que el plaguicida puede convertirse en un catión cargado positivamente y así incrementar su adsorción. También se pueden producir fenómenos de degradación del pesticida en pH extremos.
- Temperatura del suelo: la adsorción de plaguicidas es un proceso exotérmico, por lo que al incrementar la temperatura, el calor interno puede romper los enlaces y causar la desorción de moléculas de plaguicidas.

El destino de los pesticidas en suelos está controlado por fenómenos tanto fisicoquímicos como biológicos, que se pueden agrupar en: aquellos que afectan a su persistencia (degradaciones) y aquellos que afectan a su movilidad (adsorción, volatilización, absorción por plantas, erosión del viento o filtración) [Sparks 2003]. La degradación de los pesticidas se produce tanto por procesos biológicos a través de microorganismos, como por procesos químicos de fotólisis, hidrólisis, oxidación y reducción [Bavcon 2003, Kodaka 2003].

Los métodos de análisis de contaminantes en suelos son muy variados, siendo el proceso de extracción la etapa más importante a optimizar. Las distintas técnicas de extracción se basan en diferentes propiedades físicas, como muestra la tabla 1.1 [Zuloaga 2000].

Tabla 1.1. Técnicas de extracción de contaminantes orgánicos de suelos clasificadas por la propiedad física que rige el proceso.

Técnica	Propiedad física	Analitos
Espacio de cabeza	Constante de Henry	Escasa tendencia a ser adsorbidos, baja solubilidad en agua y elevada presión de vapor
Purga y trampa	Presión de vapor	Escasa tendencia a ser adsorbidos, baja solubilidad en agua y elevada presión de vapor
Desorción térmica	Temperatura de ebullición	Estabilidad térmica y temperatura de ebullición media o alta
Extracción sólido-líquido	Coefficiente de distribución	Resto de analitos

En las metodologías tradicionales, como Soxhlet o ultrasonidos, la extracción sólido-líquido emplea grandes volúmenes de disolventes y largos tiempos de calentamiento o agitación para asegurar la extracción cuantitativa del analito del suelo. Sin embargo hoy en día se han desarrollado nuevos procedimientos más eficientes, en los que se consigue la recuperación total del analito en menor tiempo y con un consumo mucho menor de disolventes. La tabla 1.2 muestra diversos métodos de la EPA para la extracción de contaminantes orgánicos de suelos contaminados.

Tabla 1.2. Métodos EPA para la extracción de contaminantes de suelos, lodos y basuras [Dean 1998].

Método EPA	Técnica de extracción	Analitos
3540	Soxhlet	Semivolátiles y no volátiles
3541	Soxhlet	PCBs, OCPs y semivolátiles
3545	Fluidos presurizados	Semivolátiles y no volátiles
3550	Ultrasonidos	Semivolátiles y no volátiles
3560	Fluidos supercríticos	Hidrocarburos y derivados del petróleo
3561	Fluidos supercríticos	PAHs

2.2. - Alimentos

El uso intensivo de plaguicidas en la producción de alimentos deja inevitablemente residuos, por lo que habrá que mantener normas estrictas para garantizar la seguridad del consumidor y de esta forma evitar los problemas asociados que a largo plazo, tienen las dosis moderadas de residuos de pesticidas. Desde 1962 la OMS a través de la FAO ha estado marcando los LMR de pesticidas en alimentos, con el fin de fomentar que los plaguicidas no se usen en exceso y que los niveles de residuos sean seguros para el consumo humano. En la actualidad se han aprobado más de 2500 LMRs que abarcan 195 plaguicidas, aunque no existen normas generales para todos los cultivos o para todos los plaguicidas [Pesticide Action Network]. Descubrir residuos de plaguicidas en un alimento no siempre entraña riesgo toxicológico, simplemente indica que han sido empleados en algún momento de su producción, o que son contaminantes ubicuos de aguas, tierras o aire, y en consecuencia, de plantas y animales.

El avance espectacular de las técnicas de análisis en los últimos años permite detectar concentraciones realmente minúsculas de plaguicidas o de sus productos de degradación en los alimentos. Debido a la gran variabilidad de alimentos y de compuestos empleados como plaguicidas, existen multitud de métodos de análisis específicos para cada alimento y para cada pesticida o familia de pesticidas. Según el *Codex Alimentarius* podemos clasificar los alimentos en grupos representativos para la validación de procedimientos de determinación de residuos de plaguicidas. La tabla 1.3 muestra esta clasificación para productos vegetales y animales.

Tabla 1.3. Agrupación de productos vegetales y animales, para el desarrollo de métodos de análisis de residuos de pesticidas.

Origen	Grupo	Elevado contenido en	Clase de productos	Ejemplo
Vegetales	I	Agua y clorofila	Hortalizas de hoja Leguminosas	Espinaca, lechuga, col, alubias
	II	Agua (escaso en clorofila)	Frutas Bayas Raíces Hortalizas de fruto	Manzana, uva, tomate, fresa, melocotón, melón, pimiento, patata, perejil, zanahoria,
	III	Ácidos	Frutos cítricos	Naranja, limón
	IV	Azúcar		Uvas pasas, dátiles
	V	Aceite o grasa	Semillas oleaginosas Nueces	Olivas, semillas girasol, aguacate, pistachos
	VI	(Materiales secos)	Cereales	Trigo, arroz, maíz, harinas
	-	Productos que requieren una prueba individual		Lúpulo, té, especias, ajo, arándanos
Animales			Carnes Despojos comestibles Grasa Leche Huevos	

2.3. - Dispositivos de membrana semipermeable (SPMDs)

La determinación directa de contaminantes hidrofóbicos orgánicos en agua presenta muchas limitaciones, debido fundamentalmente al elevado volumen de agua que es necesario procesar para la determinación de estos contaminantes a niveles de concentración tan extremadamente bajos. Multitud de estudios medioambientales demuestran que algunos organismos acuáticos tienden a acumular residuos de estos contaminantes en sus tejidos grasos a niveles de ng/g, incluso de µg/g. La absorción de contaminantes orgánicos por estos organismos se produce a través de dos vías: una activa debida a la ingesta de comida y otra pasiva por absorción a través de las membranas del organismo, como la piel o las branquias [Gobas 1992]. Los organismos acuáticos empleados como muestreadores pasivos son algunos peces y sobretodo moluscos bivalvos. Este proceso de bioacumulación induce a que se alcancen concentraciones muy elevadas de contaminantes en estos organismos, a pesar que su concentración en agua esté muy por debajo de su límite de detección. Además solo absorben la fracción del contaminante que esté biodisponible. La estimación de la contaminación de aguas a través de la determinación de contaminantes en tejidos de organismos acuáticos presenta multitud de problemas, generalmente asociados

a la heterogeneidad que existe entre individuos de la misma especie y a la posibilidad de que el organismo metabolice los contaminantes [Huckins 2002].

En 1990, Huckins et al. diseñaron dispositivos de membrana semipermeable (SPMDs - semipermeable membrane devices), con el fin de simular estos procesos de bioconcentración y actuar como muestreadores pasivos de la fracción biodisponible de contaminantes en las aguas. Al tratarse de un material sintético, podemos asegurar su homogeneidad y la reproducibilidad en los resultados, reduciendo la variabilidad debida a factores intrínsecos de los organismos acuáticos [Huckins 1990a].

En la actualidad se emplean estos dispositivos para el muestreo pasivo de gran variedad de contaminantes orgánicos; de todos ellos los compuestos más frecuentemente analizados son: PAHs [Gilli 2005, Miège 2005], PCBs [Voie 2002, Šetková 2005], OCPs [Lu 2003], dioxinas [Rantalainen 1998] y furanos [Lebo 1995] tanto en ríos, lagos y acequias, como en el agua de mar. Los SPMDs también son capaces de absorber contaminantes desde el aire, por ejemplo se han determinado PCBs [Petty 1993] y PAHs [Rantalainen 1999] en aire de interior empleando SPMD como muestreadores.

2.3.1. - Características de un SPMD.

Los SPMDs están formados por tubos planos de polietileno de baja densidad de 2.54 cm de ancho por 92 cm de largo, rellenos de 1 mL de un material lipofílico, generalmente trioleína (triglicérido formado por tres ácidos oleicos y glicerol). La baja tensión interfacial existente entre la trioleína y el polietileno permite un contacto íntimo entre ambos, consiguiendo una capa de lípido a lo largo de todo el interior de la membrana. La figura 1.5 muestra una fotografía de un SPMD y un esquema de su sección transversal donde se observa que la trioleína queda retenida en el interior del SPMD, mientras que los distintos contaminantes se difunden por los poros de la membrana de polietileno [Huckins 2004].

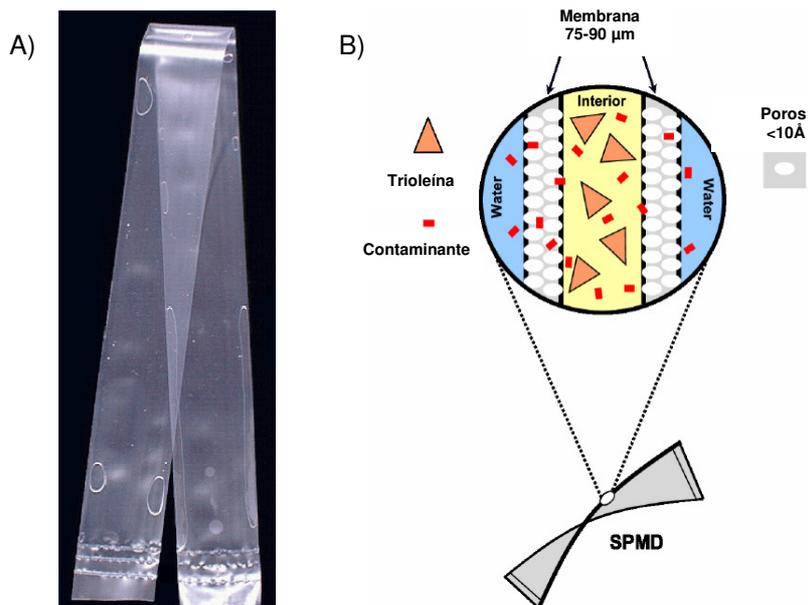


Figura 1.5. Fotografía de un SPMD (A) y esquema del interior de un SPMD por capas (B).

La membrana de polietileno tiene poros de transición de 10 Å de diámetro, presentando características similares a las limitaciones de tamaño que presentan las membranas biológicas, estimado en 9.8 Å. Este diámetro de poro permite el paso de compuestos hidrofóbicos de peso molecular pequeño o con un máximo de 600 g/mol. [Huckins 1990a, Huckins 2002]. Los compuestos adsorbidos, tanto a partículas sólidas (arcillas) como a materia orgánica (ácidos húmicos y fúlvicos), no serán retenidos en los SPMD, debido a su gran tamaño, por lo que solo se absorbe la fracción de contaminantes que esté realmente disuelta en el agua [Huckins 1993].

La elección de trioleína como relleno es debida a que es el mayor lípido no polar encontrado en organismos acuáticos y además existe una estrecha relación entre el coeficiente trioleína-agua (K_{TW}) y el coeficiente octanol-agua (K_{OW}), que es un parámetro físico fácil de encontrar en la literatura para multitud de compuestos. La trioleína presenta una gran capacidad de retención de compuestos con

$\log K_{OW} > 3$, aunque puede ser capaz de concentrar compuestos con $\log K_{OW} > 1$. Los compuestos iónicos no serán retenidos por estos dispositivos debido a la elevada resistencia a la difusión que ejerce la membrana apolar y a la baja solubilidad de estos compuestos en trioleína [Huckins 1996]. El contenido lipídico en los SPMDs es mucho mayor que en los organismos acuáticos empleados para biomonitorio, por lo que los SPMDs presentarán una mayor capacidad de absorción de contaminantes orgánicos [Huckins 2002]. Algunos autores postulan que la membrana de polietileno por sí sola, sin la presencia de trioleína, es capaz de concentrar contaminantes lipofílicos, como muestra un estudio comparativo realizado con membranas rellenas de trioleína y sin rellenar, que proporcionaban una absorción similar para compuestos con $\log K_{OW} > 6$ [Booij 1998].

2.3.2. - Variables que afectan a la absorción de contaminantes en SPMDs

La velocidad de transferencia de contaminantes desde agua/aire hacia el SPMD está gobernada por una cinética de primer orden. El SPMD absorbe los contaminantes hasta alcanzar el estado estacionario, que puede lograrse en horas, días e incluso años, según el compuesto a absorber y a las condiciones experimentales. En la mayoría de estudios realizados tanto en aire como en agua, el tiempo de exposición de los SPMD es de 20 a 30 días, por lo que en general nunca se alcanza el equilibrio [Prest 1992].

Cuando se despliegan los SPMDs en aguas naturales se produce sobre la superficie de la membrana una ligera o intensa colonización de microbios, algas y macroinvertebrados, llamada "biofouling". Esta capa de biofouling, que no tiene por qué ser uniforme a lo largo de la membrana, dificulta la difusión a través de la membrana de polietileno, lo que disminuye la velocidad de absorción de los compuestos orgánicos. Este efecto negativo en la absorción de compuestos se puede evitar añadiendo un biocida, o rociando la superficie del SPMD, o bien en el interior disuelto en la trioleína [Rantalainen 2000].

La velocidad y turbulencia de la corriente de agua también afecta a la velocidad de absorción de contaminantes; en el caso de flujos muy elevados, se reduce el espesor de la capa de agua de difusión que rodea a la membrana de polietileno, disminuyendo la resistencia a la transferencia de masa del compuesto del agua al SPMD y aumentando la velocidad de absorción. Por ejemplo, la rapidez en la absorción de PCBs y PAHs aumenta hasta 4 veces al aumentar la velocidad del agua de 1 a 30 cm/s [Booij 1998]. Sin embargo, al aumentarla de 0.004 a 0.2 cm/s, solo se consigue un aumento del 50% de la velocidad de absorción de los mismos compuestos [Huckins 2002]. Esta dependencia tan grande con la velocidad de flujo del agua, se puede reducir en las experiencias de campo, introduciendo los SPMD en soportes de muestreo especiales, como el mostrado en la figura 1.6. El empleo de estos aparatos de muestreo, fabricados expresamente para tal fin, permite introducir hasta 5 SPMDs, colocando cada uno de ellos en un disco independiente y tensado por unos muelles para evitar el contacto entre ellos.

La temperatura es otro de los parámetros que afecta a la absorción de los contaminantes, debido a que modifica su difusividad a través del SPMD, proporcionando a mayores temperaturas una velocidad de absorción mayor [Kot 2000]. A pesar de ello, esta dependencia con la temperatura no es tan fácil de predecir en SPMDs afectados intensamente por biofouling [Huckins 2002].



Figura 1.6. Soporte para desplegar los SPMDs en estudios de campo.

2.3.3. - Métodos de análisis de SPMD

El método de determinación de contaminantes en SPMDs, considerado estándar y empleado en multitud de estudios, consta de las siguientes etapas: [Huckins 2002].

- Limpieza exterior de la membrana: primero se realiza una limpieza mecánica para eliminar tanto el barro como las algas que se hayan adherido a la membrana. Después se realiza una limpieza con abundante agua corriente, comprobando que no haya agujeros o desperfectos en la membrana y se lava con HCl 1 M durante 30 segundos para eliminar sales minerales adheridas a la membrana. Finalmente se eliminan los restos de ácido con agua destilada y se seca suavemente con papel.
- Extracción: los compuestos retenidos en los SPMDs se extraen a través de una diálisis con grandes cantidades de disolvente orgánico, generalmente hexano, durante dos días consecutivos.
- Limpieza del extracto: esta etapa está muy relacionada con el tipo de analito que queramos determinar, generalmente se emplea cromatografía de permeación en gel, aunque también se puede

realizar un fraccionamiento de los compuestos de la matriz, empleando fases sólidas como C₁₈, florisil, alúmina o sílice.

- Cuantificación del analito: generalmente se realiza a través de técnicas cromatográficas.

En los últimos años, se han ido desarrollando modificaciones de esta metodología general, encaminadas fundamentalmente a la reducción del tiempo de análisis. Para ello se han estudiados distintas alternativas al proceso de diálisis como son: la extracción por fluidos presurizados de PAHs [Wenzel 2004], la extracción asistida por microondas de OCPs, PCBs y PAHs [Yusà 2005a] y éteres policromados y policloronaftalenos [Yusà 2006b], incluso la sonicación de SPMDs seccionados en trozos pequeños para extraer PCBs, OCPs y retardantes de llama bromados [Šetková 2005].

Finalmente, en el empleo de SPMD como muestreadores pasivos es necesario un estricto control de calidad, para considerar las posibles contaminaciones tanto sea en la etapa de fabricación de SPMDs, muestreo, transporte y almacenamiento, como en el posterior análisis químico.

2.3.4. - Ventajas en el empleo de SPMDs frente a indicadores biológicos

El empleo de SPMDs presenta numerosas ventajas respecto al monitoreo en organismos acuáticos para la estimación de la concentración biodisponible de contaminantes en aguas, como por ejemplo:

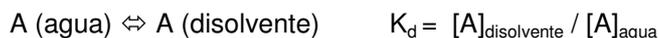
- Los organismos acuáticos pueden metabolizar y depurar los contaminantes acumulados en él [Prest 1992].
- La absorción en las membranas de las branquias de los peces puede verse modificada debido al stress [Gale 1997].
- La absorción de contaminantes puede modificarse dependiendo de factores anatómicos, fisiológicos y de comportamiento, por ejemplo: sexo, porcentaje de grasa, composición lipídica, hábitos de alimentación o ritmo de respiración [Hofelt 1997].

- Además los organismos pueden tener algún tipo de limitación geográfica o pueden no sobrevivir en ambientes demasiado tóxicos [Hofelt 1997].

3. - Métodos de extracción para muestras líquidas

3.1. - Extracción líquido-líquido

Se basa en la distinta distribución de los componentes de la muestra entre dos disolventes inmiscibles, donde matriz y analito tienen diferente solubilidad en cada uno de ellos. Cuando se alcanza el equilibrio, la concentración de analito en cada disolvente viene determinada por el coeficiente de distribución.



Valores elevados del coeficiente de distribución permiten una extracción con disolventes cuantitativa del analito presente en agua. Habitualmente, se suelen realizar entre dos y tres extracciones consecutivas para asegurar una extracción cuantitativa del analito. El equilibrio químico que rige el proceso de partición de un analito entre dos disolventes, puede modificarse de varios modos: modificando el pH, formando pares iónicos, formando complejos con iones metálicos o añadiendo sales neutras a la fase acuosa para reducir la solubilidad del analito.

Las ventajas que presenta esta metodología son:

- El amplio rango de disolventes distintos y mezclas de ellos que pueden ser empleados, permite una gran versatilidad a esta técnica.
- Es un método muy simple que no requiere el uso ni de instrumentaciones complejas, ni de consumibles costosos, a excepción de los disolventes empleados.

Entre los principales inconvenientes que presenta la extracción líquido-líquido, citaremos:

- El empleo de grandes volúmenes de disolvente requiere una posterior evaporación de los mismos para concentrar los extractos, lo que añade una etapa más al proceso analítico y que a menudo es

bastante costosa en tiempo. Además se requiere el uso de disolventes de elevada pureza para evitar contaminaciones.

- En muestras que contienen surfactantes o grasas, se producen emulsiones en ocasiones difíciles de romper. Por lo que a veces es necesario, centrifugar, filtrar a través de lana de vidrio, enfriar, añadir sales o añadir pequeñas cantidades de otros disolventes.
- La capacidad de extracción puede verse modificada dependiendo del tipo de muestra, por lo que existe una gran variabilidad.

3. 2. - Extracción en fase sólida

Este tipo de extracción consiste en poner en contacto una muestra gaseosa o líquida con una fase sólida, donde el analito es adsorbido selectivamente sobre la superficie del sólido [Moors 1994]. Este sorbente sólido debe retener preferentemente el analito antes que a otros constituyentes de la muestra y normalmente se suelen realizar varias eluciones con distintos disolventes o mezcla de ellos para ir eluyendo selectivamente matriz y analito. Para un manejo más simple, lo más común es empaquetar el sólido extractante en pequeños tubos o cartuchos y hacer pasar el líquido a través de estos.

La extracción en fase sólida consta principalmente de cuatro etapas: acondicionamiento del soporte, adsorción de la muestra, lavado de interferentes y finalmente elución del analito de interés. La figura 1.7 muestra un esquema del procedimiento estándar a seguir.

El proceso de separación analito-muestra puede basarse en tres fenómenos distintos:

- Fase reversa: el objetivo es separar compuestos no polares desde una muestra de elevada polaridad, por ejemplo agua. Para este tipo de aplicaciones se requieren soportes sólidos relativamente hidrofóbicos, siendo eluidos con una pequeña cantidad de disolvente orgánico.

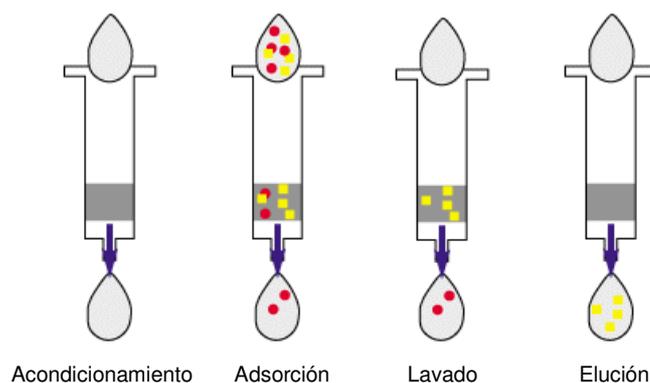


Figura 1.7. Esquema de los cuatro pasos en extracción en fase sólida.

- Fase normal: en esta técnica se quiere aislar compuestos polares de muestras no polares, como por ejemplo aceites, por lo que se emplearán soportes polares para extraer el analito y eluirlo con un disolvente polar.
- Intercambio iónico: para extraer compuestos iónicos o que puedan ionizarse con un cambio en el pH. Emplean soportes con grupos intercambiadores de cationes o aniones, dependiendo del analito a retener y se eluye con disolventes orgánicos.

Los principales parámetros a elegir en este tipo de extracciones son:

- preacondicionamiento del soporte sólido
- el tipo de fase sólida
- modo de introducción de la muestra
- disolvente para eliminar matriz
- disolvente de elución del analito

Para la extracción en fase sólida se pueden emplear un gran número de soportes sólidos. Los más comunes están formados por partículas de sílice porosa unidas a una fase orgánica, pero también existen otros formadas por resinas poliméricas de composición muy variada, o incluso rellenas de otros materiales

como, carbón activo o carbón grafitizado. Las fases sólidas compuestas de sílice unida a una fase orgánica, son las más usadas debido a su gran versatilidad, hoy en día existen disponibles comercialmente un gran número de ellas. La tabla 1.4 muestra los soportes de sílice más usados, por orden creciente de polaridad [Fritz 1999].

Tabla 1.4. Fases orgánicas, ligadas a partículas de sílice, habitualmente empleadas en SPE.

Fase orgánica ligada	Polaridad	Nombre común
Octadecil	Muy apolar	C ₁₈
Octil	Apolar	C ₈
Étil	Ligeramente polar	C ₂
Ciclohexil	Ligeramente polar	CH
Fenil	Ligeramente polar	PH
Ciano propil	Polar	CN
Diol	Polar	2OH
-	Polar	SiOH
Carboximetil	Intercambiador catiónico débil	CBA
Aminopropil	Intercambiador aniónico débil	NH ₂
Ácido propil benceno sulfónico	Intercambiador catiónico fuerte	SCX
Trimetil amino propil	Intercambiador aniónico fuerte	SAX

De todas ellas, la C₁₈ es la más usada, empleada casi rutinariamente para cualquier extracción de compuestos apolares de muestras polares, como por ejemplo: pesticidas organofosforados en aguas [Ballesteros 2004] o antibióticos en orina [Tuerk 2006]. La unión fase orgánica-sílice es químicamente estable en presencia de la mayoría de disolventes orgánicos, aunque se puede producir algún fenómeno de hidrólisis a pH superior a 8.

El empleo de soportes basados en polímeros orgánicos, además de ser estables en todo el rango de pHs, presentan una mejor eficiencia a la hora de extraer compuestos orgánicos, debido a su mayor área superficial. La tabla 1.5 muestra una lista de los adsorbentes poliméricos más usados hoy en día [Fritz 1999].

Tabla 1.5. Sorbentes poliméricos empleados en SPE.

Distribuidor	Nombre	Tipo
Hamilton	PRP	PS-DVB
Interaction	MP-1	PS-DVB + C ₁₈
	MP-2	Polivinil piridina
	MP-DVB	PS-DVB
Lab. Instruments	Ostion SP-1	PS-DVB
	Synachrom	PS-DVB-EVB
	Spheron MD	Metacrilato-DVB
	PLRS-S	PS-DVB
Polymer Labs. Supelco	XAD-2	PS-DVB
	DAX-8	Polimetacrilato
	CG	PS-DVB
	Tenax CG	Poli(2,6-difenil-p-fenilenóxido)
	Oasis	Poli-DVB-vinilpirrolidona
Waters	Oasis	Poli-DVB-vinilpirrolidona

PS, poliestireno; DVB, divinilbenceno; EVB, etilvinilbenceno.

Finalmente comentaremos el empleo de materiales carbonosos como fase sólida. Desde la década de los setenta se llevan empleando sorbentes de carbón activo, aunque hoy en día presentan mejores resultados los de carbón grafitizado. Entre sus propiedades cabe destacar su elevada área superficial y una fuerte adsorción de compuestos. Aunque a menudo presentan eluciones lentas o incluso no cuantitativas.

Una vez elegido el tipo de fase sólida, uno de los parámetros más importantes a seleccionar es el disolvente a emplear. La polaridad del disolvente determina la capacidad de eluir el analito del sorbente en el menor volumen posible. La figura 1.8 muestra la capacidad de elución de cada disolvente según se emplee en fase normal o reversa.

La extracción en fase sólida presenta las siguientes ventajas respecto a la extracción líquido-líquido:

- Rápida, de manipulación simple y permite una fácil automatización.
- Emplea cantidades mucho menores de disolventes orgánicos, reduciendo costes y evitando la posterior evaporación de grandes volúmenes de disolvente.

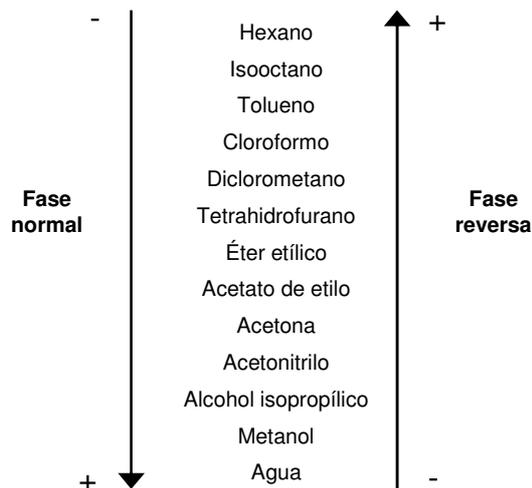


Figura 1.8. Comparación de la capacidad de elución de distintos disolventes para su empleo en fase normal o reversa.

- Presenta una mayor versatilidad, ya que solo es necesaria una diferencia razonable en la extractabilidad para separar dos solutos.
- Normalmente el volumen de disolvente empleado para la extracción cuantitativa del analito suele ser mucho menor que el volumen original de la muestra, pudiéndose alcanzar factores de preconcentración mayores de 1000.

La única desventaja que presenta este tipo de extracción es que en ocasiones presenta problemas de obstrucción en líquidos muy viscosos, aunque siempre se puede reducir la viscosidad disolviendo la muestra con algún disolvente.

3. 3. - Microextracción en fase sólida

Este método de extracción llamado SPME (solid-phase microextraction), consiste en una primera etapa de adsorción del analito sobre la superficie de una fibra de sílice entrelazada, seguida de una segunda etapa de desorción térmica del analito en el interior de un instrumento de separación y cuantificación, generalmente un cromatógrafo de gases. La elección de un soporte sólido

adecuado es uno de los parámetros más importantes a establecer, ya que debe adsorber fuertemente al analito del medio donde se encuentre, sea este tanto líquido como gaseoso.

Las fases estacionarias de sílice fundida cubierta de poli(dimetilsiloxano) son probablemente las más utilizadas en este tipo de extracciones. Debido a su carácter apolar se emplea en la extracción de una gran variedad de compuestos hidrofóbicos, como por ejemplo: extracción de la fracción BTEX (benceno, tolueno, etil benceno y xilenos) de aire y agua [Eisert 1996]. Para la extracción de compuestos polares y algunos no polares, se han desarrollado fibras de sílice recubiertas de poliacrilato, empleadas en la extracción de fenoles de aguas residuales [Buchholz 1994].

Debido a la gran estabilidad térmica, la geometría cilíndrica y el pequeño diámetro de estos soportes de sílice, se puede colocar dentro de la cubierta de una jeringa, como se muestra en la figura 1.9 y poder realizar la desorción térmica directamente en el inyector de un cromatógrafo de gases convencional.

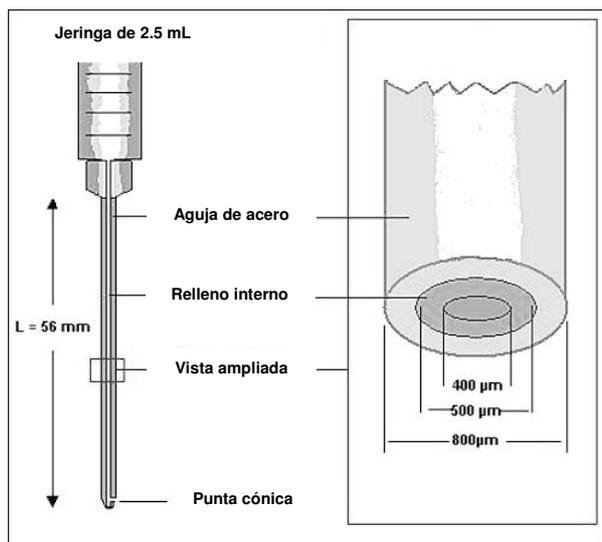


Figura 1.9. Esquema de una jeringa con relleno para su empleo en SPME.

Además de permitir introducir la fibra a través del septum del inyector, la cubierta evita posibles contaminaciones y pérdidas de analito durante el tiempo entre adsorción de la muestra y desorción térmica en el cromatógrafo de gases. A pesar de ello, el tiempo que transcurre entre los fenómenos de adsorción y desorción debe ser el menor posible. Para minimizar este tiempo, suelen emplearse inyectores automáticos modificados, que permiten una extracción automática mediante SPME y la posterior inyección cromatográfica en un tiempo de segundos.

Para incrementar la adsorción del analito en la fibra y además conseguirlo en un menor tiempo, se puede calentar la muestra durante la adsorción del analito en la fibra. Con este fin se han desarrollado accesorios que combinan la SPME con muestreadores de espacio de cabeza. La muestra se introduce en el muestreador en un vial cerrado y se calienta a una determinada temperatura, por lo que aumenta la concentración de compuestos volátiles en la fase gaseosa, muestreando directamente en esta fase gaseosa rica en analito. A modo de ejemplo, este tipo de extracción también se puede emplear para la determinación de la fracción BTEX en aguas, con un tiempo de adsorción de tan solo un minuto [Zhang 1993].

Finalmente indicar que en determinaciones por HPLC se pueden acoplar interfases en las que se produce la desorción del analito utilizando fase móvil. Este sistema se ha empleado para la extracción y posterior determinación de PAHs en muestras de agua por HPLC, desorbiendo los compuestos con acetonitrilo-agua (80/20 v/v) [Chen 1995].

4. - Métodos de extracción para muestras sólidas

4.1. - Extracción líquido-sólido

El empleo directo de disolventes para la extracción de analitos de muestras medioambientales es uno de los métodos de extracción más antiguos y usados en química analítica [Dean 1998]. Podemos clasificar estos métodos en dos grupos: aquellos que necesitan un aporte de calor (Soxhlet) y aquellos que no necesitan calor, pero necesitan algún tipo de agitación (agitación o sonicación).

4.1.1. - Agitación

Es la extracción más simple, que consiste en introducir muestra y disolvente en un recipiente adecuado y agitar durante un determinado tiempo. Existe una gran variedad de agitadores comerciales, que permiten distintas formas de agitación circular, como el agitador vortex. Por lo general después de esta agitación se necesita separar la muestra del disolvente a través de una etapa de filtración o centrifugación, dependiendo de la muestra se puede conseguir la separación del extracto insoluble por una simple decantación.

Una modalidad en este tipo de extracción es la extracción por ultrasonidos o sonicación, que emplea ondas sonoras para producir la agitación de la muestra en el disolvente. Para ello, se puede emplear tanto una sonda como un baño generador de ultrasonidos, repitiendo el proceso dos o tres veces más.

4.1.2. - Soxhlet

La extracción Soxhlet fue introducida a mitades del siglo XIX y desde entonces siempre se ha considerado como método de referencia para asegurar la eficiencia de extracción de cualquier nueva metodología. Para su funcionamiento la muestra se introduce en un cartucho poroso de celulosa, que actúa como filtro, acompañada de la misma cantidad de sulfato sódico anhidro. Este cartucho se coloca en el interior del tubo Soxhlet, como indica la figura 1.10, en el matraz de fondo redondo se introduce el disolvente orgánico, que al aplicar calor se evapora,

llegando al refrigerante por el tubo A y destilando encima del cartucho que contiene la muestra. El disolvente va llenando lentamente el compartimiento de la muestra hasta llegar al nivel del tubo B, que por efecto sifón arrastra todo el extracto de la muestra de vuelta al matraz. Este ciclo se repite varias veces, obteniéndose siempre una extracción de la muestra con disolvente puro. Esta técnica requiere largos tiempos de extracción entre 3 y 48 horas.

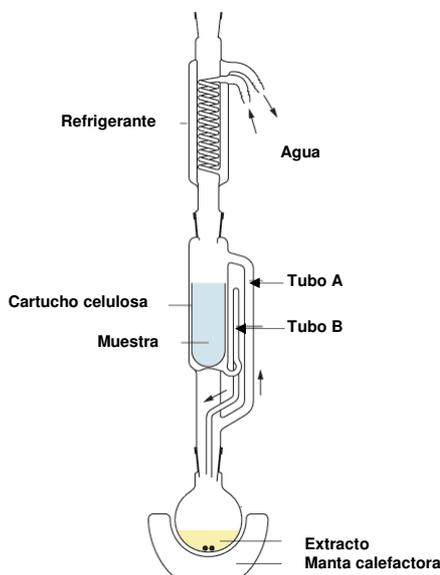


Figura 1.10. Esquema de un extractor Soxhlet.

4.1.3. – Diálisis

En una diálisis se extrae el analito de la muestra empleando grandes cantidades de disolvente orgánico sin ningún tipo de agitación o calentamiento. Estos procedimientos sólo se emplean en aplicaciones muy concretas, como es la extracción de contaminantes orgánicos de SPMDs. En este caso, debido a la existencia de poros en la membrana de polietileno, los analitos van difundiendo a través de esta membrana al exterior hasta alcanzar el equilibrio. Es necesario un elevado tiempo de extracción para asegurar que se ha alcanzado el equilibrio, o al menos un elevado porcentaje de analito se haya extraído al disolvente orgánico. Esta metodología está considerada como de referencia para la extracción de contaminantes de SPMDs [Huckins 2002]. La tabla 1.6 muestra las distintas

alternativas empleadas para la extracción de distintos contaminantes de SPMDs instalado tanto en agua como en aire [Yusá 2005a]. Como se observa en dicha tabla, todas ellas emplean grandes cantidades de disolvente orgánico, generalmente hexano, y elevados tiempos de extracción.

Tabla 1.6. Procedimientos de extracción de distintos compuestos de SPMDs basados en diálisis.

Muestra	Compuestos	Disolvente empleado	Tiempo (horas)
Agua de río	OCPs, PCBs, PAHs, PCDDs	250 mL hexano	48
Agua	PAHs	150 mL hexano	48
Aire	PCBs	250 mL hexano	48
Agua	OCPs, PCBs, PAHs	360 mL	24
Agua de río	OCPs	250 mL hexano	48
Pantano	PCDDs, PCDFs	900 mL hexano	48
Agua de río	PCBs, OCPs	250 mL hexano	48
Agua de río	PAHs	Ciclopentano	24
Agua de río	PAHs	Hexano	48
Acequia	PAHs	250 mL hexano	48
Agua de río	PCDDs, PCDFs, PCBs	400 mL hexano	48
Agua de río	OCPs, PCBs, PAHs	250 mL hexano	48
Agua de río	PCBs, PAHs	100 mL ciclohexano	48
Agua de río	PAHs	150 mL hexano	48
Agua de río	PAHs, OCPs, PCBs	250 mL hexano	48
Agua de río	PAHs, OCPs, PCBs	750 mL hexano	72
Aire / Agua de mar	PCBs	120 mL hexano:diclorometano 80:20	48
Aguas residuales	PCBs, PAHs, OCPs	100 mL ciclohexano	48
Aire	PAHs	300 mL hexano	48
Agua de río	PCBs, OCPs	160 mL hexano	48

4.2. - Extracción con fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es una sustancia que se encuentra por encima de su punto crítico (temperatura crítica y presión crítica), obteniendo un fluido que presenta propiedades intermedias entre líquidos y gases. La extracción con fluidos supercríticos (SFE, supercritical fluid extraction) aprovecha las excelentes características que presentan estos fluidos supercríticos para extraer un analito de un sólido, como son: su poder de solvatación, su mínima tensión superficial, su alta difusividad y su baja viscosidad [Dean 2003]. Generalmente se suele emplear como fluido supercrítico dióxido de carbono ($T_C = 31 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_C = 59 \text{ atm}$), pero también se pueden utilizar otros gases como: etano ($T_C = 32 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_C = 50 \text{ atm}$) óxido nitroso ($T_C = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_C = 73 \text{ atm}$) o amoníaco ($T_C = 132 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_C = 115 \text{ atm}$). Entre las ventajas que presenta el uso de dióxido de carbono destacamos su

relativamente baja temperatura y presión necesaria para obtener condiciones supercríticas, siendo también importante que sea un producto inerte, no tóxico, no corrosivo y no muy caro [Zuloaga 2000]. La naturaleza no polar del dióxido de carbono supercrítico similar al hexano, a veces limita su capacidad extractora, por lo que es común añadir un disolvente orgánico o modificador en pequeñas cantidades, como metanol, acetonitrilo o acetona, para aumentar la polaridad de la mezcla de extracción [Motohashi 2000].

Un equipo de extracción con fluidos supercríticos, como se muestra en la figura 1.11, consta de los siguientes componentes: una fuente de dióxido de carbono y de modificador de alta pureza, una bomba termostatazada para el fluido supercrítico (enfriando para evitar cavitación), una segunda bomba para el modificador, un horno para los reactores, un restrictor de presión y viales para recoger los extractos. El dióxido de carbono se mezcla con el modificador a través de una llave en forma de “T” a alta presión, la mezcla pasa por el reactor que contiene la muestra y que está a una temperatura adecuada, generándose el fluido supercrítico y extrayendo el analito de la muestra durante un determinado tiempo. Tras ello, el extracto se transfiere a los viales

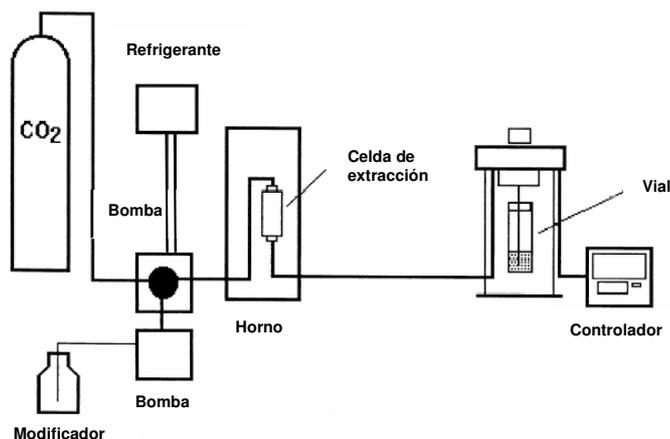


Figura 1.11. Esquema de los componentes de un equipo de SFE.

Algunos ejemplos de extracciones con fluidos supercríticos de pesticidas en distintas muestras son: extracción de 92 pesticidas de manzanas empleando CO₂ a 189 bares y 45 °C, durante 10 minutos [Stefani 1997]; extracción de 117 plaguicidas no polares de aceite de maíz y mantequilla,s empleando CO₂ a 27.58 MPa y 60 °C, durante 5 minutos [Hopper 1999]; extracción de pesticidas organoclorados de ajo con CO₂ a 30.3 MPa y 40 °C, durante 1 minuto [Wang 1998a] o extracción de Dacthal y compuestos derivados de suelos, empleando CO₂ a 400 bares y 150 °C, durante 15 minutos [Field 1998].

4.3. - Extracción asistida por microondas

La extracción asistida por microondas (MAE, microwave-assisted extraction) emplea radiación electromagnética de microondas para desorber el analito de su matriz. De toda el espectro electromagnético, solo se considera radiación de microondas a aquella cuya longitud de onda esté comprendida entre 0.3 mm y 1 m, con frecuencias de 100 GHz a 300 MHz, esto sitúa a éste tipo de radiación entre las ondas de radio y la zona infrarroja. A pesar del amplio rango de frecuencias posibles, los hornos microondas comerciales, tanto domésticos como científicos, solo trabajan a frecuencias de 2450 MHz [Dean 1998].

4.3.1. - Calentamiento por microondas

El principio por el cual se produce calentamiento al emplear energía de microondas puede ser por conducción iónica o por rotación bipolar, produciéndose ambos mecanismos simultáneamente en multitud de ocasiones. La conducción iónica es la migración electroforética de los iones al aplicar un campo electromagnético, este flujo de iones provoca fricción debido a la resistencia que ejerce el disolvente y produce calentamiento. La rotación bipolar es el realineamiento de dipolos con el campo aplicado, así que empleando una frecuencia de microondas de 2450 MHz, se produce un alineamiento de los dipolos de $4.9 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$, siendo este movimiento molecular el que produce el calentamiento. La gran diferencia que presente este tipo de calentamiento con los sistemas convencionales consiste en que el calentamiento se produce en el seno

de la disolución y no por convección desde una fuente externa, produciendo un calentamiento mucho más homogéneo y eficaz.

La capacidad de un disolvente para absorber energía de microondas y comunicarla a otras moléculas presentes en él depende de su factor de disipación. El factor de disipación ($\tan \delta$) de un disolvente es el cociente entre su pérdida dieléctrica (ϵ''), la eficiencia en convertir la energía microondas en calor, y su constante dieléctrica (ϵ'), la polarizabilidad de una molécula en un campo magnético [Sparr Eskilsson 2000]. Las moléculas polares y los ácidos absorben esta energía muy intensamente, debido a que poseen un momento dipolar permanente que es afectado por las microondas, sin embargo disolventes no polares, como el hexano o el tolueno, no se calientan en presencia de microondas. La tabla 1.7 muestra la constante dieléctrica de los disolventes más usados en MAE [MLS].

Tabla 1.7. Constante dieléctrica (ϵ') y temperatura de ebullición de los principales disolventes usados en MAE.

Disolvente	ϵ'	Temp. ebullición (°C)
Agua	80.1	100.0
Acetonitrilo	37.5	81.6
Metanol	32.6	64.6
Etanol	24.3	78.2
Acetona	20.7	56.0
Ciclohexanona	18.3	155.4
Tolueno	2.3	110.6
Hexano	1.9	68.7

Esta extracción se puede realizar a presión elevada o a presión atmosférica, dependiendo si el reactor esté cerrado o abierto. Si se realiza en reactores cerrados, se pueden hacer extracciones a temperaturas superiores a la de ebullición del disolvente empleado, mejorando la eficiencia e incrementando la velocidad de la extracción.

Existen tres mecanismos por los cuales se produce la extracción de un analito de una muestra empleando microondas [Jassie 1997]:

- Mecanismo I: la muestra se sumerge en un disolvente o mezcla de ellos que absorban intensamente la energía de las microondas y produzcan un calentamiento.
- Mecanismo II: la muestra se puede extraer combinando disolventes polares que absorban las microondas y apolares que extraigan el analito. Una alternativa consiste en el uso de barras de polímero fluorado inerte (Carboflon o Weflon) como agitadores magnéticos en el interior del reactor, que además de mejorar la extracción del analito por la agitación interna, absorben la energía de las microondas y transfieren el calor al disolvente.
- Mecanismo III: en aquellas muestras que sean capaces de absorber microondas, sobretodo aquellas con elevado contenido en agua, podemos emplear disolventes transparentes a las microondas para extraer el analito, ya que la propia muestra es la que calentará al disolvente.

4.3.2. - Elección del disolvente

La elección del disolvente más adecuado es esencial para obtener un óptimo proceso de extracción, entre las propiedades físicas del disolvente tenemos que considerar principalmente: su capacidad de absorción de microondas, su interacción con la matriz de la muestra y la solubilidad del analito en él. Interesa que el disolvente posea una gran selectividad y de esta forma extraer la mayor cantidad posible de analito y la menor cantidad de matriz de la muestra. Otro parámetro importante es la compatibilidad del disolvente empleado con la siguiente etapa del proceso analítico, generalmente una etapa de limpieza del extracto, para evitar tediosos procesos de evaporación y/o cambios de disolventes.

Podemos clasificar los disolventes más empleados, para la extracción de compuestos orgánicos, según cual sea su mecanismo de calentamiento. De esta forma en el Mecanismo I, se emplea: agua para la extracción de Atrazina de suelos [Xiong 1998], tetrahidrofurano para extraer pesticidas organoclorados en sedimentos [Silgoner 1998] o tampones acuosos de pH=10 para la extracción de

herbicidas de Imidazolinona de suelos [Stout 1996]. En el Mecanismo II, la mezcla más usada es acetona:hexano (1:1), por ejemplo para la extracción de 95 compuestos semivolátiles orgánicos marcados por la EPA [Lopez-Avila 1995] y fenoles de suelos [Egizabal 1998] o extracción de PAH de partículas atmosféricas [Piñeiro-Iglesias 2000]. Otras mezclas de disolventes empleadas, que producen calentamiento por el Mecanismo II, son: etil acetato-ciclohexano (1:1) para la extracción de organoclorados de pescados [Weichbrodt] o el uso de tolueno que se calienta con una pequeña cantidad de agua (10 %) para la extracción de PCBs, PAHs y organoclorados de sedimentos [Pastor 1997]. En el caso de muestras con elevado contenido en agua (Mecanismo III), existen metodologías que emplean distintos disolventes orgánicos, invisibles a las microondas, para la extracción de aceites esenciales de plantas [Paré 1994].

4.3.3. - Volumen de disolvente

La cantidad de disolvente empleado para la extracción de una muestra está comprendido entre 10 y 30 mL. Este volumen debe ser suficiente para cubrir en su totalidad a la muestra, sobre todo en aquellos casos en los que la muestra pueda hincharse. Lógicamente el volumen de disolvente a emplear vendrá relacionado con la cantidad y volumen de muestra a extraer. En un estudio de la extracción de hidrocarburos en muestras de sedimentos, empleando 1-15 gramos de muestra y entre 10 y 30 mL de disolvente, se llegó a la conclusión de que la relación cantidad de muestra-volumen de disolvente no debería de ser mayor del 30 % [Vázquez Blanco 2000]. Generalmente, en otras técnicas de extracción al aumentar el volumen de disolvente también aumenta la extracción del analito, pero varios estudios demuestran que en MAE el empleo de un exceso de disolvente puede disminuir la extracción de los analitos, por ejemplo en la extracción de: PCBs y PAHs en lodos y sedimentos [Enders 1996, Chee 1996a].

4.3.4. - Temperatura y tiempo de extracción

Es uno de los parámetros más estudiados, no solo en MAE, sino también en cualquier otra técnica de extracción, debido a que a mayor temperatura de trabajo se obtiene una mayor eficiencia en la extracción. Esto es debido a que al

augmentar la temperatura el disolvente tiene mayor capacidad para disolver el analito, además disminuye su tensión superficial y su viscosidad, lo que permite una mayor mojabilidad de la muestra [Sparr Eskilsson 2000].

Las temperaturas de trabajo suelen ser de 100 a 150 °C, obteniéndose recuperaciones elevadas en tiempos muy cortos, pero para ello hay que asegurarse de que el analito a determinar sea estable en estas condiciones de temperatura y presión. Entre el gran número de familias de compuestos orgánicos que son estables, tanto a la radiación de microondas, como a su extracción a alta temperatura se encuentran los contaminantes: LAHs, PAHs, PCBs, fenoles y polibromados entre otros [Yusà 2006a, Lopez-Avila 1998] y pesticidas organoclorados [Lopez-Avila 1994], piretroides [Sanusi 2004], triazinas [Hoogerbrugge 1997], organofosforados [Lopez-Avila 1995], etc. En el caso de compuestos termolábiles, se pueden emplear temperaturas más suaves, como por ejemplo para extraer herbicidas derivados de la sulfonilurea en suelos se emplean temperaturas inferiores a 70 °C [Font 1998] o para extraer aminoácidos en alimentos se emplean temperaturas entre 40 y 80 °C [Kovács 1998]. Para la extracción de compuestos de polímeros, establecer la temperatura de extracción es aún más importante, ya que a temperaturas elevadas se favorece la permeabilidad del polímero al disolvente, mejorando considerablemente la eficiencia en la extracción [Marcato 2000], pero el uso de temperaturas demasiado altas puede provocar una excesiva extracción de matriz o incluso la fusión total o colapso del polímero.

Los tiempos de extracción empleados en MAE son significativamente más cortos que empleando técnicas convencionales. En general se consiguen recuperaciones cuantitativas en tiempos cercanos a los 10 minutos, aunque existen estudios que en tan solo 3 minutos consiguen extraer pesticidas en suelos y sedimentos [Lopez-Avila 1994, Chee 1996b]. El empleo de tiempos de extracción superiores no mejora la extracción de los analitos, así por ejemplo para la extracción de herbicidas derivados de la sulfonilurea en suelos, se obtienen prácticamente las mismas recuperaciones en 5 que en 30 minutos de extracción

[Font 1998]. El mismo comportamiento se observa en la extracción del fungicida Dimetomorph de suelos, en el que no hay apenas diferencias de recuperación al extraer durante 3 o 45 minutos [Stout 1998]. En la extracción de compuestos termolábiles, un excesivo tiempo de extracción puede provocar la degradación de los analitos [Pylypiw 1997].

4.3.5. - Influencia de otros parámetros en el proceso de extracción

Aunque en menor medida que los parámetros citados anteriormente, la extracción de un analito puede verse modificada por:

- La cantidad de agua o humedad que posea la muestra: ya que el agua absorbe fuertemente la energía de microondas y puede producir un sobrecalentamiento durante la extracción.
- La potencia del magnetrón: según el disolvente que se emplee y sobretodo del número de reactores que extraigamos simultáneamente, necesitaremos aplicar una potencia determinada. Si es insuficiente no se alcanzará la temperatura de extracción y si es muy superior, se produce el llamado efecto “bumping”, que consiste en un calentamiento brusco y no homogéneo en el tiempo, con radiaciones muy energéticas, seguidas de largos tiempos con radiación prácticamente nula [Zuloaga 2000].
- Finalmente, el efecto del pH: la eficiencia en la extracción de determinadas familias de compuestos depende del pH, como por ejemplo al emplear un pH básico aumenta la extracción de herbicidas derivados de la imidazolinona de suelos, aunque también aumenta la extracción de otros componentes de la matriz como ácidos húmicos [Scout 1996].

4.3.6. - Equipos comerciales

Los componentes esenciales de cualquier horno microondas son: un generador de microondas, también llamado magnetrón, una guía de ondas, una cavidad resonante y una fuente de energía. Los reactores en los que se introduce la muestra y se realiza la extracción, ver figura 1.12, están fabricados con

materiales transparentes a las microondas, como por ejemplo Teflón o tetrafluoroetileno. En uno de estos reactores se suele introducir un tubo para medir la presión o una sonda de fibra de vidrio para medir la temperatura, de esta forma se monitorea el proceso y el sistema regula la potencia del magnetrón para obtener la temperatura o presión requerida.

La gran diferencia de precio entre hornos microondas domésticos y específicos de laboratorio para realizar extracciones con disolventes orgánicos, radica en las medidas de seguridad para el operador, ya que evitan fugas de radiación de microondas, explosiones en presencia de disolventes orgánicos, así como permiten una mayor durabilidad del magnetrón [Dean 1998]. Entre las múltiples casas comerciales que fabrican equipos de extracción por microondas, solo CEM (Matthews, EEUU) con su equipo MARS-5 y Milestone (Soriso, Italia) con el Ethos SEL, permiten realizar extracciones asistidas por microondas con disolventes orgánicos, el resto solo se pueden emplear para digestiones con ácidos y por motivos de seguridad, según el fabricante, no es recomendable para realizar extracciones [Erickson 1998].

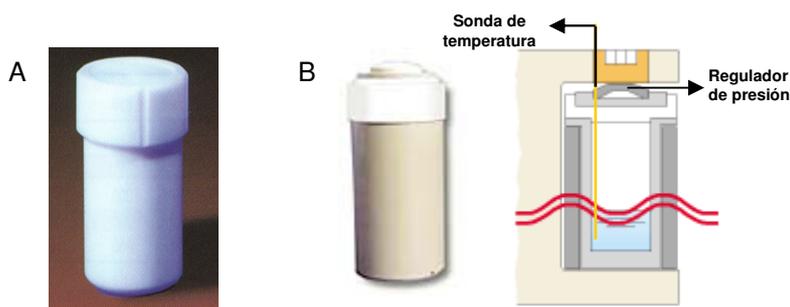


Figura 1.12. Reactores empleados en MAE. (A, en hornos microondas convencionales; B, en hornos de laboratorio)

4.4. - Extracción con fluidos presurizados

En la extracción con fluidos presurizados (PFE, pressurized fluid extraction), también llamada ASE (assisted solvent extraction) los analitos se extraen de la matrices sólidas empleando altas temperaturas (40-200°C) y

presiones elevadas (1000-3000 psi). La mayor eficiencia en la extracción es debida a dos procesos [Dean 2003]:

- Solubilidad y transferencia de masa: el trabajo a temperatura elevada provocan un aumento en la solubilidad del analito en el disolvente, una rápida difusión y una mejor transferencia de masa.
- Interrupción del equilibrio en superficie: las temperaturas elevadas anulan las interacciones soluto-matriz causadas por fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno y atracción bipolar, además disminuyen la viscosidad y la tensión superficial provocando una mayor penetración del disolvente en la matriz. El empleo de presiones elevadas permite el uso de disolventes a temperaturas superiores a su ebullición y permiten también una mayor penetración del disolvente en la muestra.

4.4.1. - Funcionamiento

Un extractor de fluidos presurizados está formado, como muestra la figura 1.13., por un suministro de disolvente, una fuente de nitrógeno, una bomba, una celda de extracción, un horno y un sistema de colección de extractos. Los reactores son de acero y pueden tener varios tamaños, desde 1 a 33 mL. La muestra, liofilizada o mezclada con un agente desecante, debe ocupar todo el espacio interior del reactor, por lo que es común añadir arena de sílice o un agente higroscópico dispersante (Speed Matrix o Hydromatrix, según fabricante) para rellenar el espacio sobrante. En el extremo inferior del reactor se coloca un papel de filtro para evitar el paso de sólidos por las líneas de conducción del extracto y evitar posibles obturaciones.

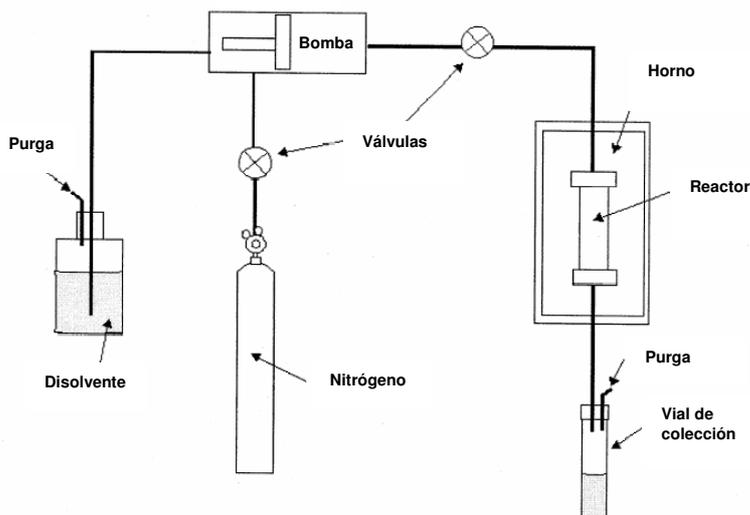


Figura 1.13. Esquema de un sistema típico de extracción con fluidos presurizados.

El sistema funciona de la siguiente forma: la muestra se introduce en el reactor y éste se coloca automáticamente en el interior del horno, a la temperatura de extracción, en posición vertical. Se introduce el disolvente en el reactor, empleando una bomba, por el extremo superior, y se aplica una presión determinada. La muestra se mantiene en estas condiciones un determinado tiempo de extracción, generalmente 5 ó 10 minutos. Este ciclo se suele repetir una o dos veces más, empleando disolvente nuevo, que arrastra el extracto a los viales de colección. Finalmente, se produce el vaciado del reactor y de las líneas de transferencia, empleando una corriente de nitrógeno.

4.4.2. - Principales parámetros en el proceso de extracción

Esta modalidad de extracción es ampliamente utilizada para la extracción de gran variedad de compuestos de muestras sólidas como: PAHs en suelos [Dean 1998], nonilfenol y ésteres de ftalato en sedimentos [Cortazar 2005], PAHs en polvo atmosférico [Yusà 2006c], residuos de bisphenol en alimentos [Pardo 2006], residuos de pesticidas en frutas y vegetales [Adou 2001] o insecticidas organoclorados en pescados [Weichbrodt 2000].

Las variables más importantes a modificar en la optimización de la extracción con fluidos presurizados son las siguientes: temperatura (de 50 a 150 °C), tiempo estático de extracción (5-10 min), volumen de la celda de extracción (de 5 a 11 mL) y presión (entre 1500 y 2000 psi). Los disolventes más empleados en PSE son: acetona, diclorometano, hexano y mezclas de ellos. En este caso, a contrario que en MAE, no existe ninguna limitación en el empleo de ningún disolvente. Otra gran diferencia es la menor dependencia de la eficiencia de extracción con el disolvente a emplear. En un proceso de optimización de extracción de PAHs en suelos contaminados, se estudió el efecto del disolvente sobre la eficiencia en la extracción de estos compuestos, para ello se utilizaron las mismas condiciones de extracción: temperatura de 100°C, presión de 14 MPa, tiempo de extracción 5 minutos y tiempo de equilibración 5 minutos; empleando como disolventes: acetona, diclorometano, metanol, acetonitrilo, hexano y mezclas diclorometano:acetona y hexano:acetona [Saim 1998]. Según este estudio, no se observaron diferencias significativas entre los distintos disolventes empleados, a excepción del hexano, que proporcionó recuperaciones bajas, posiblemente debidas a la baja polaridad de este disolvente. En otro estudio, 19 plaguicidas organofosforados fueron extraídos de alimentos, previamente adicionados, empleando ciclohexano:acetona (1:1) y diclorometano:acetona (1:1), ambos proporcionaron recuperaciones similares, aunque en el caso de la mezcla ciclohexano:acetona se obtenía una mayor precisión con valores de desviación estándar relativa (RSD) menores de 10 % [Obana 1997].

4.4.3. - Equipos comerciales

Existen dos sistemas de PFE disponibles comercialmente el “*Accelerated solvent extraction*” (ASE100, ASE200 o ASE300) distribuido por Dionex Corporation (Sunnyvale, CA, E.E.U.U.) y el *Fast Pressurized solvent extraction* (PSE) de Applied Separations (Allentown, PA, EEUU). Ambos sistemas proporcionan prácticamente las mismas características de temperatura y presión máximas, a excepción de que el modelo ASE trabaja en serie, mientras que el modelo Fast PSE realiza seis extracciones simultáneas, además el modelo de

Dionex mantiene termostatazadas las líneas de transferencia, evitando las posibles obturaciones por precipitación del extracto al disminuir la temperatura.

4.5. - Comparación de metodologías de extracción para muestras sólidas

A la hora de seleccionar cual es el mejor método de extracción, no solo tenemos que considerar su efectividad, sino también otros factores como: consumo de tiempo y disolventes, habilidad del operador, posibilidad de automatización, etc. La tabla 1.8 muestra un resumen de las principales características de los métodos previamente estudiados. Como se observa en esta tabla, no resulta tarea fácil seleccionar cual es la más adecuada.

Tabla 1.8. Características generales de las principales metodologías de extracción disponibles para muestras sólidas [Sparr Eskilson 2000, Dean 2000].

Técnica	Soxhlet	Sonicación	Díálisis	SFE	MAE	PLE
Tiempo	3-48 h	10-60 min	8-48 h	10-60 min	3-60 min	5-30 min
Cantidad muestra (g)	1-30	1-30	-	1-5	1-30	1-30
Disolvente empleado (mL)	100-500	30-200	100-500	2-5	10-40	10-100
Automatización	En serie	En serie	En serie	Si	Si	Si
Optimización parámetros	-	-	-	Compleja	Simple	Simple
Compuestos termolábiles	Si	Si	Si	No	No	No
Extracción de matriz	Media	Media	Baja	Elevada	Elevada	Elevada
Habilidad del operador	Baja	Moderada	Baja	Alta	Moderada	Moderada
Inversión económica	Baja	Baja	Baja	Elevada	Moderada	Elevada

De todas las características de cada método de extracción podemos considerar como las más importantes las siguientes [Dean 2000]:

- coste inicial del equipo
- coste operacional
- requerimientos del método
- impacto medioambiental
- nivel de automatización

Es posible que tras considerar todos estos factores la opción más fácil sea la de mantener las metodologías tradicionales (Soxhlet o agitación), por ser de uso cotidiano y estar asegurada su fiabilidad. Pero teniendo en cuenta factores más económicos, la balanza se decantará por estas nuevas metodologías

instrumentales, ya que proporcionan tiempos de análisis por muestra considerablemente más cortos, minimizan el consumo de disolventes, disminuye la cantidad de residuos generados y además se reduce la manipulación de la muestra, mejorando la seguridad del operador y el ambiente laboral.

5. - Limpieza de extractos

La determinación de contaminantes orgánicos, presentes en niveles traza en muestras medioambientales o alimentos, requiere de un proceso de purificación o limpieza del extracto con el que se consiga separar los analitos a determinar de las especies interferentes y que además se obtenga una recuperación cuantitativa de todos ellos. Las especies interferentes presentes en este tipo de muestras son generalmente compuestos de elevado peso molecular, como lípidos, polímeros o pigmentos, que imposibilitan la posterior determinación cromatográfica (tanto por GC como por HPLC). Las metodologías más frecuentemente empleadas para la limpieza de extractos cromatográficos son: extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y cromatografía de permeación en gel.

5.1. - Extracción líquido-líquido

Este procedimiento, también denominado *partición con disolventes*, se emplea comúnmente en la limpieza de extractos. La partición con hexano-acetonitrilo es uno de los métodos más empleados para la eliminación de grasas o aceites de extractos con alto contenido lipídico. El procedimiento es muy simple y consiste en disolver este extracto graso en hexano, que se extrae repetidas veces con acetonitrilo, estos disolventes son inmiscibles y forman dos fases bien separadas. Además el acetonitrilo es un mal disolvente para las grasas, pero sin embargo disuelve, con mayor avidez que el hexano, una gran variedad de contaminantes orgánicos, como PCBs, PAHs y multitud de plaguicidas.

Esta metodología sola o combinada con otra técnica es comúnmente empleada en multitud de procedimientos, como por ejemplo: en la determinación de PAHs y multiresiduos de pesticidas en aceite oliva se emplea una partición con acetonitrilo-hexano para extraer estos compuestos de la matriz [Guardia-Rubio 2006, García Sánchez 2006], en la determinación de dioxinas en matrices biológicas por PFE se emplea partición con dimetil sulfóxido, acetonitrilo y hexano par eliminar compuestos grasos [Kitamura 2004] o en la determinación de

alquilfenoles en peces y moluscos se extrae con acetonitrilo y se emplea una partición con hexano para eliminar los restos grasos de la matriz [Tsuda 2000].

5.2. - Extracción en fase sólida

Al igual que en el apartado interior, este método de extracción también es ampliamente utilizado como proceso de limpieza de extractos. Las fases sólidas más empleadas para realizar SPE en fase normal son generalmente adsorbentes inorgánicos polares, como: gel de sílice, alúmina o florisil (gel de sílice de magnesio). Estos soportes retienen muy fuertemente los compuestos orgánicos hidrofílicos y en menor medida los compuestos hidrofóbicos. El proceso de elución se realiza con un disolvente hidrofóbico, como por ejemplo hexano, al que se van añadiendo pequeñas cantidades de modificador, que suele ser un disolvente más hidrofílico, produciéndose una separación paulatina de los compuestos según su hidrofobicidad. También se pueden emplear soportes hidrofóbicos como carbón grafitizado o fases orgánicas unidas a sílice como la C₁₈, donde se retienen los compuestos muy lipofílicos eluyéndose el resto.

Generalmente las fases sólidas polares (sílice, alúmina y florisil) requieren de un proceso de activación, en el que empleando temperaturas de 300-350 °C se eliminan las moléculas de agua que bloquean los puntos polares activos del soporte sólido. Esta activación mejorando considerablemente la reproducibilidad ya que de esta forma siempre habrá el mismo número de puntos activos por gramo de soporte, sin depender de la humedad que haya podido captar del medio. Cuando se emplea alúmina, además de la activación a elevada temperatura, también se requiere de una desactivación del soporte, que se consigue añadiendo pequeñas cantidades de agua, para bloquear de una forma controlada el número de puntos activos de la alúmina y de esta forma ajustar la capacidad de retención del soporte a nuestro analito.

El empleo de la extracción en fase sólida como método para realizar la limpieza de extractos cromatográficos esta ampliamente extendido para la

determinación de multitud de analitos en matrices de distinta índole. A continuación citaremos algunos ejemplos del uso de SPE en el análisis de plaguicidas, como: en la determinación de Endosulfan y derivados en suelos, tras una extracción PFE se emplea un tratamiento con florisil para limpiar el extracto [Hussen 2006]; en la determinación de 21 plaguicidas por MAE en suelos, el extracto se purifica empleando fases de florisil y alúmina como adsorbente [Barriada-Pereira 2003], en la determinación de organofosforados en tejidos animales tras una partición con disolventes se limpia el extracto con un cartucho de C₁₈ [Pagliuca 2005] o finalmente en la determinación de piretroides en mantequilla y aceites vegetales se usan cartuchos de carbón grafitizado [Ramesh 1998].

5.3. - Cromatografía de permeación en gel

Esta técnica fue inicialmente desarrollada para determinar la distribución de pesos moleculares de polímeros y consiste en la separación de los distintos compuestos de una mezcla por tamaño, mediante un proceso de partición entrópica en una matriz porosa. Se denomina cromatografía de permeación en gel (GPC, Gel permeation chromatography) aunque a veces es también conocida como cromatografía de exclusión por tamaños (SEC, size exclusion chromatography). La técnica consiste en una cromatografía líquida convencional que emplea columnas de un material macroporoso, generalmente de copolímero poliestireno-divinilbenceno, que es mecánicamente fuerte y puede soportar presiones y flujos elevados [Saunders 2004]. Como fase móvil es muy común el empleo de diclorometano o tetrahidrofurano, pero debido a su peligrosidad tanto para el operador como para el medio ambiente, se suele sustituir por alcanos, tanto cíclicos como lineales. El uso de modificadores como metanol, acetato de etilo o metil tert-butil éter es frecuente para ajustar las condiciones de elución [Vreuls 1996]. La figura 1.14 muestra el proceso de separación de la GPC y un dibujo de la estructura macroporosa de la fase estacionaria. Esta metodología se considera universal, debido a que se puede emplear en todo tipo de muestras y

analitos, ya que la separación se produce única y exclusivamente por interacciones físicas [Fernández-Moreno 2006].

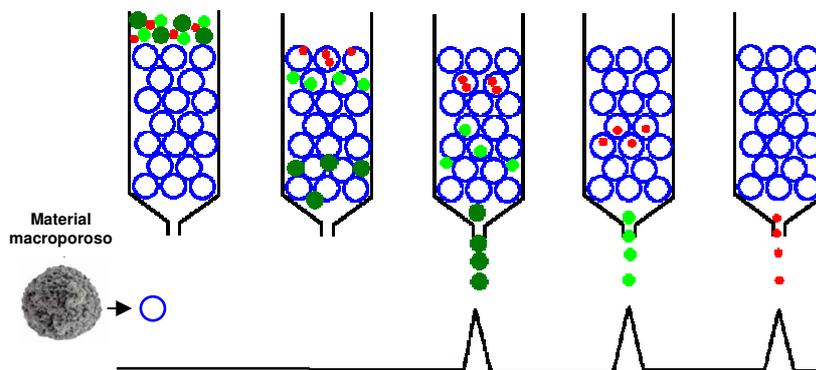


Figura 1.14. Esquema del proceso de separación empleando GPC.

Existen multitud de metodologías analíticas que emplean la GPC como etapa de limpieza de extractos, sobretodo en matrices muy grasas como alimentos, ya que los tiempos de elución de los triglicéridos son muy distintos de los principales contaminantes orgánicos, de esta forma se emplea en la determinación de PAH en aceite de orujo de oliva [Martínez-López 2005] o en la determinación de compuestos organohalogenados en tejido adiposo [Saito 2004]. En el caso de suelos y sedimentos, la GPC también es capaz de separar el azufre coextraído de la muestra que interfiere en la determinación cromatográfica. En el análisis de pesticidas también existen precedentes como por ejemplo en análisis de multiresiduos de pesticidas en aceite de oliva [Guardia-Rubio 2006] o en tejidos animales [Garrido-Frenich 2006]. La gran aceptación de esta metodología es debida a su fácil manejo, versatilidad y simplicidad del proceso, además de obtener recuperaciones cuantitativas.

Se han descrito distintas metodologías en las que se acopla directamente GPC con un cromatógrafo de gases, empleando como interfase dos válvulas de 6 vías, para la determinación de pesticidas organofosforados en aceite de oliva [Vreuls 1996, Jongenotter 2002]. Del mismo modo existen algunos casos de

acoplamiento directo entre GPC y HPLC en fase normal, a través de una previa evaporación del disolvente, para la determinación de PCBs y OCPs en muestras grasas y medioambientales [Rimkus 1996].

A menudo una simple limpieza de extractos por GPC, no es suficiente para eliminar completamente los residuos de grasa, por ello se suele combinar la GPC con otro sistema de separación como SPE, para que la separación de los compuestos se produzca por dos fenómenos primero por tamaño y después por polaridad. Ejemplos de ello son: la limpieza de extractos de tejido humano por GPC seguida de SPE con sílice para determinar compuestos clorados [Saito 2004], la limpieza de extractos de matrices biológicas con GPC y SPE con LiChrolut EN para medir PAHs nitrogenados [Dusek 2002] o la limpieza de extractos de vegetales con GPC y SPE con una mini columna de Florisil y sílice para determinar pesticidas nitrogenados y fosforados [Ueno 2003].

6. - Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

6.1. - Acoplamiento cromatografía de gases y espectrómetro de masas.

La espectrometría de masas es sin duda la técnica analítica instrumental más útil y completa que existe hoy en día, al ser rápida, universal y tremendamente específica, presentando una excelente capacidad de identificación y cuantificación. Esta técnica también proporciona información estructural de moléculas orgánicas, que nos ayuda a su correcta identificación.

El acoplamiento entre cromatografía de gases y espectrometría de masas, introducido por primera vez por Golhke en 1959 [Golhke 1959], combina la cromatografía de gases que produce la separación de muestras complejas y la espectrometría de masas, que proporciona información tanto cualitativa como cuantitativa de cada analito, esté separado o no de otros componentes de la matriz de la muestra. De hecho la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas es la técnica más usada hoy en día para la determinación de compuestos volátiles en muestras ambientales [Santos 2003].

El gran desarrollo de la microelectrónica en las últimas décadas, ha permitido la fabricación de sistemas GC-MS de baja resolución con un coste moderado y de manejo muy simple, que permite el empleo de esta técnica tan útil en laboratorios de rutina. Las limitaciones que presentan estos equipos para su uso cotidiano son: un reducido rango de masas de trabajo (hasta 600-1000 uma) y la falta de versatilidad en el uso de distintas técnicas de ionización, mientras que los equipos de alta resolución no solo presentan un elevado coste, difícil de asumir por un laboratorio de análisis convencional, sino que además requieren de unas instalaciones y un mantenimiento mucho más complejo [Esteban 1993].

Un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas consta de las siguientes partes, esquematizadas en la figura 1.15:

- Cromatógrafo: Separa los distintos componentes de la muestra, con el consiguiente aislamiento del analito del resto de la matriz.
- Interfase: es la unión entre cromatógrafo y espectrómetro, por la que se introduce la muestra a medir.
- Sistema de vacío: mantener un vacío del orden de 10^{-6} torr es esencial para el buen funcionamiento del equipo.
- Ionización: es el lugar donde se ioniza la muestra.
- Analizador: los iones previamente formados se separan según sus valores de m/z.
- Electrónica: un estricto control electrónico de todas las partes constituyentes del equipo es imprescindible.

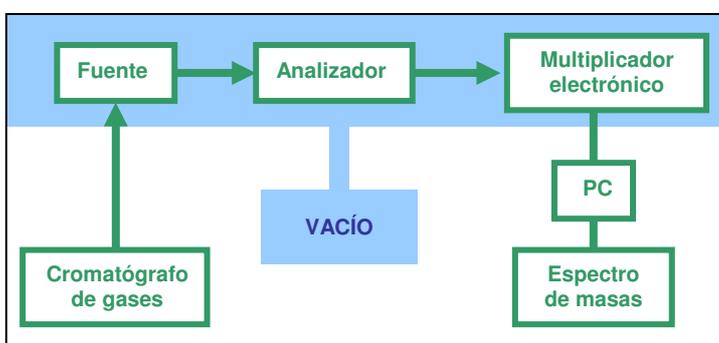


Figura 1.15. Esquema de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

La conectividad entre éstas técnicas se consigue fácilmente gracias a que ambas trabajan en fase gaseosa y requieren una cantidad muy pequeña de muestra para realizar el análisis. La interfase debe transferir cuantitativamente todo el analito y reducir el flujo de gas portador para obtener un vacío apropiado para que pueda operar el espectrómetro de masas. El único obstáculo que presenta este acoplamiento directo es la diferencia de presiones entre: atmosférica a la salida de la columna y un alto vacío a la entrada del espectrómetro de masas, pero se solventa con el empleo de columnas capilares que al requerir flujos de gas portador de solo 1-2 mL/min, son tolerados perfectamente por el espectrómetro de

masas. El gas portador a emplear debe ser fácilmente eliminable de la fuente iónica y no debe reaccionar con la muestra ni interferir en su espectro, siendo Helio el más frecuentemente empleado.

La unión de un espectrómetro de masas a un cromatógrafo líquido, es mucho más compleja y presenta un número mayor de dificultades. A pesar de ello existen distintas clases de interfases, como por ejemplo: electrospray (ES), ionización a presión atmosférica (API), ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI), etc. [Agilent].

Los analizadores más empleados en equipos acoplados a cromatógrafos de gases son los siguientes:

- Magnético: los iones se aceleran empleando un potencial y se hacen pasar por un campo magnético perpendicular por la línea de vuelo del ión. Al pasar por este campo, los iones siguen un camino circular cuyo radio es proporcional al valor m/z del ión.
- Tiempo de vuelo: los iones se mueven en línea recta dentro del “tubo de vuelo”, alcanzando velocidades distintas y llegando al detector en orden creciente de masas.
- Cuadrupolar: consiste en dos pares de electrodos alineados paralelamente entre sí, que pueden ser de sección hiperbólica, elíptica o circular. Mediante la aplicación a cada pareja de electrodos opuestos de un voltaje y radiofrecuencias específicos, podemos ir enfocando a través de este túnel los distintos iones según su valor de m/z .
- Trampa iónica: consiste en un sistema de tres electrodos anulares de superficie hiperbólica o circular, en los que al aplicar radiofrecuencias los iones quedan atrapados en su interior, describiendo órbitas circulares estables. Incrementando el potencial de esta radiofrecuencia, se desestabiliza la órbita de estos iones y salen de la trampa al detector secuencialmente según su valor de m/z .

Las características generales de estos cuatro tipos de analizadores se encuentran en la tabla 1.9. Como se observa en la tabla, el analizador de sector

magnético de doble enfoque es el que mejor características operativas presenta, pero el coste resulta excesivamente elevado, por lo que sólo se empleará en aquellas aplicaciones donde se requieran límites de detección extremadamente bajos. Los analizadores de tiempo de vuelo proporcionan una excelente selectividad y sensibilidad, mientras que los de trampa iónica permiten adquisiciones por tándem masas. La elección del analizador más adecuado siempre va a depender del uso que se vaya hacer de él, de las necesidades de sensibilidad, de la versatilidad de su uso, del personal disponible y cómo no del coste que seamos capaces de asumir. Finalmente, en la figura 1.16 se muestra un esquema del funcionamiento de cada uno de ellos [University of Bristol].

Tabla 1.9. Características generales de los principales analizadores de masas.

Criterio	Cuadrupolo	Trampa iónica	Sector magnético de doble enfoque	Tiempo de vuelo
Rango de masas (Da)	2 - 1000	10 - 1000	2 - 4000	5 - 1500
Precisión de masas	-	$\pm 0.1 - 0.2$ m/z	< 2 mDa	± 10 mDa
Velocidad	5200 – 10000 amu/s	5600 - 10000 amu/s	0.15 s/decade	5000 - 40000 transiciones /s
Modos de adquisición	Full scan SIM	Full scan SIM	Full scan SIM	Full scan
Sensibilidad	1-10 pg OFN	1-10 pg OFN	100 fg 2.3.7.8-TCDD	1-2 pg HCB
Rango dinámico	10^4 - 10^7	10^4 - 10^5	$>10^4$	10^3 - 10^5
Versatilidad	EI PCI NCI	EI PCI NCI	EI PCI NCI Ionización en campo	EI PCI NCI
Resolución de masas	1 uma	1 uma	10000	1000-10000
Tándem masas	no	MS ⁿ (n=2-10)	no	no
Coste	bajo	bajo	muy alto	alto

OFN, octafluoronaftaleno; TCDD, dioxina; HCB, hexaclorobenceno.

6.2. - Tipos de ionización

El método de ionización más antiguo, universal, reproducible y más ampliamente utilizado para muestras gaseosas es la ionización por impacto electrónico (EI, electrón impact). Sin embargo, esta técnica es muy agresiva y produce una gran fragmentación, complicando a menudo la interpretación del espectro, por lo que a menudo se recurre a otro tipo de ionización menos agresiva, con el fin de conseguir el ión molecular y muy poca o nula fragmentación. Existen multitud de alternativas que producen una ionización mucho más “suave”, como

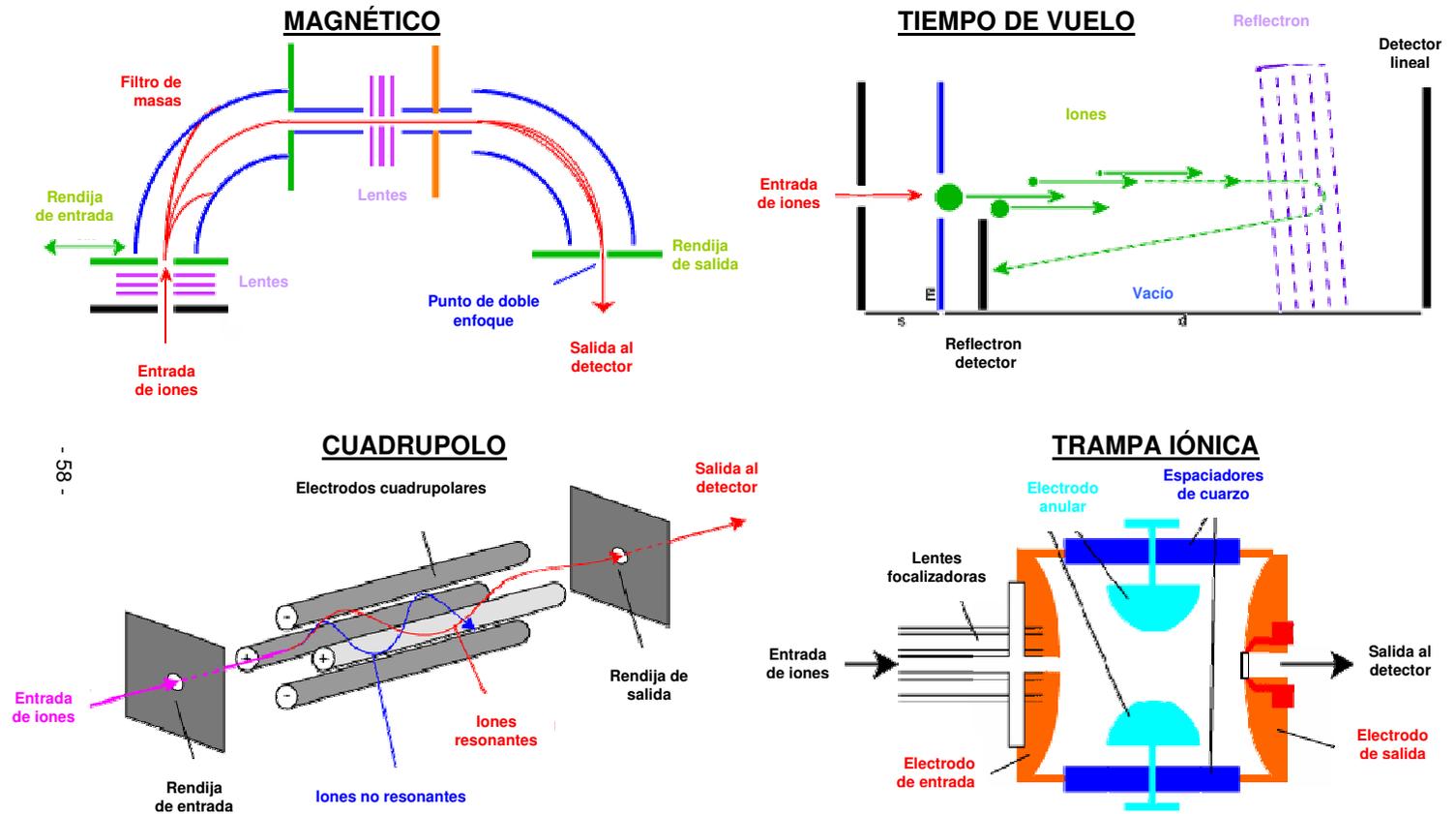


Figura 1.16. Esquema de los analizadores más empleados en equipos de GC-MS.

por ejemplo: el bombardeo con átomos rápidos o iones o la desorción por láser asistida por matriz, siendo la ionización química (CI, chemical ionization) la más empleada para muestras gaseosas [Santos 2003].

6.2.1. - Ionización por impacto electrónico

En la ionización por impacto electrónico la muestra en fase gaseosa se introduce en la cámara de ionización, donde las moléculas son bombardeadas con electrones, produciéndose choques. Si la energía de estos electrones es superior al potencial de ionización de la molécula, ésta se ioniza positivamente, formando el ión molecular y liberando un electrón. Si el choque se produce de una forma muy eficaz, la energía comunicada por el electrón está en exceso, provocando la rotura de uno o más enlaces del ión molecular y generándose una fragmentación característica de esa molécula. Este patrón de fragmentación específico es la considerada “huella digital” de la molécula y nos sirve para certificar su identificación.

Por lo general tras el proceso de ionización se forman iones positivos con una sola carga, aunque en algunos casos se pueden llegar a formar iones negativos, sobretodo en moléculas que contengan átomos muy electronegativos, como por ejemplo halógenos. Mucho menos frecuente es la formación de iones con dos o tres cargas, que se forman en cantidades despreciables, debido a la baja eficacia del proceso [Esteban 1993].

La eficacia en la ionización de la molécula, depende de la molécula a determinar, pero aumenta con la energía de los electrones. Por convenio universal se ha adoptado el valor de 70 eV como energía electrónica estándar, para poder comparar directamente los espectros producidos en diferentes laboratorios y de esta forma editar espectrotecas o librerías de espectros. Existen numerosas librerías de espectros disponibles en el mercado, suministradas por instituciones como el NIST (National Institute of Standards and Technology) o Wiley [NIST, Wiley]

6.2.2. - Ionización química

En este método se introduce un gas reactivo en la cámara de ionización que es ionizado por bombardeo de electrones, siendo el gas reactivo ionizado el que interacciona con la muestra, ionizándola. La proporción relativa de gas reactivo-muestra debe ser al menos de 1000:1, para evitar una posible ionización por impacto electrónico de la molécula a determinar. Los choques en este tipo de ionización, no suelen tener exceso de energía, por lo que los iones moleculares formados son muy estables y apenas se producen fragmentaciones.

La tabla 1.9 muestra los gases reactivos empleados en ionización química, el ión reactivo que se forma y su afinidad protónica (A_p), siendo el metano, isobutano y amoníaco los más usuales [Santos 2003]. La reacción más habitual es la transferencia de un protón del gas ionizado a la molécula a estudiar generando iones positivos, para ello es necesario que la A_p de la molécula sea mayor que la del gas reactivo. Cuanto mayor sea esta diferencia, mayor será el exceso de energía que se produce en el choque, y la molécula se fragmentará más. Por lo que el empleo de gases reactivos con una elevada afinidad protónica, producirá una menor fragmentación de la molécula [Constantin 1991].

Tabla 1.9. Gases reactivos más empleados con sus correspondientes valores de afinidad protónica (A_p).

Gas	Ión reactivo	A_p (Kcal/mol)
Hidrógeno	H_3^+	101
Metano	CH_5^+	127
	$C_2H_5^+$	159
Eteno	$C_2H_5^+$	159
Agua	H_3O^+	165
Propano	$C_3H_7^+$	182
Isobutano	$t-C_4H_9^+$	195
Amoníaco	NH_4^+	207

Otro tipo de reacciones que también se producen, pero en menor medida, son cambio de carga, adiciones electrofílicas o abstracciones de aniones. La ionización química también puede generar iones negativos, sobretodo en compuestos con átomos muy electronegativos. Esto es una gran ventaja, ya que

se consigue una gran selectividad para compuestos halogenados, como PCBs, plaguicidas organoclorados y compuestos bromados entre otros. En muchos casos empleando ionización química negativa se consigue una mayor sensibilidad que por impacto electrónico, como por ejemplo para la determinación de organofosforados en tejidos humanos [Russo 2002] o piretroides en suelos [Yasin 1996].

Existen equipos que disponen de ionización por impacto electrónico e ionización química, que además permiten el uso simultáneo de ambos. Este cambio de una a otra ionización se consigue en intervalos extremadamente pequeños de tiempo, lo que permite obtener ambos espectros simultáneamente (EI y CI) de cada pico cromatográfico.

6.3. - Espectrómetro de masas de trampa iónica

6.3.1. - Funcionamiento

El analizador de trampa iónica está formado por tres electrodos: el electrodo anular, el electrodo de entrada y el electrodo de salida, que forman una cavidad en la cual es posible almacenar y analizar iones. La figura 1.17 muestra las partes de la constan un detector de trampa iónica.

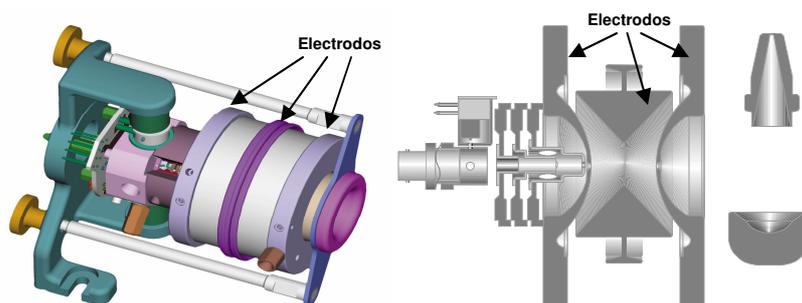


Figura 1.17. Vista externa y esquema de un detector de trampa iónica Thermo Finnigan.

Los iones formados en la fuente entran en el analizador donde se aplican diferentes voltajes generando un campo eléctrico tridimensional en la cavidad de la trampa. Este campo atrapa y concentra los iones, girando en órbitas estables.

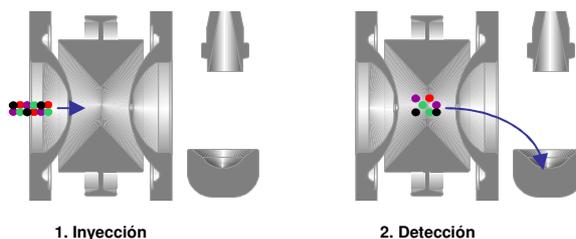
La naturaleza de la trayectoria depende del potencial y de la relación m/z de los iones. Durante la detección, los potenciales de los electrodos se alteran, provocando inestabilidad en las trayectorias de los iones y saliendo uno a uno hacia el detector, en orden creciente de su valor m/z , dando lugar a un espectro de masas.

El empleo de detectores de masas en cromatografía permite varias modalidades de medida, siendo los más tradicionales:

- **Full Scan**: se realiza un barrido completo de la muestra obteniendo un registro total de todos los iones.
- **SIM** (selected ion monitoring): se registra de forma continua la presencia de uno o varios iones previamente seleccionados.

El funcionamiento de este detector para ambas modalidades se esquematiza en la figura 1.18 [Xcalibur 2000]. En modo *Full Scan* se introducen los iones en la trampa en una primera etapa, para posteriormente ir trasladando cada ión al detector, por orden según su valor de m/z . En modo SIM se introduce la muestra en la trampa, se aísla el ión o los iones a cuantificar, y posteriormente se llevan al detector. En ambos procesos la medida es secuencial, por lo que la señal obtenida no es continua, sino por lotes.

A - *Full Scan*



B - SIM

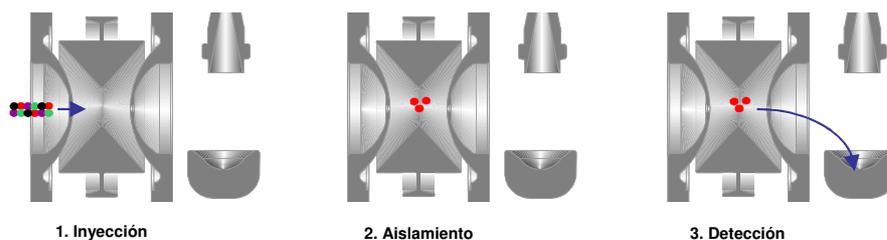


Figura 1.18. Esquema del funcionamiento de un detector de trampa iónica en las modalidades de *Full Scan* y SIM.

En detectores de masas de sector magnético o de cuadrupolo el empleo del modo *SIM* conlleva un notable aumento de la sensibilidad respecto al modo *Full Scan*; pero en equipos de trampa iónica, debido a su carácter secuencial, no existe una mejora significativa de sensibilidad [Santos 2003]. Para incrementar la sensibilidad en equipos de trampa iónica se recurre a uso de la modalidad *tándem masas*

6.3.2. - Espectrometría de masas en *tándem*

Una de las características del analizador de trampa iónica es su capacidad para aislar un ión y fragmentarlo obteniendo así lo que se denomina un “espectro *tándem masas*” o “espectro *MS-MS*”. El procedimiento esquematizado en la figura 1.19 es el siguiente: una vez ionizada la muestra, se selecciona un ión precursor, se aísla, se fragmenta por impacto con el gas de colisión y se obtiene un espectro con los iones fragmento, todos ellos derivados del ión precursor. Este modo de trabajo permite obtener una alta sensibilidad y selectividad, además de ayudar a la elucidación de la estructura del ión [Bauerle 1995].

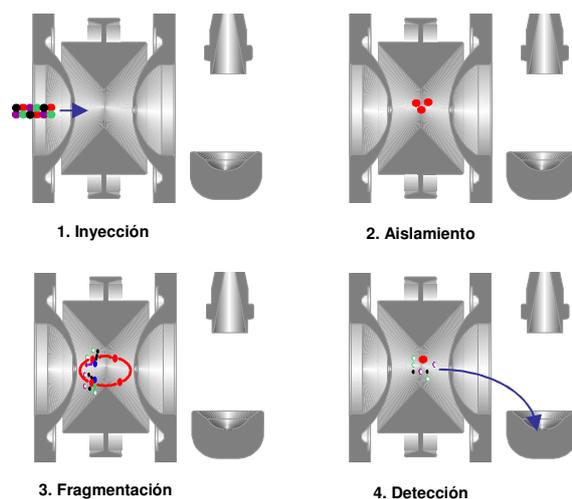


Figura 1.19. Esquema de funcionamiento de un detector de trampa iónica en modo *tándem masas*.

El aumento de sensibilidad no se consigue por un aumento de señal, sino por una enorme reducción del ruido de fondo. Este proceso de rotura se puede repetir con un ión fragmento y conseguir el espectro de MS^3 y así sucesivamente

hasta MSⁿ. Cuantas más roturas se hagan, más aumentará la especificidad de la medida, pero la cantidad de ión disponible disminuye considerablemente y con ello la sensibilidad. Esto es muy útil en la determinación de moléculas muy grandes, que permiten un elevado número de roturas, como por ejemplo la determinación de yessotoxinas en mariscos por MS⁴ [Fernandez Amandi 2002] o en la determinación de secuencias de aminoácidos de valinomicina por MS¹⁰ [Ngoka 2000].

El uso de la modalidad tándem masas se puede emplear para la determinación de prácticamente cualquier molécula y solo se requiere seleccionar un ión de gran m/z y elevada intensidad, y un simple ajuste de la energía de excitación para fragmentarlo. En la bibliografía se encuentran un gran número de trabajos que optimizan estos parámetros para infinidad de compuestos para no solo aumentar la selectividad en la medida, sino también la sensibilidad, como por ejemplo dioxinas en aguas residuales con límites de detección (LOD) de 0.054 pg [Kemmochi 2003] o compuestos organoestánicos en aguas marinas con LOD entre 0.26 y 0.84 pg [Tsunoï 2002].

Algunos autores han comparado los resultados obtenidos por cromatografía de gases con detección de espectrometría tándem masas y de alta resolución, en la determinación de PCBs coplanares en muestras de pescado, obteniendo resultados estadísticamente comparable a través de distintos ejercicios de intercalibración [Malavia 2004]

6.4. – Avances en las determinaciones por espectrometría de masas

La espectrometría de masas de alta resolución basada en analizadores de sector magnético, está considerada como la metodología más sensible y selectiva, de hecho se emplea como referencia para el análisis de compuestos a niveles de partes por trillón en multitud de muestras. Como ya dijimos, estos equipos requieren de una inversión muy elevada y de operadores con mucha experiencia, lo que incrementa considerablemente el coste de los análisis. El empleo de otro tipo de analizadores unidos a modificaciones en el sistema cromatográfico, son

alternativas que nos pueden permitir mejoras globales del sistema, ya sea reduciendo costes, disminuyendo el tiempo necesario para cada análisis o incrementando la selectividad de las medidas.

- PTV-GC-MS-MS: se pueden emplear inyectores de vaporización a temperatura programada (PTV – programmed temperature vaporizing) acoplados a equipos de trampa iónica para determinaciones por tándem masas. El uso de estos inyectores permite una inyección de un volumen mayor de extractos, de 50 a 100 μL , incrementando de esta forma la sensibilidad. La selectividad en estas determinaciones la proporcionan las específicas adquisiciones obtenidas por espectrometría de masas en tándem. Ejemplo de ello es la determinación de pesticidas de aguas en las que se obtuvieron LODs de 1 a 100 pg/mL [Hada 2000] o la determinación de polibromobifenilos, polibromodifenil éteres y policloronaftalenos en sedimentos obteniéndose LODs entre 4 y 20 pg/g [Yusà 2006a].
- FGC-TOF-MS: el empleo de cromatografía de gases rápida (Fast GC) emplea columnas capilares mucho más cortas, mayores flujos de gas portador y rampas muy elevadas de temperatura, consiguiendo tiempos de retención dos órdenes de magnitud más cortos, pudiendo obtener cromatogramas completos en menos de un minuto. Debido a la rapidez que se requiere en estas adquisiciones, se emplean analizadores de tiempo de vuelo (TOF – time of fly). Ejemplo de ello son: la determinación de aceites esenciales en el que el tiempo total del cromatograma se reduce de 20-60 minutos a 0.7-2 minutos según muestras [Bicchi 2004]; o la determinación de 18 PAHs en muestras de aire en las que se reducen los tiempos de 40 a 13 minutos, para su completa separación [Ravindra 2006].
- GCxGC-TOF-MS: en esta técnica se acoplan directamente dos columnas con distintos sistemas de separación, generalmente la primera es una

columna apolar convencional, mientras que la segunda es una columna polar muy corta. Por lo que los compuestos que coeluyen en la columna apolar, se separarán correctamente en la columna polar, mejorando extremadamente la selectividad de la determinación. Con esta metodología se consigue obtener cromatogramas en dos dimensiones. Debido a la rapidez que se requiere en la obtención de los espectros de masas, se emplean detectores de tiempo de vuelo. Por ejemplo, esta técnica se emplea en la determinación de compuestos volátiles de flores [Ozel 2006] o en la clasificación de aerosoles [Welthagen 2004].

Finalmente, a modo de resumen de estas alternativas, la figura 1.20 muestra las diferencias de estas metodologías respecto sensibilidad, selectividad y velocidad del análisis [Focant 2005].

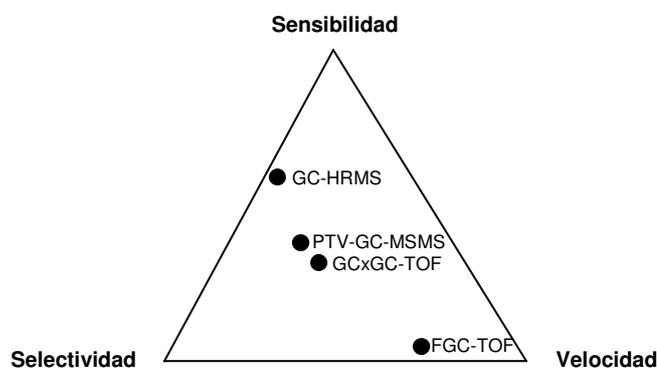


Figura 1.20. Triángulo analítico de las metodologías estudiadas.

CAPÍTULO 2a

OBJETIVOS

El objetivo de la presente Tesis es el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de plaguicidas en distintas muestras, empleando alternativas a los métodos clásicos, como extracciones con fluidos presurizados y asistida por microondas, para su posterior medida a través de cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas.

Este objetivo lo dividimos en los siguientes apartados o subobjetivos:

- Desarrollo de métodos de espectrometría de masas en tándem, para la determinación de plaguicidas, empleando un cromatógrafo de gases con detector de masas de trampa iónica. Las familias de plaguicidas estudiadas serán: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides y otras.
- Determinar las mejores condiciones de medida, empleando hornos microondas y fluidos presurizados, para la extracción de plaguicidas de distintas muestras como: suelos, vegetales y dispositivos de membrana semipermeables (SPMDs). Las variables a modificar serán principalmente, el disolvente empleado, la temperatura, el tiempo de extracción y el número de ciclos de extracción. Previamente habrá que comprobar la estabilidad al proceso de extracción de los compuestos estudiados.
- Debido al tratamiento a alta temperatura, se producirá una elevada co-extracción de matriz de la muestra que puede interferir en la determinación cromatográfica del plaguicida, por lo que se ideará una etapa adicional de limpieza del extracto. En una primera tentativa se emplearán técnicas de limpieza de extracto convencionales como: partición con disolventes, extracción en fase sólida o cromatografía de permeación en gel, modificando estos métodos para cada tipo de muestra a extraer.

- Para comprobar la eficiencia de las nuevas metodologías de extracción desarrolladas, se determinará la cantidad de plaguicida en muestras reales y se compararán los resultados con los obtenidos a través de técnicas de extracción reconocidas y de absoluta fiabilidad, como son: el Soxhlet, la extracción con ultrasonidos o la diálisis para el caso de los SPMDs.
- Una vez desarrolladas estas metodologías, se estimarán parámetros analíticos como límite de detección, precisión, recta de calibrado, rango lineal, recuperaciones en muestras adicionadas y recuperaciones en muestras certificadas siempre que sea posible.
- Finalmente se estudiará el fenómeno de retención de plaguicidas en SPMDs, tanto en agua como en aire. Se estimará qué familias de plaguicidas se absorben con mayor intensidad en estos muestreadores pasivos, así como la variabilidad en la absorción modificando parámetros como: temperatura del agua, composición del agua (pH, fuerza iónica, presencia de otros compuestos) y tiempo de exposición.

CAPÍTULO 2b
AIM AND SCOPE

The aim of this PhD Thesis is the development of analytical methodologies for the pesticide determination in several samples, employing alternatives to the classical methods, such as pressurized fluid or microwave-assisted extraction, with gas chromatographic determinations coupled to mass-spectrometry detection.

This main objective can be divided into the following goals:

- Development of pesticide determination methods based on tandem mass spectrometry, employing a gas chromatograph with an ion trap mass spectrometry detector. The studied pesticides are included in the main families such as organochlorinated, organophosphorus, carbamates, pyrethroid and others.
- Establishment of the best conditions for the extraction of pesticides from several kinds of samples, by using microwave-assisted (MAE) and pressurized fluid extractors (PFE). The samples under study will be soils, vegetables and semi-permeable membrane devices (SPMDs). The variables to be modified will be extraction solvent, temperature, extraction time and number of extraction cycles. Previously, it is necessary to assay the chemical stability of the studied compounds under the high energetic extraction procedure developed.
- High amount of matrix compounds are also co-extracted by using these high temperature and pressure treatments, so an additional clean-up methodology is required in order to avoid these compounds, assuring a clean chromatograph without interferences. In first attempt conventional clean-up methodologies, such as solvent partitioning, solid-phase extraction or gel permeation chromatography will be employed, being adjusted for each specific kind of treated sample.

- In order to assure the efficiency of pesticide extractions using the MAE or PFE methodologies, the obtained results will be compared with a series of established reference procedures such as Soxhlet or sonication extractions. Dialysis will be employed as a reference procedure in the pesticide extraction from SPMDs.
- Other analytical parameters such as: sensitivity, calibration curve, limits of detection and accuracy, will be established for the developed procedure. Recoveries of studied compounds, in spiked samples and/or certified reference materials, will be calculated in all cases.
- Finally, several studies will be performed to study the pesticide absorption phenomenon of SPMD deployed in air and water environments. This study will be carried out employing several families of non polar pesticides in order to evaluate which of these families are capable to be absorbed by using these devices. Variability in the absorption of pesticides from water will be evaluated modifying temperature, pH, salinity, organic matter presence and deployment time.

CAPÍTULO 3

RESUMEN

1. - Determinación por cromatografía gaseosa

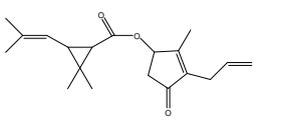
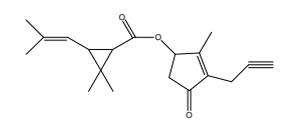
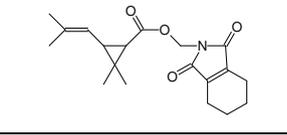
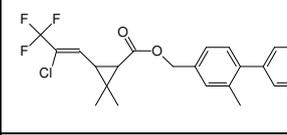
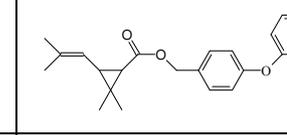
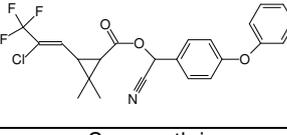
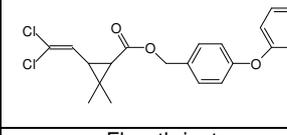
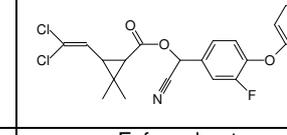
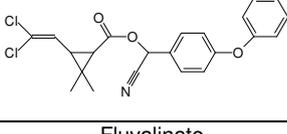
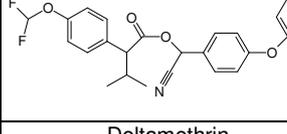
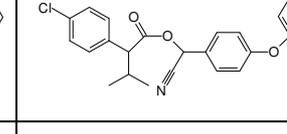
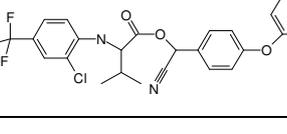
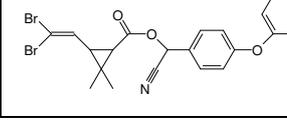
En cada uno de los estudios realizados, la primera etapa siempre ha consistido en la búsqueda de las mejores condiciones cromatográficas para obtener la mejor separación de los analitos, tanto entre ellos mismos, como de la matriz. El empleo de un cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas de trampa iónica permite obtener señales muy selectivas que nos permiten una perfecta identificación de cada compuesto, así como una cuantificación en la que la presencia de especies interferentes es mucho menor. Además, la trampa iónica permite realizar espectros de tándem masas, lo que además de mejorar la selectividad, incrementa la sensibilidad de la determinación, debido a una considerable reducción en el ruido de fondo.

Los compuestos estudiados son plaguicidas de diversas familias, teniendo en común dos propiedades que son imprescindibles para su determinación por cromatografía de gases, su elevada volatilidad y su estabilidad a altas temperaturas. Las distintas determinaciones cromatográficas que se han realizado en la presente memoria las podemos separar en: insecticidas piretroides, insecticidas organoclorados y análisis de multiresiduos de plaguicidas (37 compuestos de distintas familias, incluyendo organoclorados, organofosforados, piretroides, carbamatos y otras).

1.1. - Insecticidas piretroides

Los pesticidas de tipo piretroide presentan en su estructura átomos de carbono asimétricos, dobles enlaces y anillos ciclopropano, que les proporcionan un carácter quiral. La tabla 3.1 muestra la estructura química de los plaguicidas piretroides estudiados en la presente memoria. Para cada uno de estos compuestos existen distintos estereoisómeros, presentando cada uno de ellos un distinto comportamiento cromatográfico. Debido a este motivo, compuestos como Permethrin, Fluvalinate o Flucythrinate presentan dos picos cromatográficos, e

Tabla 3.1. Estructura química de los insecticidas piretroides estudiados.

	Allethrin	Prallethrin
		
Tetramethrin	Bifenthrin	Phenothrin
		
λ-Cyhalothrin	Permethrin	Cyfluthrin
		
Cypermethrin	Flucythrinate	Esfenvalerate
		
Fluvalinate	Deltamethrin	
		

incluso el Cyfluthrin o el Cypermethrin presentan cuatro picos correspondientes a distintos estereoisómeros del mismo compuesto empleando una columna capilar Hewlett-Packard HP5 (5% metilsiloxano), que es la columna estándar para la separación de contaminantes orgánicos. Este elevado número de picos por compuesto aumenta la complejidad del cromatograma, produciéndose algún solapamiento entre picos. La figura 3.1 muestra cromatogramas de gases con detección de captura electrónica de un patrón de estos compuestos, donde se observan claramente solapamientos a determinados tiempos de retención. Como

se observa en la figura, las parejas de compuestos Tetramethrin-Bifenthrin, Cypermethrin-Flucytrinate y Esfenvalerate-Fluvalinate eluyen al mismo tiempo, por lo que no podremos diferenciarlos empleando un detector no selectivo como el FID o el ECD.

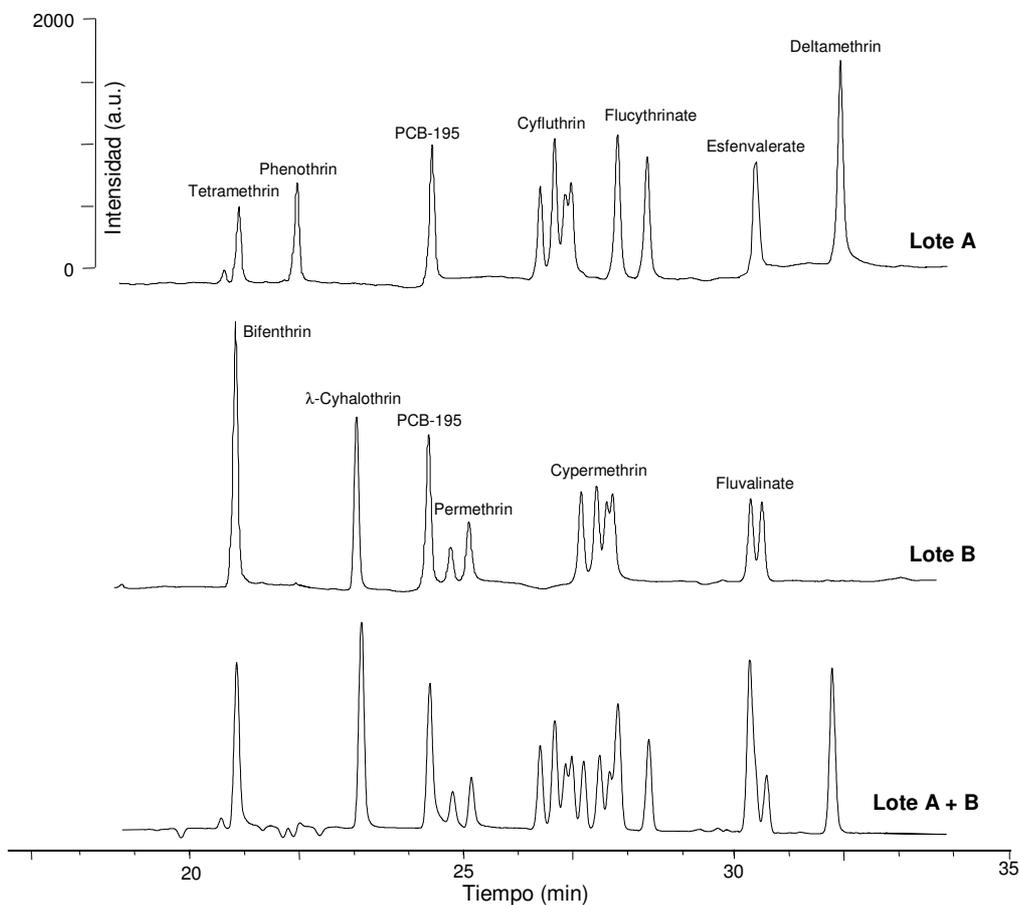


Figura 3.1. Cromatogramas de distintas mezclas de insecticidas piretroides y PCB-195 (patrón interno) empleando una columna capilar HP-5 y detección ECD.

El empleo de detectores de espectrometría de masas, nos permite conocer el espectro de masas de todos los compuestos que eluyen de la columna. Además de obtener una identificación completa de cada compuesto a través de sus iones característicos, podemos ser capaces de cuantificar por separado

aquellos compuestos que coeluyan al mismo tiempo de retención, siempre que dispongan de iones que no estén afectados por otros compuestos. La tabla 3.2 muestra los iones característicos de los insecticidas piretroides estudiados, tanto por impacto electrónico, como por ionización química negativa. Los iones seleccionados para cada compuesto fueron los más intensos de su espectro, empleando como criterio que tuvieran una intensidad mayor del 20%. En el caso de ionización por impacto electrónico el Tetramethrin y el Fluvalinate solo presentaron en su espectro un ión de elevada intensidad, por lo que limita la determinación a un único ión, con el riesgo de poder estar interferido por otras especies.

Tabla 3.2. Iones seleccionados para la determinación de piretroides por GC-MS empleando ionizaciones EI y NCI.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Iones ($m/z \pm 0.5$)	
		Impacto electrónico	Ionización química negativa
Tetramethrin	20.0, 20.3	164	168 + 331
Bifenthrin	20.3	181 + 166	205 + 386
Phenothrin	21.6	183 + 123 + 81	167 + 205 + 349
λ -Cyhalothrin	22.8	181 + 141 + 197	205 + 241
Permethrin	24.8, 25.1	183 + 165	207 + 209 + 171
Cyfluthrin	26.5, 26.8, 26.9, 27.1	206 + 199 + 127	207 + 209 + 171
Cypermethrin	27.3, 27.7, 27.8, 27.9	181 + 127 + 163	207 + 209 + 171
Flucythrinate	27.9, 8.5	225 + 199 + 157	243 + 199 + 424
Esfenvalerate	30.6	225 + 125 + 181	211 + 213 + 168
Fluvalinate	30.6, 30.7	250	294 + 296
Deltamethrin	32.5	253 + 181	81 + 79

1.1.1. – Determinación por ionización química negativa

Generalmente en los espectros de masas obtenidos por ionización química negativa, se produce una menor fragmentación, obteniéndose un menor número de iones y de mayor m/z que en impacto electrónico. Este efecto se aprecia claramente para el Phenothrin en la figura 3.2, donde el modo EI fragmenta mucho la muestra y sin embargo en NCI solo se obtienen dos iones característicos. Debido a que se forman iones más grandes, los espectros en NCI nos pueden mostrar directamente el ión molecular y/o ayudar a elucidar la estructura química de un compuesto desconocido.

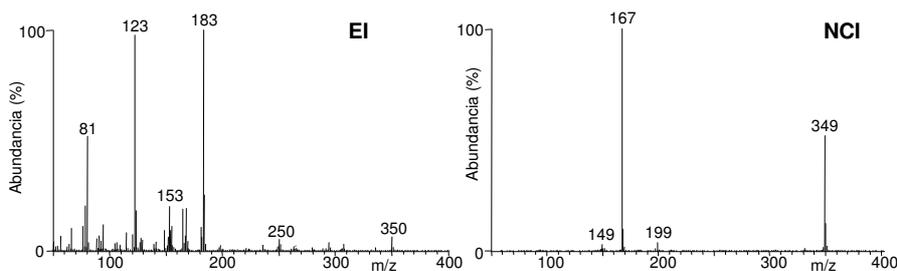


Figura 3.2. Espectros de masas del Phenothrin por impacto electrónico e ionización química negativa.

Para favorecer la formación de iones de m/z elevados, se modificaron los parámetros del detector para producir una ionización mucho más suave, que no rompa excesivamente la molécula. El objetivo es conseguir iones lo más grande posible, para más tarde, realizar una determinación por tándem masas empleando los iones de mayor m/z . Para ello se modificaron los siguientes parámetros:

- Flujo del gas reactivo (metano): el valor estándar es 0.3 mL/min, al aumentar este flujo, aumenta la cantidad de metano en la cámara de ionización, por lo que la ionización se vuelve más suave. El valor máximo empleado fue 1.5 mL/min debido a que el trabajo con flujos mayores aumenta excesivamente la presión de la cámara (Convectron 119 mTorr, ion gauge $1.5 \cdot 10^{-4}$ Torr) y reduce la vida media del filamento.
- Temperatura de la fuente: el valor estándar es de 250°C, al disminuir esta temperatura se produce una fragmentación menos efectiva y favorece la formación de fragmentos mayores. Se redujo la temperatura hasta valores de 150°C, ya que temperaturas menores ensucian la fuente del detector rápidamente.
- Energía de ionización: el valor estándar es de 70 eV, pero se redujo este valor hasta 40 eV, para intentar disminuir la fragmentación.

Se realizó un estudio con modificaciones monoparamétricas tomando como partida las condiciones recomendadas por el fabricante del equipo y consideradas estándar [Xcalibur 2000]. La figura 3.3 muestra las correspondientes variaciones en el área de los iones mayoritarios del Flucythrinate, donde se observa que a mayor flujo de metano incrementan el valor del área de todos los

iones, al disminuir la energía de ionización se pierde sensibilidad al reducirse el área de todos ellos, mientras que disminuyendo la temperatura de la fuente, no solo se modifica el área de los iones, sino que también se produce un cambio significativo en la relación entre ellos. A partir de una temperatura de la fuente de 175 °C, se invierte la relación de áreas, siendo el área del ión m/z 243 mayor que la del ión m/z 200. Como se observa en la figura 3.3c a una temperatura de 150 °C se obtiene un máximo en el área de ión m/z 243, mejorando también la sensibilidad.

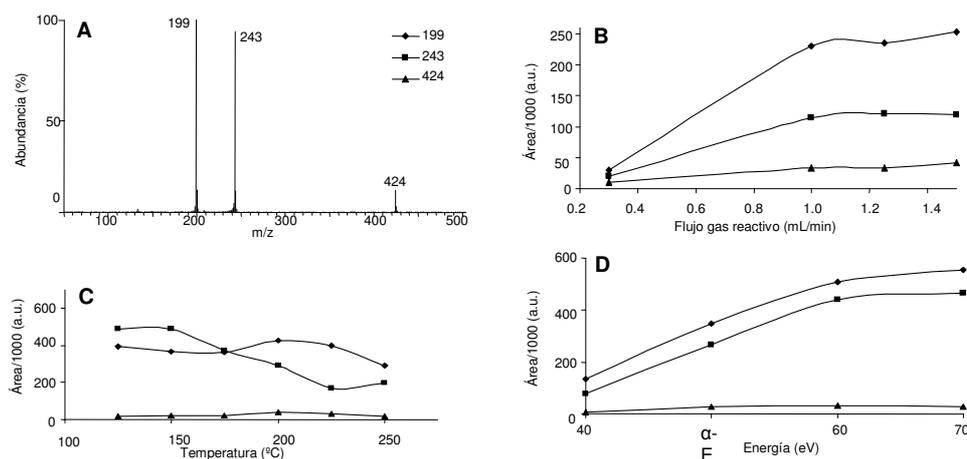


Figura 3.3. Espectro de masas NCI del Flucythrinate (patrón de 500 ng/mL) (A) y variaciones en el área de cada ión modificando el flujo del gas reactivo (B), la temperatura de la fuente (C) y la energía de ionización (D).

Este estudio se realizó teniendo en cuenta las variaciones en el área de los iones mayoritarios de todos los compuestos y alcanzando un compromiso se seleccionaron las mejores condiciones de medida, que corresponden a un flujo de metano de 1.5 mL/min, una temperatura de la fuente de 150 °C y una energía de ionización de 70 eV. Utilizando estas condiciones de medida para el modo de ionización NCI, se seleccionaron los iones de medida para cada compuesto entre los iones de mayor intensidad. La tabla 3.2 muestra cuales son los iones seleccionados para la determinación de cada uno de los insecticidas piretroides estudiados por NCI.

1.2. - Insecticidas organoclorados

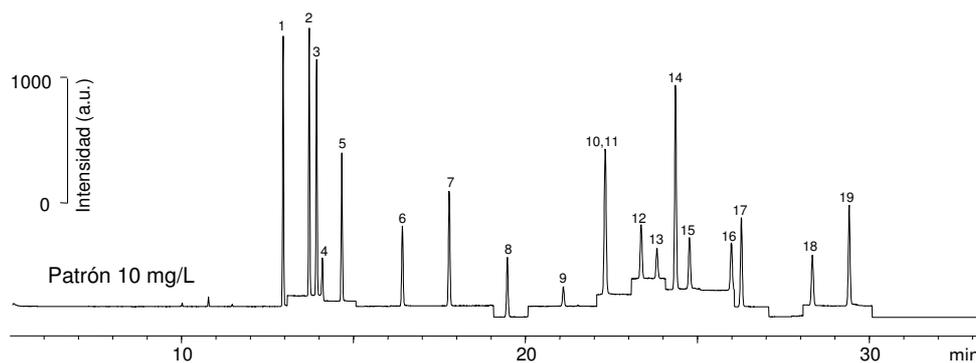
Este tipo de insecticidas, los primeros en usarse a gran escala y prohibidos en multitud de países desde hace décadas, han sido ampliamente estudiados y desarrollados en la bibliografía. Para su determinación se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo, realizando medidas en modo SIM. Las masas seleccionadas que se emplearon para la determinación de cada compuesto se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Masas seleccionadas para la determinación de insecticidas organoclorados.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Iones producto (m/z \pm 0.5)
α -Lindane	12.9	181 + 183
β -Lindane	13.6	109 + 111
γ -Lindane	13.8	109 + 181
PCNB ^a	13.9	142 + 237
δ -Lindane	14.6	109 + 181
Heptachlor	16.3	100 + 272
Aldrin	17.7	66 + 79
Heptachlor epóxido	19.4	81 + 353
α -Endosulfan	21.0	195 + 170
DDE	22.2	246 + 247
Dieldrin	22.2	79 + 263
Endrin	23.3	67 + 81
β -Endosulfan	23.8	195 + 159
DDD	24.3	235 + 238
Endrin aldehído	24.7	67 + 250
Endosulfan sulfato	25.9	272 + 229
DDT	26.2	235 + 237
Endrin cetona	28.3	67 + 317
Methoxychlor	29.4	227 + 228

^a Patrón interno (Pentacloronitrobenceno)

Empleando una columna HP-5ms se observa algún solapamiento cromatográfico, como por ejemplo a 22.2 minutos entre el DDE y el Dieldrin, pero se solventa determinando cada uno de ellos con distintos iones, m/z 246 y 247 para el DDE y m/z 79 y 263 para el Dieldrin. La figura 3.4 muestra un cromatograma de un patrón multicomponente de insecticidas organoclorados de 10 mg/L, en el que se observa la eficiente separación entre los picos estudiados.



(1. α -Lindane, 2. β -Lindane, 3. γ -Lindane, 4. PCNB, 5. δ -Lindane, 6. Heptachlor, 7. Aldrin, 8. Heptachlor epóxido, 9. α -Endosulfan, 10. DDE, 11. Dieldrin, 12. Endrin, 13. β -Endosulfan, 14. DDD, 15. Endrin aldehído, 16. Endosulfan sulfato, 17. DDT, 18. Endrin cetona, 19. Methoxychlor).

Figura 3.4. Cromatograma GC-MS de insecticidas organoclorados.

1.3. – Determinaciones tándem masas

Para incrementar la sensibilidad en las determinaciones cromatográficas, se desarrolló un método tándem masas para cada uno de los compuestos estudiados. Para ello se estudiaron los siguientes parámetros:

- Seleccionar un ión precursor: elegiremos o los más intensos del espectro de masas o aquellos de mayor valor m/z que tengan una intensidad significativa.
- Ajustar el voltaje de excitación: al incrementar su valor, el ión seleccionado se fragmenta más, por lo que su intensidad disminuirá y aumentarán las señales de sus iones producto.
- Seleccionar iones producto: de entre los iones producto que se generan a partir del ión precursor, seleccionaremos aquellos de mayor intensidad.

Como se muestra en la figura 3.5 a modo de ejemplo extensible al resto de compuestos estudiados, el espectro de masas del Esfenvalerate tiene como iones más intensos m/z 225 y 125, por lo que seleccionamos el ión m/z 225 como precursor, por ser más intenso y además tener un valor m/z superior. El ión m/z 419, a pesar de ser el ión precursor de la molécula a estudiar, no lo seleccionamos, debido a que al ser poco intenso proporcionaría una baja

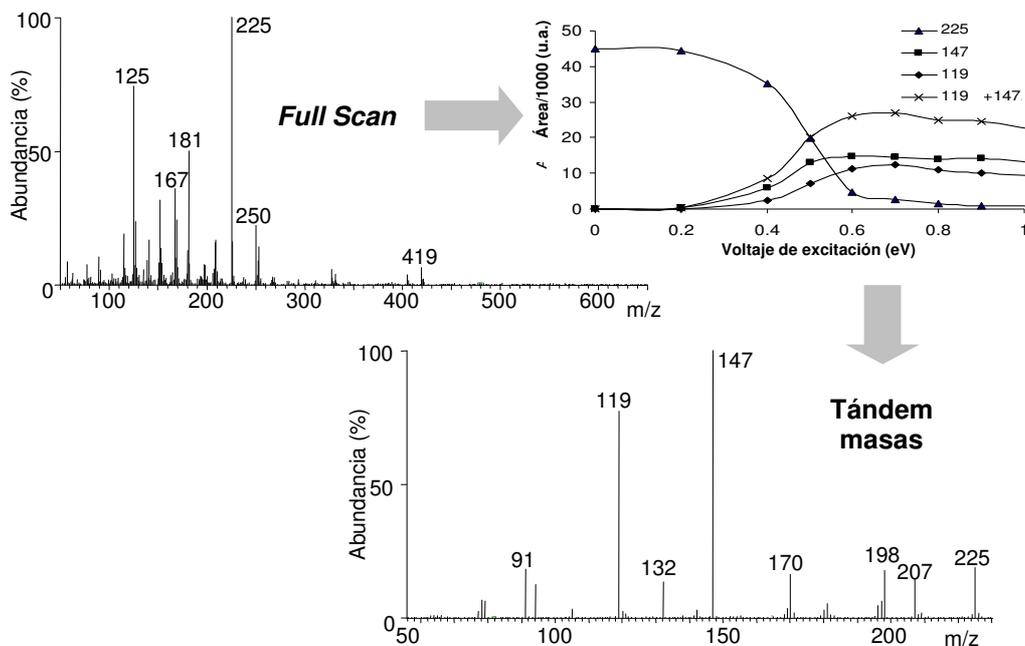
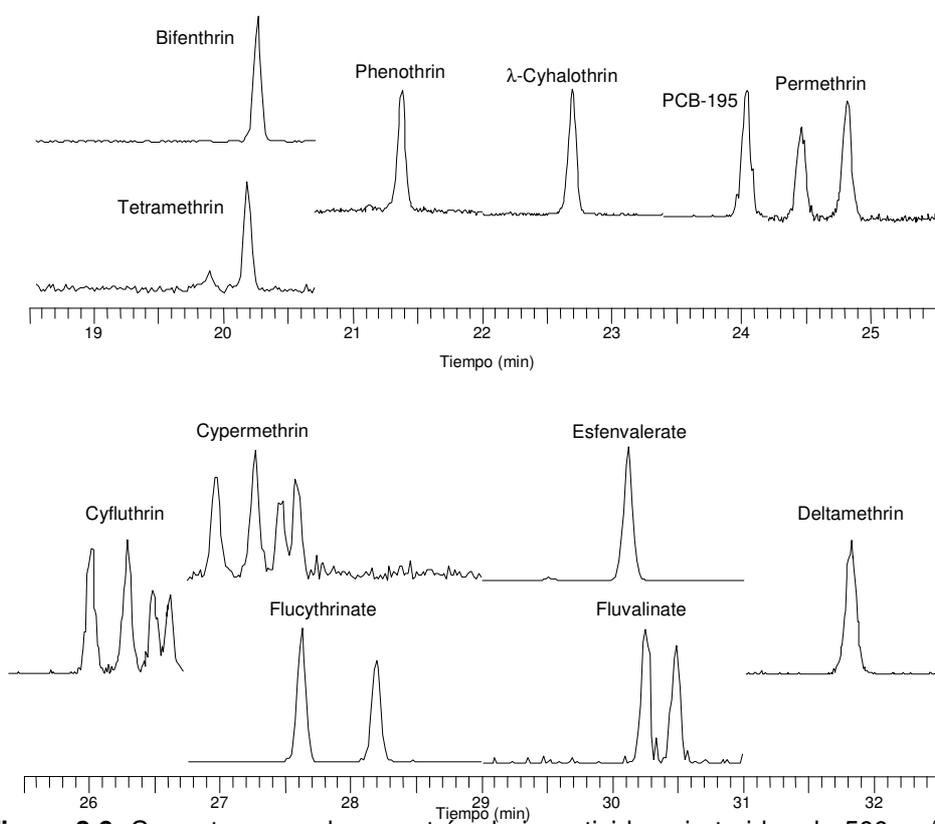


Figura 3.5. Espectro de masas del Esfenvalerate en modo *Full Scan* y tándem masas. El gráfico muestra la evolución del área de los iones producto frente al voltaje de excitación aplicado.

sensibilidad. Al aplicar un voltaje de excitación se van formando los iones m/z 147 y 119 mayoritariamente, que seleccionamos como iones producto. El voltaje de excitación más adecuado será aquel que proporcione una mayor área de los iones producto. Al ir aumentando el voltaje se fragmenta más el ión precursor, generándose una mayor cantidad de iones producto, pero si incrementamos demasiado el voltaje, se fragmentan tanto el ión precursor como los producto, disminuyendo las áreas de ambos y con ello la sensibilidad. El gráfico de la figura 3.5 indica que para el Esfenvalerate un voltaje de excitación de 0.70 eV proporciona el valor de área mayor. La tabla 3.4 muestra los iones precursores, energía de excitación e iones producto para la determinación de piretroides por tándem masas empleando ionización por impacto electrónico y química negativa. Se observa que en el modo de ionización química negativa algunos compuestos como: Phenothrin, Permethrin o Deltamethrin no presentan fragmentaciones, esto es debido a que los iones negativos formados al fragmentarse no produce iones producto de carga negativa, que se pueden determinar.

Tabla 3.4. Condiciones de medida para la determinación de piretroides por GC-MS-MS empleando ionización EI y NCI.

Compuesto	Impacto electrónico			Ionización química negativa		
	Ión precursor ($m/z \pm 2.0$)	V (eV) ^a	Iones producto ($m/z \pm 0.5$)	Ión precursor ($m/z \pm 2.0$)	V (eV) ^a	Iones producto ($m/z \pm 0.5$)
Tetramethrin	164	0.65	107 + 135	331	0.50	167
Bifenthrin	181	0.75	166 + 165	205	0.70	161 + 165
Phenothrin	183	0.85	165 + 168	^b		
λ -Cyhalothrin	197	0.65	141 + 161	205	0.65	165 + 161
Permethrin	183	0.80	165 + 168	^b		
Cyfluthrin	226	0.60	199 + 206	^b		
Cypermethrin	163	0.65	127 + 91	^b		
Flucythrinate	225	0.80	147 + 119	243	0.80	199 + 183
Esfenvalerate	225	0.70	147 + 119	392	1.20	350
Fluvalinate	250	1.30	200 + 215	294	1.05	194 + 250
Deltamethrin	172	0.50	93 + 91	^b		

^aV, Voltaje de excitación^b Este compuesto no presenta fragmentaciones en modo NCI-MS-MS.**Figura 3.6.** Cromatograma de un patrón de insecticidas piretroides de 500 ng/mL en modo tándem masas.

El cromatograma resultante de un patrón de 500 ng/mL de una mezcla de piretrinas medido en modo tándem masas se muestra en la figura 3.6, donde se aprecia claramente que es posible medir simultáneamente en un mismo rango de tiempo todos los compuestos, empleando distintas condiciones de medida. Además al ser una determinación muy selectiva, ya que cada compuesto solo genera unos pocos iones, no hay interferencias entre compuestos que coeluyen al mismo tiempo de retención.

Tabla 3.5. Condiciones de medida para la determinación de plaguicidas en modo Full scan y tándem masas.

Compuesto	Full Scan	Tándem masas		Iones producto (m/z \pm 0.5)
	Iones producto (m/z \pm 0.5)	Ión precursor (m/z \pm 2.0)	V (eV) ^a	
Propamocarb	58	58	1.10	43 + 42 + 41
Propoxur	110	110	1.30	81 + 63 + 82
HCB	284 + 286 + 282	284	1.65	214 + 249 + 212
Carbosulfan	164 + 149	164	1.00	149 + 131 + 117
Lindane	181 + 183 + 219	181	1.20	146 + 145 + 109
Diazinon	179 + 137 + 199	179	1.45	121 + 163 + 137
Pirimicarb	166 + 238	166	1.70	96 + 137 + 123
Ethiofencarb	107 + 77 + 168	107	1.30	77 + 79 + 91
Chlorpyrifos-methyl	286 + 288	288	1.40	243 + 273 + 210
Metribuzin	198	198	1.30	110 + 151 + 153
Heptachlor	272 + 274 + 270	272	1.30	237 + 235
Metalaxyl	160 + 206 + 190	160	1.10	130 + 144 + 145
Terbutryn	185 + 226 + 170	185	0.95	170
Malathion	127 + 173 + 99	173	0.95	127 + 99 + 117
Aldrin	263 + 265 + 293	263	1.60	193 + 191 + 227
Chlorpyrifos	314 + 258 + 199	314	1.25	258 + 286
Fenthion	278	278	1.35	245 + 213 + 169
Pendimethalin	252 + 162 + 191	252	1.20	162 + 191 + 208
Heptachlor epoxide	353 + 355 + 351	353	1.40	263 + 317 + 334
Endrin	246 + 248	246	1.65	176
Oxadiazon	175 + 258 + 177	175	1.15	112 + 147 + 140
Buprofezin	175 + 104 + 249	175	1.15	117 + 132 + 130
Oxyfluorfen	252 + 300 + 317	252	1.40	170 + 196 + 169
Dieldrin	245 + 243	245	1.25	173 + 209 + 175
Diclofop-methyl	340 + 253 + 342	340	1.15	253 + 281 + 254
Propargite	135 + 173 + 201	135	1.05	107 + 77
Carbofuran	160	160	1.30	104 + 118
Fenoxycarb	116 + 255	116	1.20	88 + 89

^a V, voltaje de excitación

1.4. – Determinación de multiresiduos de pesticidas

Aprovechando la excelente capacidad de separación que ofrece un cromatógrafo de gases y la extraordinaria selectividad que ofrece la detección por tándem masas, podemos ser capaces de determinar una gran cantidad de

compuestos simultáneamente en una sola determinación cromatográfica. De esta forma se determinó conjuntamente una mezcla que contenía un gran número de plaguicidas, de distintas familias, incluyendo pesticidas piretroides entre otros. Las condiciones de medida en tándem masas para estos compuestos se muestran en la tabla 3.5.

2. - Extracción de insecticidas piretroides de suelos por MAE

Para poder realizar extracciones asistidas por microondas (MAE) es imprescindible que los analitos a determinar sean estables, tanto a esta radiación, como al calentamiento que provoca. Existe un gran número de especies que son estables a este tratamiento y han sido ampliamente estudiadas, como por ejemplo los contaminantes PCBs y PAHs o multitud de pesticidas organoclorados [Pastor 1996]. En el momento en que se realizó este estudio no existía ninguna metodología para la extracción de pesticidas piretroides empleando microondas. Por lo que la primera etapa consistió en comprobar la estabilidad de estos compuestos durante el calentamiento por microondas. Para ello se irradió a la máxima potencia (700 W, 12 min) un patrón de 500 µg/L y se calculó la recuperación obtenida para cada uno de los compuestos estudiados, siendo todas ellas superiores al 94%. Posteriormente se ha encontrado otra referencia de extracción asistida por microondas de los piretroides Acrinathrin, Bifenthrin, λ-Cyhalothrin y Deltamethrin en fresas, presentando también una excelente estabilidad [Sanusi 2004].

2.1. - Limpieza de extractos de suelo

Una vez asegurada la estabilidad de estos compuestos el siguiente paso consiste en buscar un método de limpieza adecuado para los extractos de suelos tratados por microondas. Debido a las altas presiones y temperaturas que se alcanzan en los reactores, se extrae una mayor cantidad de matriz de muestra, entre la que destacamos materia orgánica y azufre. El procedimiento empleado para esta limpieza del extracto consistió en un fraccionamiento con columnas de florisil, previamente empleado por nuestro grupo para el análisis de diversos contaminantes en sedimentos extraídos por microondas [Peris 2005]. El inconveniente de emplear florisil para el fraccionamiento de piretroides, consiste en que, debido a que son compuestos con una ligera polaridad, es necesario el empleo de un disolvente más polar para su elución. De esta forma debemos de elegir el disolvente más apropiado para que la elución de piretroides sea

cuantitativa y la extracción de matriz mínima. Para ello se emplearon distintos disolventes como: diclorometano:hexano (1:2, v/v), éter dietílico o acetato de etilo. Siendo el acetato de etilo el que presentó una mejor elución de los piretroides retenidos en el florisil. Pero debido a la polaridad del disolvente también eluyen gran cantidad de componentes de la matriz de la muestra, que no presentan ningún residuo sólido visible, pero si un elevado número de picos cromatográficos que interfieren con nuestros analitos. Para ello se redujo la polaridad del acetato de etilo, combinándolo con hexano en distintas proporciones, de esta forma al reducir la polaridad de la mezcla, se eluirán menos componentes de la matriz. Como muestra la figura 3.8, una mezcla de acetato de etilo:hexano (33%, v/v) es la que proporciona una recuperación cuantitativa para los piretroides estudiados y una mínima coextracción de componentes de la matriz de la muestra.

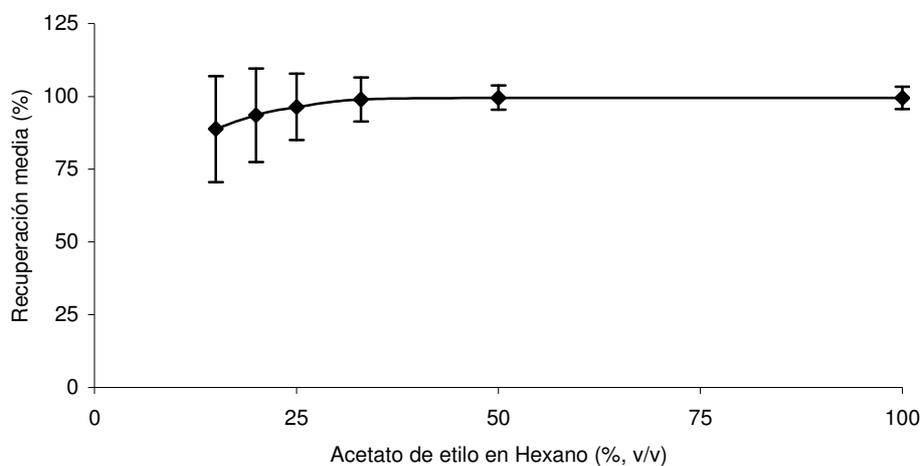


Figura 3.8. Recuperación media de piretroides retenidos en florisil y eluidos con distintas mezclas acetato de etilo – hexano.

Tras la extracción por microondas y el fraccionamiento con florisil de muestras de suelo se observó la presencia de azufre elemental, presente en suelos con elevada actividad microbiana [Bravo 2004]. La presencia de pequeñas cantidades de azufre en el extracto, impide la determinación cromatográfica debido a que aparecen picos de gran tamaño, que interfieren con los analitos a medir,

sobretudo al emplear detectores ECD. Por lo que se adicionaron al extracto hilos de cobre activo, durante varias horas, para reducir y eliminar estos restos de azufre, como se emplea en otros estudios encontrados en la bibliografía [Pastor 1997, Peris 2005].

2.2. - Parámetros de extracción por microondas

Una vez desarrollado el método de limpieza de extractos adecuado para la determinación de piretrinas en suelos, se prosiguió con la búsqueda de las mejores condiciones para la extracción del suelo por microondas. Para ello, se empleó un horno de microondas doméstico, por lo que las únicas variables a modificar fueron: potencia del magnetrón (350, 500 y 750 W) y tiempo de extracción (3, 6, 9 y 12 minutos). Todas las extracciones se realizaron en reactores de teflón (PTFE) de 100 mL de volumen interno, empleando 2 gramos de suelo y 11 mL de tolueno:agua (10:1) como disolvente, condiciones similares a las empleadas para la extracción por MAE de PCBs y PAHs [Peris 2005].

Para calcular las recuperaciones se emplearon suelos exentos de piretrinas, que fueron liofilizados y tamizados a 250 μm . Posteriormente se añadieron 0.2 mL de un patrón multicomponente de 500 $\mu\text{g/L}$ de piretrinas en isooctano, se dejó evaporar a temperatura ambiente y se añadió 1 mL de agua, removiendo con una varilla de vidrio. El suelo se mantuvo a 8°C durante 48 horas para fomentar la unión de los insecticidas al suelo. Los valores de recuperación se calcularon como el cociente entre concentración encontrada después de todo el tratamiento de la muestra y lo añadido previamente. La figura 3.9 muestra las recuperaciones obtenidas según las distintas condiciones empleadas. Todas las extracciones se realizaron a intervalos de 3 minutos de extracción seguidos de tres minutos de reposo, para evitar sobrepresiones en el reactor que pudieran provocar fugas. Como se observa en el gráfico, son necesarios 9 minutos de extracción a 700 W para obtener recuperaciones cuantitativas en la extracción de insecticidas piretroides. Para potencias menores se requiere un tiempo de extracción de 12 minutos para la completa extracción de estos compuestos.

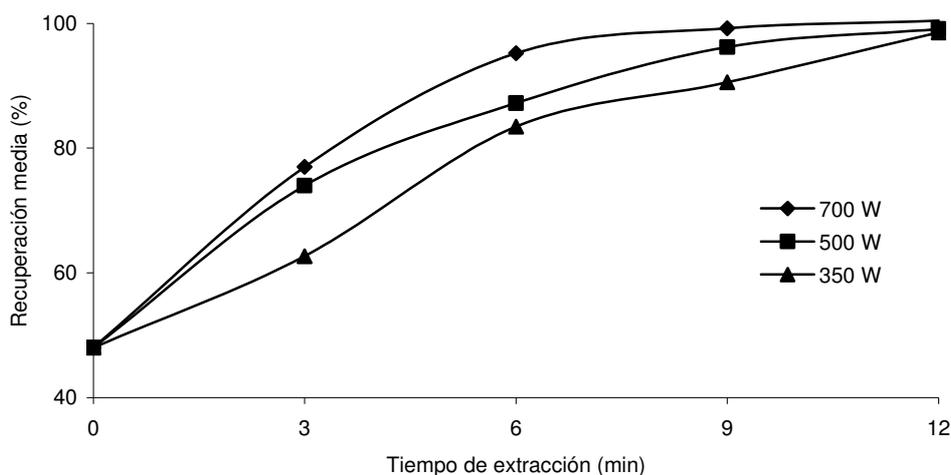


Figura 3.9. Recuperación media de piretroides extraídos de suelos, empleando distintas condiciones de extracción asistida por microondas. (Los valores a tiempo cero corresponden a una extracción sin el empleo de energía de microondas durante 2 horas).

2.3. - Parámetros analíticos del método

Empleando el método desarrollado se obtienen recuperaciones cuantitativas para los insecticidas piretroides. La sensibilidad del método es adecuada alcanzando límites de detección entre 1 y 3 ng/g con detección ECD y entre 0.3 y 0.7 ng/g con detección NCI-MS. Excepto el Phenothrin que presenta una peor sensibilidad debido al reducido número de átomos electronegativos en su estructura, obteniendo límites de detección de 200 y 2 ng/g para detecciones por ECD y NCI-MS respectivamente.

Para asegurar la efectividad del método de MAE propuesto, se extrajeron los piretroides de muestras reales durante 9 minutos y se compararon los resultados con los obtenidos por un método de referencia, que consistió en una extracción con ultrasonidos por triplicado empleando el mismo disolvente. Las muestras reales analizadas fueron suelos de cultivo que habían sido sometidos a distintos tratamientos con pesticidas, incluyendo insecticidas piretroides. La tabla

3.6 muestra los piretroides encontrados en estas muestras y la concentración para cada uno de ellos obtenida por ambos métodos, siendo los resultados comparables. Como se observa en la tabla, existen niveles apreciables de residuos de insecticidas piretroides en suelos cultivados, a pesar de que estos plaguicidas estén considerados como de rápida biodegradación [Extoxnet].

Tabla 3.6. Niveles de insecticidas piretroides encontrados en suelos cultivados extraídos por ultrasonidos y por MAE.

Compuestos encontrados		Concentración (ng/g \pm s, n=2)	
		Ultrasonidos	MAE
Muestra 1	Deltamethrin	52.2 \pm 0.7	52.5 \pm 0.6
	Cypermethrin	4.7 \pm 0.2	4.8 \pm 0.2
Muestra 2	Cypermethrin	8.6 \pm 0.1	8.93 \pm 0.02
Muestra 3	Deltamethrin	26.6 \pm 0.7	29.0 \pm 0.5
	Bifenthrin	36.3 \pm 0.3	37.6 \pm 0.5

3. - Extracción de insecticidas organoclorados de suelos y lechugas con disolventes presurizados

3.1. - Extracción de insecticidas organoclorados de suelos

En una primera etapa se realizaron determinaciones de insecticidas organoclorados en suelos a través de una extracción con fluidos presurizados (PFE) desarrollada previamente [Scott 2003]. Para ello se introdujeron 8 g de suelo en reactores de acero de 33 mL de volumen interno, completando el volumen con un agente desecante (hydromatrix). La extracción se realizó con acetona:diclorometano (1:1, v/v) a 100°C y 2000 psi durante 10 minutos. El extracto se evaporó hasta 10 mL empleando un flujo de nitrógeno y se determinó por GC-MS sin ningún tratamiento del extracto.

Para comprobar la eficiencia en la extracción de estos insecticidas de suelos se determinó una muestra certificada por el método PFE y por un método Soxhlet empleado como referencia. El suelo empleado fue CRM 805-050 suministrado por *Resource Technology Corporation* (Laramie, USA), los compuestos encontrados y su respectiva concentración, obtenida por ambos procedimientos de extracción, se muestran en la tabla 3.7 y están todos ellos dentro del rango indicado por el proveedor de la muestra certificada, a excepción de los valores para el Endrin aldehído y DDT que están por debajo del límite de detección del método.

Table 3.7. Determinación de insecticidas organoclorados en una muestra certificada de suelo (CRM 805-050), empleando extracción Soxhlet y fluidos presurizados.

Compuesto	Concentración ($\mu\text{g/g} \pm \text{ts}$, n=3)		
	Valor certificado	Soxhlet	PFE
Lindane	11 \pm 5	11.5 \pm 0.5	10.2 \pm 0.8
α -Endosulfan	7 \pm 4	3.2 \pm 0.6	2.9 \pm 0.3
DDE	19 \pm 9	26.6 \pm 0.6	23.3 \pm 0.5
Endrin	13 \pm 8	18.3 \pm 0.4	20.9 \pm 0.8
β -Endosulfan	6 \pm 3	4.3 \pm 0.9	3.7 \pm 0.6
DDD	20 \pm 9	22.0 \pm 0.5	17 \pm 1
Endrin aldehído	0.1 \pm 0.2	- ^a	- ^a
DDT	0.8 \pm 0.3	- ^a	- ^a
Methoxychlor	16 \pm 8	17.7 \pm 0.3	15.1 \pm 0.9

^a Resultado inferior al LOD.

Los cromatogramas obtenidos para ambos extractos se encuentran en la Figura 3.10, proporcionando señales similares y sin observarse picos anómalos originarios de la matriz del suelo.

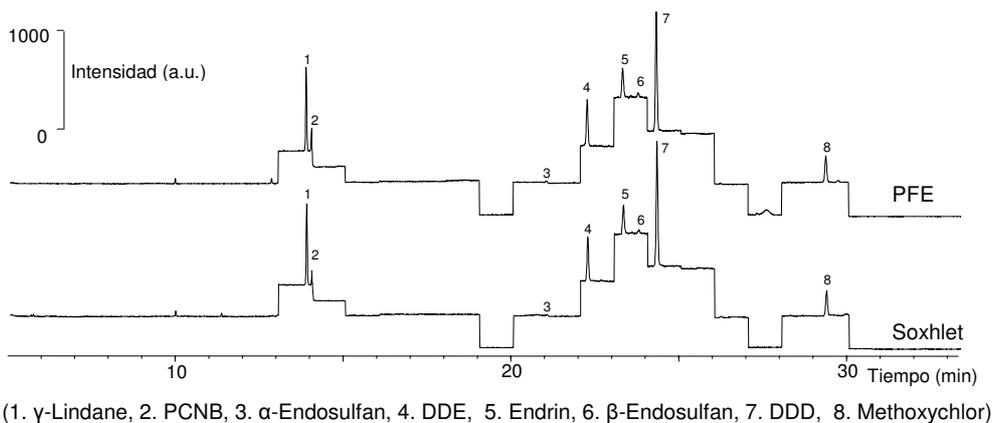


Figura 3.10. Cromatogramas de extractos del suelo CRM 805-050, empleando extracción Soxhlet y PFE. (Condiciones de medida en Tabla 3.3).

3.2. - Extracción de Endosulfan de lechugas

Para la determinación de Endosulfan (α -Endosulfan, β -Endosulfan y su principal metabolito Endosulfan sulfato) en lechugas se usaron las mismas condiciones de extracción empleadas en el análisis de insecticidas organoclorados en suelos. Las hojas de lechuga fresca se lavaron con abundante agua desionizada, comprobando que no quedaran restos de suelo adherido y se secaron suavemente con papel. Se utilizaron las celdas de PFE más pequeñas disponibles (de 11 mL de volumen interno), se introdujeron 1.5 gramos de lechuga troceada y se intercalaron pequeños volúmenes de hydromatrix[®] hasta rellenar completamente la celda de extracción. Para conocer la eficiencia de la extracción por PFE, se fortificaron muestras de lechuga con 33 $\mu\text{g/g}$ de Endosulfan, inyectando directamente con una aguja 100 μL de patrón en el interior de hojas y de tallos por separado y se extrajeron empleando tres ciclos consecutivos de extracción. La figura 3.11 muestra las recuperaciones obtenidas para los compuestos de Endosulfan empleando uno, dos o tres ciclos de extracción, mostrándose claramente que con solo dos ciclos de extracción se produce la

máxima recuperación de los compuestos estudiados. Los resultados para lechugas fortificadas con Endosulfan son similares para ambos casos, independientemente que extraigamos hojas o tallos de lechuga, proporcionando recuperaciones entre el 72 y 77 % empleando dos ciclos de extracción.

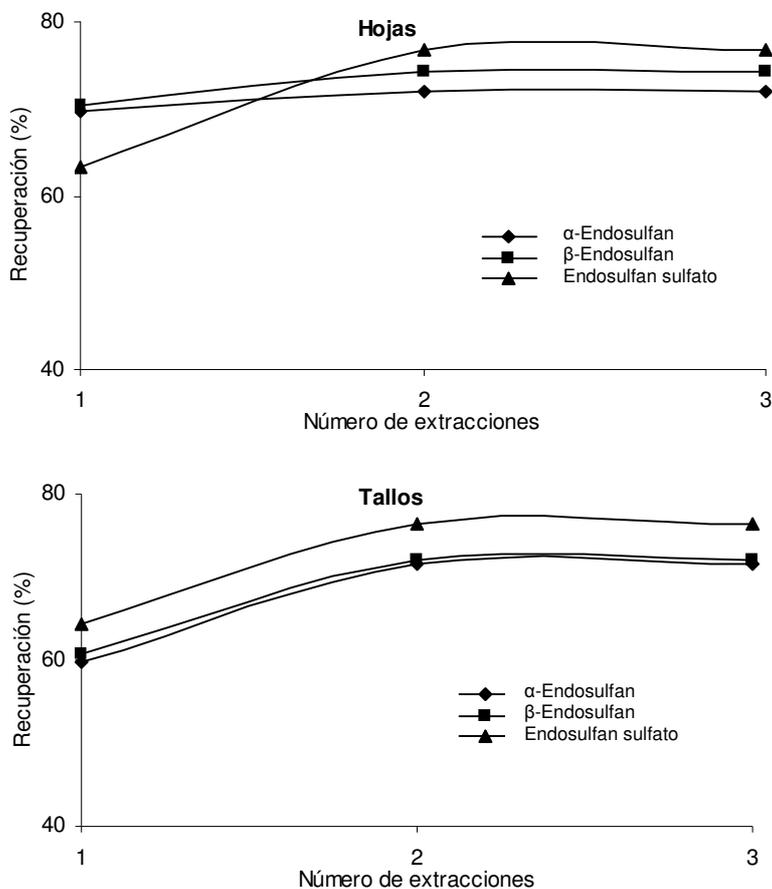


Figura 3.11. Recuperaciones obtenidas en la extracción de Endosulfan de hojas (A) y tallos (B) de lechugas por PFE empleando extracciones consecutivas.

Los límites de detección obtenidos para la determinación de α -Endosulfan, β -Endosulfan y Endosulfan sulfato, extraídos de lechugas por PFE, son 0.05, 0.03 y 0.04 $\mu\text{g/g}$ respectivamente.

3.3. - Absorción de Endosulfan por lechugas plantadas en suelos contaminados

Para este estudio de absorción de insecticidas organoclorados en lechugas se empleó Endosulfan, debido a su uso extensivo en distintos cultivos vegetales. Se determinaron por separado los isómeros α y β y su principal metabolito el Endosulfan sulfato. En primer lugar se preparó un suelo fortificado con estos compuestos y se comprobó que el Endosulfan quedaba retenido por la materia orgánica de este. Asimismo se estudió el efecto de envejecimiento de este insecticida en el suelo, que indica una mayor retención del compuesto en el suelo cuanto mayor sea el tiempo en que estén en contacto. Este envejecimiento también puede indicar una posible degradación química o microbiológica de plaguicida.

Para ello se fortificaron 5 g de suelo con Endosulfan, añadiendo el patrón de insecticida disuelto en 40 mL de acetona para obtener una concentración de 20 $\mu\text{g/g}$ en suelo. Se dejó evaporar a temperatura ambiente durante una noche y se extrajo por el método antes descrito. Se prepararon varias réplicas que se determinaron a tiempo cero, 6 y 14 días. Las recuperaciones obtenidas para cada compuesto se muestran en la figura 3.12, donde se observa la evolución en la extracción de cada compuesto.

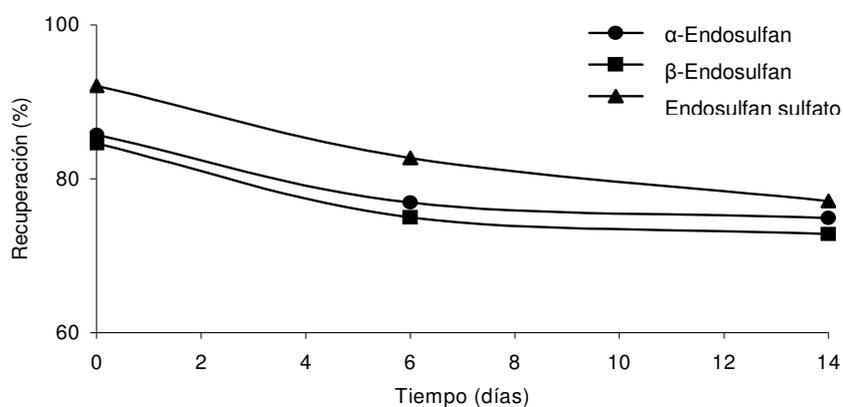


Figura 3.12. Efecto de envejecimiento en la fortificación de suelos con 20 $\mu\text{g/g}$ de Endosulfan.

Una vez comprobado que el Endosulfan permanece disponible para ser absorbido por las lechugas se procedió a la preparación de suelo contaminado con Endosulfan en grandes cantidades, para emplearlo como medio de cultivo de lechugas preplantadas y dejarlas crecer durante 10, 20 y 33 días para determinar la cantidad de compuestos de Endosulfan que absorben. Para ello se prepararon dos lotes de suelo contaminado, cada uno de ellos a distinto nivel de concentración, 10 y 50 $\mu\text{g/g}$ de Endosulfan, de la siguiente forma. A 800 g de suelo se añadieron 8 o 50 mg de cada uno de estos compuestos, según lote, disueltos en 2 litros de acetona, dejando secar a temperatura ambiente durante 48 horas y homogeneizando la mezcla cada 12 horas.

Las plantas de lechuga empleadas en este estudio, mostradas en la figura 3.13 tenían una altura inicial de 10 centímetros y un peso entre 15 y 20 gramos. Se llenaron macetas con 40 g de suelo sin tratar y con suelo contaminado de 10 y 50 $\mu\text{g/g}$. Seguidamente se introdujeron en ellas las lechugas con la menor cantidad posible de suelo de origen, se regaron y se colocaron en un invernadero bajo luz artificial, con ciclos de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de oscuridad. La humedad y temperatura del aire fue monitoreada durante todo el proceso, oscilando entre 43 y 79 % de humedad y una temperatura entre 15.2 y 24.1 $^{\circ}\text{C}$. La capacidad de retención de agua del suelo se determinó experimentalmente, estimándose en 20 mL, por lo que cada día se regó cada una de las macetas con 20 mL de agua corriente.



Figura 3.13. Plantas de lechuga empleadas en el estudio de absorción de Endosulfan.

Estas plantas se dejaron crecer durante 10, 20 y 33 días, tras este tiempo de cultivo se desenterraron cuidadosamente las raíces y se lavó la planta en su totalidad con abundante agua desionizada, secándose con papel. Se determinó la cantidad de Endosulfan absorbido por las raíces y por las hojas de lechuga independientemente, empleando el método PFE antes descrito. Las plantas de lechuga cultivadas en suelo no contaminado se emplearon como blancos, para comprobar la ausencia de contaminaciones de Endosulfan de origen desconocido. La tabla 3.8 muestra la evolución en la concentración de Endosulfan encontrado en raíces y hojas de las lechugas plantadas en suelos contaminados, durante los 10, 20 y 33 días que duró el estudio.

Tabla 3.8. Absorción de Endosulfan por lechugas cultivadas en suelos contaminados.

Compuesto	Suelo ^a ($\mu\text{g/g}$)	Concentración ($\mu\text{g/g} \pm \text{s}$, n = 3)					
		Día 10		Día 20		Día 33	
		Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja
α -Endosulfan	10	0.3 \pm 0.2	- ^b	1.4 \pm 0.7	- ^b	1.7 \pm 0.3	- ^b
β -Endosulfan	10	0.12 \pm 0.08	- ^b	1.0 \pm 0.6	- ^b	1.5 \pm 0.3	- ^b
Endosulfan sulfato	10	0.14 \pm 0.06	- ^b	1.2 \pm 0.5	- ^b	1.5 \pm 0.4	- ^b
α -Endosulfan	50	0.5 \pm 0.3	- ^b	1.7 \pm 0.8	- ^b	2.5 \pm 0.6	0.08 \pm 0.04
β -Endosulfan	50	0.4 \pm 0.2	- ^b	0.8 \pm 0.3	- ^b	2.3 \pm 0.6	0.05 \pm 0.01
Endosulfan sulfato	50	0.5 \pm 0.2	- ^b	1.2 \pm 0.4	- ^b	1.7 \pm 0.4	0.07 \pm 0.01

^a Concentración de Endosulfan adicionada al suelo.

^b Resultado obtenido inferior al LOD

Como se observa en la tabla 3.8, la concentración de Endosulfan en las raíces aumenta con el tiempo de cultivo en el suelo contaminado, llegando a alcanzar niveles cercanos a 2 $\mu\text{g/g}$ tras 33 días de cultivo en el suelo más contaminado. La concentración de Endosulfan encontrado en hojas es mucho más baja que en raíces, como era de esperar, ya que la absorción de este compuesto se produce en las raíces y se va distribuyendo lentamente por el resto de la planta, además de una progresiva dilución debida al propio crecimiento de la planta. Los niveles de Endosulfan encontrado en hojas están siempre por debajo del límite de detección, a excepción de las plantas cultivadas durante 33 días en el suelo más contaminado, que revelaron concentraciones de 0.05 a 0.08 $\mu\text{g/g}$ de los distintos compuestos de Endosulfan estudiados.

4. - Limpieza del extracto de la muestra para el análisis cromatográfico de insecticidas piretroides en muestras grasas.

4.1. – Eficiencia de distintas metodologías para la limpieza del residuo.

El objetivo del presente estudio consiste en diseñar una metodología para la limpieza de extractos grasos en determinaciones de insecticidas piretroides. Tomaremos aceite de oliva como modelo de muestra, ya que es una muestra totalmente grasa y además en ella pueden observarse residuos de pesticidas piretroides procedentes del tratamiento de los olivos. En la mayoría de métodos existentes en la bibliografía para la determinación de piretroides en muestras grasas, como aceites, mantequillas, leche o alimentos, el primer procedimiento para la limpieza del extracto consiste en una partición con acetonitrilo-hexano [Rosenblum 2002], por lo que lo emplearemos como tratamiento estándar. Los insecticidas piretroides se transfieren a la fase de acetonitrilo, mientras que los compuestos grasos permanecen disueltos en la del hexano. El problema que presenta esta metodología es que solo es capaz de eliminar el 99% de grasa, dejando un residuo sólido del 1%, que imposibilita una determinación cromatográfica directa. Por lo que es necesario buscar una metodología adicional para eliminar la mayor parte posible de residuo sólido. Las alternativas que se valoraron fueron primero GPC [Barrek 2003] y posteriormente extracción con fase sólida con distintas fases como: florisil [Zehring 2001], C₁₈ [Di Muccio 1999], alúmina [Lentza-Rizos 2001] y carbón grafitizado [Ramesh 1998].

El procedimiento de limpieza basado en GPC se realizó con las mismas condiciones que en la separación de PAHs en aceite de oliva [Martínez-López 2005], que consistieron en dos columnas Envirogel GPC de Waters de (19 × 150 mm y 19 × 300 mm), empleando 5 mL/min de diclorometano como fase móvil y detección por ultravioleta a 254 nm. Los insecticidas piretroides estudiados eluyeron entre 10.5 y 13.0 minutos, por lo que no pueden separarse del pico del aceite que es mucho más ancho y coeluye a este tiempo de retención, pero podemos emplear esta técnica acoplada a otras para mejorar el proceso de limpieza del extracto.

Se probaron distintas fases estacionarias para realizar extracciones en fase sólida, como: florisil, carbón grafitizado (GCB), C₁₈ y alúmina en las tres variantes disponibles ácida, básica y neutra. Como disolvente de carga y de elución se empleó acetonitrilo para poder tratar los extractos directamente después de realizar la partición con acetonitrilo-hexano. En primer lugar se comprobó la elución de los insecticidas piretroides al hacerlos pasar por cada una de estas fases sólidas, siendo en todos casos cuantitativa a excepción de la alúmina que fue necesario desactivarla con un 10 % de agua para alúminas ácida y neutra y con un 5 % de agua para alúmina básica.

Para cuantificar cual es el mejor método de limpieza del extracto, se emplearon 5 g de aceite de oliva, que se disolvieron en 5 mL de hexano y se hicieron tres particiones con 5 mL de acetonitrilo. El extracto de 15 mL de acetonitrilo, que contiene aproximadamente 50 mg de residuo graso, se hizo pasar por los distintos cartuchos y se determinó gravimétricamente cual era la cantidad de residuo que permanecía disuelto en el acetonitrilo. La tabla 3.9 muestra los resultados de estas experiencias, siendo los cartuchos de C₁₈ los que proporcionaban el menor residuo graso, a pesar de ello 11 mg sigue siendo una cantidad de residuo demasiado alta para la inyección directa en el cromatógrafo de gases.

Tabla 3.9. Rendimiento de distintas metodologías de limpieza de extractos en 5 g de aceite tras una partición acetonitrilo-hexano.

Método de limpieza	Residuo graso (n=3)	
	mg ± s	% (w/w) ^a ± s
Ninguno	56 ± 8	1.1 ± 0.2
Florisil	36 ± 3	0.70 ± 0.05
Carbón grafitizado (GCB)	22 ± 4	0.43 ± 0.06
C ₁₈	11 ± 1	0.22 ± 0.02
a-Al ₂ O ₃ (10%)	17 ± 4	0.34 ± 0.08
n-Al ₂ O ₃ (10%)	19.2 ± 0.3	0.37 ± 0.01
b-Al ₂ O ₃ (5%)	17.1 ± 0.2	0.34 ± 0.01
GPC Envirogel	9.7 ± 0.1	0.19 ± 0.01
C ₁₈ + GPC	4.4 ± 0.9	0.09 ± 0.02
a-Al ₂ O ₃ (10%) + GPC	5.5 ± 0.3	0.11 ± 0.01
n-Al ₂ O ₃ (10%) + GPC	5 ± 1	0.10 ± 0.02
b-Al ₂ O ₃ (5%) + GPC	5.1 ± 0.1	0.10 ± 0.01
a-Al ₂ O ₃ (10%) + C ₁₈	3 ± 1	0.06 ± 0.02
n-Al ₂ O ₃ (10%) + C ₁₈	5 ± 1	0.10 ± 0.02
b-Al ₂ O ₃ (5%) + C ₁₈	2.2 ± 0.9	0.04 ± 0.02

^a El porcentaje de residuo se calculó respecto a la cantidad inicial de aceite empleada.

De igual forma se determinó la cantidad de residuo sólido que permanecía en el extracto después de una separación por GPC, recogiendo de 10.5 a 13.0 minutos el extracto obtenido tras el proceso de partición, siendo de 10 mg, también demasiado elevada para una inyección directa.

Finalmente se determinaron los cromatogramas de GPC correspondientes a los extractos de aceite después de ser tratados por los procedimientos empleados: partición y las distintas fases de extracción en fase sólida. La figura 3.14 muestra estos cromatogramas en los que se observa la presencia de un pico muy ancho de 8.5 a 10.5 minutos, seguido de otros más pequeños. El efecto del GCB y del florisil es similar, reduciéndose todos los picos, sin embargo el empleo de las fases C_{18} y alúmina básica proporcionaban perfiles cromatográficos muy distintos (líneas amarilla y naranja). La alúmina básica elimina el pico de 9.4 minutos, mientras que la fase C_{18} elimina el de 9.9 minutos, por lo que el empleo de ambas fases en una extracción en fase sólida conjunta, sería capaz de eliminar ambos picos completamente.

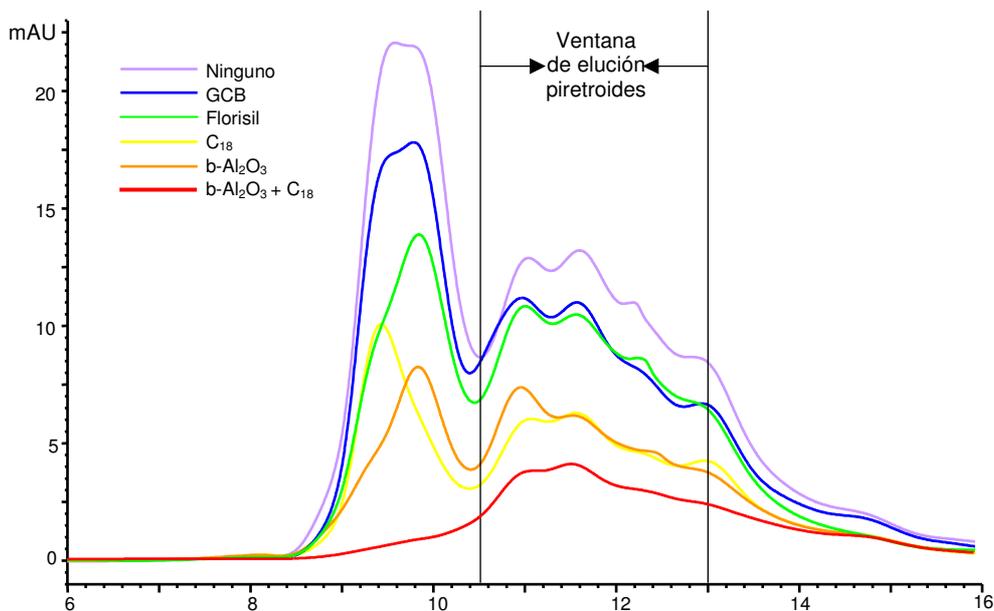


Figura 3.14. Cromatogramas de GPC de residuos de partición acetoneitrilo-hexano de 5 g de aceite de oliva sometidos a distintos procedimientos de limpieza de extractos.

La tabla 3.9 también muestra los residuos grasos obtenidos tras combinar distintas fases sólidas con GPC y entre ellas, siendo la combinación de alúmina básica y C₁₈ la que más reduce el residuo sólido. Como se muestra en la figura 3.14 (línea roja) el pico de 8.5 a 10.5 minutos del aceite desaparece casi en su totalidad empleando esta combinación de fases sólidas, que proporciona un residuo sólido de 2 mg, que permite la inyección directa en el cromatógrafo de gases, sin ensuciar excesivamente el sistema.

4.2. – Parámetros analíticos en la determinación de piretroides en aceites

La búsqueda de las mejores condiciones de limpieza del extracto se realizó con aceite de oliva, pero para comprobar que esta metodología es igualmente válida para otros aceites vegetales, se realizaron ensayos de recuperación a dos niveles de concentración en aceites de girasol, maíz y soja. La tabla 3.10 muestra los resultados obtenidos, siendo todas las recuperaciones cuantitativas y oscilando entre 91 y 104% para aceites de oliva y de 91 a 115% para el resto de aceites vegetales.

Tabla 3.10. Recuperación de insecticidas piretroides en aceites vegetales fortificados.

Compuesto	Recuperación (% ± s, n=3)							
	Oliva		Girasol		Maíz		Soja	
	100 ng/g	25 ng/g	100 ng/g	25 ng/g	100 ng/g	25 ng/g	100 ng/g	25 ng/g
Tetramethrin	99 ± 3	103 ± 7	103 ± 3	97 ± 7	102 ± 5	109 ± 8	96 ± 6	102 ± 5
Bifenthrin	100 ± 1	100 ± 5	98 ± 1	101 ± 5	107 ± 2	115 ± 3	99 ± 2	97 ± 4
Phenothrin	102 ± 1	99 ± 2	101 ± 1	100 ± 2	99 ± 2	99 ± 1	97 ± 2	99 ± 3
λ-Cyhalothrin	104 ± 2	96 ± 9	98 ± 4	95 ± 1	98 ± 2	92 ± 1	94 ± 1	92 ± 4
Permethrin	99 ± 3	99 ± 3	99 ± 2	101 ± 2	101 ± 2	102 ± 5	99 ± 3	98 ± 2
Cyfluthrin	101 ± 2	96 ± 4	100 ± 3	97 ± 4	101 ± 4	97 ± 2	98 ± 2	97 ± 3
Cypermethrin	100 ± 2	103 ± 7	101 ± 3	97 ± 4	104 ± 5	100 ± 4	97 ± 3	95 ± 5
Flucythrinate	98 ± 2	97 ± 4	99 ± 3	95 ± 5	98 ± 2	95 ± 2	94 ± 2	91 ± 3
Esfenvalerate	103 ± 3	91 ± 9	99 ± 2	98 ± 2	97 ± 3	95 ± 7	95 ± 1	91 ± 4
Fluvalinate	97 ± 5	91 ± 9	98 ± 3	97 ± 3	99 ± 3	102 ± 3	97 ± 2	99 ± 5
Deltamethrin	97 ± 5	96 ± 2	100 ± 5	92 ± 9	110 ± 2	102 ± 7	99 ± 2	94 ± 9

Con el empleo de la metodología propuesta se obtienen límites de detección entre 0.3 y 1.4 ng/g empleando detección tándem masas. Los cromatogramas obtenidos para un aceite de oliva fortificado con 25 ng/g de insecticidas piretroides se muestran en la figura 3.15, donde se observan los espectros tándem masas para cada uno de los compuestos estudiados.

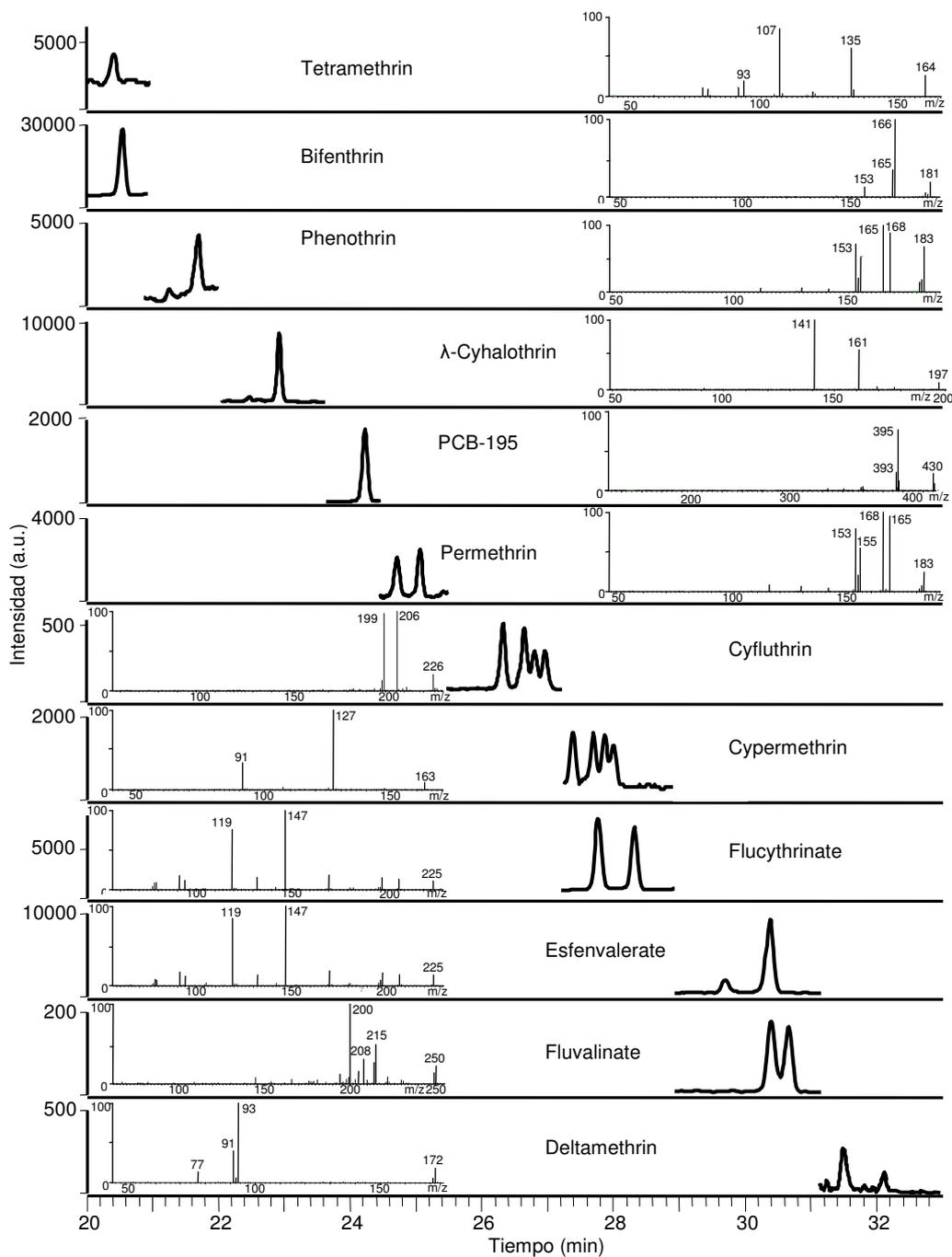


Figura 3.15. Cromatograma y espectros MS-MS de piretroides extraídos de aceite de oliva fortificado a 25 ng/g, empleando el procedimiento recomendado.

5. - Extracción de plaguicidas de dispositivos de membrana semipermeable (SPMDs).

5.1. - Extracción asistida por microondas de piretroides retenidos en SPMDs.

En primer lugar, se estudió la estabilidad física de las membranas frente al tratamiento por microondas. Para ello se extrajeron SPMDs durante 10 minutos a distintas temperaturas y con 30 mL de distintos disolventes, empleando un horno microondas específico de laboratorio. Como era de esperar, la temperatura máxima de trabajo del SPMD depende del disolvente empleado, por lo que para disolventes polares como acetonitrilo o acetato de etilo la temperatura máxima de trabajo es de 100 °C, mientras que para disolventes poco polares como hexano o tolueno, la temperatura de trabajo no puede ser mayor de 70 °C. La extracción de SPMDs con mezclas de disolventes, como: hexano-acetona o tolueno-acetona, ambos al 50 % v/v, permite tratamientos a 90 °C. Si se superan estas temperaturas se disuelve completamente el SPMD formándose una pasta formada por plástico, trioleína y disolvente que no permite la posterior separación del disolvente. El aspecto de un SPMD antes y después del tratamiento por microondas se muestra en la figura 3.16, donde se aprecia claramente que la membrana de polietileno mantiene su estructura, aunque con una consistencia mucha más rígida.

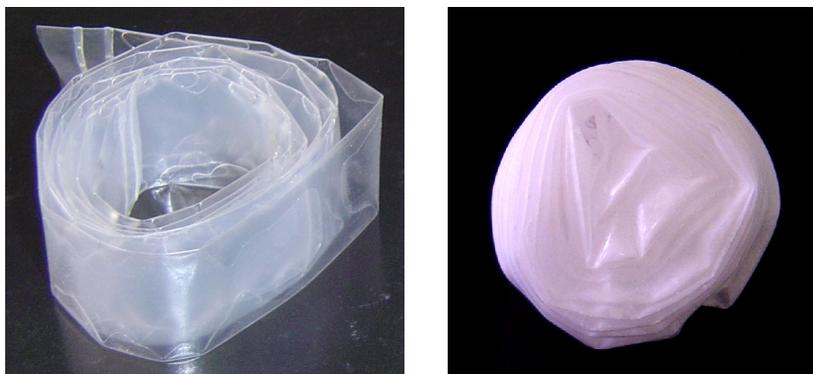


Figura 3.16. Fotografías de SPMDs antes y después de ser extraídas por MAE con acetona-hexano a 70 °C durante 10 minutos.

Se adicionaron SPMDs con 100 ng de cada uno de los piretroides estudiados, introducidos directamente en la trioleína, y se extrajeron por microondas, empleando distintos disolventes a su temperatura máxima de trabajo. La tabla 3.11 muestra las recuperaciones obtenidas para cada disolvente, siendo la extracción con tolueno la que mejor recuperaciones proporciona tras dos ciclos consecutivos de extracción. Sin embargo, la extracción con tolueno requiere una potencia de 1000 W para alcanzar la temperatura de extracción, lo que puede reducir la vida media del magnetrón si el uso es muy frecuente. Por esta razón se optó por el empleo de acetona-hexano como disolvente, que tras dos ciclos proporciona una recuperación media de piretroides de 91 ± 10 % con un requerimiento mucho menor de potencia, lo que aumenta la vida media del magnetrón.

Tabla 3.11. Condiciones de extracción por MAE y recuperaciones de insecticidas piretroides (100 ng) en SPMDs fortificados, empleando distintos disolventes.

Disolvente	Temperatura (°C)	Potencia (W)	Ciclos	Recuperación (% \pm s, n = 2)	Extracto (g)
Hexano	70	1000	1	58 \pm 11	0.56
			2	78 \pm 12	0.82
Tolueno	70	1000	1	80 \pm 14	0.82
			2	98 \pm 11	1.04
Ciclohexano-hexano	70	1000	1	55 \pm 13	0.66
			2	73 \pm 15	1.72
Acetonitrilo	100	150	1	42 \pm 9	0.08
			2	57 \pm 9	0.11
Etil acetato	100	400	1	52 \pm 8	0.89
			2	70 \pm 10	1.31
Hexano-acetona	90	250	1	66 \pm 9	0.91
			2	91 \pm 10	1.45
Tolueno-Acetona	90	200	1	61 \pm 16	1.12
			2	82 \pm 20	1.50
Hexano (Diálisis)	-	-	1+2	79 \pm 16	0.03

Como ha quedado confirmado en otros estudios realizados en la presente tesis doctoral, los insecticidas piretroides presentan una elevada estabilidad a las microondas, por lo que un tratamiento con acetona-hexano al 50 % v/v a una temperatura de 90 °C no provoca ninguna descomposición o degradación de estos compuestos. Como se observa en la tabla 3.11, el empleo de estas condiciones,

extrae aproximadamente 1.5 g de matriz de la muestra, principalmente formados por plastificantes y trioleína, por lo que se requiere un proceso efectivo de limpieza de extractos; así que se empleó la metodología desarrollada en el capítulo anterior para la determinación de insecticidas piretroides en aceites vegetales.

Para asegurar la eficiencia del método de extracción desarrollado, se realizó un estudio comparativo entre MAE y el método de referencia, que para este tipo de muestras consiste en una doble diálisis con 200 mL de hexano durante 24 horas [Petty 1993]. Como muestra se emplearon SPMDs (n=4) que se habían desplegado en una habitación cerrada, la cual había sido tratada previamente con aerosoles domésticos de insecticidas de distinta composición y concentración. La tabla 3.12 muestra la composición y concentración de estos aerosoles y los piretroides encontrados en las distintas membranas extraídas por MAE y diálisis. Los resultados obtenidos con cada metodología fueron estadísticamente comparables, proporcionando todos ellos un valor de *t* de Student experimental menor al teórico que es 2.92 (n=2, 95%).

Tabla 3.12. Determinación de insecticidas piretroides concentrados en SPMDs (masa~4.85 g) extraídos por diálisis y por MAE.

Muestra	Compuesto	Concentración (%) ^a	Concentración ^b (µg/SPMD ± s, n=2)		
			Diálisis	MAE	<i>t</i> _{exp} (n=2) ^c
1	Tetramethrin	0.13	1.10 ± 0.02	1.07 ± 0.05	0.96
	Phenothrin	0.06	0.72 ± 0.01	0.70 ± 0.03	0.86
2	Cypermethrin	0.10	0.133 ± 0.005	0.139 ± 0.004	1.33
3	Tetramethrin	0.08	0.52 ± 0.02	0.54 ± 0.02	1.72
	Permethrin	0.04	0.224 ± 0.006	0.232 ± 0.002	1.79
	Allethrin	0.03	0.44 ± 0.02	0.416 ± 0.008	2.04
	Piperonil butóxide	0.33	2.06 ± 0.05	2.11 ± 0.08	0.97
4	Prallethrin	0.40	7.5 ± 0.1	7.3 ± 0.3	0.63
	Phenothrin	0.10	1.03 ± 0.01	1.04 ± 0.02	1.04

^a Concentración de piretroides en el aerosol comercial empleado.

^b Estos extractos fueron diluidos 10 veces para su determinación por GC.

^c El valor de *t* de Student para n=2 y 95% es 2.92

Además de comprobar la exactitud de los resultados obtenidos, se compararon los cromatogramas de GC-MS y GC-MS-MS obtenidos por ambas metodologías, MAE y diálisis, para comprobar que se han eliminado completamente los residuos de trioleína y plastificantes que pudieran interferir en

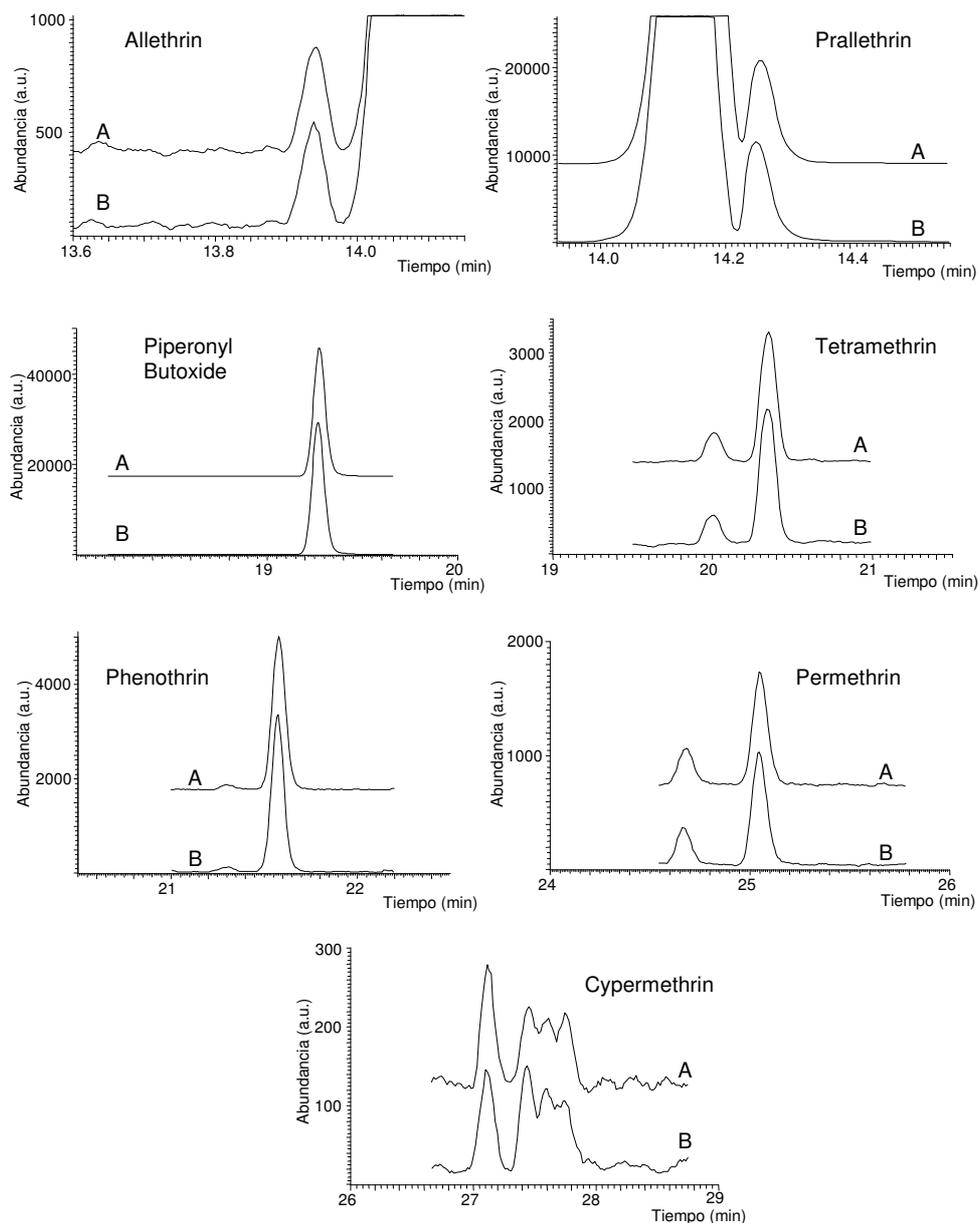


Figura 3.17. Comparación de cromatogramas GC-MS-MS de los compuestos piretroides encontrados en SPMDs extraídos por diálisis (A) y MAE (B).

el análisis cromatográfico de piretroides. La Figura 3.17 muestra los cromatogramas de los distintos piretroides encontrados por ambos métodos, en los que no se observan picos interferentes.

Empleando el procedimiento desarrollado se obtuvieron los siguientes parámetros analíticos: límites de detección de 0.3 a 0.9 ng/SPMD, precisión estimada como desviación estándar relativa de 2.9 a 9.4 % y recuperaciones de 87 ± 8 a 103 ± 7 %, a excepción del Deltamethrin que fueron del 61 ± 8 %. A modo de resumen, la tabla 3.13 muestra las principales ventajas que ofrece el procedimiento de MAE desarrollado frente al método de diálisis de referencia, en la que caben destacar principalmente el bajo consumo de disolvente y sobretodo la considerable reducción en el tiempo de extracción de 48 a 1 hora.

Tabla 3.13. Comparación de diálisis y MAE en la extracción de insecticidas piretroides de SPMDs.

Parámetro	Diálisis	MAE
Consumo de disolvente (mL)	400	60
Tiempo de extracción (horas)	48	1
Extracción de matriz (g \pm s, n = 2)	0.034 \pm 0.003	1.45 \pm 0.08
Recuperación de piretroides (% \pm s, n = 2)	79 \pm 16	91 \pm 10
Afectado por condiciones ambientales	Si	No
Inversión	Muy baja	Moderada

5.2. – Modificación del procedimiento de extracción para la determinación de plaguicidas retenidos en SPMDs.

Los compuestos estudiados en este apartado se encuentran la tabla 3.14, la mayoría de ellos han sido determinados previamente por MAE lo que confirma su estabilidad a las microondas, pero para algunos de ellos como: Propamocarb, Carbosulfan, Pirimicarb, Ethiofencarb, Metalaxyl, Fenthion, Pendimethalin, Oxadiazon, Buprofezin, Oxyfluorfen, Propargite o Fenoxycarb no existen precedentes de uso. Por este motivo se comprobó previamente la estabilidad de estos plaguicidas al tratamiento por microondas desarrollado, irradiando un patrón disuelto en acetona-hexano durante 10 minutos y calentando a 100 °C, las recuperaciones obtenidas demostraron que estos compuestos tampoco se

degradan durante el tratamiento por microondas. Para la extracción de pesticidas de SPMDs se emplearon las mismas condiciones de extracción por microondas que en la determinación de insecticidas piretroides, consistiendo en dos extracciones con 30 mL de acetona-hexano al 50 % v/v, durante 10 min a 90 °C.

Tabla 3.14. Parámetros químico-físicos de los compuestos a estudiar y recuperaciones de SPMDs adicionados con 100 ng de cada compuesto.

Compuesto	Solubilidad en agua (mg/L)	log K _{ow}	Recuperación (% ± s, n=2)	
			Dialisis	MAE
Propamocarb	700	0.08	80±2	84 ± 6
Propoxur	2000	1.56	68 ± 2	86 ± 8
HCB	0.005	6.42	30 ± 2	33 ± 2
Carbosulfan	0.03	3.30	59 ± 3	99 ± 2
Lindane	7.3	3.80	72 ± 1	96 ± 1
Diazinon	40	3.74	43 ± 2	57 ± 2
Pirimicarb	2700	1.70	52 ± 1	67 ± 4
Ethiofencarb	1900	2.04	87 ± 3	99 ± 9
Chlorpyrifos-methyl	4	- ^a	67 ± 4	89 ± 4
Metribuzin	1200	1.57	68.3 ± 0.9	96 ± 1
Heptachlor	0.056	5.50	65 ± 1	63 ± 1
Metalaxyl	7100	1.75	85 ± 2	93 ± 5
Terbutryn	25	3.74	67 ± 1	108 ± 4
Malathion	145	2.75	54.0 ± 0.3	72 ± 1
Aldrin	0.027	7.40	39 ± 2	44 ± 2
Chlorpyrifos	2	4.70	85 ± 3	98 ± 3
Fenthion	55	4.09	84.8 ± 0.8	104 ± 3
Pendimethalin	0.3	5.18	68 ± 3	101 ± 2
Heptachlor epoxide	- ^a	- ^a	64 ± 0.7	84 ± 1
Allethrin	5	4.96	101 ± 3	102 ± 4
Endrin	220	5.34	106 ± 4	105 ± 3
Oxadiazon	0.7	4.80	62 ± 1	86.3 ± 0.4
Buprofezin	0.9	1.31	69 ± 1	96 ± 2
Oxyfluorfen	0.1	4.47	102 ± 5	100 ± 2
Dieldrin	0.1	6.20	78 ± 1	91 ± 3
Diclofop-methyl	3	- ^a	92 ± 6	94 ± 5
Propargite	10.5	5.00	90 ± 1	95.7 ± 0.7
Carbofuran	700	1.67	65 ± 2	81 ± 6
Bifenthrin	0.1	8.00	72 ± 3	95 ± 5
Tetramethrin	4.6	4.49	84 ± 1	95 ± 3
Fenoxycarb	5.76	4.30	86 ± 5	90 ± 10
Phenothrin	2	7.54	103 ± 1	98 ± 6
λ-Cyhalothrin	0.005	5.26	63.1 ± 4	98.3 ± 0.7
Permethrin 1	0.2	6.10	89 ± 4	91 ± 6
Permethrin 2	0.2	6.10	85 ± 2	98 ± 3
Flucythrinate 1	0.48	2.08	82 ± 2	99 ± 8
Flucythrinate 2	0.48	2.08	83 ± 3	102 ± 1
Fluvalinate 1	0.002	3.85	95 ± 5	98 ± 9
Fluvalinate 2	0.002	3.85	97 ± 3	102 ± 1
Esfenvalerate	0.3	6.22	89 ± 1	98 ± 3

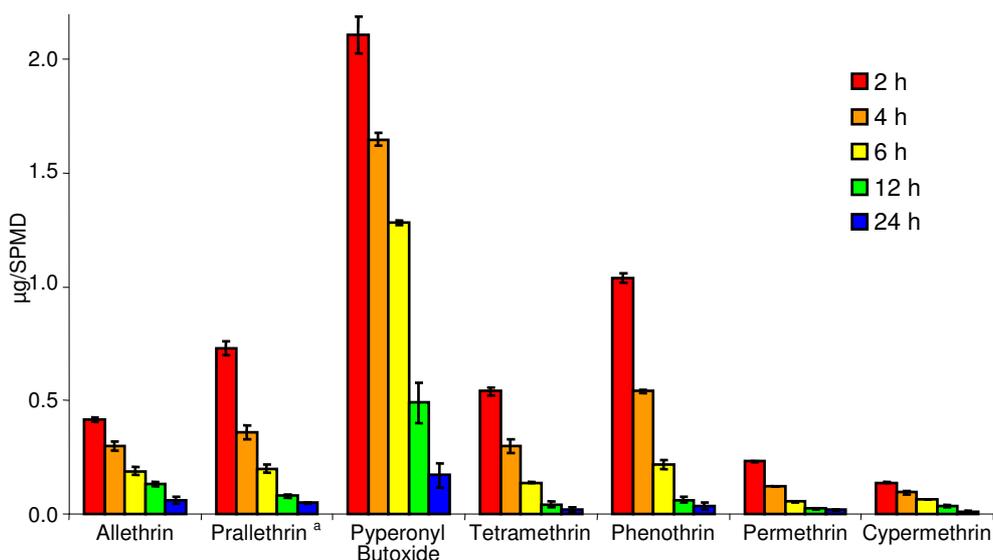
^a Datos no encontrados.

El procedimiento de limpieza empleado habitualmente para la limpieza de extractos de SPMDs consiste en una cromatografía de permeación en gel. Pero debido a la gran diversidad de compuestos que van a estudiarse simultáneamente, muchos de ellos presentan una ventana de elución similar a los residuos de trioleína y plastificantes provenientes de la matriz, por lo que no es el procedimiento más adecuado. El protocolo empleado consistió en una partición acetonitrilo-hexano, seguido de una extracción en fase sólida con alúmina- C_{18} , similar al empleado en la determinación de piretroides en aceites vegetales. Se realizaron algunas modificaciones para mejorar las recuperaciones de algunos compuestos, como Pirimicarb, Terbutryn y Buprofezin, que mejoraban su recuperación al eluir los analitos con 10 mL de acetonitrilo seguidos de 10 mL adicionales de metanol. Empleando la metodología descrita se consiguieron límites de detección entre 0.5 y 7 ng/SPMD, una precisión como RSD de 3 a 15 % y recuperaciones similares entre MAE y diálisis, tal como se muestra en la tabla 3.14.

5.3. - Absorción de insecticidas piretroides desde aire

Las distintas experiencias se realizaron en una habitación de 22 m³ de volumen, cerrada y oscura. Previamente la habitación se limpió convenientemente, se ventiló durante varias horas y se aplicó un aerosol de insecticida comercial durante 15 segundos, correspondiendo a una dosis aproximada de 0.54 g/m³ de ingrediente activo. Tras un periodo de tiempo variable (2, 4, 6, 12 y 24 horas) se colocaron dos SPMDs en el interior de la habitación a una distancia de dos metros del techo. Los SPMDs se recogieron tras 48 horas desde la aplicación del aerosol, se envolvieron en papel de aluminio y se conservaron en un congelador a -20 °C, empleando bolsas de plástico individuales. Para evaluar el efecto de posibles contaminaciones, se instalaron SPMDs en otras habitaciones sin tratar para comprobar la ausencia de contaminaciones. La figura 3.18 indica las concentraciones de insecticidas encontrados en SPMDs, tras distintos tiempos de espera entre la aplicación del aerosol y la instalación del SPMD. Elevadas concentraciones de piretroides fueron encontradas tras 2 horas desde la

aplicación del insecticida, variando de 0.14 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ para el Cypermethrin hasta 7.3 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ para el Prallethrin. Las concentraciones tan altas encontradas para Prallethrin y Piperonyl butoxide son debidas en parte a la elevada concentración de estos compuestos en los aerosoles empleados, de 0.4 y 0.3 % respectivamente (ver tabla 3.12). La cantidad de piretroides absorbida por los SPMDs disminuye al aumentar el tiempo de espera entre aplicación de aerosol e instalación del SPMD, aunque tras 24 horas desde la aplicación, la cantidad de pesticidas encontrados sigue siendo muy elevada, con valores desde 0.012 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ para el Cypermethrin, hasta 0.50 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ para el Prallethrin.



^a Las concentraciones de Prallethrin fueron divididas 10 veces para ajustarlas a la escala del gráfico.

Figura 3.18. Concentración de insecticidas piretroides encontrados en SPMDs desplegados tras 2, 4, 6, 12 y 24 horas de la aplicación del aerosol de insecticida.

5.4. - Variables que afectan a la absorción de plaguicidas desde agua

Para estudiar el fenómeno de absorción de plaguicidas por SPMD desde el agua, se realizaron distintas experiencias siguiendo el montaje mostrado en la figura 3.19. En un vaso de vidrio, colocado en el interior de un baño termostático, se introducen dos litros de agua destilada y se agita

constantemente empleando un agitador magnético. Tras un tiempo de 1 hora de espera, para que se alcance la temperatura requerida, se introducen 100 ng de cada plaguicida a estudiar disueltos en 100 μL de acetona. A continuación se introduce en el vaso un SPMD y se mantiene sumergido empleando un fino alambre de acero. Tras un tiempo de absorción de 2 días el SPMD se recoge, se limpia con agua destilada y se seca suavemente con papel. La temperatura del agua se mantuvo a 25 $^{\circ}\text{C}$, aunque también se realizaron estudios a 10 y 18 $^{\circ}\text{C}$. Se emplearon distintos tiempos de absorción (2, 4 y 6 días) y se modificó la composición del agua, empleándose distintos valores de pH (4, 6.5 y 9), fuerza iónica (0.1, 1 y 5 g/L NaCl) y cantidad de disolvente presente (adicionando el agua con 0.1, 0.5 y 1 mL de acetona). El efecto de otros compuestos orgánicos presentes en el agua, como glucosa o almidón, también se estudió empleando concentraciones de 1 g/L de estos compuestos en agua.

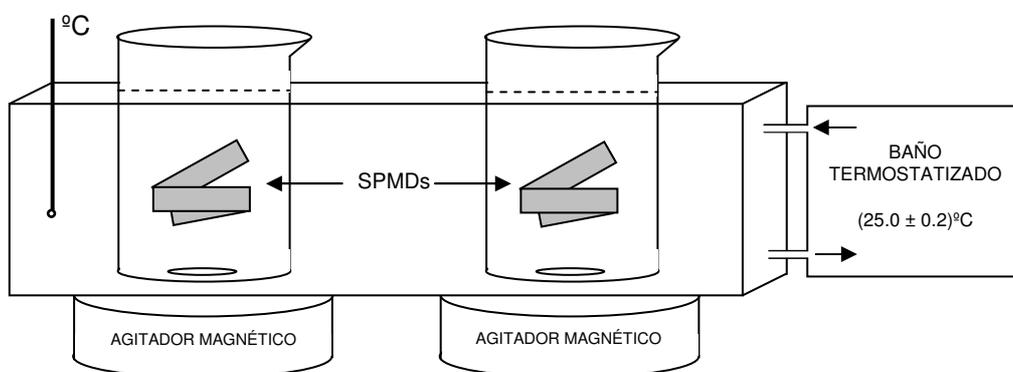


Figura 3.19. Esquema del montaje en el que se realizaron los estudios de absorción de pesticidas en agua por SPMDs.

En primer lugar veremos cual es la capacidad de retención de los SPMDs dependiendo de la especie a retener. Las características físico-químicas del compuesto nos indican cual será su comportamiento, sobretodo el coeficiente octanol-agua ($\log k_{ow}$) y la solubilidad en agua, por lo que cada compuesto o familias de compuestos mostrarán un comportamiento determinado. Si clasificamos la absorción en SPMDs de los distintos plaguicidas por familias, podemos ver ciertas similitudes. La figura 3.20 muestra la retención de los

plaguicidas empleados tras 2, 4 y 6 días de absorción, ordenados por familias. Los compuestos piretroides son los plaguicidas más retenidos por SPMD, debido en parte a sus elevados coeficientes octanol-agua. Sin embargo la familia de los carbamatos, con valores menores de $\log K_{OW}$ desde 0.08 a 3.30, presentan una absorción media del 16% tras 6 días de absorción. Como consecuencia de estos resultados, se recomienda el uso de estos muestreadores para el estudio de plaguicidas piretroides, pero se desaconseja para los carbamatos. En el caso de pesticidas organofosforados y organoclorados se observa una gran variabilidad, por lo que cada compuesto habrá que estudiarlo desde un punto de vista individual.

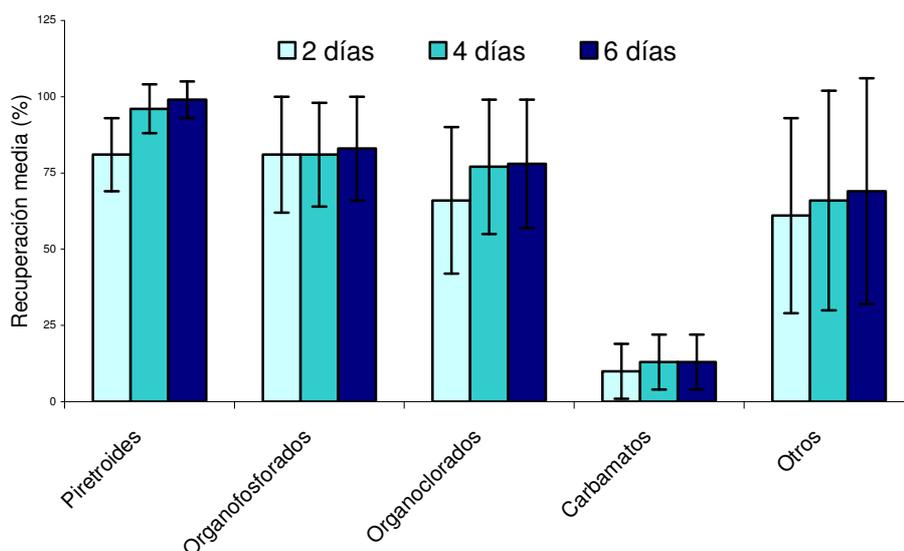


Figura 3.20. Concentración de plaguicidas, clasificados por familias, en SPMDs tras 2, 4 y 6 días de tiempo de absorción.

Finalmente, se observó cual era la variabilidad de estos resultados frente a grandes cambios en la temperatura y composición del agua. La temperatura del agua resultó ser uno de los parámetros que más afecta a la absorción de los pesticidas en SPMDs, obteniéndose absorciones mucho mayores a temperaturas suaves de 18 y 25 °C, que a temperaturas mas bajas como 10 °C. Respecto a la composición del agua, solo se detectaron algunas variaciones específicas con el

pH, como la leve degradación de Fenthion a pH básico, confirmado por otros autores [Wang 1998b], o las bajas absorciones presentadas por Chlorpyrifos metil y Esfenvalerate también a pH básico. Respecto a la salinidad, no se apreciaron grandes diferencias de absorción con la fuerza iónica del agua, al igual que otros estudios realizados con PAHs para los que tampoco afectaba [Huckins 1999]. El efecto de la materia orgánica en el agua, ya sea como disolvente orgánico, como glucosa, o como almidón, tampoco modifica considerablemente la absorción de estos compuestos. Por lo que podemos extrapolar, diciendo que la absorción de los plaguicidas estudiados con SPMDs desde agua, no está afectada por la composición del agua, siendo únicamente alterada por grandes cambios en la temperatura.

5.5. - Absorción de plaguicidas con SPMDs en acequias.

Este estudio se realizó en distintas acequias, situadas en lugares próximos al lago de la Albufera de Valencia, durante los meses de verano de 2005. Dos SPMDs fueron instalados en cada una de las acequias estudiadas, durante 30 días, empleando un muestreador cilíndrico de acero como el mostrado en la figura 1.6. Este muestreador se sumergió completamente en el agua a una profundidad de un metro desde la superficie y evitando el contacto directo con el fondo. Tras el tiempo de absorción, se recogieron los SPMDs y se realizó una limpieza externa de los mismos, para eliminar restos de barro y algas de la superficie. Cada SPMD fue lavado independientemente con agua desionizada, se sumergió en HCl 1 M durante 30 segundos, se enjuagó con agua desionizada y se secó suavemente con un papel. Los SPMD se determinaron por el procedimiento desarrollado anteriormente y los resultados se muestran en la tabla 3.15.

Como se observa en la tabla se retienen gran cantidad de plaguicidas en los SPMDs instalados en cantidades muy distintas, desde 4 ng/SPMD para el Buprofezin en la acequia 2, hasta 1.45 µg/SPMD de Ethiofencarb en la acequia 1. En la figura 3.21 se aprecia la excelente identificación de los compuestos encontrados, que proporcionan una señal que no aparece en los blancos de

SPMD realizados, lo que nos permite determinar cantidades del orden de nanogramos en SPMDs desplegados en aguas.

Tabla 3.15. Plaguicidas encontrados en SPMDs instalados en distintas acequias durante 30 días.

Acequia	Compuesto	Concentración ^(a) (ng/SPMD \pm s, n=2)
1	Ethiofencarb	1450 \pm 30
	Metalaxyl	46 \pm 1
	Chlorpyrifos	95 \pm 5
	Fenthion	39 \pm 2
	Buprofezin	14 \pm 4
	Tetramethrin	180 \pm 20
	Phenothrin	1260 \pm 90
2	Metalaxyl	20,7 \pm 0,2
	Buprofezin	4,1 \pm 0,2
	Oxyfluorfen	7,8 \pm 0,3
	Diclofop-methyl	5,8 \pm 0,2
	Chlorpyrifos	400 \pm 20
3	Terbutryn	5,6 \pm 0,3
	Phenothrin	29,1 \pm 0,3
	Permethrin 1	43 \pm 1
	Permethrin 2	73 \pm 8

^(a) Cada muestra fue inyectada en el cromatógrafo directamente y diluida 10 veces para ajustar las áreas obtenidas a la curva de calibrado.

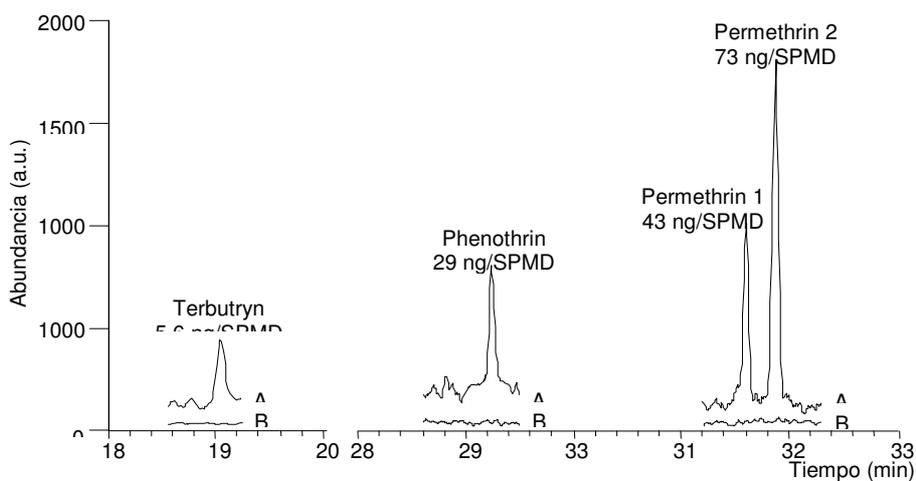


Figura 3.21. Cromatogramas GC-MS-MS de plaguicidas encontrados en SPMD de la acequia 3 (A) y un blanco de SPMD (B).

CAPÍTULO 4

RESULTS

I. “Comparison of different mass spectrometric detection techniques in the gas chromatographic analysis of pyrethroid insecticide residues in soil after microwave-assisted extraction”

Francesc A. Esteve-Turrillas, Agustín Pastor and Miguel de la Guardia

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 384 (2006) 801-809

Impact Index (2005) [ISI Web] = 2.695

Francesc A. Esteve-Turrillas · Agustín Pastor ·
Miguel de la Guardia

Comparison of different mass spectrometric detection techniques in the gas chromatographic analysis of pyrethroid insecticide residues in soil after microwave-assisted extraction

Received: 28 June 2005 / Revised: 24 October 2005 / Accepted: 1 November 2005 / Published online: 17 December 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract A comparative study was carried out for the simultaneous determination of 11 pyrethroid insecticides in soil by gas chromatography (GC)–ion trap (IT)–mass spectrometry (MS). The comparison encompassed two different ionization modes (electron impact and negative chemical ionization) and three data acquisition procedures (full scan, selected ion monitoring and MS/MS). The pyrethroids investigated were tetramethrin, bifenthrin, phenothrin, λ -cyhalothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, flucythrinate, esfenvalerate, fluvalinate and deltamethrin. Soil samples were treated with toluene/water by microwave-assisted extraction for 9 min at 700 W and clean-up was performed with florisol. Clean soil samples were spiked with pyrethroids at spike levels of 10, 25 and 50 ng/g. The method employed provided a concentration factor of 10. The ionization gas employed in the negative chemical ionization mode was methane. The use of MS/MS acquisition in electron impact ionization mode provided the best results, due to its high selectivity and sensitivity, giving very low limits of detection of 0.08–0.54 ng/g. In the negative chemical ionization mode, the full scan and selected ion monitoring methods gave detection limits of 0.12–1.40 ng/g. The proposed methods were applied to soils spiked at several levels (from 10 to 50 ng/g) with insecticides. The electron impact mode with MS/MS acquisition performed the best, minimizing matrix spectrum interference and providing average recovery values of 84–120% with relative standard deviations of 3.2–7.2%.

Keywords Pyrethroid · Residues · Soil ·
Negative chemical ionization · MS/MS

Introduction

Pyrethrins are natural insecticides generated from chrysanthemum flowers; extracts obtained from them contain about 30% pyrethrins [1]. These compounds are formed from chrysanthemic acid, which has insecticidal properties [2]. Synthetic pyrethrins, called pyrethroids, present better stability to sunlight and are effective for a larger spectrum of pests than natural ones, and they show selective activity against insects and present low toxicity to mammals and birds [3]. Some commercial products also include organophosphorus or carbamate insecticides in their formulations, because pyrethroids may only paralyze; they are not always lethal [4].

Environmental pyrethroid contamination is generated through their use in agriculture. These compounds are retained in soils due to their low solubility in water and their high K_{ow} values; they generally do not leach or disseminate from the point of application [5]. Chromatographic methods like high performance liquid chromatography (HPLC) or gas chromatography (GC) are widely used to determine pyrethroids present at trace levels. As shown by inter-laboratory studies, GC methods are often used with electron capture (ECD) or mass spectrometry (MS) detectors [6, 7]. The pyrethroid molecules have halogen atoms (such as chlorine and fluorine) which increase the sensitivities of ECD and negative chemical ionization (NCI-MS) to them [8, 9]. ECD provides rapid, sensitive, easy to maintain and low-cost detection, but mass spectrometry is always needed for definite result confirmation [7, 10]. Tandem mass spectrometry (MS/MS) generally provides very high selectivity and similar or better sensitivity than full scan acquisition for a large number of compounds [11–13].

In ion trap mass chromatography [10, 14, 15], ions are formed at a filament in the ion trap and then, by employing radiofrequencies (RF), these ions are held in the trap, spinning in stable orbits. Increasing the RF potential causes the orbits of the ions to become unstable, so the ions move from the trap to the multiplier. The potential at which this ejection occurs depends upon the mass of the ion, and so gradually increasing the RF generates a mass spectrum.

F. A. Esteve-Turrillas · A. Pastor (✉) · M. de la Guardia
Analytical Chemistry Department, University of Valencia,
Edifici Jeroni Muñoz, 50th Dr. Moliner,
46100 Burjassot, Valencia, Spain
e-mail: agustin.pastor@uv.es
Tel.: +34-96-3544454
Fax: +34-96-3544454

Tandem mass spectrometry (MS/MS) acquisition involves collision-induced dissociation. By employing an RF it is possible to isolate the precursor ion, and then an excitation resonant voltage is applied over the trap, which causes collisions with the buffer gas (usually helium), fragmenting the ions and generating a MS/MS spectrum. It is possible to perform MSⁿ with an ion trap mass detector, although high *n* values result in signals that are too low for residue determination.

The high selectivity of MS/MS comes from the specific dissociation of the precursor ion, which improves the ability of the detector to identify a specific ion and so it potentially decreases detection limits. Therefore, it is a powerful tool for performing trace analysis on environmental samples [8, 10]. Using the ion trap detector in selected ion monitoring mode does not generally increase the sensitivity over the full scan acquisition mode, although better selectivity has been reported in some cases [16].

Electron impact (EI) and chemical ionization (CI) are often used to produce the ionization. EI in full scan mode is the most commonly used technique for determinations based on gas chromatography with mass spectrometry detection, owing to the ability to identify the compound in spectral libraries. In CI mode (which is more selective than EI), the ion polarity can be positive (PCI) or negative (NCI); NCI is more sensitive and selective than PCI for organochlorinated and organophosphorus compounds, and so it is widely employed for pesticide determinations [8, 9, 11].

Some pyrethroid compounds have been determined by electron impact tandem mass spectrometry during multi-residue analyses of vegetables and foodstuffs [11, 12, 17–25]. This technique gives low detection limits, as can be seen in Table 1. CI–MS/MS has only been performed for tetramethrin, bifenthrin, deltamethrin and cypermethrin in a comparative study between selected ejection isobutane chemical ionization (SECI) and collisionally activated dissociation (CAD) performed on standard solutions [6], and for λ -cyhalothrin, permethrin, cypermethrin and deltamethrin in tobacco samples (by NCI–MS/MS).

The aim of the work reported in this paper was to test the potential offered by gas chromatography with ion trap mass spectrometry to determine pyrethroid insecticide residues in soils.

Experimental

Apparatus and reagents

A Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) HP6890 Series II gas chromatograph with a Hewlett-Packard HP-5 capillary column (30 m×0.32 mm I.D., 0.25 μ m film thickness), equipped with an electron capture detector (ECD-⁶³Ni), and a Thermo Finnigan (San Jose, CA, USA) Trace gas chromatograph with a Restek (Bellefonte, PA, USA) Rtx-5MS column (30 m×0.25 mm I.D., 0.25 μ m film thickness), equipped with a Thermo Finnigan ion trap mass spectrometer detector (Polaris Q), were used.

A domestic Intellrowave microwave oven (LG Inc., Owings Mills, MD, USA), with an exit maximum power of 700 W, was employed for extracting pyrethroids.

Pyrethroid standard solutions were prepared in isooctane with tetramethrin (98%, w/w), bifenthrin (99%, w/w), phenothrin (94%, w/w), λ -cyhalothrin (97%, w/w), permethrin (95%, w/w), cyfluthrin (98%, w/w), cypermethrin (95%, w/w), flucythrinate (96%, w/w), esfenvalerate (95%, w/w), fluvalinate (91%, w/w) and deltamethrin (95%, w/w). These standards were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). 10 μ g/mL PCB-195 in toluene was used as the internal standard (provided by Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany) and was prepared in isooctane.

The toluene, *n*-hexane, ethyl acetate, isooctane and Na₂SO₄ used for pesticide residue analysis were provided by Scharlau (Barcelona, Spain). Florisil 60–100 mesh supplied by Across (Geel, Belgium) was activated overnight at 300 °C before use. Copper wires were activated with nitric acid and cleaned with distilled water and acetone.

General procedure

Spiked samples

Spiked soil samples were prepared by adding 0.2 mL of the 100, 250 and 500 ng/mL standards of 11 pyrethroids to 2 g freeze-dried soil. The solvent was evaporated completely at room temperature, and then 1 mL water was added, it was shaken and finally stored at 8 °C for 48 h.

Sample treatment

The soil samples were freeze-dried and sieved to 250 μ m. Soil (2 g), 10 mL toluene, 1 mL water and 0.2 mL of 50 μ g/mL internal standard were placed in a PTFE reactor. For the spiked samples, 10 mL toluene and 0.2 mL internal standard were added. The reactor was hermetically sealed and irradiated at 700 W for nine minutes. After it had been cooled using cold water, the reactor was opened and 8 g of Na₂SO₄ was added in order to dry the extract. The dry soil extract was completely transferred to a tube using a Pasteur pipette and 2×5 mL fresh toluene, which was then evaporated. The extract was reconstituted in 2 mL hexane and then some activated copper wires were added in order to remove any sulfur extracted from the soil. This extract was passed through a 2 g florisil-activated column and eluted with 20 mL ethyl acetate:hexane 33% (v/v). The fraction collected was evaporated to dryness under flowing nitrogen and the residue was dissolved in 200 μ L isooctane.

GC–MS determination

A splitless volume of 1 μ L was injected at 270 °C, employing helium as the carrier gas in constant flow mode at

Table 1 Reported limits of detection (in ng/g) for pyrethroid residues using GC-MS/MS

Samples	Tetramethrin	Bifenthrin	Phenothrin	λ -Cyhalothrin	Permethrin	Cyfluthrin	Cypermethrin	Flucythrinate	Esfenvalerate	Fluvalinate	Deltamethrin	Reference
Standards	— ^(a)	— ^(a)	—	—	—	—	— ^(a)	—	—	—	5000 ^(b)	Bauerle et al. [6]
Eggs	1.1	1.1	1.9	—	4.2	3.7	3.2 ^(b)	—	1.6	—	3.8	Gamón et al. [11]
Fresh vegetables	—	—	—	—	10	—	—	—	500	—	—	Lehotay et al. [12]
Fresh foodstuffs	—	0.18	—	—	0.61	—	0.21	—	1.60	—	0.49	Martinez et al. [17]
Fresh vegetables	—	0.02	—	—	0.03	0.06	0.05	0.02	0.03	—	0.57	Arrebola et al. [18]
Beans	—	31	1.3	—	28	34	17	11	22	—	4	Garrido et al. [19]
Melon	—	6	19	—	27	3	28	7	13	—	11	Garrido et al. [19]
Water melon	—	9	31	—	30	27	26	10	33	—	1	Garrido et al. [19]
Vegetables	—	0.1	0.1	—	0.6	0.6	0.7	0.3	0.3	—	0.1	Arrebola et al. [20]
Residues	—	0.1	0.8	—	1.3	0.4	4.5	0.1	0.4	—	2	Gonzalez et al. [21]
Post harvest beans	—	2.7	1.2	—	2.4	2.9	1.5	0.2	2.1	—	0.3	Martinez et al. [22]
Fruit/Vegetables	—	0.5	—	—	23	—	18	—	—	—	2	Agüera et al. [23]
Fruit/Vegetables	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Lehotay [24]
Water	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Gonçalves et al. [25]
Tobacco	—	—	—	—	20 ^(b)	—	0.004	—	—	—	—	Gonçalves et al. [25]
	—	—	—	—	—	—	10 ^(b)	—	—	—	10 ^(b)	Haib et al. [26]

Note: References obtained for the period Jan 1984 to Mar 2005

^(a)Not established^(b)Measured in negative chemical ionization mode

1 mL/min. The oven temperature program was: 60 °C, hold for 2 min, increase at a rate of 20 °C/min up to 210 °C, then 3 °C/min up to 270 °C, and finally hold for 7 min. The transfer line temperature was 300 °C.

An electron energy of 70 eV was applied and helium was used as the damping gas at a flow rate of 0.3 mL/min. The source temperatures used were 250 °C for the EI and 150 °C for the NCI mode. A maximum ion time of 25 ms was employed and methane was used as the reagent gas at a flow rate of 1.5 mL/min for NCI measurements.

Acquisitions in full scan mode were carried out over a mass scanning range of m/z 50–650. Selected ions for each acquisition mode are shown in Tables 2 and 3. Ion trap tests and mass calibrations were performed weekly with perfluorotributylamine (PFTBA).

GC-ECD determination

A splitless volume of 2.5 μ L of the clean extract was injected at 270 °C, employing nitrogen as carrier gas in constant flow mode at 1.3 mL/min. The oven temperature program was the same as that used in GC MS. The detector temperature was 300 °C and nitrogen was employed as the make-up gas with a flow rate of 50 mL/min.

Results and discussion

Establishment of the ionization parameters

A 500 ng/mL pyrethroid standard (in isooctane) was injected into the GC while different detector conditions were tested in order to study the ionization and fragmentation behavior of the target compounds. The studies were carried out independently for each ionization mode, because ionization volume switching is necessary in order to change between the electron impact and negative chemical ionization modes.

Pyrethroid compounds present a high number of GC peaks due to the existence of several structural isomers that overlap with some of the compounds under study, such as the pairs tetramethrin–bifenthrin, cypermethrin–flucythrinate and esfenvalerate–fluvalinate. These compounds were studied separately to avoid spectral interferences, by employing two different batches of pyrethroid standards.

The chemical ionization conditions were modified in order to obtain the molecular ion or alternatively the biggest m/z ion fragments with high intensity, in order to minimize interference and so to develop a MS/MS procedure for these ions. Detector parameters such as electron energy (from 40 to 70 eV), source temperature (from 125 to 250 °C) and reagent gas flow (from 0.3 to 1.5 mL/min) were modified. These parameters can affect the response and, of course, the fragmentation pattern, and were evaluated in monoparametric studies. The default equipment parameters were used as the starting point, which were: an electron source energy of 70 eV, a source temperature of 250 °C and a methane

Table 2 Detector parameters used for pyrethroid determinations in electron impact mode

Pyrethroid	Ionization Selected ions ^(b) (<i>m/z</i>)	MS/MS fragmentation				
		Precursor ion ^(c) (<i>m/z</i>)	Excitation energy (eV)	Q	Ion range (<i>m/z</i>)	Product ions ^(b) (<i>m/z</i>)
Tetramethrin	164.1	164.1	0.65	0.225	41 170	107.0+135.0
Bifenthrin	181.1+166.1	181.1	0.75	0.225	45 185	166.1+165.1
Phenothrin	183.1+123.2+81.1	183.1	0.85	0.225	45 190	165.1+168.1
λ -Cyhalothrin	181.1+141.1+197.1	197.1	0.65	0.225	49 200	141.1+161.1
PCB-195 ^(a)	429.9+427.8+357.9	429.9	1.45	0.225	107 435	394.8+392.8
Permethrin	183.1+165.1	183.1	0.80	0.225	45 190	165.1+168.1
Cyfluthrin	206.1+199.2+127.1	226.1	0.60	0.225	56 230	199.1+206.1
Cypermethrin	181.1+127.1+163.1	163.1	0.65	0.225	40 170	127.1+91.1
Flucythrinate	225.1+199.1+157.1	225.1	0.80	0.225	56 230	147.0+119.1
Esfenvalerate	225.0+125.1+181.1	225.0	0.70	0.225	56 230	147.1+119.1
Fluvalinate	250.1	250.1	1.30	0.225	62 255	200.1+215.1
Deltamethrin	253.1+181.1	172.1	0.50	0.225	43 175	93.1+91.1

^(a)Internal standard^(b)Range of measurement was $m/z \pm 0.5$ ^(c)Isolation window width employed was $m/z \pm 2.0$

flow of 0.3 mL/min (only for NCI). These values were modified by increments of 10 eV, 25 °C and 0.25 mL/min.

As an example, Fig. 1 shows the influences of these ionization parameters on the area of the three biggest intensity ions formed (m/z 199.3, 242.8 and the molecular ion 424.0) for flucythrinate.

Increasing the flow of reactor gas (methane) also increased the peak area for all ions tested. A high methane flow reduces ionization, reducing fragmentation and increasing the abundance of high m/z ions. A flow of 1.5 mL/min gave the biggest peak area values. A flow of 1.75 mL/min increased the ion trap pressure (Convectron 0.119 Torr and ion gauge 1.5×10^{-4} Torr) excessively and rapidly

decreases the filament lifetime, so we did not study higher flows than this.

Decreasing the source temperature results in an important modification of the ionization pattern: an increase in the m/z 242.8 peak area. When temperatures of less than 200 °C were used, a change in the intensity of the highest peak was observed, where the m/z 242.8 peak area became bigger than m/z 199.3. A source temperature of 150 °C was selected, which gives the highest peak area for m/z 242.8.

The electron source energy also affects the peak areas of all of the ions considered here; peak areas increase as this parameter is increased. Therefore, a default electron energy of 70 eV was selected.

Table 3 Detector parameters used for pyrethroid determinations in negative chemical ionization mode

Pyrethroid	Ionization Selected ions ^(b) (<i>m/z</i>)	MS/MS fragmentation				
		Precursor ion ^(c) (<i>m/z</i>)	Excitation energy (eV)	Q	Ion range (<i>m/z</i>)	Product ions ^(b) (<i>m/z</i>)
Tetramethrin	167.5+331.0	331.0	0.50	0.225	82 340	167.2
Bifenthrin	205.2+385.9	205.0	0.70	0.225	51 210	161.0+165.0
Phenothrin	167.2+205.0+349.0	^(d)				
λ -Cyhalothrin	205.4+241.1	205.0	0.65	0.225	51 210	165.1+161.0
PCB-195 ^(a)	430.0+428.2+431.8	^(d)				
Permethrin	207.4+209.5+171.2	^(d)				
Cyfluthrin	207.5+209.3+171.3	^(d)				
Cypermethrin	207.3+209.1+171.2	^(d)				
Flucythrinate	242.8+199.3+424.0	242.8	0.80	0.225	49 205	199.3+183.0
Esfenvalerate	210.9+212.8+167.5	392.0	1.20	0.450	196 400	349.5
Fluvalinate	294.2+296.0	294.2	1.05	0.225	73 300	194.0+250.0
Deltamethrin	81.0+79.0	^(d)				

^(a)Internal standard^(b)Range of measurement was $m/z \pm 0.5$ ^(c)Isolation window width employed was $m/z \pm 2.0$ ^(d)This compound does not present any fragmentation

The other pyrethroid compounds studied present similar behaviors to flucythrinate, and to ensure the best compromise, a flow rate of 1.5 mL/min, a source temperature of 150 °C and a electron energy of 70 eV were selected as the best NCI conditions.

The m/z values employed for pyrethroid determination, in full scan and SIM acquisition modes, are shown in Tables 2 and 3 for the EI and NCI modes, respectively. The mass spectra obtained for the EI and NCI ionization modes show that there are spectral interferences for two overlapping compounds, tetramethrin and bifenthrin, in electron impact ionization (in full scan and SIM modes). Figure 2 shows the EI mass spectra of both compounds, where the m/z 164.1 is the only ion available for the tetramethrin determination, which is also produced by bifenthrin fragmentation. A positive interference of less than 5% in area counts (see Fig. 2) was obtained for tetramethrin determination in the presence of bifenthrin at the same level of concentration (tested at 500 ng/mL).

MS/MS detector parameters

Once the ionization process was optimized, the MS/MS procedure was investigated for both EI and NCI. Parameters such as the precursor ion to be isolated (m/z 50–650), the resonance excitation voltage (0–3 eV), the maximum excitation energy (0.225, 0.300 or 0.450) and the product ions were tested for each compound under consideration in order to increase the sensitivity. Two batches of 500 ng/mL pyrethroid standard were also used to avoid the aforementioned overlapping interference.

The precursor ion was adjusted to be among the most intense and characteristic ions in the mass spectrum. The resonance excitation voltage applied to the fragmentation of the precursor ion was adjusted in order to avoid its complete disappearance and to maximize the peak areas of measured ions. The variations in the peak areas of esfenvalerate ions with the excitation voltage energy are shown in Fig. 3.

For electron impact ionization, the peak at m/z 225.0 was employed as the precursor ion, which generated product ions at m/z 147.1 and 119.1. For negative chemical ionization, the precursor and product ions were m/z 392.0 and 349.5, respectively. Mass and MS/MS spectra for EI and NCI ionizations are also shown in Fig. 3, where 0.70 and 1.20 eV were the excitation voltage energies selected for both ionization modes, respectively. Tables 2 and 3 show the m/z values of the precursor and product ions, the excitation voltage energy, the Q value, and the measured range of ions established for each pyrethroid compound and for the EI and NCI modes, respectively. Compounds as phenothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin and deltamethrin, as well as the internal standard (PCB-195), did not produce fragmentations of any precursor ion when tested in NCI mode. Thus MS/MS acquisition is not feasible for these compounds in negative chemical ionization mode.

The maximum excitation energy only has three possible values: 0.225, 0.300 and 0.450. The high-energy value

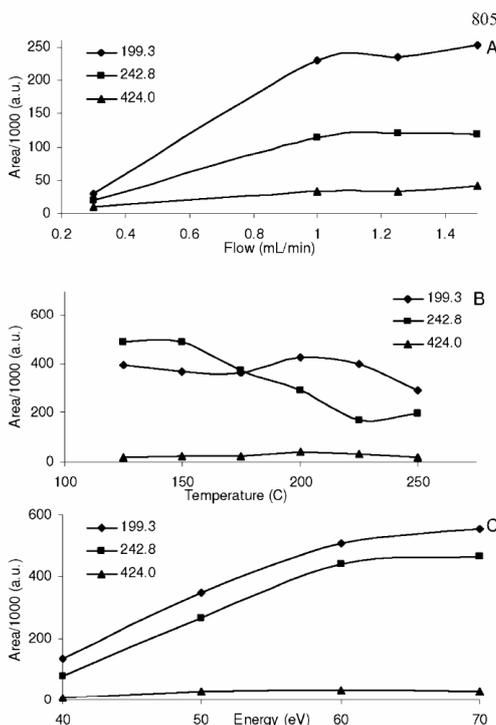


Fig. 1 a–c Influence of detector parameters such as reactor gas flow (a), source temperature (b) and electron voltage energy (c) on flucythrinate ion peak area

(0.450) is for compounds that are difficult to fragment, and it provides more accurate ion values but a smaller mass range than when lower energy values are used. Low energy (0.225) provides less accurate ion values and a wider mass range than for 0.450 [6]. Only minor sensitivity differences were observed in this study, and a Q value of 0.225 was employed to obtain wider mass ranges, except for esfenvalerate in the NCI mode, for which the sensitivity substantially increases when a Q value of 0.450 is used.

The maximum ion time (25–50 ms) was found to have little influence on the peak area signal. Thus, the default value of 25 ms was selected.

Analytical features

Calibration curves were prepared at six concentration levels from 50 to 1,000 ng/mL using a pool of the 11 pyrethroid compounds and a fixed concentration of 50 ng/mL internal standard. Limits of detection were established from the expression $3 \times S_{\text{blank}}/b$, where b is the calibration curve slope and S_{blank} is the standard deviation of the mean of five measurements of a low-concentration standard (50 ng/mL in EI-full scan and EI-SIM modes, and 10 ng/mL in the rest).

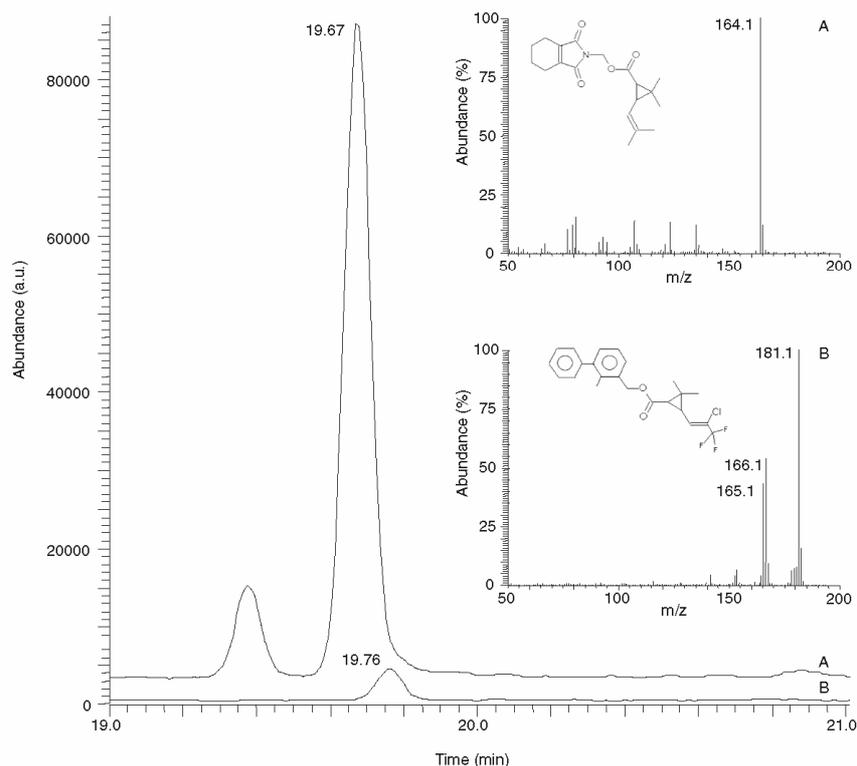


Fig. 2 a–b GC EI mass spectra and chromatograms (m/z 164.1 \pm 0.5) of a 500 ng/mL standard of tetramethrin (a) and bifenthrin (b)

Table 4 shows the limits of detection for the pyrethroids in every acquisition mode, for both EI and NCI ionizations.

EI–MS–MS acquisition provides the best sensitivity, with limits of detection ranging from 0.08 to 0.54 ng/g. NCI–SIM (with limits of detection from 0.18 to 0.90 ng/g) and NCI–full scan (from 0.12 to 1.40 ng/g) also provide high sensitivity. For electron impact ionization, full scan and SIM acquisition do not provide high sensitivity due to chromatographic system mass interferences. Finally, MS/MS acquisition in the NCI mode did not provide results that were as good as those for electron impact, since the parent ion fragmentation did not generate stable negative ions to determine.

Upon comparison with previously reported procedures (see Table 1), we can conclude that the LOD values found in the present study are, in general, equal to or better than previous ones. The procedure developed by Arrebola et al. [18] for fresh vegetables gave extremely low LOD values,

which probably depend on the sample clean-up used and the concentration of pyrethroids extracted from fresh samples. However, it is worth noting that the recovery values found in the aforementioned paper (71–111%) and RSD values (10–18%) are worse than those found in these study, which varied from 84 to 120% for EI–MS/MS and were between 3.2 and 7.2% for recovery and RSD, respectively.

Comparison with ECD measurement

The analytical features observed during pyrethroid determination were also observed in conventional GC–ECD, which was used to evaluate the improvements provided by mass spectrometry detection. The overlapping compounds could not be determined independently, and two batches of standard solutions were needed for this study: Mix A (with tetramethrin, phenothrin, λ -cyhalothrin, cyfluthrin,

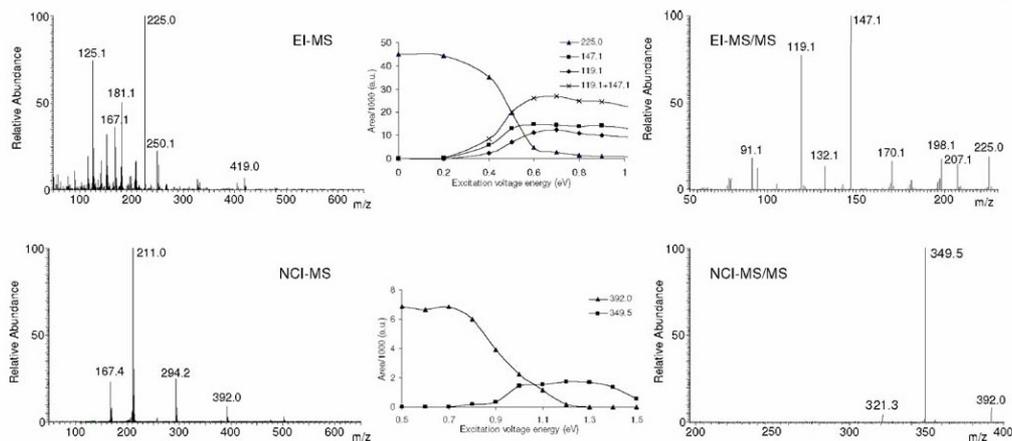


Fig. 3 Esfenvalerate mass and MS/MS spectra for EI and NCI ionizations. Graphs show the variations in precursor and product ion peak areas vs. the excitation voltage energy for each ionization mode

flucythrinate, esfenvalerate and deltamethrin) and mix B (with bifenthrin, permethrin, cypermethrin and fluvalinate). Both were prepared with the same concentration range, from 50 to 1,000 ng/mL. Standard phenothrin calibration curves were prepared at concentration levels of 20 to 0.2 $\mu\text{g/mL}$ due to the low sensitivity of ECD to this compound [8].

Table 4 shows the limits of detection for each pyrethroid from ECD determinations. Higher limits of detection, between 0.53 and 2.60 ng/g, were obtained for ECD determinations than for MS. This method was particularly bad for phenothrin detection, for which a LOD of 190 ng/g was found.

Analysis of soil samples

In order to study the selectivity of the method, the levels of pyrethroids present at three concentration levels in soils were determined using all measurement modes. Soil samples were spiked with 10, 25 and 50 ng/g of the 11 pyrethroid insecticides considered. The soil recoveries obtained for the seven strategies evaluated are shown in Table 5. For high concentration levels of pyrethroids in the soils, good recoveries were obtained for most of the determination modes tested, but MS/MS acquisition in EI mode provided the best selectivity at low concentrations.

Table 4 Limits of detection for pyrethroid determination in soil, obtained using GC with electron impact ionization (EI) and negative chemical ionization (NCI) in different modes and an electron capture detector (ECD)

Pyrethroid	LOD (ng/g)						
	EI			NCI			ECD
	Full scan	SIM	MS/MS	Full scan	SIM	MS/MS	
Tetramethrin	0.65	0.59	0.33	0.12	0.20	1.20	2.1
Bifenthrin	0.47	0.13	0.08	0.18	0.64	0.56	1.3
Phenothrin	0.78	0.46	0.37	1.40	0.51	(a)	190
λ -Cyhalothrin	1.20	0.72	0.30	0.30	0.22	0.45	0.53
Permethrin	1.80	0.27	0.18	0.38	0.35	(a)	1.6
Cyfluthrin	1.90	1.30	0.47	0.28	0.72	(a)	1.2
Cypermethrin	1.90	0.37	0.15	0.44	0.18	(a)	2.6
Flucythrinate	2.90	0.55	0.29	0.23	0.64	0.43	1.6
Esfenvalerate	1.3	0.64	0.54	0.17	0.90	1.00	1.8
Fluvalinate	1.40	0.85	0.14	0.38	0.25	0.41	2.3
Deltamethrin	3.70	1.30	0.28	0.59	0.44	(a)	1.4

(a) This compound does not show any observed fragmentation

Table 5 Recoveries (% ± s) of pyrethroid insecticides in spiked soil samples, analyzed by gas chromatography electron capture detection and the proposed mass spectrometry methodologies

Pyrethroid	Concentration level (ng/g)	ECD	Electron impact ionization			Negative chemical ionization		
			Full scan	SIM	MS/MS	Full scan	SIM	MS/MS
Tetramethrin	10	92±7	114±12	105±12	86±13	96±18	105±9	160±10
	25	105±3	99±16	98±7	93±4	114±7	110±2	140±7
	50	96±5	95±8	92±9	84±6	120±12	113±2	130±3
Bifenthrin	10	118±5	123±6	93±10	91±3	95±4	97±5	119±7
	25	98±3	105±7	84±5	85±6	104±9	99±1	95±2
	50	102±5	101±2	74±10	84±3	108±3	107±2	104±2
Phenothrin	10	^(a)	119±14	104±13	100±3	110±3	109±2	^(b)
	25		99±2	97±3	100±4	63±12	69±11	
	50		100±4	98±8	100±2	78±10	84±1	
λ-Cyhalothrin	10	97±4	138±10	103±7	95±8	99±8	104±2	130±2
	25	111±1	114±13	119±5	103±6	93±7	95±8	103±2
	50	97±3	102±3	84±5	103±3	94±4	96±1	113±4
Permethrin	10	102±1	132±29	119±13	120±20	100±20	100±20	^(b)
	25	102±4	105±31	112±3	100±5	73±11	81±4	
	50	106±2	97±8	98±4	98±6	53±8	55±4	
Cyfluthrin	10	88±23	138±50	170±60	97±7	97±19	105±15	^(b)
	25	115±1	154±19	140±30	101±4	84±10	88±7	
	50	106±1	135±24	89±18	102±5	77±8	80±7	
Cypermethrin	10	124±20	185±37	127±15	116±16	97±17	109±9	^(b)
	25	115±1	131±28	112±17	93±13	80±17	95±6	
	50	116±5	129±25	99±2	104±7	80±20	98±17	
Flucythrinate	10	115±4	139±25	169±5	90±6	82±11	92±1	133±9
	25	112±2	129±5	130±20	103±7	85±6	88±2	117±5
	50	120±2	120±2	99±4	109±5	89±6	92±4	123±13
Esfenvalerate	10	145±2	93±26	95±8	102±2	85±0	85±1	147±12
	25	143±5	144±19	138±19	95±8	79±2	80±3	115±5
	50	128±3	118±11	92±3	100±5	87±9	98±1	111±3
Fluvalinate	10	160±5	129±49	118±13	98±8	78±8	80±8	140±14
	25	158±4	103±28	122±8	98±5	74±9	80±2	140±40
	50	143±3	103±8	101±3	102±1	73±11	84±1	130±20
Deltamethrin	10	127±11	84±42	150±25	98±3	84±5	86±3	^(b)
	25	140±10	73±43	125±4	98±4	73±3	74±2	
	50	136±9	58±23	102±1	99±1	77±10	81±11	

^(a)Not detected^(b)Not determined

Conclusion

A comparison between the six different mass spectrometry determination strategies shows that there are significant differences between the sensitivities obtained. EI-MS/MS method provides the best sensitivity and SIM mode with negative chemical ionization also provided good sensitivity. Selectivity was significantly lower for the full scan methods, mainly for the EI ionization mode.

The selectivities and sensitivities of ion trap mass spectrometry determinations are greatly enhanced when MS/MS experiments are performed with EI ionization. MS/MS determinations with negative chemical ionization also give

acceptable LOD values for tetramethrin, bifenthrin, λ-cyhalothrin, flucythrinate, esfenvalerate and fluvalinate.

ECD is currently considered to be a good method for the routine analysis of pyrethroids. This study reinforces the idea that electron capture determinations give relatively good sensitivity and selectivity, even if mass spectrometry is always needed to confirm the results. The overlapping peaks seen with ECD were resolved using mass spectrometry.

The good recoveries of pyrethroid insecticides from spiked soils achieved using the EI-MS/MS method demonstrate the applicability of the proposed method to the determination of very low quantities of pyrethroid residues in soil.

Acknowledgements The authors acknowledge the financial support of the Ministerio de Educación y Ciencia (PPQ2000-0816) and F.A.E.T. the "V Segles" grant provided by the Universitat de València to carry out this study.

References

1. Müller TL (2005) Extension toxicology network: Pesticide information profiles website. See <http://extoxnet.orst.edu/pips/pips.html> (last accessed 14th November 2005)
2. Jin H, Webster GRH (1998) *Fresenius J Anal Chem* 360:573-579
3. Beyond Pesticides (2005) Safety Source for Pest Management website. See <http://www.beyondpesticides.org/infoservices/pcos/> (last accessed 14th November 2005)
4. US EPA (2005) U.S. Environmental Protection Agency website. See <http://www.epa.gov> (last accessed 14th November 2005)
5. NPIC (2005) National Pesticide Information Center website. See <http://npic.orst.edu/> (last accessed 14th November 2005)
6. Bauerle GF, Ray KL, Brodbelt JS (1995) *Anal Chim Acta* 317:137-148
7. Pang G, Can YZ, Fan CL, Zhang JJ, Li XM, Mu J, Wang DN, Liu SM, Song WB, Li HP, Wong SS, Kubinec R, Tekel J, Tahotna S (2000) *J Chromatogr A* 882:231-238
8. Esteve-Turrillas FA, Aman CS, Pastor A, de la Guardia M (2004) *Anal Chim Acta* 522:73-78
9. Yasin M, Baugh PJ, Bonwick GA, Davies DH, Hancock P, Leinoudi M (1996) *J Chromatogr A* 754:235-243
10. Mandalakis M, Tsapakis M, Stephanou EG (2001) *J Chromatogr A* 925:183-196
11. Gamón M, Lleó C, Ten A (2001) *J AOAC Int* 84:1209-1216
12. Lehotay SJ, Lightfield AR, Harman-Fetcho JA, Donoghue DJ (2001) *J Agric Food Chem* 49:4589-4596
13. Pimay S, Ricordel I, Libong D, Bouchonnet S (2002) *J Chromatogr A* 954:235-245
14. Lee WW, Oh CH, Kim PS, Yang M, Song K (2003) *Int J Mass Spectrom* 230:25-31
15. Thermo Finnigan (2000) Xcalibur manuals. Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA
16. Santos FJ, Galceran MT (2003) *J Chromatogr A* 1000:125-151
17. Martínez Vidal JL, Arrebola FJ, Mateu-Sánchez M (2002) *Rapid Commun Mass Spectrom* 16:1106-1115
18. Arrebola FJ, Martínez Vidal JL, Mateu-Sánchez M, Álvarez-Castellón FJ (2003) *Anal Chim Acta* 484:167-180
19. Garrido-Frenich A, Arrebola FJ, González-Rodríguez MJ, Vidal JL, Mora Díez N (2003) *Anal Bioanal Chem* 377:1038-1046
20. Arrebola FJ, Martínez Vidal JL, González-Rodríguez MJ, Garrido-Frenich A, Sánchez Morito N (2003) *J Chromatogr A* 1005:131-141
21. González-Rodríguez MJ, Garrido-Frenich A, Arrebola FJ, Martínez Vidal JL (2002) *Rapid Commun Mass Spectrom* 16:1216-1224
22. Martínez Vidal JL, González-Rodríguez MJ, Arrebola FJ, Garrido-Frenich A, Sánchez López FJ (2003) *J AOAC Int* 86:856-867
23. Agüera A, Contreras M, Crespo J, Fernández-Alba AR (2002) *Analyst* 127:347-354
24. Lehotay SJ (2000) *J AOAC Int* 83:680-697
25. Gonçalves C, Alpendurada MF (2004) *J Chromatogr A* 1026:239-250
26. Haib J, Hofer I, Renaud JM (2003) *J Chromatogr A* 1020:173-187

II. “Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from soil”

Francesc A. Esteve-Turrillas, Caroline S. Aman, Agustín Pastor and Miguel de la Guardia

Analytica Chimica Acta, 522 (2004) 73–78

Impact Index (2005) [ISI Web] = 2.760

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Analytica Chimica Acta 522 (2004) 73–78

ANALYTICA
CHIMICA
ACTAwww.elsevier.com/locate/aca

Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from soil

F.A. Esteve-Turrillas, C.S. Aman, A. Pastor*, M. de la Guardia

Analytical Chemistry Department, University of Valencia, Edifici Jeroni Muñoz, 50th Dr. Moliner, E-46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 7 April 2004; received in revised form 17 June 2004; accepted 17 June 2004

Abstract

An analytical method has been developed for the microwave-assisted extraction of synthetic pyrethroid insecticide residues in soils and their determination by gas chromatography with electron capture detector (ECD) and mass spectrometry (MS) detector. Clean soil samples were spiked with nine pyrethroids: tetramethrin, cyfluthrin, flucythrinate, deltamethrin, bifenthrin, permethrin, cypermethrin and fluralinate were used for this study. Concentration levels were 50 ng g^{-1} for all the compounds studied except for sumitrin for which a $10 \mu\text{g g}^{-1}$ was evaluated. Two grams of sample were treated in a closed PTFE reactor with 10 mL toluene and 1 mL water and irradiated at 700 W during 9 min. The toluene extract was evaporated and reconstituted in 2 mL hexane and copper wires added in order to remove sulphur interferences. Clean-up with 2 g of florisil and elution with 20 mL ethyl acetate:hexane 33% (v/v) was performed. Best chromatographic conditions were established for GC-ECD analysis for routine analysis and GC-NCI-MS for confirmation. Recovery yields of spiked soils were from 97 to 106% for eight of the pyrethroid and 86% for the tetramethrin, with relative standard deviations from 1 to 7%. Results were comparable with those found by ultrasonic extraction in the analysis of real samples and limit of detection values obtained were in the range from 1 to 200 ng g^{-1} for ECD and from 0.3 to 2 ng g^{-1} for NCI-MS.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Pyrethroids; Residues; Microwave-assisted extraction; MAE; Soil; NCI-MS

1. Introduction

Pyrethroids are the synthetic analogues of natural compounds derived from chrysanthemum flowers [1]. These compounds are the most effective and safe natural insecticides, because of their selective activity for insects and low toxicity for mammals and birds [2]. The insecticide character of pyrethroids is due to the chrisantemic acid group in their structure [3].

Pyrethroids are considered as contact poisons, affecting the insect nervous system, opening the sodium channels and depolarising the neuronal membranes. In order to increase the effectivity of the pesticide, it is usually formulated with synergist compounds, such as piperonyl butoxide or *n*-octyl bicycloheptene dicarboximide [1].

The aquatic ecosystem contamination of pyrethroids is mainly generated by agricultural uses and direct industrial effluents. These compounds remain retained in soils and

do not leach from the application point due to their high lipophilicity and low water solubility [1].

Pyrethroid residue determinations are made in general by chromatographic methods with electron capture (ECD) [4–14] or mass spectrometry (MS) [15–17] detectors. Additionally there are some tentatives in the literature for high performance liquid chromatography determination of pyrethroids [18,19]. The most employed extraction procedures are: solid phase extraction for liquid samples like wine [7] or milk [11] and mechanical stirring [4–8,11,13,18], sonication [12–16] or Soxhlet extraction [17,19] for solid samples. Clean-up methods based on florisil column are generally employed [4,5,7–10,12–15,18,19], but also liquid–liquid extraction [6] and size exclusion chromatography [11] have been proposed.

Fast and simultaneous extraction of several compounds, based on the use of high temperatures during a short period of time and low solvent volume consumes are the great advantages of the microwave-assisted extraction in front of the conventional methods [20]. Nowadays, many methods have been developed for the microwave-assisted extraction of analytes in different samples. Solvents employed for the

* Corresponding author. Fax: +34 963544454.
E-mail address: agustin.pastor@uv.es (A. Pastor).

extraction must be able to dissolve the analyte and to absorb microwave energy, and because of that sometimes it is necessary the use of solvent mixtures, like acetone:hexane [17] or mixtures of immiscible organic solvents with water [21].

A mixture of toluene with water (to catch the microwave radiation), has been assayed for the determination of nine synthetic pyrethroid residues in soils, in spite of the fact that the single precedent of pyrethroid extraction, *cis*-permethrin *trans*-permethrin [17], was based on the use of an acetone:hexane mixture. On the other hand an improved florisil clean-up and a final detection through GC-ECD and GC-NCI-MS were employed.

2. Experimental

2.1. Apparatus and reagents

A Hewlett Packard HP6890 Series II gas chromatography (Palo Alto, CA, USA) with a Hewlett Packard HP-5 capillary column (30 m \times 0.32 mm i.d., 0.25 μ m film thickness), equipped with an electron capture detector (ECD-⁶³Ni); and a Finnigan Trace GC (Waltham, MA, USA) with a Restek column Rtx-5MS (Bellefonte, PA, USA) (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness), equipped with a Finnigan ion trap mass spectrometer detector Polaris Q were used for pyrethroid determination.

For the extraction of pyrethroids from soil samples, an ultrasonic bath J.P. Selecta (Barcelona, Spain) and a domestic microwave oven LG Inc. model Intellowave (Maryland, USA) with an exit maximum power of 700 W were employed. In this latter cases hermetically sealed 100 mL interned volume PTFE reactors with 1 cm wall thickness were used [22].

To avoid overlapping interferences, two batches of pyrethroid standard solutions were prepared in isooctane: Mix A with tetramethrin (98% w/w), sumithrin (94% w/w), cyfluthrin (98% w/w), flucythrinate (96% w/w) and deltamethrin (95% w/w); and Mix B with bifenthrin (99% w/w), permethrin (95% w/w), cypermethrin (95% w/w) and fluralinate (91% w/w), at concentration levels of 500 μ g L⁻¹ for all the pyrethroids, except for the sumitrin 10 mg L⁻¹. Standards were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). PCB-195 was used as internal standard provided from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) and prepared at 50 μ g L⁻¹ level in isooctane.

Toluene, *n*-hexane, ethyl acetate, isooctane and Na₂SO₄ for pesticide residue analysis were provided by Scharlau (Barcelona, Spain), and florisil 60–100 mesh by Across (Geel, Belgium), this later compound was activated at 300 °C for 8 h before use.

2.2. General procedure

2.2.1. Preparation of spiked samples

Soil samples were spiked by adding 0.2 mL of standard mixtures of pyrethroids and PCB-195 to 2 g of soil, previ-

ously lyophilized and sieved to 250 μ m. When the solvent was completely evaporated at room temperature, 1 mL of water was added, being spiked samples shacked and stored at 8 °C for 48 h before their analysis. Recovery values were established from the quotient between concentration found and that added.

2.2.2. Ultrasonic extraction

Two grams of soil sample and 0.5 g of Na₂SO₄ were sonicated in a closed 100 mL pyrex glass flask for 20 min with 20 mL toluene. This extraction was repeated three times.

2.2.3. Microwave-assisted extraction

Two grams of sample were introduced in a PTFE reactor of 100 mL internal volume, 10 mL toluene and 1 mL water were added and the reactor was closed and irradiated at 700 W during 9 min. After cooling, the reactor was opened and 8 g of Na₂SO₄ were added in order to dry the extract.

2.2.4. Clean up of extracts

The extracts obtained by the two aforementioned procedures were evaporated and reconstituted in 2 mL hexane, and copper wires were added in order to remove sulphur. After 8 h (the time required for total removal of sulphur which is identified by the black colour of copper wires), the hexane solution was passed through a 2 g florisil activated column and eluted with 20 mL of an ethyl acetate in hexane 33% (v/v) solution. The fraction recollected was evaporated and dissolved in 200 μ L isooctane.

2.2.5. GC analysis

For GC-ECD determinations, an injection volume of 2.5 μ L was employed in splitless mode. The injector temperature was 270 °C and helium was used as carrier gas in constant flow mode at 1.3 mL min⁻¹. The temperature program of the oven was as follows: 60 °C, held for 2 min, increased at a rate of 20 °C min⁻¹ to 210 °C, then at 3 °C min⁻¹ to 270 °C and finally held 7 min. The detector temperature was 300 °C and nitrogen was employed as make-up gas at a flow of 50 mL min⁻¹.

In GC-NCI-MS analysis, a splitless injection volume of 1 μ L was used. The injector temperature was 270 °C and helium was employed as carrier gas in constant flow mode at 1 mL min⁻¹. Oven temperature program was the same that used for ECD. Transfer line and ion source temperatures were 300 and 250 °C, respectively and an electron voltage of 70 eV was employed for ionization. Measurements were carried out in negative chemical ionization mode, with a full scan acquisition range from 50 to 650 *m/z*. A damping gas flow of 0.3 mL min⁻¹ and methane as reagent gas at a flow of 0.3 mL min⁻¹ were employed. Detector test and mass calibration were performed with perfluorotributylamine (PFTBA).

Peak area data found for samples were interpolated in the corresponding calibration curve, using in all the cases PCB-195 as internal standard.

3. Results and discussion

3.1. Stability of pyrethroids in front of microwave irradiation

In order to verify the stability of the compounds considered, preliminary studies were made for 0.2 mL of an isooctane pyrethroids standard solution treated at the maximum power of the microwave oven in the presence of 10 mL toluene and 1 mL water during several times. Irradiation times of 6, 9 and 12 min were employed in intervals of 3 min heating and 3 min cooling. No higher times than 12 min were employed to avoid leaks in the reactor and to enhance the operator safety by avoiding overpressure.

Recovery results are shown in Table 1 and they confirm the high stability of the pyrethroids under the microwave treatment. In spite of the low stability of pyrethroids in the environment, it is clear that the compounds studied are not destroyed by irradiation in presence of toluene and water.

3.2. Development of a clean up method

Preliminary experiments to search for an appropriate clean-up of extracted pyrethroids were done on a mixture of pyrethroid standard solutions in isooctane of 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ level (except 10 mg L^{-1} for sumithrin) and a pyrethroid-free soil sample treated with toluene and water under pressure for 6 min inside a microwave oven, which was employed as typical matrix.

Pyrethroid extracts were passed through a florisil column to reduce matrix interferences in the chromatographic determination. Several solvents were tested to elute completely the pyrethroids. In a first attempt, dichloromethane 33% (v/v) in hexane was employed, since it is generally employed for others chlorinated pesticides and PCB's [21].

Table 1
Recovery percentage of several pyrethroid standards of 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ irradiated during different periods of time at 700 W

Pyrethroid	Recovery (%) \pm s ^a		
	t = 6 min	t = 9 min	t = 12 min
Tetramethrin	98 \pm 2	97 \pm 1	94 \pm 2
Sumithrin	100 \pm 1	99 \pm 1	102 \pm 1
Cyfluthrin	101 \pm 4	101 \pm 2	101 \pm 4
Flucythrinate	99 \pm 1	101 \pm 1	100 \pm 3
Deltamethrin	98 \pm 4	98 \pm 1	99 \pm 2
Bifenthrin	101 \pm 2	102 \pm 1	101 \pm 2
Permethrin	99 \pm 2	102 \pm 2	100 \pm 1
Cypermethrin	100 \pm 3	103 \pm 4	102 \pm 3
Fluvalinate	100 \pm 3	101 \pm 2	101 \pm 4

Standard solutions in isooctane were treated in a 100 mL closed PTFE reactor in the presence of 10 mL toluene and 1 mL water.

^a Results obtained are the average of two independent determinations and the corresponding standard deviation.

However in the aforementioned conditions pyrethroids were not eluted. Diethyl ether used previously by other authors [12–14,18,19] was also tested and good recoveries were provided for all pyrethroids, except for tetramethrin which only was recovered at the 50% level.

Ethyl acetate allows the quantitative extraction of pyrethroids [4–7], but results were affected by the presence of coextracted substances from the soil, that provided no clean chromatograms with an irregular baseline and low signal to noise ratios. Dilutions of ethyl acetate in hexane were tested to decrease this matrix effect, but a reduced pyrethroids recovery was also found. Ethyl acetate 33% (v/v) in hexane provided the best results with minimal matrix coextraction and it provided quantitative data for all pyrethroids, except for tetramethrin which had a final recovery yield of 86%.

3.3. Microwave parameters for the pyrethroids extraction from soils

Power output and irradiation time are the main experimental parameters for microwave-assisted extraction. Spiked soils were irradiated modifying both, power values, from 350 to 700 W, and irradiation times, between 3 and 12 min. Table 2 shows the pyrethroids recovery yields found in different conditions. Other parameters, like the extractant selection, the effect of toluene volume and sample mass, were evaluated in a previous study [21] devoted to hydrocarbon, PCB and DDT determination in soils.

The microwave-assisted extraction employing 700 W and 6 min was effective for cyfluthrin, deltamethrin, permethrin, cypermethrin and fluvalinate; but for 9 min the recovery was quantitative for all the others pyrethroids (bifenthrin, flucythrinate and sumithrin), except for tetramethrin that only was recovered at the 85% level in spite of the increase of the irradiation time till 12 min.

In the treatment held at 500 W, only 6 min were needed for the complete recoveries of cyfluthrin, permethrin and fluvalinate; in 9 min flucythrinate, deltamethrin and cypermethrin and in 12 min for sumithrin. For the largest treatment time bifenthrin and tetramethrin only recovered 92 and 82%, respectively.

The extraction at 350 W generated lower recoveries, quantitative results were obtained for fluvalinate in 6 min; cyfluthrin, permethrin and cypermethrin in 9 and 12 min for the others pyrethroids (sumithrin, flucythrinate and deltamethrin), except bifenthrin and tetramethrin that only got 95 and 82% recovery yields, respectively.

When samples were let to stand for 2 h in the presence of toluene and water, only the 50% of pyrethroids considered were extracted to the organic phase, thus indicating the need of an extra energy to improve the solvent extraction of pyrethroids and the interest of using a 700 W irradiation for 9 min in order to enhance the quantitative recovery of studied compounds and to reduce the time of analysis.

Table 2
Recovery of pyrethroids from a soil sample after a microwave-assisted extraction in different conditions

Pyrethroid	Recovery (%) \pm s ^a													
	0 W			350 W			500 W			700 W				
	12 min	9 min	6 min	12 min	9 min	6 min	12 min	9 min	6 min	12 min	9 min	6 min		
Tetramethrin	43 \pm 4	67 \pm 8	74 \pm 4	82 \pm 1	77 \pm 1	78 \pm 4	82 \pm 1	81 \pm 1	77 \pm 2	82 \pm 1	71 \pm 1	82 \pm 3	86 \pm 1	85 \pm 1
Sumithrin	42 \pm 3	62 \pm 6	71 \pm 6	101 \pm 2	78 \pm 2	61 \pm 3	101 \pm 2	85 \pm 1	76 \pm 1	103 \pm 3	67 \pm 6	88 \pm 1	97 \pm 1	101 \pm 1
Cyfluthrin	46 \pm 8	65 \pm 7	91 \pm 7	102 \pm 3	101 \pm 7	75 \pm 6	102 \pm 3	101 \pm 3	96 \pm 6	102 \pm 5	71 \pm 9	100 \pm 5	104 \pm 7	104 \pm 6
Flucythrinate	43 \pm 2	57 \pm 8	87 \pm 9	99 \pm 2	88 \pm 5	68 \pm 6	99 \pm 2	98 \pm 3	87 \pm 4	102 \pm 2	61 \pm 6	91 \pm 2	100 \pm 1	101 \pm 1
Deltamethrin	37 \pm 6	54 \pm 5	75 \pm 4	100 \pm 2	86 \pm 4	84 \pm 4	100 \pm 2	100 \pm 1	84 \pm 4	104 \pm 2	64 \pm 6	103 \pm 4	106 \pm 2	107 \pm 1
Bifenthrin	52 \pm 2	67 \pm 5	74 \pm 1	95 \pm 2	90 \pm 4	81 \pm 2	95 \pm 2	90 \pm 3	80 \pm 1	92 \pm 2	76 \pm 4	85 \pm 1	97 \pm 1	98 \pm 2
Permethrin	53 \pm 2	57 \pm 3	92 \pm 4	103 \pm 2	102 \pm 2	88 \pm 2	103 \pm 2	108 \pm 5	102 \pm 5	102 \pm 1	86 \pm 5	102 \pm 2	100 \pm 1	101 \pm 2
Cypermethrin	60 \pm 5	69 \pm 6	91 \pm 6	103 \pm 5	95 \pm 4	91 \pm 3	100 \pm 6	100 \pm 5	88 \pm 6	104 \pm 5	87 \pm 8	103 \pm 6	102 \pm 5	105 \pm 6
Fluralinate	56 \pm 5	66 \pm 2	96 \pm 9	102 \pm 1	98 \pm 2	85 \pm 6	102 \pm 1	103 \pm 5	95 \pm 4	101 \pm 1	84 \pm 6	103 \pm 4	101 \pm 2	102 \pm 2

Samples were spiked with 50 ng g⁻¹ of all standard compounds, except for sumithrin for which a 1 μ g g⁻¹ level was added.

^a Results obtained are the average of two independent determinations \pm the corresponding standard deviation.

3.4. Safety features

The use of an unmodified domestic microwave oven for sample treatment provided the same safety features than those found in their use for cooking, without being observed radiation leaks which could affect the operator health and which have been reported for those systems modified to improve fume or vapours escape.

As an additional safety operation, a glass beaker with 100 mL distilled water was placed in a cold position, in the corner of the oven cavity, to avoid that unabsorbed radiation inside the reactor could come back to the magnetron.

The use of hermetically sealed reactors avoid the operator exposure and during the period of both, preliminary studies and application of the developed procedure, no accidents occurred.

When reactors were employed more than 100 times in some cases we detected small gaseous leaks and these reactors were rejected.

3.5. Analytical features of microwave-assisted extraction of pyrethroids

Typical chromatograms found for both, standard solution and extracts of spiked soil samples, determined by the proposed method, were indicated in Fig. 1 corresponding to the ECD detection.

It must be noticed that, due to the overlapping of chromatography peaks of considered compounds, the use of NCI-MS is preferable to that of ECD, in which case standard solution were injected separately from mixtures A and B indicated in the experimental set.

Calibration curves were established with seven standards, with pyrethroids concentrations ranging from 1000 to 10 μ g L⁻¹ and an internal standard concentration of 50 μ g L⁻¹. Limit of detection values were established from the expression $3s_{\text{blank}}/b$, being s_{blank} the standard deviation of five measurements of a standard solution of 50 μ g L⁻¹ and b the slope of the calibration curve. Table 3 shows the

Table 3
Calibration curves and limit of detection values for pyrethroids determination by GC-ECD

Pyrethroid	Area (A.U.) = $a + bC$			LOD (ng g ⁻¹)
	(ng mL ⁻¹)			
	a	b	R^2	
Tetramethrin	0.01	0.023	0.995	2
Sumithrin	-0.02	0.001	0.983	200
Cyfluthrin	-0.05	0.265	0.993	1
Flucythrinate	0.00	0.135	0.997	2
Deltamethrin	0.00	0.146	0.990	1
Bifenthrin	0.11	0.117	0.992	1
Permethrin	0.06	0.069	0.987	2
Cypermethrin	-0.03	0.158	0.999	3
Fluralinate	0.00	0.066	0.996	2

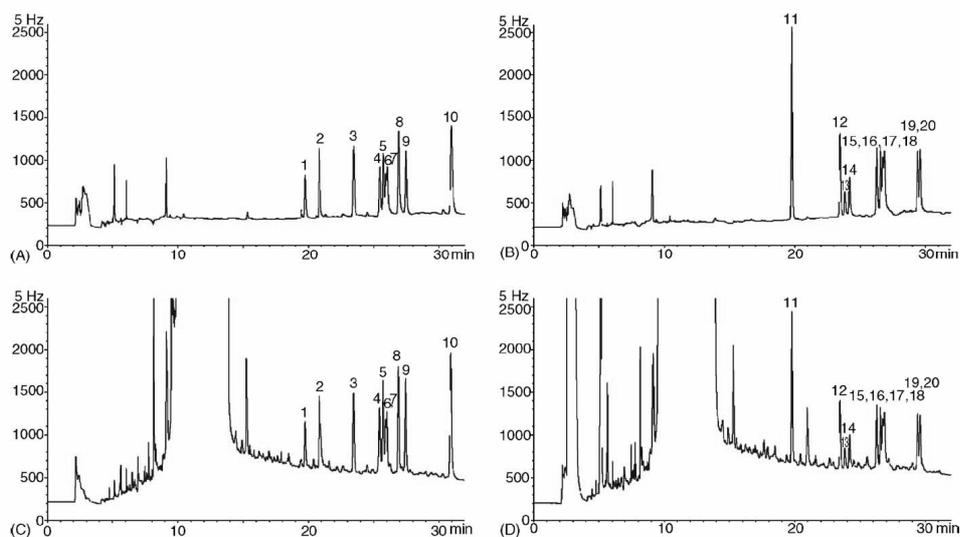


Fig. 1. GC-ECD chromatograms of standard solution of pyrethroids (A and B) and spiked soil extracts (C and D) at a 50 ng g^{-1} concentration level (except to sumithrin at $10 \mu\text{g g}^{-1}$). (1) Tetramethrin, (2) sumithrin, (3 and 12) PCB-195, (4–7) cyfluthrin, (8 and 9) flucythrinate, (10) deltamethrin, (11) bifenthrin, (13 and 14) permethrin, (15–18) cypermethrin and (19 and 20) fluvalinate.

Table 4
Ions measured, calibration curves and limit of detection values for pyrethroids determination by GC-NCI-MS

Pyrethroid	$m/z^{a,b}$	Area (A.U.) = $a + bC$ (ng mL^{-1})			LOD (ng g^{-1})
		a	b	R^2	
Tetramethrin	167.3	-0.28	0.0166	0.999	0.5
Sumithrin	167.3	-0.02	0.0007	0.999	2
Cyfluthrin	207.4	0.12	0.0074	0.999	0.6
Flucythrinate	242.8	-0.78	0.0748	0.998	0.7
Deltamethrin	81.0	0.14	0.0103	0.999	0.6
Bifenthrin	205.2	5.97	0.3938	0.998	0.5
Permethrin	207.4	-0.03	0.0014	0.998	0.3
Cypermethrin	207.4	0.03	0.0063	0.999	0.7
Fluvalinate	294.2	0.05	0.0336	0.999	0.4

^a Characteristic ions were quantified in a range of $m/z \pm 0.5$.

^b Ion measured for the internal standard (PCB-195) was $m/z = 430.5$.

calibration curves and limit of detection values in GC-ECD determination. For GC-NCI-MS measurements, Table 4 shows the selected masses employed for each pyrethroid and the analytical properties obtained.

The best sensitivity was obtained in all cases using mass spectrometry detection with limit of detection values from 0.3 to 2 ng g^{-1} . In ECD determination, limit of detection values for pyrethroids from 1 to 3 ng g^{-1} and 200 ng g^{-1} for sumithrin were found.

3.6. Comparison between microwave-assisted and ultrasonic extraction

As it has been indicated, pyrethroid insecticides can be determined after microwave-assisted extraction employing an irradiation time of 9 min and only 10 mL of toluene. In the other hand, ultrasonic extraction allows the extraction in 60 min with 60 mL of solvent. Real samples were determined by microwave-assisted and ultrasonic extraction and

Table 5
Determination of pyrethroids in soil by GC-NCI-MS using ultrasonic (US) and microwave-assisted extraction (MAE) methods

	Pyrethroids founded ^a (ng g ⁻¹)	US	MAE
Sample 1	Deltamethrin	52.2 ± 0.7	52.5 ± 0.6
	Cypermethrin	4.7 ± 0.2	4.8 ± 0.2
Sample 2	Cypermethrin	8.6 ± 0.1	8.93 ± 0.02
Sample 3	Deltamethrin	26.6 ± 0.7	29.0 ± 0.5
	Bifethrin	36.3 ± 0.3	37.6 ± 0.5

^a Results obtained are the average of two independent determinations ± the corresponding standard deviation.

the results obtained are shown in Table 5. It can be seen that, the values obtained for pyrethroids determination by both procedures are comparable.

4. Conclusion

It has been verified the stability of pyrethroid insecticides in front of microwave radiation and that they do not present any decomposition or losses during the extraction with toluene from spiked soil samples. The microwave-assisted extraction procedure is a fast and serious alternative to traditional extraction methods due to the instrumentation simplicity and the reduction of solvent consumption, waste generation and time employed, being a more environmentally friendly procedure than classical approaches based on Soxhlet extraction [17,19] or sonication [12,16].

An improved florasil-based clean-up was developed based on ethyl acetate:hexane (1:2) which provided the best recovery of studied compounds.

Chromatographic determinations were optimized for routine analysis by ECD, but for confirmation results and to obtain a best sensibility NCI-MS must be employed. In mass spectrometry, negative chemical ionization provides high selectivity for chlorinated compounds and the employment of selected masses permits the simultaneous identification and quantification of the nine pyrethroids under study.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Ministerio de Educación y Ciencia (PPQ2000-0816) and the grant "V Segles" provided by the Universitat de València to carry out this study.

References

- [1] Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles. Oregon State University. <http://extoxnet.orst.edu>.
- [2] D. Dent, *Insect Pest Management*, second ed. CAB International, 2000.
- [3] H. Jin, G.R.H. Webster, *Fresenius J. Anal. Chem.* 360 (1998) 573.
- [4] J. Nowak, J. Piasecki, L. Lwandowska, *Chem. Anal.* 40 (1995) 33.
- [5] Y.C. Ling, I.P. Huang, *J. Chromatogr. A* 695 (1995) 75.
- [6] K. Vig, D.K. Singh, H.C. Agarwal, A.K. Dhawan, P. Dureza, *J. Environ. Sci. Health B* 36 (2001) 421.
- [7] J.J. Jimenez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, L. Toribio, E. Arias, *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 147.
- [8] G.F. Pang, C.L. Fan, Y.Z. Chao, T.S. Zho, *J. Chromatogr. A* 667 (1994) 348.
- [9] M.S. Abbassy, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67 (2001) 225.
- [10] B. Alberó, C. Sanchez-Brunete, J.L. Tadeo, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 1165.
- [11] A. Di Muccio, P. Pelozzi, D.A. Barbini, T. Generali, A. Ausili, F. Vergori, *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 51.
- [12] T.B. Gao, S.M. Zhang, J.G. Tian, *Fenxi. Ceshi. Xuebao* 18 (1999) 6.
- [13] Z.J. Wang, W.A. Li, *Fenxi. Huaxue* 26 (1998) 1247.
- [14] T. Okada, M. Uno, M. Nozawa, K. Tanigawa, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 24 (1983) 147.
- [15] M. Yasin, P.J. Baugh, G.A. Bonwick, D.H. Davies, P. Hancock, M. Leinoudi, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 235.
- [16] G.A. Bonwick, C. Sun, P. Abdul Latif, P.J. Baugh, C.J. Smith, R. Armitage, D.H. Davies, *J. Chromatogr. A* 707 (1995) 293.
- [17] L. Rosenblum, S.T. Garris, J.N. Morgan, *J. AOAC Int.* 85 (2002) 1167.
- [18] M.E. Metwally, M.S. Osman, R. Al-Rushaid, *Food Chem.* 59 (1997) 283.
- [19] C.G. Wright, R.B. Leidy, H.E. Dupree, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51 (1993) 356.
- [20] C. Sparr Eskilsson, E. Björklund, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 227.
- [21] A. Pastor, E. Vázquez, R. Ciscar, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 241.
- [22] F. Lizondo, M.T. Vidal, M. de la Guardia, *Análisis* 19 (1991) 136.

III. “Uptake and bioavailability of persistent organic pollutants by plants grown in contaminated soil”

Francesc A. Esteve-Turrillas, Wanda C. Scott, Agustín Pastor and John R. Dean

Journal of Environmental Monitoring, 7 (2005) 1093–1098

Impact Index (2005) [ISI Web] = 1.578



Uptake and bioavailability of persistent organic pollutants by plants grown in contaminated soil

Francesc A. Esteve-Turrillas,^a Wanda C. Scott,^b Agustín Pastor^a and John R. Dean^{a,b}

^a Analytical Chemistry Department, University of Valencia, Edifici Jeroni Muñoz, 50th Dr. Moliner, 46100 Burjassot, Spain

^b School of Applied Sciences, Northumbria University, Ellison Building, Newcastle upon Tyne, UK NE1 8ST. E-mail: john.dean@unn.ac.uk; Fax: +44 191 227 3519; Tel: +44 191 227 3047

Received 25th May 2005, Accepted 19th August 2005

First published as an Advance Article on the web 9th September 2005

This paper assesses the uptake of persistent organic pollutants (POP's) into plants. In particular, uptake of α -endosulfan, β -endosulfan and endosulfan sulfate from lettuce. The lettuce plants were grown on compost that had previously been contaminated at 10 and 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ per POP. The soil was slurry spiked by adding the appropriate amount of POP in acetone in an approximate ratio of 1 : 2, w/v soil : solvent. The solvent was left to evaporate at ambient temperature for 24 hours. Lettuce plants were grown under artificial daylight for 12 hours a day. The influence of soil ageing on the recovery of POP's from spiked soil samples was also assessed. The average recovery of endosulfan compounds from slurry spiked soil (10, 20 and 40 $\mu\text{g g}^{-1}$) was consistent (92.9 \pm 4.4% for $n = 9$). However, ageing of endosulfan compounds on the slurry spiked soil resulted in lower recoveries (average losses were 12.5% after 14 days ageing of slurry spiked soil). The uptake of POP's was assessed by measuring the amount of endosulfan compounds in roots and leaves from lettuce plants after 10, 20 and 33 days. In addition, control plants grown in uncontaminated soil were monitored and analysed. It was found that endosulfan compounds were present in the roots of all lettuce plants irrespective of soil spike level or age of plant. In the 33 day lettuce plants where the soil was spiked at the highest level (50 $\mu\text{g g}^{-1}$) endosulfan compounds were determined in the leaves. The root to leaf ratio was found to be 3.1 for α -endosulfan, 46.0 for β -endosulfan, and 24.3 for endosulfan sulfate. Spiked lettuce samples were subjected to *in vitro* gastrointestinal extraction to assess the bioavailability of endosulfan compounds. No detectable endosulfan compounds were determined in the gastric extracts while small quantities (range 0.06–0.12 $\mu\text{g g}^{-1}$) were found in the intestinal extraction. All samples (soil and lettuce) were extracted using pressurised fluid extraction and analysed using gas chromatography with mass selective detection.

1. Introduction

Huge amounts of organochlorine insecticides are used throughout the world for the control of a wide variety of pests in food and non-food crops.¹ These compounds are well-known as environmentally persistent organic pollutants (POP's) and tend to accumulate in wildlife due to their lipophilicity.² The majority of these insecticides *e.g.* DDT, are banned in terms of their usage in the developed world.³

Currently, endosulfan is one of the most common organochlorine insecticides used; it has been used as a DDT substitute, owing to its lower bioaccumulation and is widely employed in large amounts in many parts of the world.⁴ Endosulfan (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin 3-oxide) comprises two stereoisomers, the α -isomer and β -isomer. This insecticide is used for a broad spectrum of pests as well as on several food crops such as tea, coffee, grains, fruits and vegetables; it has also been used as a wood preservative.^{5,6} In spite of this, it is considered a highly toxic pesticide (toxicity class 1) according to the US Environmental Protection Agency.^{5,7} Endosulfan is extremely toxic to fish and aquatic invertebrates and produces strong effects on the nervous system of many organisms, including man.^{4,6,8} This neurotoxic action is greater for the α -isomer compared to the β -isomer.⁹ Chronic exposure to endosulfan may result in convulsions and behavioural aberration.⁹

Endosulfan is considered as moderately persistent in the soil environment, its two isomers having different degradation

times, with half life values of 35 and 150 days in soils under neutral conditions for the α - and β -isomers, respectively.⁵ Its dissipation depends on several factors such as volatilization, hydrolysis, microbial degradation and photodecomposition, including the presence of fertilizer, humus content, crop pattern, atmospheric temperature, rain or pollutant concentration.^{6,10,11} Water degradation of this compound is rapid, but it can persist for longer times when it is bound to soil particles. Hydrolysis is the main degradation process for endosulfan, the β -isomer being hydrolysed faster than the α -isomer.⁴ The principal degradation product in soils and vegetables is endosulfan sulfate, even though other minority breakdown products are also formed such as diol, aldehyde, ether and lactone endosulfan derivatives.^{4,6,12}

According to the US Environmental Protection Agency (EPA), endosulfan pesticide levels in food are usually below the tolerance levels; 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ being the maximum allowable residue level for lettuce plants.⁷ Endosulfan has been detected in several food samples such as vegetables (0.5–13 ng g^{-1}), fruit juices (1–5 ng g^{-1}), tobacco, seafood (0.2–1.7 fg g^{-1}) and milk.^{5,13}

Relatively few studies have investigated the plant uptake of organic compounds from contaminated soils. For example, Gonzalez and co-workers have investigated the uptake of organochlorine pesticides (OCPs) by leek,¹⁴ tomato,¹⁵ and lettuce and chard¹⁶ grown on organic farms in the Los Padres Lake watershed in Argentina. In each case OCPs were accumulated in each type of plant studied. The chemical uptake and the distribution into the plant are affected by several factors

such as physico-chemical properties of the compound, environmental conditions, soil type and plant characteristics (type of root system, shape and chemical characteristics of the leaves, and lipid content).¹⁷ These processes are complex and can be described as a series of consecutive partition reactions, between soil solids and soil water, soil water and plant roots, plant roots and transpiration stream, and transpiration stream and plant stem. Compounds with high K_{OW} values are most likely to be sorbed by the plant root, while chemicals with lower K_{OW} values are likely to be translocated within the plant and may reach the above ground portions of the plant.¹⁷

Determination of endosulfan residues has usually been carried out by Soxhlet extraction in soils and homogenisation with organic solvents in vegetables, followed by gas chromatography separation with ECD or MS detection.¹² Recently, traditional analytical methods such as Soxhlet or liquid-liquid extraction (LLE) have been replaced by pressurised fluid extraction (PFE),¹⁸ microwave-assisted extraction (MAE)¹⁹ or supercritical fluid extraction (SFE),^{20,21} which require less energy, less solvent and provide shorter extraction times.^{22,23}

Nowadays, a new trend to evaluate the toxicity of persistent organic pollutants in terms of their potential bioavailability has been identified.²⁴ Various approaches are available based on the ability to simulate the environmental or human absorption conditions that are likely to lead to the availability of the POP from its matrix. While extensive studies have focused on the availability of POP's from soil²⁵ little has been done directly related to the potential uptake, and hence bioavailability, of POP's from vegetables.

The aim of this paper is to (a) assess the recovery of endosulfan compounds (α -endosulfan, β -endosulfan and endosulfan sulfate) from soil, (b) evaluate the uptake of endosulfan compounds into lettuce plants grown on contaminated soil, and (c) evaluate the potential for simulated *in vitro* gastrointestinal absorption of endosulfan compounds from lettuce.

2. Experimental

2.1. Apparatus and reagents

A Hewlett Packard gas chromatography HP G1800A GCD (Palo Alto, CA, USA) with a Hewlett Packard HP-5ms capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness), equipped with a quadrupole mass spectrometer detector was used for POP determinations.

A Dionex Accelerated Solvent Extraction ASE™ 200 (Sunnyvale, CA, USA) was used to extract soil and lettuce samples. Hydromatrix supplied by Varian Ltd. (Surrey, UK) was employed for sample drying and sample dispersion during the extraction process.

Standard solutions were prepared in dichloromethane, with α -endosulfan (99.6% w/w), β -endosulfan (99.9% w/w) and endosulfan sulfate (97.7% w/w) provided by Riedel-de Haën (Steinheim, Germany). A TCL Pesticides Mix provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used for reference material determination. Pentachloronitrobenzene (PCNB) (99% w/w) was employed as the internal standard (Aldrich, Steinheim, Germany). Acetone and dichloromethane were provided by Fisher Chemicals (Loughborough, UK) and anhydrous Na_2SO_4 by BDH Laboratory Supplies (Poole, UK).

Compost soil (Levington multipurpose compost) and lettuce seedling plants were obtained directly from local markets. A Resource Technology Corporation (Laramie, USA) certified reference material CRM805-050 was employed to assure the quantitative extraction of α -endosulfan and β -endosulfan in soils by the PFE method employed.

For the *in vitro* gastrointestinal extraction a shaking water-bath (Grant Instruments Ltd., OLS 200, Cambridge, UK) was employed. The pH values were adjusted with dilute HCl and NaOH and measured using a pH meter (Jenway 3010, Dun-

mow, UK). Pepsin-A powder 1 anson unit per g (lactose as diluent) and amylase were provided by BDH Chemicals Ltd. (Poole, UK), bile salts from Sigma Chemicals and pancreatin from Fisher Scientific.

2.2. General procedure: extractions

2.2.1. Soxhlet extraction of soil. In a cellulose extraction thimble, approximately 5 g (accurately weighed) of soil and 5 g of anhydrous Na_2SO_4 were added. The sample was extracted with 220 mL of acetone : dichloromethane 1 : 1 (v/v) for 24 hours. The extract was evaporated under a nitrogen flow to <10 mL, then 20 μ L of internal standard of 5 mg mL⁻¹ was added. The final extract solution (10.0 mL) was analysed by GC-MS.

2.2.2. Pressurised fluid extraction of soil. Into a 33 mL cell, approximately 8 g (accurately weighed) of soil and hydromatrix were added. The full cell was closed and extracted at 100 °C and 2000 psi, for 10 minutes, with acetone : dichloromethane 1 : 1 (v/v) as solvent. This extract was evaporated under a nitrogen flow to <10 mL, then 20 μ L of internal standard was added. The final extract solution (10.0 mL) was analysed by GC-MS.

2.2.3. Pressurised fluid extraction of lettuce. Into a 11 mL cell, approximately 5 g (accurately weighed) of lettuce and hydromatrix were placed. Two sequential extractions were performed at 100 °C and 2000 psi, during 10 minutes, with acetone : dichloromethane 1 : 1 (v/v) as solvent. In order to remove the extracted water 5 g of anhydrous Na_2SO_4 was added post-extraction, this extract was evaporated under a stream of nitrogen to dryness, then 0.5 mL of internal standard (10 μ g mL⁻¹) was added and this solution was analysed by GC-MS.

2.2.4. Liquid-liquid extraction of water, gastric and intestinal juice. Aqueous samples were extracted using 3 \times 10 mL DCM. The samples consisted of (15 mL) distilled water, gastric juice (0.1% w/v pepsin in saline) and intestinal juice (3% w/v pancreatin, 1% w/v amylase and 0.15% w/v bile salts). Each sample was spiked with endosulfan compounds (all 10 μ g mL⁻¹) to assess the influence of sample matrix on recovery. After addition of the internal standard (25 ppm) the extracts were analysed using GC-MS.

2.2.5. *In vitro* gastrointestinal extraction of lettuce. This determination consists of two sequential processes, a gastric and an intestinal digestion, each one carried out employing simulated human conditions (enzymes, pH and temperature). In the first stage, approximately 5 g (accurately weighed) of lettuce (chopped in several pieces) was treated with 15 mL of pepsin (0.1% w/v in saline). The pH of the solution was adjusted to pH 1.8 with diluted HCl. The mixture was then shaken at 100 rpm in a thermostatic bath maintained at 37 °C. The pH was measured every 30 min and maintained less than 2.5 with HCl. After 3 hours, the solution was centrifuged at 3000 rpm for 5 min and filtered.

The second stage involved extraction with intestinal juices. To the gastric digest residue, 5 mL of pancreatin (3% w/v), 5 mL of amylase (1% w/v) and 5 mL of bile salts (0.15% w/v), all in saline solution, were added. Diluted NaOH was used to maintain the pH at ~7 whilst shaking at 100 rpm for 3 hours in the thermostatic bath employing the same conditions as before. All extracts (gastric and intestinal) were extracted with 3 \times 15 mL DCM. This was then evaporated under a nitrogen flow to dryness and 0.5 mL of internal standard of 10 μ g mL⁻¹ was added prior to GC-MS analysis. The resultant sample residue

was analysed by PFE employing the same conditions as for the lettuce samples.

2.3 General procedure: preparation of soils and lettuce

2.3.1. Preparation of endosulfan contaminated soils for spiking experiments. To determine the influence of soil on the recovery of endosulfan compounds, spiking experiments were performed at (a) different concentrations (10, 20 and 40 $\mu\text{g g}^{-1}$) and (b) using different spiking procedures (spot, slurry) to investigate the effect of ageing. The effect of concentration was investigated using 25, 50 and 100 μL of a 2000 ppm stock solution of each endosulfan compound which was added to approximately 5 g of soil (accurately weighed). The effect of spiking procedure was investigated using 50 μL of each endosulfan compound. In spot spiking mode, the spiking solution was added directly to the soil in the extraction cell while in slurry spiking mode the spiking solution was added to 40 mL of acetone and then poured over the soil. The solvent was then allowed to evaporate overnight. The influence of endosulfan contact time on the soil was investigated by allowing the slurry spiked soil to age for 1, 6 and 14 days. Each soil sample was extracted using PFE using the procedure described above.

2.3.2. Preparation of endosulfan contaminated lettuces. Contaminated soils at two levels of concentration were used for this study. For the low level, 2 L of acetone containing 8 mg of each endosulfan compound standard was added to 800 g of soil and mixed thoroughly. The high level was prepared in the same manner except with 40 mg of endosulfan standard. The final endosulfan compound concentration in soil was estimated to be 10 and 50 $\mu\text{g g}^{-1}$, for low and high contamination levels respectively. After air drying for 48 h, the soils were mixed to ensure homogeneity prior to growing the lettuce seedling plants.

Small lettuce seedlings (approximately 10 cm height and 15–20 g) were transplanted into individual pots with 40 g of endosulfan spiked soil. Several lettuces were also planted in unspiked soil as control samples. The lettuce plants were grown over 10, 20 and 33 days. The plants were grown under artificial light with time intervals of 12 hours daylight and 12 hours dark. The air temperature and humidity were monitored over the growing duration. The air temperature was within the range 15.2 to 24.1 $^{\circ}\text{C}$ while the humidity varied between 43 and 79%. The water retention capacity of the soil was experimentally determined to be a minimum of 20 mL, therefore each plant was watered daily with 20 mL of water. No excess water resulted from this process. α -Endosulfan, β -endosulfan and endosulfan sulfate determinations were carried out on the lettuce plants (roots and leaves).

2.4 GC-MS analysis

For GC-MS determinations, an injection volume of 1 μL was employed in split mode (1 : 4). The injector temperature was 250 $^{\circ}\text{C}$ and helium was used as the carrier gas in constant flow mode of 1 mL min^{-1} . The temperature program of the oven was as follows: 60 $^{\circ}\text{C}$, held for 1 min, increased at a rate of 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 180 $^{\circ}\text{C}$, then a second rate of 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 250 $^{\circ}\text{C}$ and finally held 1 min. The detector temperature was 280 $^{\circ}\text{C}$ and measurements were carried out in selected ion monitoring (SIM) acquisition mode. Retention times and main ions selected for each compound, with their relative abundances, are summarized in Table 1. Detector tune tests were performed daily with perfluorotributylamine.

3. Results and discussion

3.1. Analytical features of persistent organic pollutant determination

Calibration curves were established with five standards, with concentrations ranging from 2 to 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ using an internal standard of concentration 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Limit of detection values were established using the expression $3s_{\text{blank}}/b$, where s_{blank} is the standard deviation of five measurements of a standard solution of 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and b the slope of the calibration curve. Table 1 shows the limit of detection values obtained for each compound. The detector response was linear over the range of concentration studied, with correlation coefficients ranging from 0.979 to 0.999. Limits of detection in soil were 0.6, 0.4 and 0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ for α -endosulfan, β -endosulfan and endosulfan sulfate, respectively and 0.05, 0.03 and 0.04 $\mu\text{g g}^{-1}$ in lettuce determinations.

3.2. Extraction of POP's compounds from soil

The first step was the development of an approach for the determination of POP's in soils, based on PFE. Previously determined optimal conditions for extraction of POP's from soil were employed.²⁶ A certified reference material was analysed by Soxhlet extraction and by PFE in order to assess the quantitative extraction of these compounds from soil. Pressurised fluid extraction uses a smaller amount of solvent than Soxhlet and provides quicker extractions. In this procedure a pre-concentration step was needed to increase sensitivity. It involved subjecting the extract to a nitrogen flow in order to achieve partial solvent evaporation. Recovery tests were carried out to check that minimal compound losses occurred under the cited conditions. Typical recoveries ranged from 82% for DDT to 94% for methoxychlor after Soxhlet extraction (solvent volume reduced from 220 mL to <10 mL) and 83% for α -endosulfan to 95% for endrin aldehyde after PFE (solvent volume ~50 mL reduced to <10 mL). No correction was made to subsequent data to adjust for these solvent evaporation losses. The recovery of POP's from the certified reference material, CRM 805-050, as determined by Soxhlet and PFE methods followed by GC-MS are shown in Table 2. In each case the results, by each extraction technique, were in agreement with certificate values. It should be noted that endosulfan sulfate was not present in the CRM. On that basis PFE was used for subsequent determination of POP's from soil.

3.3. Endosulfan ageing in soil

For this contaminant uptake study in lettuces, endosulfan compounds were the only persistent organic pollutant studied, owing to their wide use in vegetable crops. The endosulfan compounds studied were the α - and β -isomers, and their major metabolite, endosulfan sulfate.

In order to test the quantitative recoveries of endosulfan compounds at different concentration levels in soil, PFE was performed on spiked soil at three concentrations (10, 20 and 40 $\mu\text{g g}^{-1}$). Results shown in Table 3(A) indicate that quantitative recoveries can be obtained from slurry spiked soil irrespective of concentration. Soil blanks were also extracted and analysed to ensure that no other chlorinated insecticides or majority compounds were present, which may affect the endosulfan degradation and lettuce uptake.¹¹ Different ways of soil spiking were studied in order to investigate the influence of soil organic matter on the retention of endosulfan compounds. The results, shown in Table 3(B), indicate the influence of soil ageing on the recovery of endosulfan compounds from slurry spiked soil samples. The lowest recoveries were obtained from the slurry spiked soil which had been aged for 14 days indicating the influence of soil organic matter on the retention of endosulfan compounds.

Table 1 GC-MS parameters and limits of detection for persistent organic pollutants determination

Compound	RT	Quantifier ion (<i>m/z</i> , %)	Qualifier ion (<i>m/z</i> , %)	LOD/ $\mu\text{g mL}^{-1}$ in solution	LOD/ $\mu\text{g g}^{-1}$ in soil	LOD/ $\mu\text{g g}^{-1}$ in lettuce
Lindane	13.84	108.95 (100)	180.90 (98)	0.3	0.4	0.03
α -Endosulfan	21.01	194.90 (100)	169.90 (75)	0.5	0.6	0.05
DDE	22.24	245.95 (100)	246.95 (60)	0.6	0.7	0.06
Endrin	23.29	67.15 (100)	81.05 (34)	0.4	0.5	0.04
β -Endosulfan	23.75	194.90 (100)	158.90 (80)	0.3	0.4	0.03
DDD	24.31	235.05 (100)	237.50 (64)	0.3	0.4	0.03
Endrin aldehyde	24.72	67.05 (100)	249.85 (21)	0.6	0.7	0.06
Endosulfan sulfate	25.85	271.75 (100)	228.85 (80)	0.4	0.5	0.04
DDT	26.22	235.05 (100)	236.95 (64)	0.5	0.7	0.05
Methoxychlor	29.37	227.15 (100)	228.15 (17)	0.4	0.5	0.04
PCNB ^a	13.95	141.95 (100)	236.80 (90)			

^a Internal standard.

3.4. Endosulfan total determination in lettuce

Pressurised fluid extraction was carried out to assess the total recovery of each endosulfan compound from spiked lettuce samples. Both leaf surface and stems were spiked with endosulfan compounds at a concentration in lettuce of $33 \mu\text{g g}^{-1}$. The influence of PFE on the recovery of endosulfan compounds was evaluated. This was done by carrying out three successive extractions on the same spiked lettuce sample to assess the completeness of recovery. The results are shown in Table 4. It is observed that two extractions are needed for exhaustive recovery of endosulfan compounds from spiked lettuce samples. It is also observed that quantitative recovery is not obtained (average recoveries range from 72 to 77%). This may be attributable to degradation within the lettuce matrix or losses that occur during the spiking process.

3.5. Uptake of endosulfan compounds by lettuce

The uptake of endosulfan compounds by lettuce grown on contaminated soil (10 and $50 \mu\text{g g}^{-1}$) was determined. Control lettuce plants were also grown on unadulterated soil. Lettuce plants were harvested at 10, 20 and 33 days. The results are shown in Table 5. In accordance with expectations it is noted that endosulfan compounds are detected in the roots of lettuce plants even after 10 days. However, a growing period of 33 days on the most contaminated soil ($50 \mu\text{g g}^{-1}$) is required before any endosulfan compounds are detected in the leaves. The root to leaf ratio was found to be 3.1 for α -endosulfan, 46.0 for β -endosulfan, and 24.3 for endosulfan sulfate. It is also noted that during the growing period 10–33 days the amount of

endosulfan compounds in the roots of the lettuce plants increases. Similar results have been reported for leeks¹⁴ and tomatoes¹⁵ grown on organic farms (no direct application of pesticides) in Argentina over short, medium and long term growth periods. In this work^{14,15} endosulfan compound residues were monitored in the roots and leaves of leeks and tomatoes. In the case of leek plants,¹⁴ endosulfan compound residues were always the highest in the root for younger plants (15 and 59 days). In the case of leek plants at maturity (210 days) the highest levels were found in the leaves. These findings were in contrast to the data presented for tomatoes¹⁵ where the highest endosulfan compound residue levels were found in the leaves at 15, 59 and 151 days. In the case of residue levels of endosulfan compounds in the leek and tomato studies significantly higher concentrations of endosulfan sulfate were always found. This was reported to be due to the fact that both α -endosulfan and β -endosulfan metabolise within the plant to endosulfan sulfate.^{14,15}

3.6. Endosulfan stability using *in vitro* gastrointestinal extraction

In vitro gastrointestinal extraction consists of two procedures that simulate human digestion. The first stage involves extrac-

Table 3 Influence of (A) concentration and (B) spiking procedure and ageing on the recovery of endosulfan compounds from soil using PFE-GC-MS

(A)	Influence of concentration on recovery (%) from slurry spiked soil		
	α -Endosulfan	β -Endosulfan	Endosulfan sulfate
$10 \mu\text{g g}^{-1}$	89.0 ± 0.9	88.1 ± 3.3	95.0 ± 3.5
$20 \mu\text{g g}^{-1}$	90.0 ± 1.9	88.5 ± 3.2	94.1 ± 4.0
$40 \mu\text{g g}^{-1}$	95.6 ± 1.3	94.3 ± 1.1	101.6 ± 2.6
(B)	Influence of soil spiking procedure and ageing on the recovery (%) of endosulfan compounds (spiking concentration $20 \mu\text{g g}^{-1}$)		
	α -Endosulfan	β -Endosulfan	Endosulfan sulfate
Direct spiking	90.0 ± 1.9	88.5 ± 3.2	94.1 ± 4.0
Slurry spiking	85.7 ± 7.4	84.6 ± 6.6	92.1 ± 9.2
Slurry spiking and ageing for 6 days	76.9 ± 2.8	75.0 ± 3.7	82.7 ± 5.9
Slurry spiking and ageing for 14 days	74.9 ± 4.1	72.8 ± 1.4	77.1 ± 2.5

Table 2 Determination of POP's in a certified reference soil sample (CRM 805-050) using either Soxhlet extraction or PFE followed by GC-MS

Compound	Persistent organic pollutant concentration/ $\mu\text{g g}^{-1}$		
	Reference value ^a	Soxhlet extraction (mean \pm SD, $n = 3$)	PFE (mean \pm SD, $n = 3$)
Lindane	11 ± 5	11.5 ± 0.5	10.2 ± 0.8
α -Endosulfan	7 ± 4	3.2 ± 0.6	2.9 ± 0.3
DDE	19 ± 9	26.6 ± 0.6	23.3 ± 0.5
Endrin	13 ± 8	18.3 ± 0.4	20.9 ± 0.8
β -Endosulfan	6 ± 3	4.3 ± 0.9	3.7 ± 0.6
DDD	20 ± 9	22.0 ± 0.5	17 ± 1
Endrin aldehyde	0.1 ± 0.2	<LOD ^b	<LOD ^b
DDT	0.8 ± 0.3	<LOD ^b	<LOD ^b
Methoxychlor	16 ± 8	17.7 ± 0.3	15.1 ± 0.9

^a Resource technology corporation. ^b LOD = limit of detection.

Table 4 Influence of PFE on the recovery of endosulfan compounds from spiked lettuce samples^a

Compounds	Cumulative recovery (mean % ± SD, n = 3)					
	From leaves			From stem		
	1st extract	2nd extract	3rd extract	1st extract	2nd extract	3rd extract
α-Endosulfan	69.8 ± 11.5	71.9 ± 8.4	71.9 ± 8.4	59.7 ± 8.0	71.5 ± 6.6	71.5 ± 6.6
β-Endosulfan	70.5 ± 10.3	74.2 ± 6.3	74.2 ± 6.3	60.8 ± 10.3	72.1 ± 6.9	72.1 ± 6.9
Endosulfan sulfate	63.3 ± 11.5	76.8 ± 9.4	76.8 ± 9.4	64.4 ± 9.3	76.4 ± 6.4	76.4 ± 6.4

^a Spike level 33 µg g⁻¹.**Table 5** Uptake of endosulfan compounds by lettuce plants grown on contaminated soil followed by PFE-GC-MS

Endosulfan concentration in soil/µg g ⁻¹	Compound	Endosulfan concentration (mean ± SD, n = 3)/µg g ⁻¹					
		Day 10		Day 20		Day 33	
		Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf
10 µg g ⁻¹	α-Endosulfan	0.3 ± 0.2	<LOD ^a	1.4 ± 0.7	<LOD ^a	1.7 ± 0.3	<LOD ^a
	β-Endosulfan	0.12 ± 0.08	<LOD ^a	1.0 ± 0.6	<LOD ^a	1.5 ± 0.3	<LOD ^a
	Endosulfan sulfate	0.14 ± 0.06	<LOD ^a	1.2 ± 0.5	<LOD ^a	1.5 ± 0.4	<LOD ^a
50 µg g ⁻¹	α-Endosulfan	0.5 ± 0.3	<LOD ^a	1.7 ± 0.8	<LOD ^a	2.5 ± 0.6	0.8 ± 0.004
	β-Endosulfan	0.4 ± 0.2	<LOD ^a	0.8 ± 0.3	<LOD ^a	2.3 ± 0.6	0.05 ± 0.01
	Endosulfan sulfate	0.5 ± 0.2	<LOD ^a	1.2 ± 0.4	<LOD ^a	1.7 ± 0.4	0.07 ± 0.01

^a <LOD = less than the limit of detection.

tion with gastric juice (pepsin) to simulate the activity of the stomach, while stage two involves extraction with intestinal juice (pancreatin, amylase and bile salts) that simulates the activity of the intestines. These extractions were performed in a thermostatic bath at 37 °C with agitation during several hours. After this, liquid-liquid extraction of the gastric and intestinal extracts were carried out to determine the recovery of endosulfan compounds. Recovery tests of these processes were performed in order to assess the potential for decomposition and losses of some endosulfan compounds due to the presence of enzyme(s) and the influence of pH. Table 6 shows the recoveries of endosulfan compounds by liquid-liquid extraction in gastric juices and intestinal juices. Extraction of endosulfan compounds from distilled water was done as a control to enable the effect of the *in vitro* gastrointestinal extraction to be investigated. It is noted (Table 6) that recoveries in gastric and intestinal juices range from 82.1–86.1% which is comparable to the recoveries of endosulfan compounds from distilled water (88.5–89.9%).

3.7. Determination of endosulfan bioavailability in spiked lettuces

Assessment of the potential of gastrointestinal extraction to determine the bioavailability of endosulfan compounds required the use of spiked lettuce leaves. Lettuce leaves were spiked at a concentration of 10 µg g⁻¹. The lettuce leaves were

then subjected to *in vitro* gastrointestinal extraction. The resultant lettuce residue was then extracted using PFE. The results are shown in Table 7. The results indicate that the bioavailability of endosulfan compounds in spiked lettuce leaves is minimal (<3.5% bioavailability). The majority of the endosulfan compounds were not extracted by the *in vitro* gastrointestinal extraction approach, but remained within the lettuce matrix and were recovered by PFE. The total recovery by *in vitro* gastrointestinal extraction and PFE of the residual fraction amounted to approximately 35%. This non-quantitative recovery was attributable to losses caused by the transfer

Table 6 Liquid liquid extraction of endosulfan compounds^a from aqueous solution, gastric juice and intestinal juice followed by PFE-GC-MS

	Recovery (mean % ± SD, n = 5) based on 3 sequential extractions		
	Water	Gastric juice at pH 2.5	Intestinal juice at pH 7
α-Endosulfan	89.9 ± 0.12	82.1 ± 0.21	85.0 ± 0.20
β-Endosulfan	88.5 ± 0.19	86.1 ± 0.19	83.5 ± 0.22
Endosulfan sulfate	88.6 ± 0.34	85.4 ± 0.33	85.1 ± 0.20

^a Spike level 10 µg mL⁻¹.**Table 7** Recovery of endosulfan compounds from spiked lettuce leaves^a using PFE-GC-MS and an assessment of the bioavailability of endosulfan compounds using simulated *in vitro* gastrointestinal extraction followed by LLE-GC-MS

	Recovery (mean ± SD, n = 3) following <i>in vitro</i> gastric extraction/µg g ⁻¹	Recovery (mean ± SD, n = 3) following <i>in vitro</i> intestinal extraction/µg g ⁻¹	Residual fraction ^b (mean ± SD, n = 3)/µg g ⁻¹	Total recovery after G + I + residual fraction/µg g ⁻¹
	LLE-GC-MS	LLE-GC-MS	PFE-GC-MS	
α-Endosulfan	nd	0.06 ± 0.02	3.51 ± 0.64	3.56
β-Endosulfan	nd	0.12 ± 0.02	3.69 ± 0.76	3.81
Endosulfan sulfate	nd	0.09 ± 0.01	3.35 ± 0.72	3.44

nd = not detected. ^a Spiking level was 10 µg g⁻¹. ^b Reported on a dry weight basis (µg g⁻¹).

of lettuce material from the liquid-liquid extraction stage to the PFE stage.

The simulated *in vitro* gastric intestinal extraction was based on 3 hours gastric and 3 hours intestinal extraction. In the case of gastric extraction simulating activity in the stomach this represents the upper limit for food to be present. Typically, food is retained in the stomach from between 8 min to 3 hours. In the case of the intestinal extraction food samples can be present in the duodenum, jejunum and ileum for between 30 min, 1.5 hours and 4-5 hours, respectively. Therefore in this procedure, lettuce samples are subjected to approximately 50% of the potential time for intestinal absorption. In principle therefore, levels of intestinal extraction could double (increase by 50%) which would equate to <7% bioavailability ($0.034 \mu\text{g g}^{-1}$ for α -endosulfan, $0.065 \mu\text{g g}^{-1}$ for β -endosulfan, and $0.054 \mu\text{g g}^{-1}$ for endosulfan sulfate). These upper estimates of bioavailability from lettuce plants are well within the EPA tolerance level of $2 \mu\text{g g}^{-1}$ for the maximum allowable residue level for lettuce plants.

4. Conclusion

The uptake of α -endosulfan, β -endosulfan and endosulfan sulfate by lettuce plants from contaminated soil has been found to be minimal (up to $2.5 \mu\text{g g}^{-1}$ in roots and up to $0.8 \mu\text{g g}^{-1}$ in leaves) even when grown on contaminated soil (10 and $50 \mu\text{g g}^{-1}$). An assessment of the bioavailability of the endosulfan compounds using *in vitro* gastrointestinal extraction was carried out. It was found that a minimal amount of endosulfan compounds were determined to be available for absorption in the gut, based on the simulated extraction procedure.

Acknowledgements

One of us (F.A.E.T) thanks the financial support by the University of Valencia for the "V Segles" grant provided and John R. Dean for his support to carry out this research at Northumbria University, Newcastle upon Tyne. The Engineering and Physical Sciences Research Council are acknowledged for the award of an Industrial case award to W.C.S. in collaboration with LGC limited, London, with support from the Department of Trade and Industry under the National Measurement System Valid Analytical Measurement (VAM)

Programme. Mr. E. Ludkin, Northumbria University is acknowledged for technical support.

References

- 1 T. F. Guerin, *Environ. Pollut.*, 1999, **106**, 13.
- 2 J. Hong, H. Y. Kim, D. G. Kim, J. Seo and K. J. Kim, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1038**, 27.
- 3 A. Sabljic, *Chemosphere*, 2001, **43**, 363.
- 4 H. Ghadiri and C. W. Ross, *J. Environ. Manag.*, 2001, **62**, 55.
- 5 <http://extoxnet.orst.edu>, Extension Toxicology Network, Oregon State University, USA, September 2005.
- 6 N. Awasthi, R. Ahuja and A. Kumar, *Soil Biol. Biochem.*, 2000, **32**, 1697.
- 7 http://www.epa.gov/REDS/endosulfan_red.pdf, Environmental Protection Agency, USA, September 2005.
- 8 T. F. Guerin, *Environ. Pollut.*, 2001, **115**, 219.
- 9 V. Paul and E. Balasubramaniam, *Environ. Pharmacol.*, 1997, **3**, 151.
- 10 T. Bosma and H. Harms, *EAWAG News*, 1997, **40**, 28.
- 11 B. J. Reid, K. C. Jones and K. T. Semple, *Environ. Pollut.*, 2000, **108**, 103.
- 12 J. Castro, R. A. Perez, E. Miguel, C. Sanchez-Brunete and J. L. Tadeo, *J. Chromatogr. A*, 2002, **947**, 119.
- 13 B. Albero, C. Sanchez-Brunete and J. L. Tadeo, *J. Chromatogr. A*, 2003, **1007**, 137.
- 14 M. Gonzalez, K. S. B. Miglioranza, J. E. Aizpun De Moreno and V. J. Moreno, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 5024.
- 15 M. Gonzalez, K. S. B. Miglioranza, J. E. Aizpun De Moreno and V. J. Moreno, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 1353.
- 16 M. Gonzalez, K. S. B. Miglioranza, J. E. Aizpun De Moreno and V. J. Moreno, *Food Chem. Toxicol.*, 2005, **43**, 261.
- 17 S. R. Wild and K. C. Jones, *Sci. Total Environ.*, 1992, **119**, 85.
- 18 E. Björklund, T. Nilsson and S. Bøwadt, *Trends Anal. Chem.*, 2000, **19**, 434.
- 19 A. Pastor, E. Vázquez, R. Ciscar and M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **344**, 241.
- 20 I. J. Barnabas, J. R. Dean and S. P. Owen, *Analyst*, 1994, **119**, 2381.
- 21 E. Björklund, T. Nilsson, S. Bøwadt, K. Pilorz, L. Mathiasson and S. B. Hawthorne, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2000, **43**, 295.
- 22 C. Sparr Eskilsson and E. Björklund, *J. Chromatogr. A*, 2000, **902**, 227.
- 23 J. R. Dean and G. Xiong, *Trends Anal. Chem.*, 2000, **19**, 2381.
- 24 D. Weston and L. M. Mayer, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1998, **17**, 820.
- 25 J. R. Dean and W. C. Scott, *Trends Anal. Chem.*, 2004, **23**, 609.
- 26 W. C. Scott and J. R. Dean, *J. Environ. Monit.*, 2003, **5**, 724.

IV. “Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection”

Francesc A. Esteve-Turrillas, Agustín Pastor and Miguel de la Guardia

Analytica Chimica Acta, 553 (2005) 50–57

Impact Index (2005) [ISI Web] = 2.760

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Analytica Chimica Acta 553 (2005) 50–57

ANALYTICA
CHIMICA
ACTAwww.elsevier.com/locate/aca

Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection

Francesc A. Esteve-Turrillas, Agustín Pastor*, Miguel de la Guardia

*Analytical Chemistry Department, University of Valencia, Edifici Jeroni Muñoz, 50th Dr. Moliner, 46100 Burjassot, Valencia, Spain*Received 19 April 2005; received in revised form 21 July 2005; accepted 3 August 2005
Available online 16 September 2005

Abstract

A methodology has been developed for the determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils, based in a solid-phase extraction (SPE) with combined solid supports phases. Several solid phases such as florisil, alumina, C₁₈ and graphitized carbon black were tested in order to minimize fat residues, being a combination of treated alumina and C₁₈ which provided the best results.

Oil samples were partitioned with acetonitrile–hexane (1:1) and then eluted through a combined column packed with deactivated basic-alumina and C₁₈, employing the acetonitrile extract as elution solvent. Gas chromatography tandem mass spectrometry was used for determination.

Tetramethrin, Bifenthrin, Phenothrin, λ-Cyhalothrin, Permethrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Flucythrinate, Esfenvalerate, Fluvalinate and Deltamethrin were studied. Limits of detection values ranging from 0.3 to 1.4 ng/g and repeatability values from 4 to 13%, evaluated from the relative standard deviation of three analyses of samples spiked at 1 ng/g, were obtained.

Neither matrix effects nor interferences were observed employing the proposed treatment in olive oil analysis and recoveries at 25 and 100 ng/g level varied from 104 ± 2 to 91 ± 9%. The method can be also used for other vegetable oils such as sunflower, corn and soybean.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Pyrethroid; Residues; Vegetable oil; Solid-phase extraction; Alumina; C₁₈; Tandem mass

1. Introduction

Pyrethroids are synthetic pyrethrins that present a high sun stability and effectivity for a large spectrum of pests. Pyrethroid insecticides are widely used in fruit and vegetable crops. Nowadays, Phenothrin, λ-Cyhalothrin, Cyfluthrin, Cypermethrin and Deltamethrin are widely used in Spain for the treatment of olive crops [1]. The presence of pesticide residues in vegetable oils is an important factor in quality control that affects their price. Nowadays, the ecological agriculture which excludes categorically the use of fertilizers and pesticides, with the aim to preserve the environment and keep and increase the soil fertility, involves the need of highly sensitive and selective analytical procedures

to detect pesticide residues in called ecological products [2]. Detectable amounts of insecticide residues in olive fruits may sometimes found, being the main sources the direct application of insecticides on the tree and the contamination with soil during the collect.

Sample preparation is the most delicate step in pyrethroid determination at trace levels in vegetable oils, due to the difficult separation of pyrethroids from fatty matrix materials using standards procedures [3]. A rigorous clean-up of sample extract is necessary for a satisfactory pyrethroid separation from oil, in order to avoid high amount of fat residues in the final solution, which would decrease rapidly the column resolution efficiency and avoid the right pyrethroid determination.

Table 1 summarizes known methods for pyrethroid residue determinations in fatty materials, such as vegetable oil, animal fat, milk, butter and dietary products. The most used

* Corresponding author. Tel.: +34 96 354 44 54; fax: +34 96 354 44 54.
E-mail address: agustin.pastor@uv.es (A. Pastor).

Table 1
Reported procedures for pyrethroid residues determination in fatty samples

Sample	Sample pre-treatment	Sample weight	Pyrethroid	Recovery (%)	LOD (ppb)	Ref.			
Olive oil	Partition (hexane–acetonitrile 1:1) Low temperature precipitation SPE- <i>n</i> -Al ₂ O ₃ /acetonitrile:water	5 g	λ-Cyhalothrin	84–88	20–50	[4]			
			Permethrin	71–74					
			Cypermethrin	80–86					
			Deltamethrin	78–91					
Fat quails	Partition (hexane–acetonitrile 1:1) SPE- α -Al ₂ O ₃ 5.5%/hexane	1 g	Cypermethrin Permethrin	–	–	[5]			
Human milk	LLE (acetone–petroleum ether 1:1) Partition (hexane–acetonitrile 1:1) SPE-florisil/hexane:acetone (95:5) SPE-amirno/hexane:acetone (95:5)	25 g	Bifenthrin Cyfluthrin λ-Cyhalothrin Cypermethrin Deltamethrin Esfervalerate Flucythrinate Fluvalinate Permethrin Tetramethrin	–	15–60	[6]			
			Dietary composites	Soxhlet Partition (hexane–acetonitrile 1:1) SPE- <i>n</i> -Al ₂ O ₃ 10%/dichloromethane:hexane (70:30)	5 g	Permethrin	102–175	3–4	[7,8]
			Rape seed	PFE SPE with Al ₂ O ₃ GPC (BioBeads S-X3)	2 g	Deltamethrin λ-Cyhalothrin Cypermethrin Bifenthrin	77–128 81–115 79–112 80–90	–	[9]
			Animal fat	Blender with ethyl acetate GPC (BioBeads S-X3)	0.25 g	Permethrin Deltamethrin	67 61	10–20	[10]
			Animal fat	Cryogenic extraction SPE-florisil/ether SPE-C ₁₈ /acetonitrile	0.5 g	Cyfluthrin Cypermethrin Deltamethrin λ-Cyhalothrin Permethrin	85 118 32 14 127	12 8 2 2 10	[11]
Olive oil	GPC (TSK gel G2000 + G1000 HXL)	7.5 mg	Cyfluthrin Cypermethrin λ-Cyhalothrin Permethrin	79 92 99 98–92	40 100 30 30	[12]			
Fatty materials	Solid matrix dispersion Extrelut-3 SPE-(Extrelut 1 + C ₁₈) GPC (Ervirosep ABC + Phenogel 100A) SPE- <i>n</i> -Al ₂ O ₃ (0–5%)/dichloromethane:hexane SPE-florisil 10%/dichloromethane:hexane	1 g	Tetramethrin Cyfluthrin Flucythrinate Fluvalinate Deltamethrin	66–83 80–111	2	[13]			
			Milk, butter	Partition (acetonitrile–dichloromethane 3:1) GPC	–	–	1	[14]	
			Vegetable oil, butter	SPE-graphitised carbon black/acetonitrile	10 mL	λ-Cyhalothrin Permethrin Cyfluthrin Cypermethrin Deltamethrin	96–97 94–97 95–98 102–105 95–105	–	[15]
			Fatty samples	LLE (acetone–ether) Extrelut NT	–	Bifenthrin	–	–	[16]
Essential oil	SPE-(florisil + C ₁₈)/pentane	–	Bifenthrin	87	40	[17]			

Note: References obtained from the analytical abstracts in the period from January 1984 to November 2004. Abbreviations: LOD, limit of detection; GPC, gel permeation chromatography; SPE, solid-phase extraction; PFE, pressurized fluid extraction; SFE, supercritical fluid extraction; and LLE, liquid–liquid extraction.

extraction procedures for liquid samples are those based on a liquid–liquid partitioning with acetonitrile–hexane (1:1) [4–8]. In solid samples different methods are employed like: (i) pressurized fluid extraction (PFE) and supercriti-

cal fluid extraction (SFE) for rape seeds [9]; (ii) blending with ethyl acetate [10] and cryogenic extraction [11] for animal fat; and (iii) Soxhlet extraction for dietary composites [7,8].

The main clean-up procedures are based on gel permeation chromatography (GPC) [9,10,12–14] and solid-phase extraction (SPE) with several phases, as alumina [4,5,7–9,13], graphitized carbon black [15], florisil [6,13], diatomaceous earth [16] and mixtures florisil/C₁₈ [17] and diatomaceous earth/C₁₈ [13]. As it is shown in Table 1, acetonitrile has been frequently employed as elution solvent in SPE procedures.

On the other hand, pyrethroids determination is usually carried out by gas chromatography with electron capture or mass spectrometry detection and additional information can be obtained from the ISO standard NEN-EN 1528-1:1997 [18].

In our knowledge no analytical methods were proposed previously for the determinations of Tetramethrin, Bifenthrin, Phenothrin, Flucythrinate, Esfenvalerate or Fluvalinate residues in vegetable oil samples.

The purpose of this study was the development of a validated methodology to determine pyrethroid residues in vegetable oils like olive, sunflower, corn and soybean, based on a combination of clean-up methods: partition, solid-phase extraction and gel permeation chromatography.

2. Experimental

2.1. Apparatus and reagents

A Finnigan (Waltham, MS, USA) trace gas chromatograph, equipped with a Finnigan ion trap mass spectrometer detector Polaris Q and with a Teknokroma TRB-META.X5 column (30 m × 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness) (Barcelona, Spain), was used for chromatographic determinations.

A Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) high-performance liquid chromatograph 1050 Series, with an ultraviolet detector Hewlett Packard Series 1100, equipped with two Waters (Milford, MA, USA) Envirogel columns (19 mm × 150 mm and 19 mm × 300 mm); was employed for gel permeation chromatography.

Aluminium oxide for chromatography in both acidic (Type 504 c) and neutral form (Brockmann activity 1) were supplied by Fluka (Steinheim, Switzerland) and in the basic form (0.063–0.200 mm, 90 activity) was obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). All aluminium oxides were activated at 350 °C overnight and deactivated with distilled water. Florisil (60–100 mesh) was supplied by Acros (Geel, Belgium) and was activated overnight at 350 °C. Two grams of alumina or florisil were placed in plastic syringes between two glass wool layers and used as SPE cartridges.

Other solid phases employed were C₁₈ (500 mg Bond Elut) provided by Varian (Palo Alto, CA, USA) and graphitized carbon black (250 mg Envi-carb) obtained by Supelco (Bellefonte, PA, USA).

A Velp Scientifica (Milano, Italy) vortex zx³ stirrer was employed in the partition step.

Pyrethroid standard solutions were prepared in isooctane from Tetramethrin (98%, w/w), Bifenthrin (99%, w/w), Phenothrin (94%, w/w), λ-Cyhalothrin (97%, w/w), Permethrin (95%, w/w), Cyfluthrin (98%, w/w), Cypermethrin (95%, w/w), Flucythrinate (96%, w/w), Esfenvalerate (95%, w/w), Fluvalinate (91%, w/w) and Deltamethrin (95%, w/w). These standards were obtained from Fluka. PCB-195 10 µg/mL in toluene was used as internal standard and provided from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) and prepared in isooctane.

n-Hexane, acetonitrile, dichloromethane, isooctane and ethanol for pesticide residue analysis were provided by Scharlau (Barcelona, Spain). H₂SO₄ and KOH synthesis grade were also obtained from Scharlau.

2.2. General procedure

2.2.1. Partitioning acetonitrile–hexane

Five grams of oil sample were accurately weighted in a centrifuge 25 mL glass tube, 5 mL hexane were added and the mixture was homogenised. It was performed three successive extractions with 5 mL acetonitrile using vortex agitation and later centrifugation, being the pyrethroids transferred to the upper acetonitrile phase. The 15 mL acetonitrile extract was directly treated by SPE, without any previous evaporation step.

2.2.2. Solid-phase extraction

A 5 mL internal volume C₁₈ cartridge, containing 500 mg C₁₈, was loading with additional 2 g of basic alumina (deactivated with 5%, w/w, water) and conditioned with 10 mL acetonitrile. Then 15 mL partition acetonitrile extract were passed through the cartridge at an approximated speed of two drops per second. An additional portion of 10 mL fresh acetonitrile was passed for the complete pyrethroid elution. The acetonitrile extract was then evaporated till almost dryness in a rotary evaporator at 45 °C and 100 mbar and finally to dryness employing a nitrogen flow. The residue was dissolved in 0.5 mL of a 50 ng/mL internal standard (PCB-195) solution in isooctane.

2.2.3. GC–MS–MS determination

One microliter of sample was injected at 270 °C in splitless mode, employing a constant flow of 1 mL/min helium as carrier. The oven temperature program started from 60 °C, held for 1 min, increased at a rate of 20 °C/min up to 210 °C, then at 3 °C/min up to 270 °C and finally held 7 min. The transfer line and source temperature were fixed at 300 and 250 °C, respectively.

Electron impact ionization was performed with 70 eV energy and a helium flow of 0.3 mL/min, used as damping gas. Data acquisition in full scan mode was carried out with a mass scanning range of 50–650 *m/z*. Excitation energy, precursor and product ions for tandem mass determinations are shown in Table 2. Ion trap tests and mass calibration were weekly performed with perfluorotributylamine (PFTBA).

Table 2
Tandem mass spectrometry parameters for pyrethroids determination

Compound	Precursor ion ^a (<i>m/z</i>)	Excitation energy (eV)	Product ions ^b (<i>m/z</i>)
Tetramethrin	164.1	0.65	77.1
Bifenthrin	181.1	0.75	166.1+165.1
Phenothrin	183.1	0.85	165.1+168.1
λ -Cyhalothrin	197.1	0.65	141.1+161.1
PCE-195 ^a	429.9	1.45	394.8+392.8
Permethrin	183.1	0.80	165.1+168.1
Cyfluthrin	226.1	0.60	199.1+206.1
Cypermethrin	163.1	0.65	127.1+91.1
Flucythrinate	225.1	0.80	147.0+119.1
Esfenvalerate	225.1	0.75	147.1+119.1
Fluvalinate	250.1	1.30	200.1+215.1
Deltamethrin	172.1	0.50	77.1

^a Internal standard.

^b Isolation window width employed was *m/z* \pm 2.0.

^c Range of measurement was *m/z* \pm 0.5.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of the performance of clean-up sample procedures

Three different clean-up methodologies were tested for fat elimination in the analysis of a spiked sample of virgin olive oil: (i) acidic and basic hydrolysis; (ii) gel permeation chromatography; and (iii) solid-phase extraction. In this latter case, employing standard phases such as alumina, florisil, C₁₈ and graphitized carbon black.

In all experiments carried out the first step was an extraction by liquid–liquid partitioning with acetonitrile–hexane (1:1). It was found that pyrethroid insecticides were extracted quantitatively in the acetonitrile phase and a high percentage of fat was removed, with obtained solid residues between 0.8 and 1.4%, w/w.

Acetonitrile was employed as SPE elution solvent for two purposes: on the first hand minimizes the fatty compound elution and on the second hand avoid a solvent change between partition process and solid-phase extraction.

3.1.1. Acid and basic hydrolysis clean-up

The use of hydrolysis process is an established method for fat removal in a wide range of compounds determinations, as long as the compounds stability under these conditions was ensured, such as in polychlorinated biphenyls and some insecticides analysis. The procedure employed for pyrethroid determination in olive oil involves the treatment of 500 ng/mL pyrethroid standard solution in 5 mL hexane with 1 mL concentrated H₂SO₄ under vortex agitation during 5 min. The hexane extract was removed and two additional cleaning steps, with 5 mL hexane each one, were performed. The hexane solution obtained was treated with 5 mL water in order to eliminate acidic residues from the extract. The hexane was evaporated and reconstituted in 0.5 mL of a 50 ng/mL internal standard solution in isoctane.

A basic hydrolysis pre-treatment was also performed in the same conditions those used for acid hydrolysis, but employing 1 mL KOH 1% in ethanol.

Results obtained evidenced the instability of pyrethroids compounds under extreme pH treatments. Degradation of pyrethroids occurred in both mentioned processes, being basic pyrethroid hydrolysis stronger than acidic one. Acidic hydrolysis of solutions containing pyrethroid standards provided recoveries of 30–40% and the effect of basic hydrolysis was worse with obtained recoveries of 3–10%.

3.1.2. Gel permeation chromatography (GPC) clean-up

GPC is commonly used for interference removal of complex matrixes in pollutant determinations, such as polycyclic aromatic hydrocarbon residues in oils [19], polychlorinated biphenyl residues in food [20] or pollutants in sediment [21]. The fractionation of residue extracts allows the separation of the different compound families from the sample, moreover of a simultaneous interference removing of fatty materials, sulphur, etc.

The selection of the elution time for each compound is the main parameter in GPC when it is used as a clean-up pre-treatment. Pyrethroid elution window was established by employing 2 mL dichloromethane standard with 0.1 mg/L of all pyrethroids and collecting fractions each half-minute, determining the amount recovered in every fraction by gas chromatography. The standard solution, previously filtered through a 0.22 μ m polypropylene filter, was injected into the GPC system, employing a dichloromethane flow of 5 mL/min as mobile phase. The inset in Fig. 1 shows that a total recovery of pyrethroids was obtained with an elution window between 10.5 and 13.0 min. We can distinguish between three pyrethroid groups; the first one eluted from 10.5 to 11.0 min which includes λ -Cyhalothrin, Flucythrinate and Fluvalinate; the second one centred at 11.5 min including Tetramethrin, Bifenthrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Esfenvalerate and Deltamethrin and the third one found at 12.0 min which includes Phenothrin and Permethrin.

A second experiment was made taking the total elution volume between 10.5 and 13.0 min, corresponding to a volume of 12.5 mL, and making its analysis by gas chromatography, obtaining quantitative recoveries from 98 to 102% for all the pyrethroid considered.

An acetonitrile extract obtained for 5 g of olive oil after liquid–liquid partitioning with acetonitrile–hexane was evaporated in a rotary evaporator, reconstituted in 2 mL dichloromethane and injected in the GPC system. The fraction collected in the pyrethroid elution window provided a solid residue of 9.7 \pm 0.1 mg, not useful for gas chromatography determination of pyrethroids due to the high background noise provided at the measurement conditions. Moreover, the injection of samples treated by this way minimizes the column work life and thus can conclude that it is necessary to combine the aforementioned clean-up technique with another one in order to decrease the fat residue.

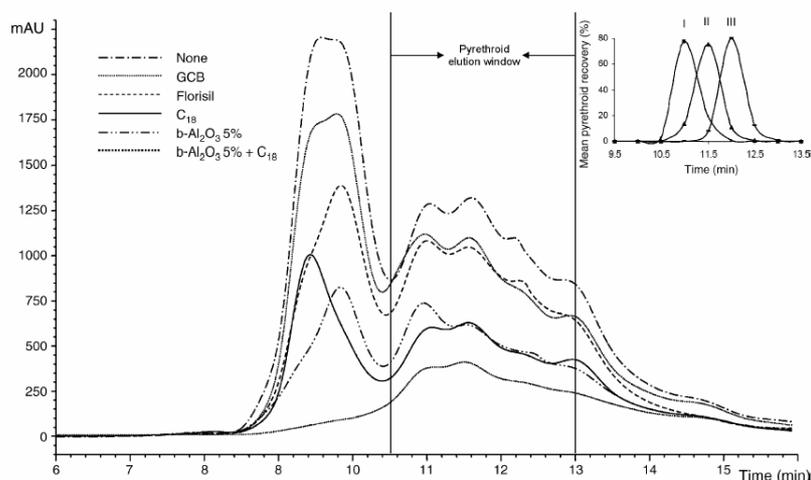


Fig. 1. GPC chromatograms obtained from oil residues without any pyrethroid after each clean-up process. Inset: Time elution window for pyrethroid compounds from a dichloromethane solution of all studied compounds (I) λ -Cyhalothrin, Flucythrinate, Fluvalinate; (II) Tetramethrin, Bifenthrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Esfenvalerate and Deltamethrin; (III) Phenothrin and Permethrin.

3.1.3. Solid-phase extraction clean-up

SPE is used in almost all methods found in the literature for pyrethroids determination in fatty samples. Several solid phases were tested such as florisil, C_{18} , graphitized carbon black (GCB) and alumina in the acidic, basic and neutral forms.

Each solid phase was checked previously with a 500 ng/mL pyrethroid standard in acetonitrile in order to ensure the quantitative elution of the studied compounds. A previous conditioning step with 10 mL acetonitrile was performed in all columns and after that a partition extract of 15 mL acetonitrile was passed through the cartridges and finally pyrethroids eluted with 10 mL fresh acetonitrile. In the case of alumina phases, an addition of an amount of water was necessary to deactivate alumina. Several recovery tests were carried out for a mixture of pyrethroid standard, employing acidic, neutral and basic alumina deactivated each one with 0, 1, 5 and 10% (w/w) of water. Alumina without water deactivation does not elute quantitatively pyrethroid compounds and a 10% of water was found to be necessary for the deactivation of acidic and neutral alumina, and a 5% in the case of basic alumina. All alumina types present similar behaviour for both pyrethroid retention and fat removal.

Gravimetric determination of oil residues were carried out after each treatment. Results are shown in Table 3 and it can conclude that none of them remove quantitatively fatty materials from the olive oil. The best results were provided employing C_{18} cartridges with an oil residue of 11 mg (0.22%). Alumina phases also present a good performance with residue amounts from 17 to 19 mg (0.34–0.37%). In

spite of this, not enough clean extracts were obtained in any case and no one treatment allows the gas chromatographic determination.

3.2. The use of combined clean-up methodologies

GPC chromatograms of oil residues without any traces of pyrethroids were obtained, in the same conditions as before,

Table 3

Fat removal performance of SPE with standard solid phases, gel permeation chromatography and combinations of both, for 5 g olive oil after a partition with acetonitrile–hexane

Clean-up method	Oil residue ($n=3$)	
	mg \pm s	% (w/w) ^a \pm s
None	56 \pm 8	1.1 \pm 0.2
Florisil	36 \pm 3	0.70 \pm 0.05
Graphitized carbon (GCB)	22 \pm 4	0.43 \pm 0.06
C_{18}	11 \pm 1	0.22 \pm 0.02
α - Al_2O_3 (10%)	17 \pm 4	0.34 \pm 0.08
n - Al_2O_3 (10%)	19.2 \pm 0.3	0.37 \pm 0.01
b - Al_2O_3 (5%)	17.1 \pm 0.2	0.34 \pm 0.01
GPC Envirogel	9.7 \pm 0.1	0.19 \pm 0.01
C_{18} + GPC	4.4 \pm 0.9	0.09 \pm 0.02
α - Al_2O_3 (10%) + GPC	5.5 \pm 0.3	0.11 \pm 0.01
n - Al_2O_3 (10%) + GPC	5 \pm 1	0.10 \pm 0.02
b - Al_2O_3 (5%) + GPC	5.1 \pm 0.1	0.10 \pm 0.01
α - Al_2O_3 (10%) + C_{18}	3 \pm 1	0.06 \pm 0.02
n - Al_2O_3 (10%) + C_{18}	5 \pm 1	0.10 \pm 0.02
b - Al_2O_3 (5%) + C_{18}	2.2 \pm 0.9	0.04 \pm 0.02

^a The residue percentage was calculated with respect to the initial amount of oil employed.

Table 4

Analytical features of GC–MS–MS determination of pyrethroids determination in vegetable oils after acetonitrile–hexane partition and combined alumina and C₁₈ SPE

Compound	Area (a.u.) = $a + bC$ (ng/mL) ^a			Standard ^b			Sample ^c	
	<i>a</i>	<i>b</i>	R ²	R.S.D. (%)	LOD (μg/L)	LOD (ng/g)	R.S.D. (%)	LOD (ng/g)
Tetramethrin	0.01	0.007	0.998	4.6	5	0.5	13.0	0.9
Bifenthrin	0.12	0.076	0.9999	3.2	1	0.1	7.7	0.3
Phenothrin	0.09	0.009	0.9993	3.3	4	0.4	7.8	1.1
λ-Cyhalothrin	0.07	0.023	0.9992	3.3	3	0.3	4.0	0.3
Permethrin	−0.01	0.018	0.9997	5.1	2	0.2	10.1	1.1
Cyfluthrin	−0.01	0.008	0.9990	5.1	3	0.3	9.3	1.0
Cypermethrin	0.11	0.010	0.997	8.3	4	0.4	9.4	1.4
Flucythrinate	−0.14	0.040	0.9990	3.8	2	0.2	7.4	0.4
Esfervalerate	−0.26	0.040	0.9992	2.2	2	0.2	9.4	1.1
Fluvalinate	−0.02	0.006	0.9990	4.1	2	0.2	12.1	1.0
Deltamethrin	−0.01	0.007	0.9992	2.0	5	0.5	6.3	0.7

^a Calibration curve.

^b Limit of detection (LOD) and relative standard deviation (R.S.D.) were established from data of a 10 μg/L pyrethroid standard.

^c Limit of detection and relative standard deviation were established from data of a sample spiked at 1 ng/g pyrethroid concentration.

after each one of the previously commented clean-up methods in order to know the peak outline and to find some different behaviours. Fig. 1 shows the aforementioned chromatograms. For the partition pre-treatment we can observe that a high peak is eluted between 8.5 and 10.5 min, and several minor peaks appear between 10.5 and 14.0 min, coeluting with pyrethroid compounds. The effect of florisil and GCB are nearly the same, decreasing all peaks, but without a complete elimination of them. It is interesting the different behaviour observed for alumina and C₁₈ treatments, both remove some fat GPC peaks, the 9.30 and 9.85 min peak, respectively.

Solid-phase extraction with a combination of alumina and C₁₈ phases improved the fat compounds removal of the oil sample (see Fig. 1). On the other hand, Table 3 shows the residual oil amount after each combined clean-up procedure, being the extract obtained after treatment with basic alumina and C₁₈ the cleanest one which provides an oil residue of 2.2 mg (0.04%, w/w), that allows the gas chromatographic determination of pyrethroid insecticides, without interference peaks. Table 3 also shows results for combination of alumina phases or C₁₈ cartridges coupled with a GPC process collect-

ing the pyrethroids fraction, also providing low oil residues amounts, but not as good as the use of a combination of basic alumina and C₁₈ phases.

3.3. Calibration and analytical features

Calibration curves were established with seven standards, with pyrethroid concentrations ranged from 10 to 1000 μg/L and an internal standard (PCB-195) fixed concentration of 50 μg/L.

Limit of detection values (LOD) were established from the IUPAC recommendation as $3S_{b,blank}/b$, where $S_{b,blank}$ is the standard deviation of five measurements of the lowest standard concentration level (10 μg/L) and b the slope of the calibration curve. In order to calculate a more realistic value of LOD, they were also calculated as the deviation of an extract of 1 ng/g spiked oil (in the final isooctane extract 10 μg/L).

Repeatability was established from the relative standard deviation of five replicate measurements of 10 μg/L pyrethroid standard and 1 ng/g spiked oil extract.

Table 5

Pyrethroid recoveries in spiked vegetable oils at two insecticide concentration using the proposed methodology

Compound	Recovery (% ± s, n = 3)							
	Olive oil		Sunflower oil		Corn oil		Soybean oil	
	100 ng/g	25 ng/g	100 ng/g	25 ng/g	100 ng/g	25 ng/g	100 ng/g	25 ng/g
Tetramethrin	99 ± 3	103 ± 7	103 ± 3	97 ± 7	102 ± 5	109 ± 8	96 ± 6	102 ± 5
Bifenthrin	100 ± 1	100 ± 5	98 ± 1	101 ± 5	107 ± 2	115 ± 3	99 ± 2	97 ± 4
Phenothrin	102 ± 1	99 ± 2	101 ± 1	100 ± 2	99 ± 2	99 ± 1	97 ± 2	99 ± 3
λ-Cyhalothrin	104 ± 2	96 ± 9	98 ± 4	95 ± 1	98 ± 2	92 ± 1	94 ± 1	92 ± 4
Permethrin	99 ± 3	99 ± 3	99 ± 2	101 ± 2	101 ± 2	102 ± 5	99 ± 3	98 ± 2
Cyfluthrin	101 ± 2	96 ± 4	100 ± 3	97 ± 4	101 ± 4	97 ± 2	98 ± 2	97 ± 3
Cypermethrin	100 ± 2	103 ± 7	101 ± 3	97 ± 4	104 ± 5	100 ± 4	97 ± 3	95 ± 5
Flucythrinate	98 ± 2	97 ± 4	99 ± 3	95 ± 5	98 ± 2	95 ± 2	94 ± 2	91 ± 3
Esfervalerate	103 ± 3	91 ± 9	99 ± 2	98 ± 2	97 ± 3	95 ± 7	95 ± 1	91 ± 4
Fluvalinate	97 ± 5	91 ± 9	98 ± 3	97 ± 3	99 ± 3	102 ± 3	97 ± 2	99 ± 5
Deltamethrin	97 ± 5	96 ± 2	100 ± 5	92 ± 9	110 ± 2	102 ± 7	99 ± 2	94 ± 9

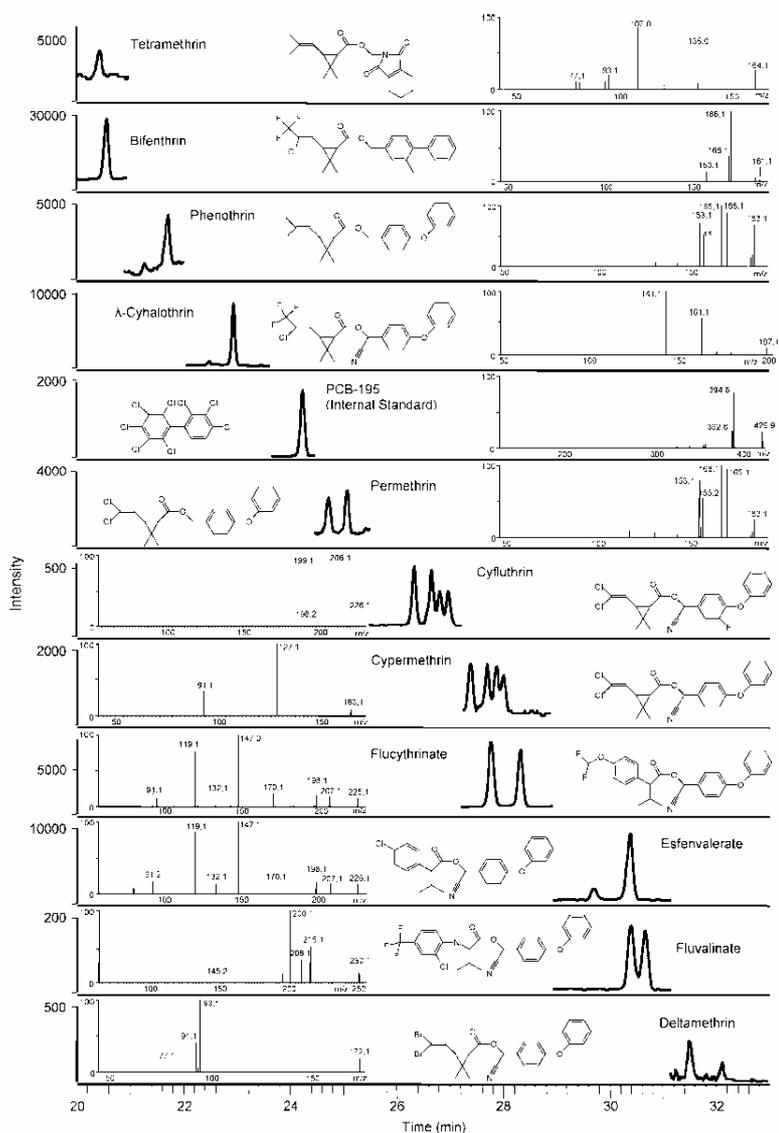


Fig. 2. GC-tandem mass chromatograms, also including the mass spectrum of every pyrethroid insecticide, considered determined in an olive oil sample spiked at 25 ng/g level.

Table 4 shows the repeatability and LOD values for each pyrethroid compound considered both in standard solution and samples, having obtained values for samples ranging from 4 to 13% and from 0.3 to 1.4 ng/g, respectively. An improvement in LOD was achieved for all pyrethroid compounds as compared with previous ones reported in the literature (see Table 1).

3.4. Pyrethroid recoveries in vegetable oils

Recovery studies were carried out with 5 g of olive oil spiked with 0.5 mL pyrethroid standard mixture at two concentration levels 250 and 1000 µg/L (final concentration referred to oil was 25 and 100 ng/g, respectively). Spiked samples were extracted and cleaned by the developed procedure. As it can be seen in Table 5, pyrethroid recoveries varied from 104 ± 2 to $91 \pm 9\%$ for the two concentration levels tested. A total ion chromatogram and mass spectrum, obtained by the recommended procedure, for a 25 ng/g spiked olive oil, is shown in Fig. 2.

In order to extend the developed methodology towards the pyrethroid determination of whatever vegetable oil, recovery studies were also performed with sunflower, corn and soybean oils. Some smooth matrix interferences were observed for Tetramethrin and Deltamethrin in sunflower and corn oil, using the highest mass product ions of 107.0 and 135.0 for Tetramethrin and 93.1 and 91.1 for Deltamethrin, but these were avoided adjusting the mass spectrometric determination parameters to the use of the 77.1 ion mass for both, obtaining appropriate recoveries. Table 5 shows the pyrethroid recoveries for vegetable oils and it can be confirmed that quantitative recoveries were found in all cases.

4. Conclusion

An easy (complex instrumentation is not required) and rapid (only two steps) methodology was developed for the quantitative extraction of pyrethroid insecticide residues from olive oils.

The use of SPE with combined solid phases (alumina and C₁₈) after a partition extraction with acetonitrile:hexane allows an effective clean-up of samples, providing clean extracts which can be directly injected in the GC system. The use of the whole partition acetonitrile extract as SPE elution solvent avoid a solvent change or evaporation step; reducing analysis time, solvent consumption and possible evaporation losses of analyte. A total volume of 35 mL acetonitrile, 10 mL for cartridge conditioning, 15 mL for partition and additional 10 mL for SPE, were employed for each sample treatment, with an estimated total analysis time of 40 min, which allows a sample throughput of 12 samples by day.

On the other hand, gas chromatography with tandem mass detection allows a high sensitive pyrethroid determination with LOD values for all pyrethroid insecticides between 0.3 and 1.4 ng/g, being also found a high selectivity of the aforementioned determination.

The proposed methodology was also used for pyrethroid determinations in sunflower, corn and soybean vegetable oils. Quantitative recoveries obtained demonstrate that the method is extensible for other vegetable oils. The method was validated for 11 pyrethroids insecticides through the evaluation of the sensitivity, repeatability and accuracy parameters.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Direcció General d'Universitats i Investigació de la Generalitat Valenciana (Project GV04B/247 and Grupos 03-118) and F.A.E.T. the "V Segles" grant provided by the *Universitat de València* to carry out this study.

References

- [1] C. de Lifian, Vademecum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales, Ediciones Agrotécnicas S.L., Spain, 2000.
- [2] Council Regulation (EEC) No. 2092/91, 24 June 1991.
- [3] F.A. Esteve-Turrillas, C.S. Aman, A. Pastor, M. de la Guardia, Anal. Chim. Acta 522 (2004) 73.
- [4] C. Lertza-Rizos, E.J. Avramides, E. Vist, J. Chromatogr. A 921 (2001) 297.
- [5] J. Le-Sech, Analusis 20 (1992) 379.
- [6] M. Zehring, A. Herrmann, Eur. Food Res. Technol. 212 (2001) 247.
- [7] L. Rosenblum, S.T. Garris, J.N. Morgan, J. AOAC Int. 85 (2002) 1167.
- [8] L. Rosenblum, T. Hieber, J. Morgan, J. AOAC Int. 84 (2001) 891.
- [9] T. Pihlstrom, G. Isaac, M. Waldeback, B.G. Osterdahl, K.E. Markides, Analyst 127 (2002) 554.
- [10] J. Zrostlikova, S.J. Lehotay, J. Hajslova, J. Sep. Sci. 25 (2002) 527.
- [11] F. Bordet, D. Inthavong, J.M. Fremy, J. AOAC Int. 85 (2002) 1398.
- [12] S. Barrek, O. Paise, M.F. Grenier-Loustalot, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 355.
- [13] A. Di-Muccio, P. Pelosi, D. Attard-Barbini, T. Generali, S. Girolimetti, P. Stefanelli, A. Leonelli, G. Amendola, L. Vergori, E. Viana-Fresquet, J. Chromatogr. A 833 (1999) 19.
- [14] A. Verant, E. Van Neste, S. Borrel, J. Mallet, Food Addit. Contam. 7 (1990) 117.
- [15] A. Ramesh, M. Balasubramanian, Analyst 123 (1998) 1799.
- [16] M. Zehring, Food Addit. Contam. 18 (2001) 859.
- [17] S. Barrek, O. Paise, M.F. Grenier-Loustalot, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 157.
- [18] Nederlands Normalisatie-Instituut, NEN-EN 1528-1:1997 en.
- [19] S. Martinez-Lopez, A. Morales-Noe, A. Pastor-García, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, J. AOAC Int., in press.
- [20] F.E. Ahmed, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 170.
- [21] M. Liess, R. Schulz, M.H.D. Liess, B. Rother, R. Kreuzig, Water Res. 33 (1999) 239.

V. “Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from semi permeable membrane devices (SPMDs) used to indoor air monitoring”

Francesc A. Esteve-Turrillas, Agustín Pastor and Miguel de la Guardia

Analytica Chimica Acta, 560 (2006) 118-127

Impact Index (2005) [ISI Web] = 2.760



Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from semi permeable membrane devices (SPMDs) used to indoor air monitoring

Francesc A. Esteve-Turrillas, Agustín Pastor*, Miguel de la Guardia

Analytical Chemistry Department, University of Valencia, Edifici Jeroni Múñoz, 50th Dr. Moliner, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 29 July 2005; received in revised form 2 December 2005; accepted 6 December 2005
Available online 17 January 2006

Abstract

A rapid and environmentally friendly methodology was developed for the extraction of pyrethroid insecticides from semi permeable membrane devices (SPMDs), in which they were preconcentrated in gas phase. The method was based on gas chromatography mass–mass spectrometry determination after a microwave-assisted extraction, in front of the widely employed dialysis method. SPMDs were extracted twice with 30 mL hexane:acetone, irradiated with 250 W power output, until 90 °C in 10 min, this temperature being held for another 10 min. Clean-up of the extracts was performed by acetonitrile–hexane partitioning and solid-phase extraction (SPE) with a combined cartridge of 2 g basic-alumina, deactivated with 5% water, and 500 mg C₁₈.

Pyrethroids investigated were Allethrin, Prallethrin, Tetramethrin, Bifenthrin, Phenothrin, λ-Cyhalothrin, Permethrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Flucythrinate, Esfenvalerate, Fluvalinate and Deltamethrin. The main pyrethroid synergist compound, Piperonyl Butoxide, was also studied. Limit of detection values ranging from 0.3 to 0.9 ng/SPMD and repeatability data, as relative standard deviation, from 2.9 to 9.4%, were achieved. Pyrethroid recoveries, for spiked SPMDs, with 100 ng of each one of the pyrethroids evaluated, were from 61 ± 8 to 103 ± 7% for microwave-assisted extraction, versus 54 ± 4 to 104 ± 3% for dialysis reference method. Substantial reduction of solvent consumed (from 400 to 60 mL) and analysis time (from 48 to 1 h) was achieved by using the developed procedure.

High concentration levels of pyrethroid compounds, from 0.14 to 7.3 µg/SPMD, were found in indoor air after 2 h of a standard application. © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Semi permeable membrane device (SPMD); Pyrethroid; Residues; Microwave-assisted extraction; Indoor air; Mass–mass spectrometry

1. Introduction

Pyrethroids are extensively used against insect pests as human lice, mosquitoes, flies or cockroaches in household treatments [1]. Pyrethroids are not easily absorbed through the skin, but are absorbed through the gut and pulmonary membrane. The *World Health Organization* (WHO) considers pyrethroids as neurotoxins, paralyzing the nervous system in mammals and insects [2]. Furthermore, some pyrethroids are classified by the *U.S. Environmental Protection Agency* as class C (possible human carcinogens) [3].

The sources of indoor air pyrethroid contamination are carpets and wallpaper; electric vaporisers to prevent mosquitoes

biting; anti flea pet treatments and principally the use of insecticide sprays [4]. Cypermethrin, Cyfluthrin, Deltamethrin and Cyhalothrin are widely used against malaria vectors; moreover Permethrin is employed for prevention and control of dengue [2]. Home insecticides employed in developed countries against insects, as flies, mosquitoes or cockroaches, are mainly composed of combinations of Permethrin, Tetramethrin, Phenothrin, Cypermethrin, Allethrin and Prallethrin as active principle, being also formulated with Piperonyl Butoxide, a synergist compound which increases the insecticide effectivity, and essential oils. Some physico-chemical properties of pyrethroids studied in this paper are shown in Table 1.

Active air samplers for pyrethroids are commonly based on solid-phase extraction made on pumping high volumes of air (5–1400 L) through Tenax or polyurethane foam filters [6–9]. The need of electricity to operate the aforementioned devices and their continuous maintenance are the main drawbacks of

* Corresponding author. Tel.: +34 96 354 44 54; fax: +34 96 354 44 54.
E-mail address: agustin.pastor@uv.es (A. Pastor).

Table 1
Pyrethroids and Piperonyl Butoxide physico-chemical properties

Compound	Molecular formula	Molecular weight (g/mol)	Vapor pressure ^a (Pa)	Boiling point ^a (°C)	Partition coefficient ^a (log <i>K</i> _{ow})
Allethrin	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	302.4	2 × 10 ⁻² (30 °C)	160	4.96
Prallethrin	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	300.4	1 × 10 ⁻³ (25 °C)	313	^b
Piperonyl Butoxide	C ₁₉ H ₃₀ O ₅	338.4	1 × 10 ⁻³ (25 °C)	180	4.29
Tetramethrin	C ₁₉ H ₂₆ NO ₄	331.4	9 × 10 ⁻⁴ (30 °C)	180–190	4.49
Bifenthrin	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	422.9	2 × 10 ⁻³ (25 °C)	100	8.00
Phenothrin	C ₂₃ H ₂₆ O ₃	350.5	2 × 10 ⁻⁴ (20 °C)	290	7.54
λ-Cyhalothrin	C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃	449.9	1 × 10 ⁻⁶ (20 °C)	187–190	5.26
Permethrin	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	391.3	1 × 10 ⁻⁶ (20 °C)	200	6.10
Cyfluthrin	C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃	434.3	1 × 10 ⁻⁸ (20 °C)	^b	5.94
Cypermethrin	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	416.3	2 × 10 ⁻⁷ (20 °C)	220 ^c	6.60
Flucythrinate	C ₂₆ H ₂₃ F ₂ NO ₄	451.4	1 × 10 ⁻⁶ (25 °C)	108	2.08
Esfenvalerate	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	419.9	2 × 10 ⁻⁷ (25 °C)	151–167	6.22
Fluvalinate	C ₂₆ H ₂₂ ClF ₃ N ₂ O ₃	502.9	9 × 10 ⁻¹¹ (25 °C)	164	3.85
Deltamethrin	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	505.2	1 × 10 ⁻⁸ (25 °C)	300	4.60

^a All data were obtained from Extension Toxicology Network-Pesticide Information Profiles (EXTOXNET-PIP) [1] and International Programme on Chemical Safety (IPCS-Intox) [5].

^b Data not found.

^c Decomposition temperature.

these expensive high volume sampling equipments. The use of a very low volume active sampler to collect directly 100 mL air using a syringe has been also reported [10].

On the other hand, there is only a single precedent of the use of passive samplers for indoor determination of pyrethroids and it is based on the determination of the aforementioned pesticides in suspended dust [11].

Semi permeable membrane devices (SPMDs) are broadly employed as environmental passive water samplers being also used for air sampling with excellent results for pollutants like polychlorinated biphenyls [12] and polyaromatic hydrocarbons [13]. These devices can provide a high preconcentration of pollutants from ultratrace levels in air, evaluating long term low-dose contamination. The accumulation of pyrethroid insecticide residues (Fenvalerate, Deltamethrin and Allethrin) in SPMD has been previously reported in water contamination monitoring studies [14,15], but in our knowledge there is no precedents on their use for pyrethroids determinations in air.

On the other hand, dialysis is the common way of extraction of whatever pollutant from SPMDs, being employed as a default procedure [16]. The development of new extraction techniques, for a wide number of analytes and matrices, as microwave-assisted extraction (MAE) or pressurized solvent extraction (PSE), has been rising in the last decades, reducing the long extraction times (24–48 h), and the high solvent volumes (300–500 mL) and avoiding the evaporation of high solvent volumes required on using the traditional extraction procedures such as dialysis or Soxhlet.

MAE has been applied to a wide range of sample types for environmental analysis of pollutants, such as vegetables, soils, sediments and water with an assured efficiency [17–19]. The solvent choice is very important in microwave-assisted extraction, where a medium with a permanent dipole moment (dielectric constant) is required to catch the microwave radiation. Because of that solvents such as water ($\epsilon' = 78.3$), acetonitrile ($\epsilon' = 37.5$), acetone ($\epsilon' = 20.7$) or solvent mixtures of polar and unpolar

reagents should be necessary for the use of microwave radiation to extract pollutants in transparent solvents as hexane ($\epsilon' = 1.9$) or toluene ($\epsilon' = 2.3$), being only possible to do the direct MAE extraction with unpolar solvents in samples with a high dielectric loss [20].

Previous studies carried out in our laboratory demonstrate that MAE is a rapid and easy tool for the extraction of several pollutants from SPMDs, such as: organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons [21]; or polybrominated diethyl ethers and polychlorinated naphthalenes. Recently a rapid dialysis procedure has been also established for PAHs and PCBs extraction from SPMDs using PSE extraction [22]. Both methodologies MAE and PSE improve analytical methods performance and could be used as post treatment of samples preconcentrated on SPMDs.

Pyrethroid compounds present high stability under microwave treatments, being determined previously in soils after MAE [23] and in strawberries by using focussed MAE [24].

So, the purpose of this study was to develop a methodology for determination of pyrethroid residues, preconcentrated on SPMD by using MAE treatment of the membrane instead of dialysis.

2. Experimental

2.1. Apparatus

A Finnigan (Waltham, MS, USA) Trace gas chromatograph with a Teknokroma TRB-META.X5 (30 m × 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness) column (Barcelona, Spain) and a Finnigan ion trap mass spectrometer detector Polaris Q was used for pyrethroid mass–mass determinations.

A Milestone Ethos SEL microwave laboratory systems (Soriso, Italy) was employed for the SPMD microwave-assisted extraction. Closed Teflon reactors of 100 mL internal

volume equipped with a Milestone fiber optic temperature probe model FOT-H-MLS1 were employed to do the extraction of pyrethroids under temperature adjusted conditions.

Low-density polyethylene (LDPE) layflat tubing, 2.54 cm wide, was obtained from Brentwood Plastic Inc. (Brentwood, MO, USA) with a wall thickness ranging from 84 to 89 μm . Triolein 99% was obtained from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). A Rovebloc sealer (Barcelona, Spain) was employed to heat seal the membranes.

2.2. Reagents and standards

Basic aluminium oxide (70–230 mesh, 90 activity) obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany) was activated at 350 °C overnight and deactivated with 5% distilled water. Two grams of alumina was placed on the top of a 500 mg Bond Elut C₁₈ cartridge provided by Varian (Palo Alto, CA, USA) and it was used for cleaning the extracts. A previous conditioning with 10 mL acetonitrile was performed on the alumina-C₁₈ cartridge before use.

Pyrethroid and Pyperonyl Butoxide standard solutions were prepared in isooctane from Prallethrin (10 ng/ μL in cyclohexane), Allethrin (10 ng/ μL in cyclohexane), Tetramethrin (98%, w/w), Bifenthrin (99%, w/w), Phenothrin (94%, w/w), λ -Cyhalothrin (97%, w/w), Permethrin (95%, w/w), Cyfluthrin (98%, w/w), Cypermethrin (95%, w/w), Flucythrinate (96%, w/w), Esfenvalerate (95%, w/w), Fluvalinate (91%, w/w), Deltamethrin (95%, w/w) and Pyperonyl Butoxide (95%, w/w). PCB-195 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in toluene) was used as internal standard. All the aforementioned standards were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland) and Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany).

Acetone, *n*-hexane, acetonitrile, isooctane, toluene, cyclohexane and ethyl acetate for pesticide residue analysis were provided by Scharlau (Barcelona, Spain).

Several commercial insecticide sprays, formulated with different pyrethroid compounds, were obtained from Spanish local markets.

2.3. SPMD preparation

Preparation of SPMDs was carried out according to previously described methods [21]. Low-density polyethylene layflat tubing was cut into segments of 104 cm, which were soaked overnight in hexane in order to remove additives and interfering compounds. The extracted membrane segment was heat sealed about 2 and 1 cm from one end (the main and a second safety seal), 1 mL triolein was introduced and it was squeezed to form a continuous and thin film. The SPMD was heat sealed also twice for the other extreme. SPMDs were stored in closed vessels under refrigeration at –20 °C before exposure, in order to avoid the absorption of contaminants. Each SPMD had an approximated weight of 4.85 g and a 508 cm²/mL membrane surface area per lipid volume.

For recovery studies SPMDs were filled with 1 mL triolein containing 100 ng of each pyrethroid compound and Pyperonyl Butoxide, being also stored under refrigeration at –20 °C

in separated containers in order to prevent cross contamination.

2.4. Indoor studies

In order to obtain actual samples with different composition and concentration of pyrethroid compounds, several experiences were carried out in a 22 m³ dark and closed room treated with different insecticide sprays. The room was conveniently cleaned, closed and treated with a commercial insecticide spray during 15 s, with an application rate of 0.54 g of active ingredient m⁻³. After a period of 2, 4, 6, 12 and 24 h, four SPMDs were deployed in the room without any cover or protective structure and suspended about 2 m height for a total time of 48 h. After that, SPMDs were collected, wrapped into aluminium foil and stored under refrigeration at –20 °C in independent plastic bags. SPMD blank was placed in an untreated room to evaluate the environment contamination during the device deployment in the absence of pyrethroids application.

2.5. SPMD extraction and analysis

2.5.1. Reference method for SPMD determination

SPMD was introduced in 250 mL flasks, with 200 mL *n*-hexane and magnetically stirred in the dark during 24 h at a 22 °C constant temperature. This dialysis step was repeated employing additional 200 mL fresh hexane portions. The extracts were mixed and evaporated in a rotatory evaporator to 5 mL.

2.5.2. Microwave-assisted extraction of pyrethroid residues in SPMD

SPMD was introduced in 100 mL Teflon reactor and 30 mL acetone:hexane (1:1, v/v) was added. Reactors were closed and irradiated with 250 W power output, till 90 °C for 10 min and this temperature was held for 10 min. After cooling, reactors were opened and a second extraction with 30 mL fresh acetone:hexane mixture was performed. Both extracts were evaporated in a rotatory evaporator and finally reconstituted in 5 mL hexane.

2.5.3. Cleaning of extracts

A liquid–liquid extraction followed by a solid-phase extraction was performed in order to eliminate small amounts of triolein and membrane residues. The SPMD extract, dissolved in 5 mL hexane, was extracted with 5 mL acetonitrile three times, the pyrethroids and Pyperonyl Butoxide being transferred to the acetonitrile phase. The acetonitrile extract (15 mL) was passed through the alumina-C₁₈ cartridge and a second volume of 10 mL fresh acetonitrile was passed for the complete elution of pyrethroids. The clean extract was evaporated almost to dryness in a rotary evaporator and finally to dryness employing a nitrogen flow. The residue was dissolved in 0.2 mL of 50 ng/mL internal standard (PCB-195) in isooctane.

2.5.4. GC–MS–MS determination

One microliter volume of a clean SPMD extract was injected in splitless mode at 270 °C, employing Helium as carrier in con-

Table 2
Gas chromatography parameters for pyrethroid compounds and Piperonyl Butoxide determination by mass spectrometry

Compound	Retention time (min)	Mass-mass			
		Selected ions ^a (<i>m/z</i>)	Precursor ion ^b (<i>m/z</i>)	Excitation energy (eV)	Product ions ^a (<i>m/z</i>)
Allethrin	13.9	123.1+81.1	123.1	1.00	81.1+79.1
Prallethrin	14.2	123.1+81.1	123.1	1.00	81.1+79.1
Piperonyl Butoxide	19.3	176.1+177.1	176.1	1.30	131.2+117.3
Tetramethrin	20.0–20.3	164.1	164.1	0.65	107.0+135.0
Bifenthrin	20.3	181.1+166.1	181.1	0.75	166.1+165.1
Phenothrin	21.6	183.1+123.1	183.1	0.85	165.1+168.1
λ-Cyhalothrin	22.8	181.1+141.1	197.1	0.65	141.1+161.1
PCB-195 ^c	24.3	429.9+427.9	429.9	1.45	394.8+392.8
Permethrin	24.8–25.1	183.1+165.1	183.1	0.80	165.1+168.1
Cyfluthrin	26.5–26.8–26.9–27.1	206.1+199.1	226.1	0.60	199.1+206.1
Cypermethrin	27.3–27.7–27.8–27.9	181.1+127.1	163.1	0.65	127.1+91.1
Flucythrinate	27.9–28.5	225.1+199.1	225.1	0.80	147.0+119.1
Esfenvalerate	30.6	225.1+125.1	225.1	0.75	147.1+119.1
Fluvalinate	30.6–30.7	250.1	250.1	1.30	200.1+215.1
Deltamethrin	32.5	253.1+181.1	172.1	0.50	93.1+91.1

^a Range of measurement was *m/z* ± 0.5.

^b Isolation window width employed was *m/z* ± 2.0.

^c Internal standard.

stant flow mode at 1 mL/min. Oven temperature program was 60 °C, held for 2 min, increased at a rate of 20 °C/min up to 210 °C, then at 3 °C/min up to 270 °C and finally held for 7 min. The transfer line and source temperatures were 300 and 250 °C, respectively.

Electron impact ionization was performed with electron energy of 70 eV and 0.3 mL/min Helium was employed as damping gas. Acquisitions in full scan mode were carried out with mass scanning range from 50 to 650 *m/z*. Selected masses for full scan and excitation energy, precursor and products ions for mass–mass determinations are shown in Table 2. Ion trap tests and mass calibration were weekly performed with perfluorotributylamine (PFTBA).

Data found for samples were interpolated in external calibration lines obtained from mixed solutions of the 13 pyrethroids

considered and Piperonyl Butoxide using PCB 195 as internal standard for injection.

2.5.5. Calibration and analytical features

Calibration curves were obtained from external standards of the 13 compounds studied at seven concentration levels, with pyrethroid and Piperonyl Butoxide concentrations from 10 to 1000 µg/L and an internal standard, PCB-195, fixed concentration of 50 µg/L.

Limit of detection values were established from the IUPAC recommendation as $3S_{\text{blank}}/b$, where *b* is the slope of the calibration curve and S_{blank} is the standard deviation of five measurements of a 10 µg/L standard.

Table 3 shows the limits of detection of pyrethroids and Piperonyl Butoxide expressed as minimum compound amount (ng)

Table 3
GC–MS–MS limits of detection and calibration curves obtained for pyrethroids and Piperonyl Butoxide determination in SPMDs

Compound	Area (a.u.) = $a + bC$ (ng/SPMD) ^a			R.S.D. ^b (%)	LOD ^c (ng/SPMD)
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>R</i> ²		
Allethrin	0.04	0.0117	0.996	6.7	0.8
Prallethrin	0.04	0.0148	0.9993	5.0	0.5
Piperonyl Butoxide	0.19	0.0911	0.9997	7.6	0.8
Tetramethrin	−0.04	0.0122	0.9994	7.9	0.9
Bifenthrin	0.30	0.0653	0.9996	8.3	0.7
Phenothrin	−0.07	0.0085	0.998	2.9	0.7
λ-Cyhalothrin	−0.16	0.0200	0.997	4.0	0.8
Permethrin	−0.05	0.0170	0.9996	7.8	0.7
Cyfluthrin	−0.01	0.0048	0.9991	9.4	0.7
Cypermethrin	0.29	0.0126	0.996	8.8	0.6
Flucythrinate	−0.20	0.0305	0.998	9.0	0.4
Esfenvalerate	−0.11	0.0310	0.9995	7.6	0.3
Fluvalinate	0.02	0.0036	0.9991	9.1	0.6
Deltamethrin	0.06	0.0064	0.996	8.3	0.4

^a Calibration curve.

^b Standard relative deviation.

^c Limit of detection.

detected in the semi permeable membrane device. Limits of detection values ranging from 0.3 to 0.9 ng/SPMD were found.

Repeatability of the developed procedure was also evaluated for a 10 µg/L pyrethroid standard, for which relative standard deviation (R.S.D.) values, established for five replicate measurements, are shown in Table 3 and range from 2.9 to 9.4%.

3. Results and discussion

3.1. Preliminary studies

As it has been evidenced by our group experience [21], polyethylene membranes present enough strength to resist the microwave treatment, reaching temperatures till 90 °C during 5 min in the presence of acetone:hexane (1:1, v/v), without a complete degradation or collapse of the devices. Solvents more often employed in MAE for pesticide residue determinations are mainly a mixture of acetone:hexane (1:1), pure hexane or toluene. These sets of solvents plus cyclohexane, acetonitrile and ethyl acetate were tested with unspiked devices in order to know the maximum temperature to assure the membrane stability.

The maximum temperature resisted by the membrane depends on the solvent employed. High polarity solvents, such as acetonitrile or ethyl acetate, permit treatments at 100 °C in front of the low temperatures (till 70 °C) resisted in the presence of apolar solvents as hexane or toluene. Mixtures of toluene and hexane with acetone were also tested and permit extraction temperatures of 90 °C. Treatments with high temperatures dissolve and collapse the polyethylene membrane and do not allow the pyrethroid determination due to the high amount of plastic residues coextracted.

In accordance with previous studies [22,23], pyrethroid insecticides are stable under strong microwave treatments. A rapid test was carried out in order to check this stability, where 0.1 mL of a pyrethroids and Pyperonyl Butoxide standard solution of 1 µg/mL of each compound in 30 mL hexane:acetone (1:1, v/v) was treated under the maximum microwave treatment resisted by the SPMDs (100 °C for 10 min). Pyrethroid and Pyperonyl Butoxide recoveries obtained ranged from 96 to 105%, with a maximum deviation value of 8% ($n=3$). So, we can conclude that neither pyrethroid insecticide is degraded through the microwave treatment.

3.2. Selection of parameters for MAE

Solvent choice, temperature, extraction time, solvent volume and matrix characteristics, especially the water content, are the main variables to be selected in MAE [20]. The most important parameter is the solvent, its selection being the first variable studied for obtaining an optimum extraction process. So, solvent properties such as dielectric constant, interaction with matrix and analyte solubility were considered. Solvent selected must present a high selectivity for the extraction of pyrethroids and be compatible with the cleaning steps of the analytical procedure. The solvents tested in SPMD stability studies were employed for the extraction of pyrethroid residues (see Table 4). The sol-

vent amount employed must be enough to ensure the sample immersion, thus 30 mL was selected.

Temperature is one of the most investigated parameters in whatever extraction procedure. As previously said, SPMD treatment presents temperature restrictions due to the amount of polyethylene oligomers extracted at high temperatures. This matrix extraction depends basically on both, solvent employed and temperature reached. Thus, maximum temperatures tolerated for each solvent were employed for the recovery study.

SPMDs spiked with pyrethroids and Pyperonyl Butoxide (100 ng of each one) were extracted in several experiments, employing 30 mL of solvent. The standard procedure used was a heating step for 10 min, until to reach the maximum temperature (70, 90 or 100 °C depending on the solvent), this temperature being held for additional 10 min. Maximum power output was adjusted depending on the microwave absorption of each solvent or mixture of solvents tested. When hexane and toluene were employed, the microwave energy was directly absorbed by triolein and the system heated by convection. So, a maximum power value was used. Cyclohexane, acetonitrile, ethyl acetate and acetone absorb strongly the radiation and small power values were used to avoid overheating.

Two successive extractions made on the same SPMD were carried out under the same conditions. Experimental conditions for each extraction and pyrethroid recoveries obtained are shown in Table 4. The best results correspond to two extractions at 70 °C, with 30 mL toluene with recovery values ranging from 85 ± 9 to 113 ± 4%, except for Phenothrin with a recovery of 69 ± 3%. Hexane:acetone at 90 °C is also a good pyrethroid extractant, with recovery values ranging from 87 ± 8 to 103 ± 7%, this value 61 ± 8% being low for Deltamethrin. Toluene cannot be recommended for MAE of pyrethroids, because of the risks of magnetron damage, due to the use of a high power output. So, hexane:acetone was selected as extraction solvent. The use of other solvents achieves poor results, always being smaller than those obtained with toluene or hexane:acetone.

Recoveries obtained for the proposed MAE procedure are always the same or higher than those obtained by dialysis, this behaviour being due to the high working temperature, which provides a substantial increasing of the solvent extraction capabilities.

As shown in Table 4, the use of hexane:acetone also extracts big amounts of SPMD matrix, 1.45 g instead of the 0.03 g extracted by dialysis, but it can be corrected through the use of an appropriate clean-up of the extracts.

3.3. Matrix interferences

The main kind of interferences inherent with the use of SPMDs are related to the coextraction of triolein, polyethylene oligomers and triolein impurities, such as oleic acid and ethyl oleate. Oleic acid found in exposed SPMD results from a methyl oleate hydrolysis on the exterior side of SPMD which diffuses back into the SPMD [25].

Gel permeation chromatography has been systematically employed for the fractionation and removing of polyethylene

Table 4
Experimental conditions and pyrethroid recoveries obtained from spiked SPMDs, 100 ng each pyrethroid compound and Piperonyl Butoxide, after dialysis and microwave-assisted extraction with several solvents

	Dialysis		MAE												
	Hexane ^a	Hexane ^a	Toluene ^a	Cyclohexane:hexane ^a	Acetonitrile ^a	Ethyl acetate ^a	Hexane:acetone ^a	Toluene:acetone ^a							
Solvent volume (mL)	400	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	
Temperature (°C)	20	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	
Microwave power (W)	-	1000	1000	1000	1000	150	400	250	200						
Extraction time	48 h	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	
Compound	Recoveries (% ± s, n=2)														
	1st+2nd ^b	1st ^b	2nd ^b	1st ^b	2nd ^b	1st ^b	2nd ^b	1st ^b	2nd ^b	1st ^b	2nd ^b	1st ^b	2nd ^b	1st ^b	2nd ^b
Allethrin	92 ± 10	69 ± 11	87 ± 7	99 ± 3	113 ± 9	65 ± 4	82 ± 4	50 ± 7	64 ± 2	62 ± 2	78 ± 3	78 ± 8	102 ± 7	72 ± 10	92 ± 2
Prallethrin	91 ± 7	58 ± 9	74 ± 5	83 ± 7	96 ± 3	54 ± 5	70 ± 4	41 ± 8	54 ± 3	52 ± 3	67 ± 4	65 ± 12	87 ± 8	60 ± 8	79 ± 4
Piperonyl Butoxide	100 ± 4	65 ± 8	88 ± 2	94 ± 5	114 ± 6	62 ± 2	83 ± 3	47 ± 3	64 ± 2	59 ± 2	79 ± 1	74 ± 12	103 ± 7	68 ± 6	93 ± 1
Tetramethrin	86 ± 2	64 ± 12	81 ± 4	73 ± 7	92 ± 5	69 ± 3	87 ± 5	37 ± 9	52 ± 1	54 ± 2	72 ± 3	76 ± 13	101 ± 4	74 ± 11	97 ± 4
Bifenthrin	76 ± 4	57 ± 11	73 ± 3	65 ± 11	85 ± 9	63 ± 4	80 ± 5	33 ± 1	49 ± 1	49 ± 2	67 ± 1	69 ± 11	92 ± 2	65 ± 8	86 ± 1
Phenothrin	104 ± 3	27 ± 10	42 ± 2	49 ± 2	69 ± 3	42 ± 4	58 ± 8	27 ± 2	46 ± 2	27 ± 2	43 ± 2	72 ± 5	97 ± 9	78 ± 7	99 ± 1
λ-Cyhalothrin	62 ± 2	55 ± 10	74 ± 5	77 ± 7	97 ± 5	57 ± 2	77 ± 5	34 ± 4	47 ± 1	53 ± 3	73 ± 1	62 ± 15	88 ± 3	61 ± 9	85 ± 2
Permethrin	85 ± 5	63 ± 11	83 ± 3	81 ± 6	102 ± 5	63 ± 2	80 ± 3	49 ± 6	70 ± 1	58 ± 3	77 ± 3	66 ± 7	90 ± 9	64 ± 6	86 ± 3
Cyfluthrin	79 ± 6	62 ± 11	83 ± 4	95 ± 4	113 ± 4	58 ± 3	79 ± 5	48 ± 6	62 ± 3	58 ± 4	76 ± 4	64 ± 11	91 ± 5	62 ± 10	85 ± 5
Cypermethrin	74 ± 7	64 ± 12	86 ± 6	93 ± 7	109 ± 3	57 ± 3	77 ± 2	51 ± 8	69 ± 1	58 ± 5	77 ± 3	68 ± 11	95 ± 6	61 ± 11	85 ± 5
Flucythrinate	68 ± 4	65 ± 11	86 ± 4	85 ± 7	101 ± 4	58 ± 2	79 ± 4	55 ± 3	66 ± 1	54 ± 3	73 ± 2	63 ± 13	90 ± 2	61 ± 10	85 ± 3
Esfenvalerate	73 ± 6	62 ± 12	81 ± 4	95 ± 10	107 ± 2	56 ± 2	76 ± 2	47 ± 3	59 ± 2	50 ± 2	67 ± 2	64 ± 10	88 ± 1	59 ± 9	81 ± 3
Fluralinate	55 ± 10	59 ± 12	82 ± 6	90 ± 7	106 ± 7	51 ± 2	72 ± 3	37 ± 1	48 ± 4	51 ± 2	71 ± 2	62 ± 11	89 ± 5	57 ± 11	81 ± 4
Deltamethrin	54 ± 4	52 ± 7	66 ± 7	93 ± 10	105 ± 10	15 ± 3	27 ± 1	31 ± 2	44 ± 1	47 ± 2	55 ± 7	39 ± 11	61 ± 8	8 ± 1	17 ± 4
Average	79 ± 16	58 ± 11	78 ± 12	80 ± 14	98 ± 11	55 ± 13	73 ± 15	42 ± 9	57 ± 9	52 ± 8	70 ± 10	66 ± 9	91 ± 10	61 ± 16	82 ± 20
Matrix residue (g)	0.03	0.56	0.82	0.82	1.04	0.66	1.72	0.08	0.11	0.89	1.31	0.91	1.45	1.12	1.50

^a Solvent.

^b Extraction cycles.

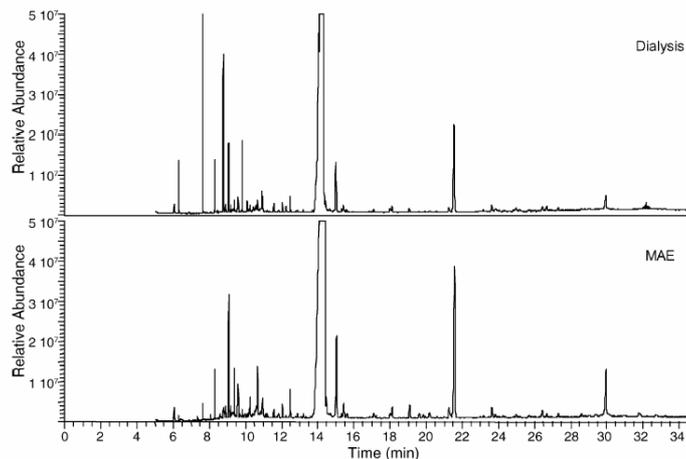


Fig. 1. Full scan GC chromatogram of SPMD blank extracted by both dialysis and MAE.

waxes and residues of oleic acid and methyl oleate from SPMD extracts. However, due to the physico-chemical properties of pyrethroid compounds (see Table 1) there is a chromatographic overlapping with matrix extract, avoiding the fractionation using Waters Envirogel GPC columns. So, the clean-up procedure, selected for all extracts, is that based on liquid–liquid extraction with acetonitrile followed by solid-phase extraction which assures the quantitative recovery of all pyrethroids from fatty matrices. Potential SPMD interferences are effectively removed with the use of a combination of alumina and C₁₈ solid phases.

Gas chromatography interferences with other persistent organic pollutants or organophosphorus insecticides, sometimes also formulated with pyrethroids, are minimized with the use of mass–mass acquisition, which allows us a selective determination, with a high sensitivity.

Full scan gas chromatograms obtained for fresh SPMD blanks extracted by both dialysis and MAE are shown in Fig. 1 and present a similar peak outline without high interference peaks at the retention times of pyrethroids.

3.4. Comparison of methods

As it has been indicated, pyrethroid insecticides can be determined in SPMDs after two successive MAE treatments with 30 mL hexane:acetone at 90 °C during 10 min. On the other hand, dialysis extraction allows the extraction in 48 h using 400 mL of solvent.

SPMDs deployed in an insecticide treated room were determined by both, MAE and dialysis extraction, and results obtained are shown in Table 5. It can be seen that the values obtained for pyrethroid and Piperonyl Butoxide determinations

Table 5
Pyrethroid analysis in indoor samples after SPMD preconcentration followed by reference dialysis and MAE procedures

Sample no.	Compound	Raw concentration ^a (%)	Concentration ^b (µg/SPMD ± s, n = 2)		
			Dialysis	MAE	t _{exp} (n = 2) ^c
1	Tetramethrin	0.13	1.10 ± 0.02	1.07 ± 0.05	0.96
	Phenothrin	0.06	0.72 ± 0.01	0.70 ± 0.03	0.86
2	Cypermethrin	0.10	0.133 ± 0.005	0.139 ± 0.004	1.33
3	Tetramethrin	0.08	0.52 ± 0.02	0.54 ± 0.02	1.72
	Permethrin	0.04	0.224 ± 0.006	0.232 ± 0.002	1.79
	Allethrin	0.03	0.44 ± 0.02	0.416 ± 0.008	2.04
	Piperonyl Butoxide	0.33	2.06 ± 0.05	2.11 ± 0.08	0.97
4	Prallethrin	0.40	7.5 ± 0.1	7.3 ± 0.3	0.63
	Phenothrin	0.10	1.03 ± 0.01	1.04 ± 0.02	1.04

Note: Data reported were obtained from SPMD deployed after 2 h application of spray insecticides.

^a Pyrethroid concentration of used spray insecticide formulations.

^b Extracts were diluted 10 times for GC measurements.

^c Student's *t*-value for n = 2 and 95% is 2.92.

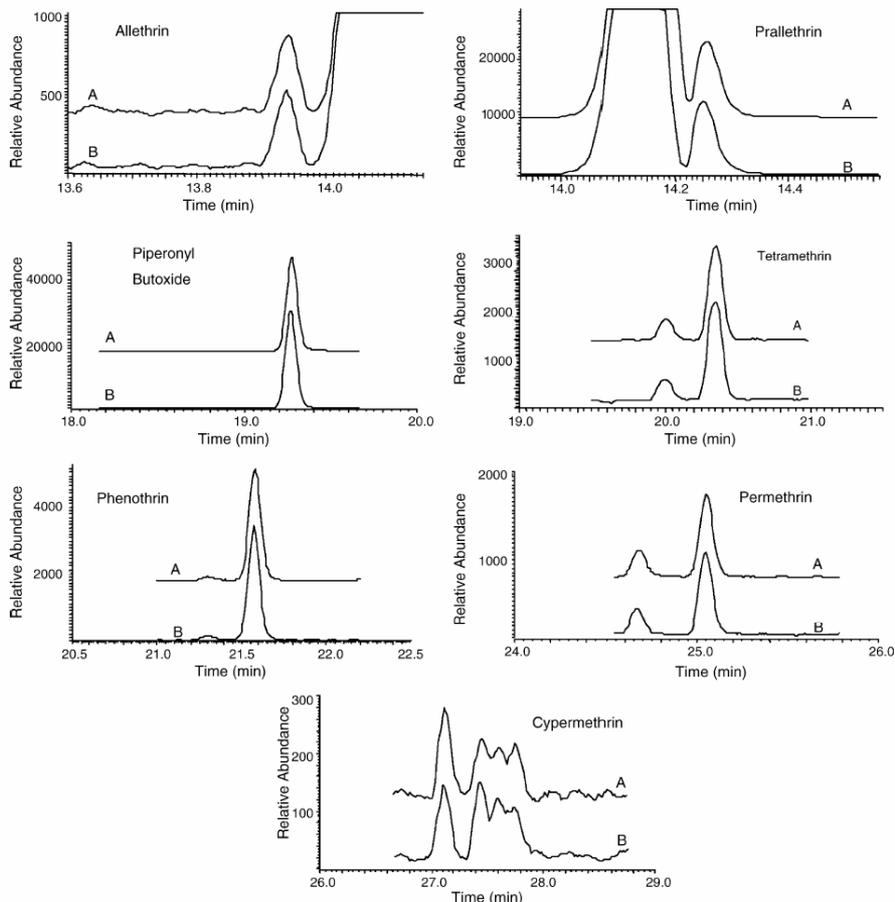


Fig. 2. GC-MS-MS chromatogram of pyrethroid insecticides contained in SPMDs extracted by both dialysis (A) and MAE (B) procedure. Cypermethrin in sample 2; Allethrin, Piperonyl Butoxide, Tetramethrin and Phenothrin in sample 3; Prallethrin and Phenothrin in sample 4. Concentrations are shown in Table 5.

by both procedures are comparable, with experimental Student's t -values lower than the theoretical one 2.92 for a probability level of 95% and 2 d.f.

On looking for the relationship between pyrethroid concentrations found in the SPMDs and raw concentration of the spray formulations applied, it can be seen that probably the physico-chemical properties of the compounds (see Table 1) strongly affect their accumulation in the membrane devices and this point must be considered for the interpretation of in field results obtained using this kind of passive samplers.

Fig. 2 shows the mass-mass chromatograms of pyrethroid insecticides, contained in SPMD samples 2–4, extracted by both dialysis and MAE. No differences were found in the background

of the two extraction procedures, so it can be concluded that the high amount of the matrix extracted by MAE was completely removed with the clean-up described procedure.

3.5. Pyrethroid insecticides persistence in indoor air

A preliminary study was carried out to estimate the indoor air contamination after conventional domestic insecticide spray treatments. A conventional spray dose was applied in a room and two SPMDs were deployed 2, 4, 6, 12 and 24 h after the spray application and removed 48 h later on. SPMDs were processed by the developed procedure and results are shown in Fig. 3. High concentration levels of pyrethroid compounds, from 0.14

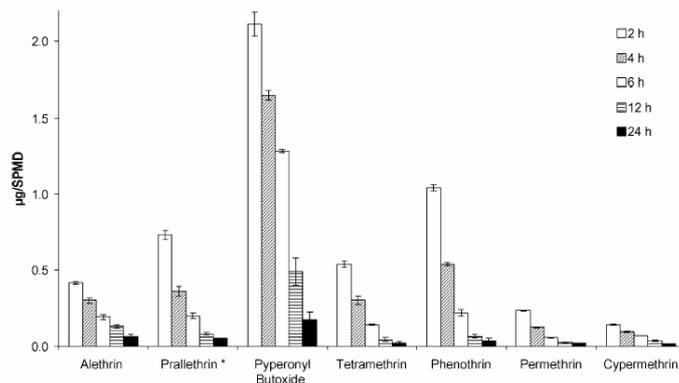


Fig. 3. Pyrethroid insecticide persistence in indoor air after a conventional domestic insecticide spray treatment. (*) Prallethrin concentrations showed were divided 10 times in order to fit the bar height. Note: SPMD devices were deployed 2, 4, 6, 12 or 24 h after spray applications and removal 48 h later on.

for Cypermethrin to 7.3 µg/SPMD for Prallethrin, were found in indoor air after 2 h of the insecticide application. The high amount found for Prallethrin and Piperonyl Butoxide in field SPMD devices could be explained by the elevated concentration of these compounds in the corresponding commercial sprays employed, being 0.4 and 0.3%, respectively, additionally than on the physico-chemical properties of the different pyrethroids (see Table 5).

The amount of pyrethroids found in SPMDs decreases with time. However, it can be seen in Fig. 3 that in devices deployed 12 and 24 h after spray applications the pyrethroid amounts found were even high, reaching values from 0.024 for Permethrin to 0.79 µg/SPMD for Prallethrin, after 12 h application; and from 0.012 for Cypermethrin to 0.50 µg/SPMD for Prallethrin, after 1 day of treatment.

4. Conclusion

Semi permeable membrane devices could be used for indoor air sampling, with a little technical support. So, the aforementioned strategy seems appropriate for monitoring studies in many homes, without any technical or complex support. SPMDs present a great flexibility in selecting sampling sites and reducing costs of monitoring [26]. Our study confirms that this passive sampling method could be convenient for the continuous monitoring of pyrethroid compounds in indoor air, additionally than previous reported data on other kind of pollutants [12,13,22].

The use of MAE is an alternative to classical dialysis of pollutants from SPMDs, and it has been evidenced that pyrethroid analysis could be done in a performed way. Table 6 shows the main advantages of MAE applied to SPMD pyrethroid extractions. The best improvements are the reduction of the extraction time, from 48 to 1 h, and the limited solvent consumption, from 400 to 60 mL. However, the dialysis could be also completed in 18 h at a controlled temperature. The main drawbacks of MAE extraction are the higher price of microwave ovens in front of

Table 6

Comparison of extraction methods to recover pyrethroids from SPMDs

Parameter	Dialysis	MAE
Solvent consumption (mL)	400	60
Extraction time (h)	48	1
Matrix extraction (g ± s, n=2)	0.034 ± 0.003	1.45 ± 0.08
Pyrethroid recovery (% ± s, n=2)	79 ± 16	91 ± 10
Affected by environment conditions	Yes	No
Investment	Very low	Moderate

the material required for dialysis procedure and the important amount of matrix materials extracted by MAE, 1.45 g in front of 0.03 g, but this problem could be avoided with the use of an efficient clean-up procedure.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Direcció General d'Universitats i Investigació de la Generalitat Valenciana (Project GV04B/247 and Grupos 03-118) and F.A.E.T. the grant "V Segles" provided by the *Universitat de València* to carry out this study. We also thank Dr. Sirpa Herve (Central Finland Regional Environment Centre, Jyväskylä, Finland) for providing us with the LDPE layflat tubing.

References

- [1] Extension Toxicology Network, Pesticide Information Profiles, Oregon State University, U.S., <http://extoxnet.orst.edu>.
- [2] Environmental Health Criteria, World Health Organization, Geneva, 1999.
- [3] U.S. Environmental Protection Agency, Washington, U.S., <http://www.epa.gov>.
- [4] J.H. Kolaczinski, C.F. Curtis, *Food Chem. Toxicol.* 42 (2004) 697.
- [5] International Programme on Chemical Safety, <http://www.intox.org>.
- [6] J. Demel, W. Buchberger, H. Malissa Jr., *J. Chromatogr. A* 931 (2001) 107.

- [7] L. Elfein, E. Berger-Preiss, K. Levsen, G. Wünsch, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 147.
- [8] L. Baraud, D. Tessier, J.J. Aaron, J.P. Quiseft, J. Pinart, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 1148.
- [9] F.J. Egea Gonzalez, A. Mena Granero, C.R. Glass, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 537.
- [10] A. Ramesh, A. Vijayalakshmi, *J. Environ. Monit.* 3 (2001) 191.
- [11] J. Pauluhn, *Toxicol. Lett.* 107 (1999) 193.
- [12] J.D. Petty, J.N. Huckins, J.L. Zajicek, *Chemosphere* 27 (1993) 1609.
- [13] M.E. Bartkov, J.N. Huckins, J.F. Müller, *Atmos. Environ.* 38 (2004) 5983.
- [14] D. Sabaliunas, A. Södergren, *Environ. Pollut.* 96 (1997) 195.
- [15] D. Sabaliunas, J. Lazutka, I. Sabaliuniene, A. Södergren, *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1998) 1815.
- [16] J.D. Petty, C.E. Orazio, J.N. Huckins, R.W. Gale, J.A. Lebo, J.C. Meadows, K.R. Echols, W.L. Cranor, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 83.
- [17] *Extraction Methods for Environmental Analysis*, John R. Dean, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, United Kingdom, 1998.
- [18] A. Pastor, E. Vázquez, R. Ciscar, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 241.
- [19] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *Quim. Anal.* 20 (2001) 131.
- [20] C. Sparr-Eskilson, E. Björklund, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 227.
- [21] V. Yusà, A. Pastor, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 540 (2005) 355.
- [22] K.D. Wenzel, B. Vrana, A. Hubert, G. Schütürmann, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5503.
- [23] F.A. Esteve-Turrillas, C.S. Aman, A. Pastor, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 73.
- [24] A. Sanusi, V. Guillet, M. Montury, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 35.
- [25] J.A. Lebo, F.V. Almeida, W.L. Cranor, J.D. Petty, J.N. Huckins, A. Rastall, D.A. Alvarez, B.B. Mogensen, E.T. Jonson, *Chemosphere* 54 (2004) 1217.
- [26] B. Vrana, A. Paschke, P. Popp, G. Schütürmann, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 8 (2001) 27.

VI. "Screening of neutral pesticides in continental waters using semi permeable membrane devices"

Francesc A. Esteve-Turrillas, Agustín Pastor and Miguel de la Guardia

Analytical and Bioanalytical Chemistry (In Press)

Impact Index (2005) [ISI Web] = 2.695

Screening of neutral pesticides in continental waters using semi permeable membrane devices

Francesc A. Esteve-Turrillas, Agustín Pastor* and Miguel de la Guardia

Analytical Chemistry Department, University of Valencia, Edifici Jeroni Muñoz, 50th Dr. Moliner, 46100 Burjassot, Valencia, Spain.

Abstract

It has been evaluated the use of semi permeable membrane devices (SPMDs) as pesticide passive samplers in order to use them for pesticide multiresidue studies in continental waters. Seven chlorinated, 5 organophosphorus, 6 carbamates, 9 pyrethroids and 10 others pesticides were tested in order to estimate which kind of compounds can be retained with these devices. The effect of water parameters such as temperature, pH, ionic strength and organic matter content were evaluated on the SPMDs pesticide retention. Uptake studies from water were performed in a glass beaker containing 2 L distilled water with 50 ng/L spiked of each investigated pesticide. A SPMD was deployed in the beaker, under turbulent conditions, being analysed the retained compounds after 2 days exposure. Each SPMD was microwave-assisted extracted twice with 30 mL hexane:acetone, until 90°C for 10 min. Then a clean-up, based on acetonitrile partitioning and solid-phase extraction (SPE), was performed. Gas chromatography with tandem mass spectrometry detection (MS-MS) was employed for pesticide determinations, providing low limits of detection from 0.5 to 7 ng/SPMD. Different absorption rates were observed for each pesticide, being higher for pyrethroids, organophosphorus and chlorinated, than for carbamates. Pesticide uptakes achieved were independent of the water composition and decreased at low temperature.

Keywords: SPMD, semi permeable membrane device, pesticide uptake, residues, tandem mass spectrometry

1. Introduction

In accordance with the U.S. Environmental Protection Agency, organic pesticides can be classified in four groups: chlorinateds, organophosphorus, carbamates and pyrethroids. Toxicity and environmental effects are clearly different for each pesticide family; organochlorinated pesticides have been forbidden in developed countries, due to their elevated bioaccumulation and high toxicity; while pyrethroids compounds present a low toxicity for mammals and short degradation times. Nowadays, a big number of new pesticides have been developed, in order to improve the toxic selectivity, to allow a rapid biodegradation and also to reduce the manufacture price, but some of these can not be classified in the aforementioned main families.

The wide variety of pesticides used for agricultural, store and conservation purposes, promotes the contamination of waters, being this contamination in general very low in concentration, but very high in diversity. The Council Directive 98/83/CE, on the quality of water intended for human consumption, defines the maximum pesticide concentration admissible in 0.10 µg/L for individual species and 0.50 µg/L for the sum of all them [1]. For chlorinated

pesticides such as, Aldrin, Dieldrin, Heptachlor and Heptachlor epoxide the maximum value is 0.03 µg/L. The Decision N° 2455/2001/EC establishes a priority list of substances, which present a significant risk to the aquatic environment, such as metals, solvents, chlorinated compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides [2]. Thus, monitoring studies involving a big number of pesticides must be performed routinely in continental waters to assess the quality of water and to control the level of contamination in order to avoid irreversible environmental damages.

Analytical methods, employed for pesticide analysis in water, always require an enrichment step, prior to the analysis by high performance liquid chromatography or gas chromatography methods. Solid-phase extraction (SPE), employing several liters of water, is mainly used for the pesticide extraction [3,4]. This active sampling methodology is time-consuming and very costly [5], because of that there is a need for alternative strategies which could preconcentrate in the field the compounds to be analyzed.

Semi permeable membrane devices (SPMDs) introduced by Huckins et al. in 1990 [6], have been employed as water passive samplers, providing a high preconcentration of pollutants [7]. The great advantages of the use of SPMDs are (i) the evaluation of both, episodic high contamination events as well as long term low-dose contamination, (ii) the easily operation and

* Corresponding author:
Tel (0034) 96.354.44.54 Fax (0034) 96.354.44.54
E-mail address: agustin.pastor@uv.es (A. Pastor)

Table 1
Reported studies about the use of SPMDs for insecticide residues determination in air, water and sediments.

Compounds evaluated	Samples	Extraction	Clean-up	Detection	Ref.
Aldrin, DDX	Water	MAE	GPC	GC-MS-MS	[11]
Chlordane, Endosulfan, Fenvalerate, Allethrin	Water	Dialysis	-	Bioassay	[12]
Dieldrin, Heptachlor, Chlorpyrifos, Trifluralin, Deltamethrin, Fenvalerate, Propachlor, Alachlor	Water	Dialysis	LLE (ACN/CHX)	GC-ECD	[13]
DDT, HCB, Malathion	Water	Dialysis	-	GC-MS	[14]
Endosulfan, Atrazine, Chlorothalonil, Chlorpyrifos	Water	Dialysis	-	-	[15]
HCB, Pentachloroisole, Lindane, BHC, Heptachlor, Dacthal, Oxychlordane, Heptachlor epoxide, Chlordane, Nonachlor, Dieldrin, Endrin, Mirex, Methoxychlor, Toxaphene, DDX	Water	Dialysis	GPC SPE-Florisil	GC-ECD	[16]
Allethrin, Prallethrin, Tetramethrin, Bifenthrin, Phenothrin, λ -Cyhalothrin, Permethrin, Cyfluthrin, Cypemethrin, Flucythrinate, Esfenvalerate, Fluralinate Deltamethrin	Air	MAE	LLE (ACN/CHX) SPE-C ₁₈ /Alumina	GC-MS-MS	[17]
Chlordane, Nonachlor, Pentachloroisole, Dieldrin, Lindane, DCPA, Aldrin, Heptachlor epoxide	Water	Dialysis	GPC	GC-MS	[18]
Lindane, Chlordane, Dieldrin, Toxaphene, DDX, Endosulfan	Air	Dialysis	GPC	GC-ECD	[19]
HCB, DDX	Water	Sonication	GPC	GC-ECD	[20]
HCB	Air	Dialysis	SPE-Alumina SPE-Silica SEC	GC-MS	[21]
HCB	Air / Water	Dialysis	GPC	GC-MS	[22]
HCH	Air	PSE	SEC	PTV-GC-MS	[23]
Organochlorinated	Environmental samples	Dialysis	-	-	[24]
Organochlorinated	Air / Water / Sediment	-	-	-	[25]

Note: References obtained from the analytical abstracts in the period from Jan-1980 to Jul-2005.

Abbreviations: DDX (DDT+DDD+DDE), GPC (gel permeation chromatography), MAE (microwave-assisted extraction), SEC (size exclusion chromatography) SPE (solid-phase extraction), PFE (pressurized fluid extraction), LLE (liquid-liquid extraction), ACN (acetonitrile), HX (hexane), CHX (cyclohexane), GC (gas chromatography), ECD (electron capture detector), MS (mass spectrometry) and PTV (programmable temperature vaporizer).

flexibility in selecting sampling sites and (iii) the reduced costs of monitoring campaigns [8]. SPMD design consists of a low-density polyethylene (LDPE) layflat tube, 70-90 μ m wall thickness, filled with triolein (99% pure). Usually, the SPMD dimensions are 0.91 meters long by 2.54 cm wide, containing 1 mL triolein.

Organic pollutants present in water can be either freely dissolved in water or adsorbed to suspended particles, such as humic acids or sediments; being the adsorbed compounds less available to aquatic animals due to the limited diffusion through the membrane cells. SPMDs mimic the absorption of compounds through cell membranes and also can evaluate the bioconcentration factor in aquatic animals. So, they are often used as an indicator of the bioavailability of hydrophobic contaminants [5].

SPMDs can be used to absorb neutral hydrophobic pesticides with molecular weights smaller than 600 a.m.u. from water. It has been evidenced that the absorption of a compound increases with water temperature and the octanol-water coefficient (log Kow) of the studied compound. Any compound with a log Kow higher than three are significantly concentrated by SPMD, although compounds with log Kow values bigger than one can be also concentrated [9,10]. Chemicals can be accumulated in SPMDs to levels comparable to or even higher than the values predicted by their octanol-water partition coefficients [5].

SPMDs absorption of pollutants, like polychlorinated biphenyls or polycyclic aromatic hydrocarbons from waters has been widely studied with excellent results [7,11]; but pesticide absorption studies only have been performed for chlorinated ones and a few number of other pesticide categories. Table 1 shows the reported procedures for the SPMDs absorption of pesticides from water, air and sediments. Excluding chlorinated pesticides, only the pyrethroid compounds Fenvalerate, Allethrin and Deltamethrin [12-13], organophosphorus Chlorpyrifos or Malathion [13-14] and others pesticides such as Trifluralin [13], Atrazine [15] and Dacthal [16] have been studied before using SPMDs.

Our research group also studied the uptake behaviour of pyrethroid insecticides from air, found a high absorption on SPMDs [17].

In this study our purpose has been to extend the use of SPMDs as passive samplers of multiclass pesticides in waters and for that 37 compounds were used as target analyte. Table 2 shows the pesticides employed in our study and their physico-chemical properties such as molecular weight, water solubility and log Kow.

The aim of the work is to provide an analytical methodology for the determination of a wide range of pesticides in SPMDs and to test the effect of water conditions on the pesticide uptake by SPMD from water.

Table 2
Physico-chemical properties of pesticides studied, ordered by their retention time using a HP5-MS column.

Name	Molecular formula	Type	Classification	Molecular weight (g/mol)	Water solubility at 25°C (mg/L)	log K _{ow}
Propamocarb	C ₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	F	Carbamate	188.3	700	0.08
Propoxur	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	I/A	Carbamate	209.2	2000	1.56
HCB	C ₆ Cl ₆	I	Organochlorinated	284.8	0.005	6.42
Carbosulfan	C ₂₀ H ₃₂ N ₂ O ₃ S	I/N	Carbamate	221.3	0.03	3.30
Lindane	C ₆ H ₆ Cl ₆	I	Organochlorinated	290.8	7.3	3.80
Diazinon	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	I/A	Organothiophosphate	304.4	40	3.74
Pirimicarb	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	I	Carbamate	238.3	2700	1.70
Ethiofencarb	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	I	Carbamate	225.0	1900	2.04
Chlorpyrifos-methyl	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	I	Organothiophosphate	322.6	4	-
Metribuzin	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	H	Triazinone	214.3	1200	1.57
Heptachlor	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	I	Organochlorinated	373.3	0.056	5.50
Metalaxyl	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	F	Acylamino acid	279.3	7100	1.75
Terbutryn	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	H	Methylthiotriazine	241.4	25	3.74
Malathion	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	I/A	Organothiophosphate	330.4	145	2.75
Aldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	I	Organochlorinated	364.9	0.027	7.40
Chlorpyrifos	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	I/A/N	Organothiophosphate	350.6	2	4.70
Fenthion	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	I/A	Organothiophosphate	278.3	55	4.09
Pendimethalin	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	H	Dimitroaniline	281.3	0.3	5.18
Heptachlor epoxide	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O	I	Organochlorinated	389.3	-	-
Allethrin	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	I	Pyrethroid	302.4	5	4.96
Endrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	I	Organochlorinated	380.9	220	5.34
Oxadiazon	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃	F	Unclassified	345.2	0.7	4.80
Buprofezin	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	I	Chitin synthesis inhibitor	305.5	0.9	1.31
Oxyfluorfen	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	H	Nitrophenyl ether	361.7	0.1	4.47
Dieldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	I	Organochlorinated	380.9	0.1	6.20
Diclofop-methyl	C ₁₆ H ₁₄ Cl ₂ O ₄	H	Aryloxyphenoxypropionic	341.2	3	-
Propargite	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	A	Sulfite ester	350.5	10.5	5.00
Carbofuran	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	I/A/N	Carbamate	221.3	700	1.67
Bifenthrin	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	I	Pyrethroid	422.9	0.1	8.00
Tetramethrin	C ₁₉ H ₂₅ NO ₄	I	Pyrethroid	331.4	4.6	4.49
Fenoxycarb	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	I	Juvenile hormone mimic	301.3	5.76	4.30
Phenothrin	C ₂₃ H ₂₆ O ₃	I	Pyrethroid	350.5	2	7.54
λ-Cyhalothrin	C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃	I	Pyrethroid	449.9	0.005	5.26
Permethrin	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	I	Pyrethroid	391.3	0.2	6.10
Flucythrinate	C ₂₆ H ₂₃ F ₂ NO ₄	I	Pyrethroid	451.5	0.48	2.08
Fluvalinate	C ₂₆ H ₂₂ ClF ₃ N ₂ O ₃	I	Pyrethroid	502.9	0.002	3.85
Esfenvalerate	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	I	Pyrethroid	419.9	0.3	6.22

Note: All data obtained from Extension Toxicology Network - Pesticide Information Profiles [26], International Programme on Chemical Safety [27], Danish EPA [28] and The Merck Index [29].

Abbreviations: I = insecticide, H = herbicide, F = fungicide, A = acaricide, N = nematocide

2. Experimental

2.1. Apparatus and reagents

A Finnigan (Waltham, MS, USA) Trace gas chromatograph with a low bleed Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) HP-5MS capillary column (30 m x 0.32 mm, 0.25 μm) and a Finnigan ion trap mass spectrometer detector Polaris Q was used for pesticide mass-mass determinations.

A Milestone Ethos SEL microwave laboratory systems (Sorisole, Italy) was employed for the microwave-assisted extraction of retained pesticides from the SPMD. Closed Teflon reactors of 100 mL internal volume equipped with a Milestone fiber optic temperature probe model FOT-H-MLS1 were employed to perform the pesticide extraction under temperature adjusted conditions.

Low-density polyethylene (LDPE) layflat tubing, 2.54 cm wide, was obtained from Brentwood Plastic Inc. (Brentwood, MO, USA) with a wall thickness ranging from 84 to 89 μm. Triolein 99% was obtained from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). A Rovebloc sealer (Barcelona, Spain) was employed to heat seal the membranes.

Basic aluminium oxide (70-230 mesh, 90 activity) obtained by Merck KGaA (Darmstadt, Germany) was activated at 350°C overnight and deactivated with 5% distilled water. 2 g of alumina were placed on the top of a 500 mg Bond Elut C₁₈ cartridge provided by Varian (Palo Alto, CA, USA) and it was used for cleaning the extracts. A previous conditioning with 10 mL acetonitrile was performed on the alumina-C₁₈ cartridge before use.

A ± 1°C temperature controlled water bath LTD6G from Grant Instruments (Cambridge, UK) was

employed for the uptake studies and the shaking of water beakers was performed with Big Squid magnetic stirrers from IKA Werke GmbH (Staufen, Germany).

Pesticide standard solutions were prepared in acetone, employing PCB-195 (10 µg/mL in toluene) as internal standard. Standards of the target compounds (see Table 2) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland) and Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany).

Acetone, n-hexane, acetonitrile and methanol for pesticide residue analysis were provided by Scharlau (Barcelona, Spain). Sodium chloride, acetic acid, ammonia, starch and glucose were provided from Merck and Guinama (Valencia, Spain).

2.2. General procedure

2.2.1. SPMDs preparation

Preparation of SPMDs was carried out according to previously described methods [11,17]. LDPE layflat tubing was cut into segments of 104 cm, which were soaked overnight in hexane in order to remove additives and interfering compounds. The membrane segment was heat sealed about 2 cm and 1 cm from one end, providing a main and a second safety seal respectively. Then 1 mL triolein was introduced into the membrane and it was squeezed to form a continuous and thin film. SPMD was heat sealed again twice for the other extreme. After that SPMDs were stored in closed vessels at -20°C, in order to avoid the absorption of contaminants before exposure. Each SPMD had an approximated weight of 4.85 g and a 508 cm²/mL membrane surface area per lipid volume.

For recovery studies SPMDs were filled with 1 mL triolein containing 100 ng of each pesticide, being also stored at -20°C in separated containers to prevent cross contaminations.

2.2.2. Laboratory exposure of SPMDs

Two liters of distilled water were kept under turbulent conditions, in a glass beaker placed into a temperature controlled bath, employing a magnetic stirrer. Then a fixed amount of 100 ng each investigated compound were added to the system dissolved in 100 µL acetone. A SPMD was deployed into the beaker and a helical steel wire was placed on the top to avoid the membrane floating to the surface. After the corresponding absorption time the SPMD was collected, rinsed with distilled water and dried with a paper tissue.

Water temperature was established at 25°C, but some studies were carried out employing also 10 and 18 °C. Distilled water medium was modified in order to evaluate the pesticide absorption at several pH (4, 6.5 and 9), ionic strength (0.1, 1 and 5 g/L NaCl) and organic solvent amount presence (spiking the water with 100, 500 and 1000 µL of acetone). It was also evaluated the effect of the addition of 1g/L starch or glucose to the water. The deployment time was always 2 days, but 4 and 6 days were also used.

2.2.3. Field studies

SPMDs were deployed in three irrigation channels, located in different places close to the Albufera Lake (Valencia, Spain) in July 2005. Two SPMDs were placed in each location for 30 days, using a cylindrical stainless steel SPMD (0.32 cm mesh). SPMDs were submerged completely into the water and placed about 1 meter below surface, avoiding a direct contact to the bottom.

Before pesticide analysis, an external cleaning of the membranes was performed in order to remove biofouling and surface residues. Each SPMD was independently rinsed with distilled water, immersed in 1M HCl solution for 30 seconds and rinsed again with distilled water, being dried mildly with a paper tissue.

2.2.4. Microwave-assisted extraction of SPMDs

Each SPMD was introduced in a 100 mL Teflon reactor and 30 mL acetone:hexane (1:1 v/v) were added. Reactors were closed and irradiated with a 250 W power output, till 90°C for 10 min and this temperature was held for 10 additional minutes. After cooling, reactors were opened and a second extraction with 30 mL fresh acetone:hexane mixture was performed. Both extracts were evaporated in a rotatory evaporator and finally reconstituted in 5 mL hexane.

2.2.5. Reference dialysis procedure

Each SPMD was introduced in a 250 mL glass flask with 250 mL n-hexane for 24 hours and this dialysis step was repeated employing additional 250 mL fresh hexane for additional 24 hours [30]. Extracts were mixed and evaporated in a rotatory evaporator to 5 mL.

2.2.6. Cleaning of extracts

A liquid-liquid extraction followed by a solid-phase extraction was performed in order to eliminate small amounts of triolein and membrane residues. The SPMD extract, dissolved in 5 mL hexane, was extracted with 5 mL acetonitrile three times, being the pesticides transferred to the acetonitrile phase. The acetonitrile extract, 15 mL, was passed through the alumina-C₁₈ cartridge, 10 mL fresh acetonitrile and 10 mL methanol were used for the complete elution of pesticides. The clean extract was evaporated almost dryness in a rotary evaporator and finally to dryness employing a nitrogen flow. The residue was dissolved in 0.2 mL of 100 ng/mL internal standard.

2.2.7. GC-MS-MS determination

One microliter of final extract was injected in splitless mode at 300°C, employing Helium as carrier in constant flow mode at 1 mL/min. Oven temperature program was 110°C, held for 1 min, increased at a rate of 5°C/min up to 280°C and finally held for 5 min. The transfer line and source temperature were 300°C and 250°C respectively.

Electron impact ionization was performed with an electron energy of 70 eV and 0.3 mL/min Helium was

Table 3
GC parameters employed for pesticides determination in full scan and MS-MS modes. Relative standard deviation (RSD) and limit of detection (LOD) obtained for each pesticide are also shown.

Compound	RT (min)	Full Scan	MS-MS			RSD (%; n=5)	LOD (ng/SPMD)
		Measured ions (Intensity) (m/z (%))	Precursor ion (m/z)	Excitation Voltage (eV)	Measured ions (Intensity) (m/z (%))		
Propamocarb	7.6	58(100)	58	1.10	43(100) + 42(50) + 41(25)	11	6
Propoxur	12.1	110(100)	110	1.30	81(100) + 63(95) + 82(45)	7	4
HCB	14.0	284(100) + 286(80) + 282(50)	284	1.65	214(100) + 249(70) + 212(50)	10	3
Carbosulfan	14.9	164(100) + 149(70)	164	1.00	149(100) + 131(35) + 117(20)	5	0.9
Lindane	15.3	181(100) + 183(95) + 219(55)	181	1.20	146(100) + 145(90) + 109(35)	9	4
Diazinon	15.9	179(100) + 137(45) + 199(35)	179	1.45	121(100) + 163(70) + 137(60)	5	1
Pirimicarb	16.9	166(100) + 238(25)	166	1.70	96(100) + 137(40) + 123(30)	6	2
Ethiofencarb	17.1	107(100) + 77(40) + 168(40)	107	1.30	77(100) + 79(35) + 91(15)	13	2
Chlorpyrifos-methyl	17.6	286(100) + 288(75)	288	1.40	243(100) + 273(95) + 210(25)	7	2
Metribuzin	17.7	198(100)	198	1.30	110(100) + 153(75) + 151(65)	12	3
Heptachlor	18.1	272(100) + 274(85) + 270(55)	272	1.30	237(100) + 235(15)	2	0.5
Metalaxyl	18.2	160(100) + 206(95) + 190(60)	160	1.10	130(100) + 144(65) + 145(50)	5	1
Terbutryn	18.9	185(100) + 226(70) + 170(55)	185	0.95	170(100)	5	1
Malathion	19.3	127(100) + 173(75) + 99(65)	173	0.95	127(100) + 99(30) + 117(30)	15	7
Aldrin	19.4	263(100) + 265(65) + 293(60)	263	1.60	193(100) + 191(55) + 227(30)	4	1
Chlorpyrifos	19.5	314(100) + 258(85) + 199(60)	314	1.25	258(100) + 286(95)	12	2
Fenthion	19.6	278(100)	278	1.35	245(100) + 169(45) + 213(35)	15	5
Pendimethalin	20.7	252(100) + 162(60) + 191(45)	252	1.20	162(100) + 191(95) + 208(90)	5	1
Heptachlor epoxide	20.9	353(100) + 355(95) + 351(50)	353	1.40	263(100) + 317(50) + 334(30)	2	0.6
Allethrin	21.4	123(100) + 81(95) + 79(90)	123	1.00	81(100) + 79(35) + 95(20)	13	4
Endrin	23.2	246(100) + 248(78)	246	1.65	176(100)	13	3
Oxadiazon	23.3	175(100) + 258(75) + 177(65)	175	1.15	112(100) + 147(85) + 140(30)	11	2
Buprofezin	23.5	175(100) + 104(45) + 249(40)	175	1.15	117(100) + 132(55) + 130(20)	5	1
Oxyfluorfen	23.6	252(100) + 300(45) + 317(40)	252	1.40	170(100) + 196(70) + 169(60)	10	3
Dieldrin	24.8	245(100) + 243(85)	245	1.25	173(100) + 209(75) + 175(50)	5	1
Diclofop-methyl	26.8	340(100) + 253(85) + 342(65)	340	1.15	253(100) + 281(35) + 254(30)	4	1
Propargite	26.8	135(100) + 173(45) + 201(25)	135	1.05	107(100) + 77(20)	12	5
Carbofuran	27.6	160(100)	160	1.30	104(100) + 118(45)	4	3
Bifenthrin	28.0	181(100) + 166(60) + 165(45)	181	0.75	166(100) + 165(70) + 153(20)	4	1
Tetramethrin	28.1	164(100) + 67(65) + 81(60)	164	0.65	107(100) + 135(40) + 93(20)	10	1
Fenoxycarb	28.2	116(100) + 255(40)	116	1.20	88(100) + 89(30)	12	4
Phenothrin	29.1	183(100) + 123(80) + 81(55)	183	0.85	165(100) + 168(95) + 153(90)	4	1
λ -Cyhalothrin	29.9	181(100) + 141(45) + 197(35)	197	0.65	141(100) + 161(80) + 120(15)	5	2
PCB-195 ^(a)	30.9	430(100) + 358(90) + 428(80)	430	1.45	395(100) + 359(90) + 393(80)	-	-
Permethrin 1	31.5	183(100) + 165(30)	183	0.80	165(100) + 153(95) + 168(80)	4	2
Permethrin 2	31.7	183(100) + 165(30)	183	0.80	165(100) + 153(95) + 168(80)	3	2
Flucythrinate 1	33.2	225(100) + 199(95) + 157(80)	225	0.80	147(100) + 119(40) + 198(25)	5	2
Flucythrinate 2	33.5	225(100) + 199(95) + 157(80)	225	0.80	147(100) + 119(40) + 198(25)	8	3
Fluvalinate 1	35.1	250(100) + 206(90) + 191(50)	250	1.30	200(100) + 215(65) + 180(50)	8	3
Fluvalinate 2	35.3	250(100) + 206(90) + 191(50)	250	1.30	200(100) + 215(65) + 180(50)	13	4
Esfenvalerate	35.3	225(100) + 125(65) + 181(40)	225	0.75	147(100) + 119(40) + 198(20)	10	3

^(a) Internal standard.

employed as damping gas. Acquisitions in full scan mode were carried out for a mass scanning range from 50 to 650 *m/z*. Selected masses for full scan and excitation energy, precursor and products ions for mass-mass determinations are shown in Table 3. The methodology employed to select the conditions of Table 3 is similar to that used before for pyrethroids [31]. Ion trap tests and mass calibration were weekly performed with perfluorotriethylamine (PFTBA).

3. Results and discussion

3.1. Extraction procedure employed

The standard extraction procedure for previously retained pollutant from SPMDs is based on a dialysis with hexane. This procedure is not suitable for a green chemistry and it is not environmentally friendly; due to the high amount of solvents used. Moreover, the elevated extraction time of 48 hours do not allow to obtain analytical results in only one day. Nowadays, fast methodologies have been developed for the extraction of pollutants from SPMDs, such as pressurized solvent extraction (PSE), microwave assisted extraction (MAE) or sonication, providing similar recoveries than dialysis, but in shorter analysis times minor than 1 hour. The aforementioned procedures have been employed for a wide range of environmental pollutants as polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diethyl ethers and polychlorinated naphthalenes, and some chlorinated and pyrethroid pesticides [11,17,20,23,32].

Our group has a wide experience in the use of MAE for pollutants analysis in different samples, such as soils, sediments, foods and SPMDs [32-35]. Thus, the first step was to assure the effectiveness of MAE for the extraction of the investigated pesticides from SPMDs.

Twenty-five of the studied pesticides have been extracted previously by MAE and it was confirmed that they are stable under the microwave treatment, however the other 12 ones were not treated before by MAE and thus in order to confirm the stability 100 ng of each studied pesticide in 30 mL hexane:acetone (1:1 v/v) were treated twice by MAE at 100°C for 10 min.

Recoveries obtained for studied compounds ranged from 75 to 105 %. In our knowledge, Propamocarb, Carbosulfan, Pirimicarb, Ethiofencarb, Metalaxyl, Fenthion, Pendimethalin, Oxadiazon, Buprofezin, Oxyfluorfen, Propargite and Fenoxycarb were not extracted before by MAE, although all of them show a good stability under microwave treatment, obtaining recovery values shown in Table 4. So, we can conclude that neither of these pesticides is degraded through the microwave irradiation and that MAE could be an appropriate methodology for their treatment.

3.2. Interferences study

Two sources of interferences can be found in the determination of pesticides in water using SPMDs. The first one is all compounds co-absorbed by SPMD during the time of devices deployment in water, as sulphur or oils [10]. The second source is the coextraction of

SPMD compounds during the extraction step, such as triolein, polyethylene oligomers and triolein impurities, as oleic acid and ethyl oleate [36]. All these indicated compounds can interfere in the pesticides determination and because of that an efficient clean-up methodology is needed before GC measurements.

A standard clean-up procedure, usually employed in SPMD analysis (see Table 1), is gel permeation chromatography (GPC), which also allows the separation of the showed compounds in several fractions. In screening studies and due to the different physico-chemical properties of each studied pesticide, the GPC elution window could be too wide, overlapping with the triolein and polyethylene oligomer fraction and thus in our case we have preferred the use of liquid and solid phase extraction.

The liquid-liquid extraction with acetonitrile/hexane followed by solid phase extraction using a combined alumina-C₁₈ cartridge was selected. This method has been previously used for pesticide determinations in vegetable oils [37], in which some variations were performed in order to obtain the highest recoveries, adding a latter elution volume with 10 mL methanol to increase the recovery of Pirimicarb, Terbutryn and Buprofezin.

Gas chromatography interferences with others persistent organic pollutants are minimized using mass-mass acquisitions, which allow us selective and sensitivity determinations and thus it seems that a clean-up based on liquid-liquid extraction and SPE could be enough to obtain accurate results.

Table 4
Pesticide recoveries after microwave-assisted repeated treatment at 100°C for 10 min, using 100 ng of each compound.

Compound	MAE recovery (% ± s, n=3)
Propamocarb	101 ± 3
Carbosulfan	105 ± 1
Pirimicarb	75 ± 3
Ethiofencarb	93 ± 3
Metalaxyl	89 ± 4
Fenthion	95 ± 5
Pendimethalin	96 ± 8
Oxadiazon	94 ± 2
Buprofezin	91 ± 2
Oxyfluorfen	98 ± 5
Propargite	100 ± 2
Fenoxycarb	105 ± 6

3.3. Calibration and analytical features

Calibration curves were obtained from external standards of the 37 pesticides studied at six concentration levels, with concentrations ranging from 50 to 1000 µg/L and an internal standard, PCB-195, at a fixed concentration of 100 µg/L.

Limit of detection (LOD) values were established from the expression $3 \cdot S_{\text{blank}}/b$, being *b* the slope of the calibration curve and *S_{blank}* the standard deviation of five measurements of a 50 µg/L standard. Table 3 shows the LOD for each pesticide, expressed as minimum compound amount (in ng) detected in the semi permeable membrane device, having found values ranging from 0.5 to 7 ng/SPMD.

Table 5

Recovery of pesticides from both SPMDs spiked with 100 ng of each studied compound and also from water spiked with 100 ng of each pesticide after different deployment time with the SPMD.

Compound	Pesticides recovery (ng/SPMD \pm s, n=2)			Pesticides retained from spiked water (ng/SPMD \pm s, n=2)		
	Dialysis	MAE	MAE	MAE	MAE	MAE
	Spiked SPMD	Spiked SPMD	Spiked SPMD ^a	Uptake 2 days	Uptake 4 days	Uptake 6 days
Propamocarb	80 \pm 2	84 \pm 6	72 \pm 6			
Propoxur	68 \pm 2	86 \pm 8	92 \pm 5	9.1 \pm 0.7	12 \pm 1	13 \pm 2
HCB	30 \pm 2	33 \pm 2	28 \pm 3	8 \pm 1	8.3 \pm 0.2	9.1 \pm 0.3
Carbosulfan	59 \pm 3	99 \pm 2	95 \pm 4	65 \pm 5	68 \pm 5	75 \pm 2
Lindane	72 \pm 1	96 \pm 1	96 \pm 3	47 \pm 1	51.0 \pm 0.7	49 \pm 2
Diazinon	43 \pm 2	57 \pm 2	62 \pm 6	32 \pm 3	33.9 \pm 0.9	35 \pm 1
Pirimicarb	52 \pm 1	67 \pm 4	70 \pm 8	^(a)	3.5 \pm 0.1	3.0 \pm 0.3
Ethiofenecarb	87 \pm 3	99 \pm 9	92 \pm 4	21 \pm 2	23 \pm 1	23 \pm 2
Chlorpyrifos-methyl	67 \pm 4	89 \pm 4	85 \pm 2	83 \pm 2	85 \pm 3	83 \pm 1
Metribuzin	68.3 \pm 0.9	96 \pm 1	104 \pm 2	6.2 \pm 0.2	6.9 \pm 0.4	8.1 \pm 0.3
Heptachlor	65 \pm 1	63 \pm 1	66 \pm 7	21 \pm 3	33.2 \pm 0.2	36 \pm 1
Metaxyl	85 \pm 2	93 \pm 5	106 \pm 5	19 \pm 1	17.4 \pm 0.1	18.8 \pm 0.2
Terbutryn	67 \pm 1	108 \pm 4	95 \pm 1	11.0 \pm 0.2	10.9 \pm 0.3	12.4 \pm 0.5
Malathion	54.0 \pm 0.3	72 \pm 1	78 \pm 4	11 \pm 2	21.2 \pm 0.3	23 \pm 1
Aldrin	39 \pm 2	44 \pm 2	42 \pm 2	12 \pm 1	16.5 \pm 0.7	17 \pm 2
Chlorpyrifos	85 \pm 3	98 \pm 3	103 \pm 2	97 \pm 1	91 \pm 3	98 \pm 2
Fenthion	84.8 \pm 0.8	104 \pm 3	96 \pm 8	79 \pm 6	77 \pm 3	80 \pm 5
Pendimethalin	68 \pm 3	101 \pm 2	98 \pm 4	79 \pm 4	78 \pm 2	75 \pm 6
Heptachlor epoxide	64 \pm 0.7	84 \pm 1	98 \pm 9	78 \pm 6	77 \pm 3	81 \pm 2
Allethrin	101 \pm 3	102 \pm 4	100 \pm 3	60 \pm 1	101.0 \pm 0.6	102 \pm 2
Endrin	106 \pm 4	105 \pm 3	104 \pm 10	78 \pm 1	104 \pm 2	102 \pm 7
Oxadiazon	62 \pm 1	86.3 \pm 0.4	82 \pm 5	59 \pm 2	73 \pm 5	79 \pm 1
Buprofezin	69 \pm 1	96 \pm 2	92 \pm 1	69 \pm 10	80 \pm 2	82.3 \pm 0.8
Oxyfluorfen	102 \pm 5	100 \pm 2	104 \pm 5	94 \pm 6	101 \pm 7	103 \pm 5
Dieldrin	78 \pm 1	91 \pm 3	96 \pm 5	75 \pm 2	83 \pm 4	80 \pm 2
Diclofop-methyl	92 \pm 6	94 \pm 5	91 \pm 5	80 \pm 6	85 \pm 4	94 \pm 5
Propargite	90 \pm 1	95.7 \pm 0.7	103 \pm 5	85 \pm 4	82.6 \pm 0.3	93 \pm 1
Carbofuran	65 \pm 2	81 \pm 6	71 \pm 3	13.2 \pm 0.8	16.9 \pm 0.4	15.7 \pm 0.2
Bifenthrin	72 \pm 3	95 \pm 5	105 \pm 3	75 \pm 3	80 \pm 4	78 \pm 3
Tetramethrin	84 \pm 1	95 \pm 3	101 \pm 3	95 \pm 6	101 \pm 1	96 \pm 1
Fenoxycarb	86 \pm 5	90 \pm 10	93 \pm 2	73 \pm 1	85 \pm 3	84 \pm 4
Phenothrin	103 \pm 1	98 \pm 6	103 \pm 3	95 \pm 1	98 \pm 2	98 \pm 1
λ -Cyhalothrin	63.1 \pm 4	98.3 \pm 0.7	105 \pm 2	87 \pm 4	84 \pm 2	99 \pm 2
Permethrin 1	89 \pm 4	91 \pm 6	96 \pm 3	80 \pm 1	94 \pm 2	97.7 \pm 0.2
Permethrin 2	85 \pm 2	98 \pm 3	102 \pm 2	86 \pm 4	95 \pm 6	99 \pm 4
Flucythrinate 1	82 \pm 2	99 \pm 8	90 \pm 2	79 \pm 4	84 \pm 4	93 \pm 6
Flucythrinate 2	83 \pm 3	102 \pm 1	97 \pm 5	80 \pm 4	91 \pm 3	102 \pm 7
Fluvalinate 1	95 \pm 5	98 \pm 9	93 \pm 5	64 \pm 5	101 \pm 3	99 \pm 4
Fluvalinate 2	97 \pm 3	102 \pm 1	95 \pm 8	75 \pm 3	92.2 \pm 0.2	99.7 \pm 0.3
Esfenvalerate	89 \pm 1	98 \pm 3	94 \pm 2	80 \pm 8	103 \pm 2	98 \pm 4

^a In this case the spiked SPMD was shaken with 2L distilled water for 48 hours.

^b Not found

Repeatability of the developed procedures was also evaluated for five measurements of a 50 μ g/L standard, for which relative standard deviation (RSD) values are also shown in Table 3 and ranged from 2 to 15 %.

Recovery studies of the proposed methodology were performed employing spiked SPMDs with 100 ng of each studied pesticide and also evaluating the recovery of pesticides from 2 L water spiked with 100 ng of pesticides. Table 5 shows the pesticide recoveries obtained, being higher than 80% for most of them. Some compounds, such as HCB, Heptachlor and Aldrin, show anomaly low recoveries due mainly to evaporation losses. Dialysis reference procedure provided similar or lower recoveries than MAE methodology.

The use of a mass spectrometric detector improves the chromatographic performance with a well discrimination, without interferences, between coeluted compounds. As it is shown in Table 3, in full scan mode there are some compounds which only present in their spectra a fragmentation ion, such as: Propamocarb, Propoxur, Metribuzin, Fenthion and Carbofuran, whereas in MS-MS mode their spectra show as least

two ions with relative intensities higher than 40%. So, it can conclude that the method selectivity was improved with the use of MS-MS acquisition, which allows us a correct identification.

3.4. Pesticide uptake from different environments

The retention capability of pesticides using SPMD from water could be different depending on the compound considered and water composition. The physico-chemical properties of the compounds studied, such as molecular weight, water solubility and especially log Kow, affect their absorption by SPMDs. Thus, each pesticide could have a different behaviour and could show a different adsorption.

In order to know the uptake of each studied pesticide with SPMDs from water, an accumulation study was performed in the laboratory, deploying SPMDs in 2 L spiked water beakers, during several deployment times: 2, 4 and 6 days. Table 5 shows the uptake recoveries for each compound at these deployment times. As it was expected, each pesticide

Table 6
SPMD uptake of pesticides from water at several conditions of temperature, pH, ionic strength and acetone amount. All experiences were carried out employing 2 L water spiked with 100 ng of each compound and a deployment time of 2 days; pesticides retained in SPMDs were determined by GC-MS-MS after MAE.

Compound	Recovery (ng/SPMD \pm s, n=2)										
	Temperature		pH		Ionic strength			Acetone amount		Starch	Glucose
	10 °C	18 °C	4	9	0.1 g/L	1 g/L	5 g/L	0.5 mL	1mL	1 g/L	1 g/L
Propamocarb	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
Propoxur	- ^a	6.8 \pm 0.2	10 \pm 1	9.6 \pm 0.5	8.3 \pm 0.5	9.4 \pm 0.2	8.7 \pm 0.6	10.1 \pm 0.6	12 \pm 1	9 \pm 1	10.3 \pm 0.4
HCB	7.3 \pm 0.2	9 \pm 1	9 \pm 1	13 \pm 1	12 \pm 1	4.1 \pm 0.2	6.8 \pm 0.1	8.6 \pm 0.5	14 \pm 1	15.4 \pm 0.6	18.6 \pm 0.8
Carbosulfan	69 \pm 1	70 \pm 6	71 \pm 5	67 \pm 7	50 \pm 4	53 \pm 1	40 \pm 28	54 \pm 1	48 \pm 5	65 \pm 4	74 \pm 4
Lindane	21 \pm 1	39 \pm 1	40 \pm 1	38 \pm 1	44 \pm 5	42 \pm 1	43.8 \pm 0.8	45 \pm 1	55 \pm 3	38 \pm 1	35.9 \pm 0.3
Diazinon	6 \pm 1	19 \pm 2	27 \pm 1	27 \pm 1	30 \pm 4	29 \pm 1	24.7 \pm 0.5	25.3 \pm 0.5	35 \pm 4	23 \pm 1	23.9 \pm 0.1
Pirimicarb	- ^a	- ^a	2.7 \pm 0.3	- ^a	4.1 \pm 0.2	4.6 \pm 0.4	6.2 \pm 0.8	7.4 \pm 0.6	7.7 \pm 0.3	5.1 \pm 0.4	5.1 \pm 0.2
Ethiofencarb	17.5 \pm 0.8	18 \pm 1	23 \pm 1	19 \pm 2	19.7 \pm 0.3	21 \pm 1	18 \pm 1	19 \pm 2	24 \pm 1	15.3 \pm 0.7	18 \pm 1
Chlorpyrifos-methyl	56 \pm 1	80 \pm 5	76 \pm 5	50 \pm 7	58 \pm 2	66 \pm 8	54 \pm 2	87 \pm 2	82 \pm 3	63.1 \pm 0.2	61 \pm 3
Metribuzin	5.7 \pm 0.6	5.6 \pm 0.2	6.9 \pm 0.2	3.4 \pm 0.4	5.8 \pm 0.3	6.2 \pm 0.5	9.0 \pm 0.4	7.7 \pm 0.2	9.5 \pm 0.5	4.1 \pm 0.6	5.6 \pm 0.2
Heptachlor	26 \pm 2	23 \pm 1	24 \pm 4	19 \pm 2	19 \pm 4	19 \pm 2	11 \pm 1	25 \pm 2	38.5 \pm 0.1	31 \pm 1	41 \pm 2
Metalaxyl	10.2 \pm 0.3	22 \pm 1	18 \pm 1	15.4 \pm 0.2	11.8 \pm 0.3	9.8 \pm 0.2	10.2 \pm 0.3	19 \pm 2	8.7 \pm 0.4	7.2 \pm 0.5	9.7 \pm 0.3
Terbutryn	4.9 \pm 0.5	10 \pm 1	11.3 \pm 0.2	11.1 \pm 0.4	13 \pm 1	7.2 \pm 0.5	11.7 \pm 0.4	11.7 \pm 0.4	13.3 \pm 0.1	12.6 \pm 0.4	13.4 \pm 0.4
Malathion	9.1 \pm 0.3	11.9 \pm 0.4	27 \pm 2	20 \pm 1	24 \pm 2	31 \pm 6	18 \pm 1	2.2 \pm 0.6	4.9 \pm 0.2	9.9 \pm 0.4	13.2 \pm 0.8
Aldrin	13 \pm 1	15 \pm 2	16 \pm 1	17 \pm 2	14 \pm 2	11 \pm 1	13 \pm 1	14 \pm 1	29.8 \pm 0.3	26 \pm 1	24 \pm 2
Chlorpyrifos	80 \pm 3	99 \pm 11	96 \pm 1	80 \pm 1	91 \pm 3	110 \pm 1	95 \pm 2	91 \pm 2	98 \pm 5	86 \pm 3	80 \pm 2
Fenthion	59 \pm 1	75 \pm 8	78 \pm 8	8 \pm 1	89 \pm 6	105 \pm 8	93 \pm 4	73 \pm 4	73 \pm 5	72 \pm 2	93 \pm 4
Pendimethalin	40 \pm 1	82 \pm 5	67 \pm 1	74 \pm 1	82 \pm 8	95 \pm 8	95 \pm 1	75 \pm 4	81 \pm 7	66.4 \pm 0.9	73.2 \pm 0.6
Heptachlor epoxide	30 \pm 3	76 \pm 6	60 \pm 2	59 \pm 1	67 \pm 7	73 \pm 2	51.7 \pm 0.8	73.3 \pm 0.8	68 \pm 2	53 \pm 5	56 \pm 2
Allethrin	52 \pm 2	59 \pm 1	88 \pm 6	87 \pm 4	104 \pm 11	101 \pm 4	104 \pm 9	60 \pm 3	90 \pm 2	90 \pm 4	98 \pm 2
Endrin	52 \pm 2	68 \pm 5	67 \pm 5	53 \pm 11	68 \pm 2	65 \pm 3	73 \pm 3	79 \pm 4	85 \pm 9	63 \pm 3	77 \pm 7
Oxadiazon	28 \pm 4	61 \pm 5	68 \pm 3	76 \pm 2	80 \pm 8	85 \pm 4	91 \pm 1	50 \pm 1	67 \pm 2	58 \pm 4	70.9 \pm 0.4
Buprofezin	34 \pm 5	70 \pm 4	64 \pm 6	82 \pm 4	82 \pm 6	91 \pm 2	78 \pm 2	57 \pm 3	73.8 \pm 0.4	52 \pm 6	67 \pm 2
Oxyfluorfen	96 \pm 1	95 \pm 5	102 \pm 15	107 \pm 1	106 \pm 1	109 \pm 3	102 \pm 4	93 \pm 3	106 \pm 8	97 \pm 2	98.6 \pm 0.9
Dieldrin	31 \pm 1	74 \pm 1	65 \pm 3	51 \pm 3	55 \pm 5	64 \pm 1	59 \pm 3	62.7 \pm 0.9	77.3 \pm 0.4	56 \pm 4	65 \pm 3
Diclofop-methyl	68 \pm 9	77 \pm 4	92 \pm 4	83 \pm 4	100 \pm 1	100 \pm 4	89 \pm 2	70 \pm 2	63 \pm 3	88 \pm 3	81 \pm 5
Propargite	68 \pm 2	71 \pm 2	89 \pm 3	85 \pm 2	81.7 \pm 0.9	78 \pm 6	75 \pm 3	66 \pm 1	82 \pm 2	94 \pm 5	92 \pm 5
Carbofuran	12.0 \pm 0.3	14 \pm 1	10.2 \pm 0.5	15.2 \pm 0.2	14 \pm 1	17.2 \pm 0.3	13.2 \pm 0.9	14.5 \pm 0.6	15.7 \pm 0.4	23 \pm 4	24 \pm 1
Bifenthrin	57 \pm 2	77 \pm 5	78 \pm 5	70 \pm 3	83 \pm 7	78 \pm 1	74 \pm 1	55 \pm 3	70 \pm 3	73 \pm 4	84 \pm 2
Tetramethrin	52 \pm 2	101 \pm 7	101 \pm 8	86 \pm 3	83 \pm 1	85 \pm 1	83 \pm 1	95 \pm 1	90 \pm 4	87 \pm 2	91 \pm 3
Fenoxycarb	42 \pm 1	64 \pm 3	68 \pm 2	71 \pm 2	69 \pm 2	75 \pm 8	75 \pm 5	70 \pm 5	81 \pm 6	70 \pm 3	84 \pm 1
Phenothrin	88 \pm 2	97 \pm 12	101 \pm 5	80 \pm 5	93 \pm 1	103 \pm 1	92 \pm 3	84 \pm 3	76 \pm 1	102 \pm 6	104 \pm 2
λ -Cyhalothrin	95 \pm 3	91 \pm 9	99 \pm 6	99 \pm 1	98 \pm 5	103 \pm 2	90 \pm 2	83 \pm 1	89 \pm 1	95 \pm 1	98 \pm 3
Permethrin 1	78 \pm 2	75 \pm 5	102 \pm 7	88 \pm 2	101 \pm 5	106 \pm 1	97 \pm 4	99 \pm 6	99 \pm 7	93 \pm 2	103 \pm 3
Permethrin 2	69 \pm 4	81 \pm 5	103 \pm 3	96 \pm 8	109 \pm 1	107 \pm 2	97 \pm 4	103 \pm 4	100 \pm 6	98 \pm 1	107 \pm 4
Flucythrinate 1	74 \pm 2	80 \pm 2	101 \pm 7	72 \pm 5	110 \pm 3	110 \pm 11	91 \pm 4	94 \pm 8	97 \pm 3	82 \pm 7	93 \pm 7
Flucythrinate 2	84 \pm 6	85 \pm 2	104 \pm 8	62 \pm 7	108 \pm 9	111 \pm 4	89 \pm 6	92 \pm 1	100 \pm 2	82 \pm 8	83 \pm 4
Fluvalinate 1	57 \pm 2	71 \pm 1	77 \pm 5	90 \pm 4	103 \pm 5	90 \pm 2	92 \pm 4	69 \pm 8	78.5 \pm 0.7	104 \pm 2	97 \pm 2
Fluvalinate 2	54 \pm 5	69 \pm 4	73 \pm 5	92 \pm 9	76 \pm 4	86 \pm 1	74 \pm 0.7	76 \pm 3	81 \pm 5	98.9 \pm 0.2	98 \pm 6
Esfenvalerate	77 \pm 7	83 \pm 5	106 \pm 1	59 \pm 1	95 \pm 5	118 \pm 1	83 \pm 6	84 \pm 5	89 \pm 7	87 \pm 7	89 \pm 8

^a Not found

shows a different behaviour, increasing the absorption with high log K_{ow} and low water solubility, but it seems in general that two days is enough time to extract the studied compounds at their maximum level.

If we classify the SPMD absorption of each compound by pesticide families, we can see some similarities. Figure 1 shows a bar graphic with the retention of SPMDs, after 2, 4 and 6 days of deployment time, classified by pesticide categories. Pyrethroid are the most retained compounds by SPMDs, with an average recovery of 99% in 6 days, due to their high values for octanol water coefficients. On the other hand the carbamate pesticides, with low K_{ow} values from 0.08 to 3.30, are the least absorbed products with a 13% of average absorption, also for 6 deployment days. These compounds present similar behaviours into each family, but organophosphorus and chlorinated present a high variation depending on the selected pesticide. Thus a specific absorption study would be necessary for each new product tested.

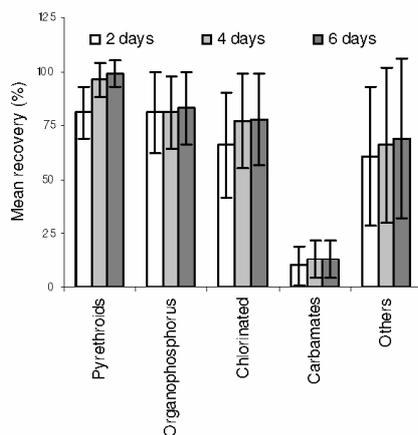


Fig. 1. Recovery of different pesticide families from spiked water by using SPMDs after different deployment times, from 2 to 6 days.

In order to test the absence of losses of compounds retained in SPMDs during the water deployment, a pesticide spiked SPMD was introduced in a 2L flesh water beaker for 2 days and after that measured by the developed procedure. Recoveries of these spiked SPMDs are shown in Table 5, being similar values than spiked SPMDs without the washing step. So, these compounds are strongly retained in SPMDs and there is no any pesticide flow toward water.

After that, several experiments were carried out in order to know how the variability of water parameters affects to the SPMD uptake of the studied pesticides. Standard conditions were set as:

2 L of distilled water spiked with 100 ng of each pesticide, water bath temperature of 25°C and a deployment time of 2 days. Thus, several water parameters were modified, such as: water temperature (10, 18 and 25°C), ionic strength (0, 0.1, 1 and 5 g/L of NaCl), solvent used in the spikes (0.1, 0.5 and 1 mL acetone) and presence of organic matter (1 g/L glucose

and 1 g/L starch). Table 6 shows the pesticide uptake for each studied compound, modifying each one of the aforementioned parameters. There is no big variations in the pesticide uptake from water at different salinity, pH or organic matter composition, as it has been reported in other studies for PAH's [38], where it was found that salinity doesn't affect to this uptake. Only the water temperature has a strong influence on the absorption rates, being higher at high temperatures as 25 or 18°C, than low ones as 10°C. Only there are some specific variations with pH, such as the observed degradation of Fenthion at basic pH, confirmed by other authors [39] or the low uptakes found for Chlorpyrifos methyl and Esfenvalerate also at basic pH. So, we can conclude that the pesticide behaviour on the uptake of SPMDs deployed in real waters will be unaffected by the water composition variability, being only modified by temperature changes.

3.5. Determination of pesticides in irrigation channels

The Albufera Lake in Valencia (Spain) was declared a Nature Reserve in 1986 and it constitutes an indispensable natural shelter for the survival of a number of biological species. Many irrigation channels flow into the Albufera Lake, carrying with them contaminants, such as metals or pesticide and being this contamination dangerous to both its fauna and flora [40]. In consequence numerous screening studies are carried out in order to control the contamination levels of the lake and surrounding irrigation channels.

The use of SPMDs, as pesticide passive samplers, was tested in three irrigation channels close to the Albufera Lake. The compounds found in these places assess the absorption of different kinds of pesticides by SPMDs.

Table 7 shows the pesticides found and their concentration into the SPMDs deployed. MS-MS spectra of compounds found in SPMDs provided a similar intensity of measured ions than the corresponding standards.

Table 7. Concentration of pesticides in SPMDs deployed in irrigation channels after 30 days sampling.

	Compound	Concentration ^a (ng/SPMD ± s, n=2)
Sample 1	Ethiofencarb	1450 ± 30
	Metalaxyl	46 ± 1
	Chlorpyrifos	95 ± 5
	Fenthion	39 ± 2
	Buprofezin	14 ± 4
	Tetramethrin	180 ± 20
	Phenothrin	1260 ± 90
Sample 2	Metalaxyl	20,7 ± 0,2
	Buprofezin	4,1 ± 0,2
	Oxyfluorfen	7,8 ± 0,3
	Diclofop-methyl	5,8 ± 0,2
	Chlorpyrifos	400 ± 20
Sample 3	Terbutryn	5,6 ± 0,3
	Phenothrin	29,1 ± 0,3
	Permethrin 1	43 ± 1
	Permethrin 2	73 ± 8

^a Each sample was injected directly and diluted 10 times, to fit area values into the calibration curve.

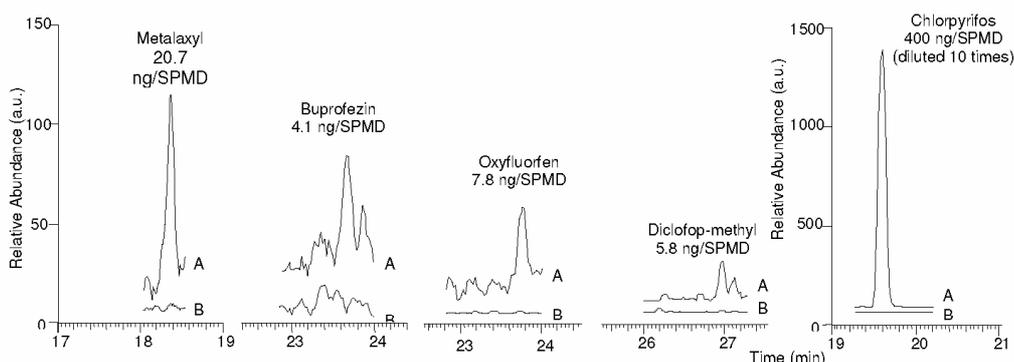


Fig. 2. MS-MS chromatogram for pesticides found in sample 2 (A) and that of the corresponding SPMD blank (B).

Sample 1 was the most contaminated one with concentration values ranging, from 14 ng/SPMD for Buprofezin, to 1.45 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ for Ethiofencarb. Samples 2 and 3 absorbed less compounds, with concentration values ranging: from 4.1 to 400 ng/SPMD for sample 2 and from 5.6 to 73 ng/SPMD for sample 3.

MS-MS chromatograms of SPMD blank and pesticides found in SPMDs deployed in samples 2 and 3 are shown in Figure 2 and Figure 3 respectively. Clean chromatograms were obtained, which allow us really low levels for pesticide determinations.

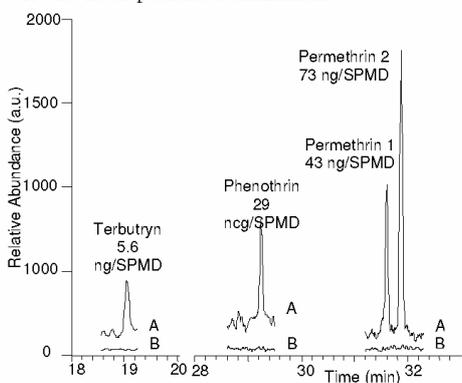


Fig. 3. MS-MS chromatogram for pesticides found in sample 3 (A) and that of the corresponding SPMD blank (B).

4. Conclusion

Semi permeable membrane devices used before for water monitoring studies of PCB, PAH and organochlorinated pesticides can be extended to different families of pesticide screening in continental waters.

High uptakes for pyrethroid and most of the organophosphorus, organochlorinated and others unclassified pesticides tested in this study were found in laboratory SPMD absorption studies. Although for carbamate pesticides the SPMD uptake obtained were

really small and thus the use of these passive samplers can not be recommended for carbamate monitoring.

The employed procedure for pesticide extraction from SPMDs, clean-up of extracts and GC-MS-MS determinations provided good recoveries, so it can conclude that the microwave-assisted extraction and the later SPE clean-up could be recommended for pesticide determinations. Moreover the use of gas chromatography with MS-MS acquisitions allows a high selectivity and sensitivity, also for the simultaneous determination of overlapped compounds at really low concentration levels, without spectra interferences. Additionally MS-MS provided for some compounds a higher number of ions than full scan acquisition, which allows a right compound identification.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Direcció General d'Universitats i Investigació de la Generalitat Valenciana (Project GV04B/247 and Grupos 03-118) and F.A.E.T. the grant "V Segles" provided by the *Universitat de València* to carry out this study. We also thank Dr. Sirpa Herve (Central Finland Regional Centre, Jyväskylä, Finland) for providing us with the LDPE layflat tubing and Mr. Vicent Llorca and Mr. Sergio Armenta for technical support in field studies.

References

- [1] Council Directive 98/83/EC. Official Journal of the European Communities.
- [2] Decision No 2455/2001/EC of the European Parliament. Official Journal of the European Communities.
- [3] J.M.F. Nogueira, T. Sandra, P. Sandra, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 209-215.
- [4] A. Belmonte Vega, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, *Anal. Chim. Acta* 538 (2005) 117-127.
- [5] A. Kot, B. Zabiegała, J. Namiesnik, *TrAC Trends in Anal. Chem.* 19 (2000) 446-459.
- [6] J.N. Huckins, M.W. Tubergen, J.A. Lebo, R.W. Gale, T.R. Schwartz, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73 (1990) 290-293.
- [7] J.A. Lebo, J.L. Zajicek, J.N. Huckins, J.D. Petty, P.H. Peterman, *Chemosphere* 25 (1992) 697-718.
- [8] B. Vrana, A. Paschke, P. Popp, G. Schüttermann, *Environ. Sci. & Pollut. Res.* 8 (2001) 27.
- [9] F. Stuer-Lauridsen, *Environ. Pollut.* 136 (2005) 503-524.

F.A. Esteve-Turrillas et al. /

- [10] J.D. Petty, C.E. Orazio, J.N. Huckins, R.W. Gale, J.A. Lebo, J.C. Meadows, K.R. Echols, W.L. Cranor. *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 83-95
- [11] V. Yusà, A. Pastor, M. de la Guardia. *Anal. Chim. Acta* 540 (2005) 355-366
- [12] D. Sabaliunas, J. Lazutka, I. Sabaliuniene, A. Södergren. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1998) 1815-1824
- [13] D. Sabaliunas, A. Södergren. *Environ. Pollution* 96 (1997) 195-205
- [14] A.I. De la Torre, C. Fernandez, J.V. Tarazona, M.J. Muñoz, *Chemosphere* 31 (1995) 2727-2737
- [15] G.I. Scott, M.H. Fulton, E.F. Wirth, G.T. Chandler, P.B. Key, J.W. Daugomah, D. Bearden, K.W. Chung, E.D. Strozier, M. DeLorenzo, S. Sivertsen, A. Dias, M. Sanders, J.M. Macauley, L.R. Goodman, M.W. LaCroix, G.W. Thayer, J. Kucklick, J. Agric. *Food Chem* 50 (2002) 4400-4408.
- [16] J.D. Petty, J.N. Huckins, C.E. Orazio, J.A. Lebo, B.C. Poulton, R.W. Gale, C.S. Charbonneau, E.M. Kaiser, *Environ. Sci. Technol* 29 (1995) 2561-2566.
- [17] F.A. Esteve-Turrillas, A. Pastor, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 560 (2006) 118-127.
- [18] G.S. Ellis, J. N. Huckins, C.E. Rostad, C.J. Schmitt, J.D. Petty, P. MacCarthy, *Environ. Toxicol. Chem.* 14 (1995) 1875-1884
- [19] T. Hamer, M. Shoeib, M. Diamond, G. Stem, B. Rosenberg, *Environ. Sci. Technol* 38 (2004) 4474-4483.
- [20] L. Šetková, J. Hajslová, P.A. Bergqvist, V. Kocourek, R. Kazda, P. Suchan, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 170-181
- [21] S.N. Meijer, W.A. Ockenden, E. Steinnes, B.P. Corrigan, K.C. Jones, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 454-461.
- [22] K. Booij, B.L. van Drooge, *Chemosphere* 44 (2001) 91-98
- [23] K.D. Wenzel, B. Vrana, A. Hubert, G. Schüttrmann, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5503.
- [24] P.A. Bergqvist, B. Strandberg, C. Rappe, *Anal. Proc. (London)* 30 (1993) 404-405.
- [25] Y. Zhang, M.H.W. Lam, K.F. Poon, B.J. Richardson, H.S. Hong, G.J.S. Zheng, R.S.S. Wu, Fenxi Huaxue, 28 (2000) 1434-1438.
- [26] Extension Toxicology Network, Pesticide Information Profiles. (Oregon State University, U.S.), <http://extoxnet.orst.edu>
- [27] International Programme on Chemical Safety (UNEP-ILO-WHO), <http://www.intox.org>
- [28] Danish EPA (København, Denmark) <http://www.mst.dk>
- [29] The Merck Index, Thirteenth Edition, Merck & Co. Inc., 2001 (Whitehouse station, New Jersey, USA).
- [30] J.D. Petty, J.N. Huckins, J.L. Zajicek, *Chemosphere* 27 (1993) 1609-1624.
- [31] F.A. Esteve-Turrillas, A. Pastor, M. de la Guardia, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 801-809.
- [32] V. Yusà, A. Pastor and M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 565 (2006) 103-111.
- [33] A. Pastor, E. Vázquez, R. Ciscar, M. de la Guardia. *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 241.
- [34] F.A. Esteve-Turrillas, C.S. Aman, A. Pastor, M. de la Guardia. *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 73-78
- [35] I. Llorca-Femenia, F.A. Esteve-Turrillas, V. Yusà, A. Pastor, M. de la Guardia. 11th Jornadas de Análisis Instrumental. November 2005 (Barcelona, Spain).
- [36] J.A. Lebo, F.V. Almeida, W.L. Cranor, J.D. Petty, J.N. Huckins, A. Rastall, D.A. Alvarez, B.B. Mogensen, B.T. Jonson, *Chemosphere* 54 (2004) 1217-1224
- [37] F.A. Esteve-Turrillas, A. Pastor, M. de la Guardia, *Anal.Chim. Acta* 553 (2005) 50-57.
- [38] J.N. Huckins, J.D. Petty, C.E. Orazio, J.A. Lebo, R.C. Clark, V.L. Gibson, W.R. Gala, K.R. Echols, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 3918-3923.
- [39] T. Wang, T. Kadlac and R. Lenahan, *Bull. Environ. Cont.Toxicol.* 42 (1989) 389-394.
- [40] E. Peris, S. Requena, M. de la Guardia, A. Pastor, J.M. Carrasco, *Chemosphere* 60 (2005) 1542-1549.

CAPÍTULO 5a

CONCLUSIONES

Además de de las conclusiones mostradas previamente en los artículos que figuran en esta memoria Tesis, las ventajas más importantes de las metodologías desarrolladas se exponen a continuación.

- En primer lugar, la determinación por cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas en tándem permite determinaciones muy sensibles y extremadamente selectivas, reduciendo al mínimo el ruido de fondo del cromatograma y la existencia de picos interferentes. Los límites de detección obtenidos para todos los plaguicidas estudiados son considerablemente mejores que empleando otras estrategias, como adquisiciones en *Full scan* o en SIM, variando de 0.8 a 5.4 ng/mL para piretroides y de 2.5 a 30 ng/mL para el resto de pesticidas estudiados. Se valoró el empleo de ionización química negativa para la determinación de piretroides, obteniéndose una mayor selectividad que por impacto electrónico, debido a la elevada especificidad en la ionización.
- Se comprobó la estabilidad a tratamientos muy energéticos, como MAE o PSE, de los piretroides y otros pesticidas estudiados. Estos compuestos no presentaron ninguna descomposición o degradación durante los estudios realizados, por lo que pueden extraerse empleando temperaturas y presiones elevadas.
- Empleando los procedimientos de extracción desarrollados, MAE y PFE, se puede alcanzar al menos la misma eficacia de extracción, o incluso mejor que empleando métodos clásicos de extracción. Se obtuvieron resultados comparables en la determinación de piretroides en suelos por MAE y por ultrasonidos; y en la determinación de organoclorados en suelos por PFE y por Soxhlet. La principal ventaja del empleo de estas metodologías es una reducción en los costes de análisis (reduciendo el tiempo de análisis y el consumo de disolvente), además de ser un procedimiento ambientalmente sostenible (debido a la menor cantidad de residuos generados) y con la posibilidad de una automatización completa del proceso.

- El procedimiento basado en PFE se empleó en la extracción de pesticidas organoclorados de lechugas. Empleando esta metodología como herramienta de análisis, se realizó un estudio de absorción de pesticidas por plantas de lechuga, empleando como medio de cultivo, suelos fortificados con Endosulfan a dos niveles de concentración 10 y 50 $\mu\text{g/g}$. La absorción de α -Endosulfan, β -Endosulfan y Endosulfan sulfato por las plantas de lechuga en estos suelos fue muy baja, encontrando niveles máximos de 2.5 $\mu\text{g/g}$ en raíces y 0.8 $\mu\text{g/g}$ en hojas en el suelo más contaminado.
- Se desarrolló una metodología de limpieza de extractos para la determinación de residuos de insecticidas piretroides en muestras grasas, empleando varios procedimientos estándar de limpieza. El empleo de una partición acetonitrilo:hexano seguido de una extracción en fase sólida con alúmina y C_{18} resultó ser el proceso más eficaz. El extracto obtenido, con un residuo sólido próximo a 2 mg (0.04 % de la cantidad inicial), permite una inyección directa en el cromatógrafo de gases sin contaminar el sistema. Esta metodología se empleó en la determinación de piretroides en aceites vegetales, proporcionando recuperaciones de 91 a 104 % en aceite de oliva adicionado, y se obtuvieron límites de detección entre 0.3 y 1.4 ng/g, que mejoraban considerablemente los encontrados en la bibliografía.
- En los estudios realizados con SPMDs, las ventajas del empleo de MAE en vez de diálisis son aún más importantes, debido a la considerable reducción del tiempo de extracción (de 48 a 1 h) y del consumo de disolvente (de 400 a 60 mL). Sin embargo, las principales desventajas de la extracción por MAE son: el elevado precio de los hornos microondas comparado con el material requerido para la diálisis y la elevada cantidad de matriz extraída. Este último inconveniente se solventa empleando el procedimiento de limpieza de extractos desarrollado para la determinación de piretroides en aceites vegetales, que es capaz de eliminar los residuos de trioleína y polietileno. Empleando la metodología desarrollada se

obtuvieron recuperaciones del 91 % para piretroides y mayores del 80 % para la mayoría de los pesticidas estudiados.

- Se realizaron ensayos de absorción de plaguicidas empleando SPMDs para el muestreo pasivo de aire y agua. Para el despliegue de estos dispositivos, solo se requiere un pequeño soporte técnico, por lo que se reducen considerablemente los costes de las campañas de monitoreo. Asimismo se confirmó la eficiencia de estos muestreadores para el control de insecticidas piretroides en el aire del interior de viviendas, obteniéndose límites de detección entre 0.3 y 0.9 ng/SPMD.
- Del mismo modo se realizó un estudio de absorción de diversas familias de pesticidas en aguas, empleando SPMDs, obteniéndose una elevada absorción de compuestos piretroides, y de la mayoría de plaguicidas organoclorados y organofosforados. Sin embargo los de tipo carbamato presentaron una absorción muy baja, por lo que se desaconseja el uso de SPMDs para esta última familia de pesticidas. Los límites de detección obtenidos para la determinación de plaguicidas en aguas empleando estos dispositivos oscila entre 0.5 y 6 ng/SPMD.
- Finalmente se observó que la absorción de plaguicidas por SPMDs no depende de la composición del agua (salinidad, pH o presencia de materia orgánica). Sin embargo, la temperatura del agua si que afecta intensamente a esta absorción, que aumenta con la misma. Así pues, podemos extrapolar que el proceso de absorción de plaguicidas con SPMDs en muestras reales, no estará afectado por la composición del agua, pero si dependerá de su temperatura.

CAPÍTULO 5b

CONCLUSIONES

In addition to the detailed conclusions shown in every paper compiled in this Thesis, the most important advantages of the designed methodologies are shown below.

- Firstly, it can be concluded that gas chromatographic tandem mass determination allows sensitive and extremely selective determinations, minimizing both the background noise of the chromatogram and the existence of interferent peaks. The obtained limits of detection (LODs) for all studied compounds are better than the obtained values with strategies such as Full scan or SIM acquisitions, ranging from 0.8 to 5.4 ng/mL for pyrethroids and from 2.5 to 30 ng/mL for the rest of pesticides studied. The use of negative chemical ionization was tested for pyrethroid compounds, providing better selectivity than electron impact ionization, due to the measurement specificity.
- It has been verified the stability of pyrethroid compounds and other pesticides studied under high energy treatments as MAE or PSE. These compounds do not present any decomposition or degradation at high temperatures and pressures.
- The developed extraction procedures, MAE and PFE, achieve at least the same or better extraction efficiency that the classical methods for several kind of samples. The main advantage of the use of these methodologies is a reduction in the analysis cost (improving analysis time and solvent consumption). Moreover they are environmentally friendly procedures (reducing waste generation) and they allow the full automation of the process.
- Pyrethroid pesticides were extracted from soils, by MAE and sonication extraction, and organochlorinated compounds from soils, using PSE and Soxhlet, obtaining quantitative recoveries in all cases. The developed extraction procedures were compared using spiked samples and certified reference materials, and it was observed comparable results between both.

- A PFE procedure was also established for organochlorinated pesticide extraction from lettuce plants. Using this methodology a lettuce plant uptake study was performed with Endosulfan spiked soils at two levels of contamination 10 and 50 $\mu\text{g/g}$. The uptake of α -Endosulfan, β -Endosulfan and Endosulfan sulphate by lettuce plants from contaminated soil has been found to be minimal, up to 2.5 $\mu\text{g/g}$ in roots and up to 0.8 $\mu\text{g/g}$ in leaves, even when grown on high contaminated soil.
- An efficient clean-up methodology was developed for the determination of pyrethroid insecticide residues in fatty samples, using several standard clean-up procedures. The use of a partitioning with acetonitrile:hexane and a solid-phase extraction combining alumina and C_{18} allows an effective clean-up of the samples. The obtained extract has a solid residue close to 2 mg (0.04% respect the initial amount of employed sample), which can be directly injected in the chromatograph. This methodology was tested in pyrethroid determinations of several vegetable oils, providing recoveries from 91 to 104 % in spiked olive oils and LODs ranging from 0.3 to 1.4 ng/g, significantly improving the sensitivity of previous methodologies.
- In the studies performed with SPMDs, the advantages of MAE methodologies in front of dialysis are even more significant, due to the considerable reduction of the extraction time (from 48 to 1 h) and the solvent consumption (from 400 to 60 mL). However, the main drawbacks of MAE extraction are the higher price of microwave ovens in front of the required material for dialysis procedure and the high amount of matrix extracted by MAE. Anyway it can be avoided by employing the clean-up procedure previously developed, which is able to remove the triolein and polyethylene residues. This methodology allows recoveries of 91 % for pyrethroid compounds and higher than 80 % for the rest of studied pesticides.
- Several studies were performed using SPMD for the uptake of pesticide compounds from air and waters. Only a simple technical support is required for the deployment of these devices, with a considerable reduction

of monitoring cost. Our study confirmed that this passive sampling method is suitable for the continuous monitoring of pyrethroid compounds in indoor air, achieving LODs from 0.3 to 0.9 ng/SPMD.

- A SPMD uptake study of pesticides from water was carried out with different families of pesticides, having obtained high uptakes for pyrethroid and for mostly all the organophosphorus and organochlorinated compounds. However, the SPMD uptake for carbamate pesticides was really low, so the use of these passive samplers for these compounds is not suggested. The obtained LODs for water pesticide determinations, using these devices, are ranging from 0.5 to 6 ng/SPMD.
- Finally, it was observed that there was not dependence between pesticide uptake and water composition (salinity, pH or organic matter composition). However, absorption rates were clearly increased with the water temperature. So, we can conclude that the pesticide behaviour on the uptake of SPMDs deployed in real samples will be unaffected by the water composition, being only altered by temperature changes.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

- [Adou 2001]** K. Adou, W.R. Bontoyan and P.J. Sweeney, Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4153-4160.
- [Agilent]** La espectrometría de Masas como sistema de detección en HPLC y electroforesis capilar. Agilent Technologies e-notes. <http://www.chem.agilent.com>
- [Ballesteros 2004]** E. Ballesteros and M. J. Parrado, Continuous solid-phase extraction and gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in natural and drinking waters, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 267-273.
- [Barrek 2003]** S. Barrek, O. Paisse and M.F. Grenier-Loustalot, Determination of residual pesticides in olive oil by GC-MS and HPLC-MS after extraction by size-exclusion chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 355-359.
- [Barriada-Pereira 2003]** M. Barriada-Pereira, E. Concha-Graña, M. J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez and E. Fernández-Fernández, Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants, *J. Chromatogr. A* 1008 (2003) 115-122.
- [Bauerle 1995]** G.F. Bauerle, K. L. Ray and J.S. Brodbelt, Determination of pyrethroid insecticides by ion trap GC-MS-MS, *Analytica Chim. Acta* 317 (1995) 137-148.
- [Bavcon 2003]** M. Bavcon, P. Trebse and L. Zupancic-Kralj, Investigations of the determination and transformations of diazinon and malathion under environmental conditions using gas chromatography coupled with a flame ionisation detector, *Chemosphere* 50 (2003) 595-601.
- [Bicchi 2004]** C. Bicchi, C. Brunelli, C. Cordero, P. Rubiolo, M. Galli and A. Sironi, Direct resistively heated column gas chromatography (Ultrafast module-GC) for high-speed analysis of essential oils of differing complexities, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 195-207.

- [BOE 1983]** Real Decreto 3349/83, de 30 de noviembre, sobre la Reglamentación técnico-sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas, Boletín Oficial del Estado (1983) España.
- [BOE 1990]** Real decreto 569/1990, de 27 de abril, relativo a la fijación de contenidos máximos para los residuos de plaguicidas sobre y en los productos alimenticios de origen animal, Boletín Oficial del Estado (1990) España.
- [BOE 1994]** Real decreto 280/1994, de 18 de febrero, por el que se establece los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal, Boletín Oficial del Estado (1994) España.
- [BOE 2000]** Real decreto 198/2000, de 11 de febrero, por el que se modifica el Real Decreto 280/1994, de 18 de febrero, por el que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal, Boletín Oficial del Estado (2000) España.
- [BOE 2004]** ORDEN PRE/753/2004, de 22 de marzo, por la que se modifican los anexos II de los Reales Decretos 280/1994, de 18 de febrero y 569/1990, de 27 de abril, por los que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal y animal, Boletín Oficial del Estado (2004) España.
- [Booij 1998]** K. Booij, H.M. Sleiderink and F. Smedes, Calibrating the uptake kinetics of semipermeable membrane devices using exposure standards, *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1998) 1236-1245.
- [Bravo 2004]** M. Bravo, G. Lespes, I.D. Gregori, H. Pinochet and M. Potin-Gautier, Identification of sulfur interferences during organotin determination in harbour sediment samples by sodium tetraethyl borate ethylation and gas chromatography-pulsed flame photometric detection, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 217-224.
- [Buchholz 1994]** K.D. Buchholz and J. Pawliszyn, Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols, *Anal. Chem.* 66 (1994) 160-167.

- [**Chee 1996a**] K.K. Chee, M.K. Wong and H.K. Lee, Optimization of microwave-assisted solvent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments using a microwave extraction system with high-performance liquid chromatography - fluorescence detection and gas chromatography - mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 723 (1996) 259-271.
- [**Chee 1996b**] K.K. Chee, M.K. Wong and H.K. Lee. Microwave extraction of phthalate esters from marine sediment and soil, *Chromatographia* 42 (1996) 378-384.
- [**Chen 1995**] J. Chen and J. Pawliszyn, Solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2530-2533.
- [**Codex Alimentarius a**] "Límites máximos del Codex para residuos de plaguicidas", Comisión del Codex Alimentarius, Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias (Roma, Italia).
<http://www.codexalimentarius.net>
- [**Codex Alimentarius b**] "Directrices sobre Buenas Prácticas en el Análisis de Residuos de Plaguicidas - CAC/GL 40", Comisión del Codex Alimentarius, Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias (Roma, Italia).
<http://www.codexalimentarius.net>
- [**Constantin 1991**] E. Constantin and A. Schnell, *Mass Spectrometry*, Ellis Horwood Limited (1991).
- [**Cortazar 2005**] E. Cortazar, L. Bartolomé, A. Delgado, N. Etxebarria, L.A. Fernández, A. Usobiaga and O. Zuloaga, Optimisation of microwave-assisted extraction for the determination of nonylphenols and phthalate esters in sediment samples and comparison with pressurised solvent extraction, *Anal. Chim. Acta* 534 (2005) 247-254.
- [**Dean 1998**] J.R. Dean, *Extraction methods for environmental analysis*, Wiley (1998).
- [**Dean 2000**] J.R. Dean and G. Xiong, Extraction of organic pollutants from environmental matrices: selection of extraction technique, *Trends in Anal. Chem* 189 (2000) 553-564.

- [Dean 2003]** J.R. Dean, Methods for environmental trace analysis, Analytical Techniques in the Sciences, Wiley (2003).
- [Di Muccio 1999]** A. Di Muccio, P. Pelosi, D. Attard-Barbini, T. Generali, S. Girolimetti, P. Stefanelli, A. Leonelli, G. Amendola, L. Vergori and E. Viana-Fresquet, Determination of pyrethroid pesticide residues in fatty materials by solid-matrix dispersion partition, followed by mini-column size-exclusion chromatography, J. Chromatogr. A 833 (1999) 19-34.
- [DOUE 2004]** Reglamento (CE) N° 850/2004 del Parlamento Europeo y de Consejo de 29 de abril de 2004 sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la Directiva 79/117/CEE, Diario Oficial de la Unión Europea.
- [Dusek 2002]** B. Dusek, J. Hajslová and V. Kocourek, Determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and their precursors in biotic matrices, J. Chromatogr. A 982 (2002) 127-143.
- [Egizabal 1998]** A. Egizabal, O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández and J.M. Madariaga, Comparison for microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for phenols in soil samples using experimental designs, Analyst 123 (1998) 1679-1684.
- [Eisert 1996]** R. Eisert and K. Levsen, Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water, J. Chromatogr. A 733 (1996) 143-157.
- [Enders 1996]** B. Enders and G. Schwedt, Supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and soxhlet extraction for the analysis of PCB's in soil and sewage sludge, Journal fur Praktische Chemie-Chemiker-Zeitung 339 (1997) 250-255.
- [EPA 1999a]** J. Reigal, Recognition and Management of Pesticide Poisonings, Environmental protection agency, Washington DC (EEUU) 1999.
- [EPA 1999b]** Office of pesticide programs list of chemicals evaluated for carcinogenic potential, Environmental protection agency, Washington DC (EEUU) 1999.

- [Extoxnet]** The extension toxicology network, pesticide information profiles, Oregon State University (EEUU).
- [Erickson 1998]** B. Erickson, Standardizing the world with microwaves, *Anal. Chem.* 70 (1998) 467a-471a.
- [Esteban 1993]** L. Esteban, *La espectrometría de masas en imágenes*, ACK Editores (1993).
- [FAO 2002]** Food and Agriculture Organization, International code of conduct on the distribution and use of pesticides, Organización de Naciones Unidas (2002) Roma, Italia
- [FAO 2003]** Food and Agriculture Organization, Global Food security and the role of sustainable fertilization, Organización de Naciones Unidas (2003) Roma, Italia.
- [Fernandez Amandi 2002]** M. Fernández Amandi, A. Furey, M. Lehane, H. Ramstad and K. J. James, Liquid chromatography with electrospray ion-trap mass spectrometry for the determination of yessotoxins in shellfish, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 329-334.
- [Fernández-Moreno 2006]** J.L. Fernández Moreno, F.J. Arrebola Liébanas, A. Garrido Frenich and J.L. Martínez Vidal, Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 97-105.
- [Field 1998]** J.A. Field, K. Monohan, R. Reed, Coupling Supercritical CO₂ and Subcritical (Hot) Water for the Determination of Dacthal and Its Acid Metabolites in Soil, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1956-1962.
- [Focant 2005]** J.F. Focant, C. Pirard, G. Eppe and E. De Pauw, Recent advances in mass spectrometric measurement of dioxins, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 265-275.
- [Font 1998]** N. Font, F. Hernández, E.A. Hogendoorn, R.A. Baumann and P. van Zoonen, Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography-UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides, *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 179-186.

- [Fritz 1999]** J. S. Fritz, Analytical solid-phase extraction, Wiley-VCH (1999) EEUU.
- [Gale 1997]** R.W. Gale, J.N. Huckins, J.D. Petty, P.H. Peterman, L.L. Williams, D. Morse, T.R. Schwartz and D.E. Tillitt, Comparison of the Uptake of Dioxin-Like Compounds by Caged Channel Catfish and Semipermeable Membrane Devices in the Saginaw River (Michigan), Environ. Sci. Technol. 31 (1997) 178-187.
- [García Sánchez 2006]** A. García Sánchez, N. Ramos Martos and E. Ballesteros, Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography–tandem mass-spectrometric determination, Anal. Chim. Acta 558(2006) 53-61.
- [Garrido-Frenich 2006]** A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, A.D. Cruz Sicilia and M.J. González Rodríguez, Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry, Anal. Chim. Acta 558 (2006) 42-52.
- [Gilli 2005]** G. Gilli, T. Schilirò, C. Pignata, D. Traversi, E. Carraro, C. Baiocchi, R. Aigotti, D. Giacosa and E. Fea, Application of semipermeable membrane device for assessing toxicity in drinking water, Chemosphere 61 (2005) 1691-1699.
- [Gobas 1992]** F.A.P.C. Gobas, Modeling the accumulation and toxicity of organic chemicals in aquatic food chains, In “Chemical Dynamics in Fresh Water Ecosystems”, Eds. Frank A.P.C. Gobas and John A. McCorquodale, Lewis Publishers, Mexico (1992).
- [Golhke 1959]** R.S. Golhke, Time-of-Flight Mass Spectrometry and Gas-Liquid Partition Chromatography, Anal. Chem. 31 (1959) 535-541.
- [Gray 1985]** A.J. Gray y D.M. Soderlund, Mammalian toxicology of pyrethroids insecticides, Vol.5, Academic Press (1985).
- [Guardia-Rubio 2006]** M. Guardia-Rubio, M.L. Fernández-De Córdoba, M.J. Ayora-Cañada and A. Ruiz-Medina, Simplified pesticide multiresidue analysis in virgin olive oil by gas chromatography with thermoionic specific,

electron-capture and mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A* 1108 (2006) 231-239.

- [Hada 2000]** M. Hada, M. Takino, T. Yamagami, S. Daishima and K. Yamaguchi, Trace analysis of pesticide residues in water by high-speed narrow-bore capillary gas chromatography–mass spectrometry with programmable temperature vaporizer, *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 81-90.
- [Hofelt 1997]** C.S. Hofelt and D. Shea, Accumulation of Organochlorine Pesticides and PCBs by Semipermeable Membrane Devices and *Mytilus edulis* in New Bedford Harbor, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 154-159.
- [Hoogerbrugge 1997]** R. Hoogerbrugge, C. Molins and R.A. Baumann, Effects of parameters on microwave-assisted extraction of triazines from soil: evaluation of an optimization trajectory, *Anal. Chim. Acta* 348 (1997) 247-253.
- [Hopper 1999]** M.L. Hopper, Automated one-step supercritical fluid extraction and clean-up system for the analysis of pesticide residues in fatty matrices, *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 93-105.
- [Huckins 1990a]** J.N. Huckins, M.W. Tubergen and G.K. Manuweera, Semipermeable membrane devices containing model lipid: A new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential, *Chemosphere* 20 (1990) 533-552.
- [Huckins 1993]** J.N. Huckins, G.K. Manuweera, J.D. Petty, D. Mackay and J.A. Lebo, Lipid-containing semipermeable membrane devices for monitoring organic contaminants in water, *Environ. Sci. Technol.* 27 (1993) 2489-2496.
- [Huckins 1996]** J.N. Huckins, J.D. Lebo, C.E. Orazio, H.F. Prest, D.E. Tillit, G.S. Ellis, B.T. Johnson and G.K. Manuweera, Semipermeable membrane devices (SPMDs) for the concentration and assessment of bioavailable organic contaminants in aquatic environments, *Techniques in aquatic toxicology*, Lewis/CRC Press (1996) 625-655.
- [Huckins 1999]** J.N. Huckins, J.D. Petty, C.E. Orazio, J.A. Lebo, R.C. Clark, V.L. Gibson, W.R. Gala and K.R. Echols, Determination of uptake kinetics

- (sampling rates) by lipid-containing semipermeable membrane devices (SPMDs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water. *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 3918-3923.
- [Huckins 2002]** J.N. Huckins, J.D. Petty, H.F. Prest, R.C. Clark, D.A. Alvarez, C.E. Orazio, J.A. Lebo, W.L. Cranor and B.T. Johnson, A guide for the use of semipermeable membrane devices (SPMDs) as samplers of waterborne hydrophobic organic contaminants, American Petroleum Institute (2002).
- [Huckins 2004]** J.N. Huckins and D.A. Alvarez, Semipermeable membrane device (SPMD), *Science for a changing world*, Columbia Environmental Research Center (2004).
- [Hussen 2006]** A. Hussen, R. Westbom, N. Megersa, L. Mathiasson and E. Björklund, Development of a pressurized liquid extraction and clean-up procedure for the determination of α -endosulfan, β -endosulfan and endosulfan sulfate in aged contaminated Ethiopian soils, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 202-210.
- [Iowa University]** Iowa state weed science. Iowa state University (EEUU). <http://www.weeds.iastate.edu>
- [ISI Web]** ISI Web of Knowledge, the Thompson Corporation, <http://isiwebofknowledge.com>
- [Jassie 1997]** L. Jassie, R. Revesz, T. Kierstead, E. Hasty and S. Metz, *Microwave-enhanced Chemistry*, American Chemical Society, Washington DC (1997).
- [Jongenotter 2002]** B. Jongenotter and H.G. Janssen, On-line GPC-GC analysis of organophosphorus pesticides in edible oils, *LC-GC Eur.* 15 (2002) 338.
- [Kemmochi 2003]** Y. Kemmochi, K. Tsutsumi and H. Nakazawa, Enhanced mass resolution tandem mass spectrometry method for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin detection with ion trap mass spectrometry using high damping gas pressure, *J. Chromatogr. A* 1016 (2003) 249-256.
- [Kitamura 2004]** K. Kitamura, Y. Takazawa, S. Hashimoto, J.W. Choi, H. Ito and M. Morita, Effective extraction method for dioxin analysis from lipid-rich biological matrices using a combination of pressurized liquid extraction and

dimethyl sulfoxide/acetonitrile/hexane partitioning, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 27-37.

- [Kodaka 2003]** R. Kodaka, T. Sugano, T. Katagi and Y. Takimoto, Clay-Catalyzed Nitration of a Carbamate Fungicide Diethofencarb, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7730-7737.
- [Kolaczinski 2004]** J.H. Kolaczinski, C.F. Curtis, Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate, *Food Chem. Toxicol.* 42 (2004) 697-706.
- [Kot 2000]** A. Kot, B. Zabiegała and J. Namiesnik, Passive sampling for long-term monitoring of organic pollutants in water, *TrAC Trends in Anal. Chem.* 19 (2000) 446-459.
- [Kovács 1998]** Á. Kovács, K. Ganzler and L. Simon-Sarkadi, Microwave-assisted extraction of free amino-acids from foods, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch. A* 207 (1998) 26-30.
- [Larson 1993]** B. Larson, L. Montonarella and F. Mousty, Technologies for environmental cleanup: soil and groundwater, Kluwer academic Publishers, Dordrecht (1993).
- [Lebo 1995]** J.A. Lebo, R.W. Gale, J.D. Petty, D.E. Tillitt, J.N. Huckins, J.C. Meadows, C.E. Orazio, K.R. Echols, D.J. Schroeder and L.E. Inmon, Use of the Semipermeable Membrane Device as an in Situ Sampler of Waterborne Bioavailable PCDD and PCDF Residues at Sub-Parts-per-Quadrillion Concentrations, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2886-2892.
- [Lentza-Rizos 2001]** C. Lentza-Rizos, E.J. Avramides and E. Visi, Determination of residues of endosulfan and five pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gas chromatography with electron-capture detection, *J. Chromatogr. A* 921 (2001) 297-304.
- [Lopez-Avila 1994]** V. Lopez-Avila, R. Young and W.F. Beckert, Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1097-1106.

- [Lopez-Avila 1995]** V. Lopez-Avila, R. Young, J. Benedicto, P. Ho, R. Kim and W.F. Beckert, Extraction of organic pollutants from solid samples using microwave energy, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2096-2102.
- [Lopez-Avila 1998]** V. Lopez-Avila, R. Young and W.F. Beckert, Stability of organic pollutants during microwave-assisted extraction from solid matrices, *J. AOAC Int.* 81 (1998) 462-476.
- [Lu 2003]** Y. Lu and Z. Wang, Accumulation of organochlorinated pesticides by triolein-containing semipermeable membrane device (triolein-SPMD) and rainbow trout, *Water Research* 37 (2003) 2419-2425.
- [Malavia 2004]** J. Malavia, F. J. Santos and M. T. Galceran, Gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry versus GC–high-resolution mass spectrometry for the determination of non-ortho-polychlorinated biphenyls in fish, *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 171-178.
- [Marcato 2000]** B. Marcato and M. Vianello, Microwave-assisted extraction by fast sample preparation for the systematic analysis of additives in polyolefins by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 285-300.
- [Martínez-López 2005]** S. Martínez-López, A. Morales-Noé, A. Pastor-García, A. Morales-Rubio and M. de la Guardia, Sample preparation improvement in polycyclic aromatic hydrocarbons determination in olive oils by gel permeation chromatography and liquid chromatography with fluorescence detection, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 1247-1254.
- [Miège 2005]** C. Miège, C. Ravelet, J.P. Croué and J. Garric, Semi-permeable membrane device efficiency for sampling free soluble fraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Chim. Acta* 536 (2005) 259-266.
- [MLS]** Microwave Laboratory System easywave software V.3.5.4.1., Milestone GMBH (Germany).
- [Moors 1994]** M. Moors, D.L. Massart and R.D. McDowall, Analyte isolation by solid phase extraction (SPE) on silica-bonded phases: Classification and recommended practices (Technical Report). Commission on General Aspects of Analytical Chemistry, *Pure Appl. Chem.* 66 (1994) 277-304.

- [Motohashi 2000]** N. Motohashi, H. Nagashima and C. Párkányi, Supercritical fluid extraction for the analysis of pesticide residues in miscellaneous samples, *J. Biochem. Biophys. Methods* 43 (2000) 313-328.
- [Ngoka 2000]** L.C.M. Ngoka and M.L. Gross, Multistep collisionally activated decomposition in an ion trap for the determination of the amino-acid sequence and gas-phase ion chemistry of lithium-coordinated valinomycin, *Int. J. Mass Spectrom.* 194 (2000) 247-259.
- [NIST]** National Institute of Standards and Technology. (E.E.U.U.)
<http://www.nist.gov>
- [Obana 1997]** H. Obana, K. Kikuchi, M. Okihashi and S. Hori, Determination of Organophosphorus Pesticides in Foods Using an Accelerated Solvent Extraction System, *Analyst* 122 (1997) 217-220.
- [Oliveira 2005]** S. Olivera Bravo y D. Rodríguez-Iturralde, "Pesticidas, salud y medioambiente", Departamento de Neuromiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, <http://iibce.edu.uy>.
- [ORST]** Oregon State University, National pesticide information center, Office of pesticide programs, Washington DC (EEUU) 2004, <http://npic.orst.edu>.
- [Ozel 2006]** M.Z. Özel, F. Göğüş and A.C. Lewis, Comparison of direct thermal desorption with water distillation and superheated water extraction for the analysis of volatile components of *Rosa damascena* using GCxGC-TOF/MS, *Anal. Chim. Acta* 566 (2006) 172-177.
- [Pagliuca 2005]** G. Pagliuca, T. Gazzotti, E. Zironi and P. Sticca, Residue analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 67-70.
- [Pardo 2006]** O. Pardo, V. Yusà, N. León and A. Pastor, Determination of bisphenol diglycidyl ether residues in canned foods by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 70-78.

- [Paré 1994]** J.R.J. Paré, J.M.R. Bélanger and S.S. Stafford, Microwave-Assisted Process (MAP): a new tool for the analytical laboratory, *Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 176-184.
- [Pastor 1997]** A. Pastor, E. Vázquez, R. Ciscar and M. de la Guardia, Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments, *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 241-249.
- [Peris 2005]** E. Peris, S. Requena, M. de la Guardia, A. Pastor and J.M. Carrasco, Organochlorinated pesticides in sediments from the Lake Albufera of Valencia (Spain), *Chemosphere* 60 (2005) 1542-1549.
- [Pesticide Action Network]** "Residuos de plaguicidas en los alimentos", Reseñas sobre el manejo de plagas nº 8, Pesticides Action Network (United Kingdom) <http://www.pan-uk.org>
- [Petty 1993]** J.D. Petty, J.N. Huckins and J.L. Zajicek, Application of semipermeable membrane devices (SPMDs) as passive air samplers, *Chemosphere*, 27 (1993) 1609-1624.
- [Pineiro-Iglesias 2000]** M. Piñeiro-Iglesias, P. López-Mahía, E. Vázquez-Blanco, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez and E. Fernández-Fernández, Microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from atmospheric particulate samples, *Fresenius J. Anal. Chem.* 367 (2000) 29-34.
- [Pramauro 1990]** E. Pramauro, Els pesticides i el medi ambient, Servei de Publicacions Universitat de València (1990).
- [Prest 1992]** H. F. Prest, W. M. Jarman, S. A. Burns, T. Weismüller, M. Martin and J. N. Huckins, Passive water sampling via semipermeable membrane devices (SPMDS) in concert with bivalves in the Sacramento/San Joaquin River Delta, *Chemosphere* 25 (1992) 1811-1823.
- [Pylypiw 1997]** H.M.J. Pylypiw, T.L. Arsenault, C.M. Thetford and M.M.J. Incorvia, Suitability of Microwave-Assisted Extraction for Multiresidue Pesticide Analysis of Produce, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3522-3528.
- [Rantalainen 1998]** A.L. Rantalainen, M.G. Ikonou and I.H. Rogers, Lipid-containing semipermeable membrane devices (SPMDs) as concentrators

of toxic chemicals in the lower Fraser River, Vancouver, British Columbia, *Chemosphere* 37 (1998) 1119-1138.

- [Rantalainen 1999]** A.L. Rantalainen, T. Hyötyläinen, M. Saramo and I. Niskanen, Passive sampling of PAHs in indoor air in Nepal, *Toxicol. Environ. Chem.* 68 (1999) 335-348.
- [Rantalainen 2000]** A.L. Rantalainen, Semipermeable membrane devices in monitoring persistent organic pollutants in the environment, Tesis Doctoral University of Jyväskylä, Finland (2000).
- [Ramesh 1998]** A. Ramesh and M. Balasubramanian, Rapid preconcentration method for the determination of pyrethroid insecticides in vegetable oils and butter fat and simultaneous determination by gas chromatography–electron capture detection and gas chromatography–mass spectrometry, *Analyst* 123 (1998) 1799-1802.
- [Ravindra 2006]** K. Ravindra, A.F.L. Godoi, L. Bencs and R. Van Grieken, Low-pressure gas chromatography–ion trap mass spectrometry for the fast determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in air samples, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 278-281.
- [Ray 1997]** D.E. Ray, *Handbook of Pesticide Toxicology Vol.2*, Academic Press (1997).
- [Rimkus 1996]** G.G. Rimkus, M. Rummler and I. Nausch, Gel permeation chromatography-high performance liquid chromatography combination as an automated clean-up technique for the multiresidue analysis of fats, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 9-14.
- [Rosenblum 2002]** L. Rosenblum, S.T. Garris J.N. Morgan, Comparison of five extraction methods for determination of incurred and added pesticides in dietary composites, *J. AOAC Int.* 85 (2002) 1167-1176.
- [Russo 2002]** M.V. Russo, L. Campanella and P. Avino, Determination of organophosphorus pesticide residues in human tissues by capillary gas chromatography–negative chemical ionization mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 431-441.

- [Saim 1998]** N. Saim, J.R. Dean, M.P. Abdullah and Z. Zakaria, An experimental design approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from highly contaminated soil using accelerated solvent extraction, *Anal. Chem.* 70 (1998) 420-424.
- [Saito 2004]** K. Saito, A. Sjödin, C.D. Sandau, M.D. Davis, H. Nakazawa, Y. Matsuki and D.G. Patterson, Development of a accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis, *Chemosphere* 57 (2004) 373-381.
- [Santos 2003]** F. J. Santos and M. T. Galceran, Modern developments in gas chromatography–mass spectrometry-based environmental analysis, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 125-151.
- [Sanusi 2004]** A. Sanusi, V. Guillet and M. Montury, Advanced method using microwaves and solid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of pyrethroid residues in strawberries, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 35-40.
- [Saunders 2004]** G. Saunders, Polymer analysis by gel permeation chromatography – A historical perspective, *LC·GC Europe* 17 (2004) 650-655.
- [Scott 2003]** W. C. Scott and J. R. Dean, Selective extraction of persistent organic pollutants from environmental matrices, *J. Environ. Monit.* 5 (2003) 724-731.
- [Šetková 2005]** L. Šetková, J. Hajšlová, P.A. Bergqvist, V. Kocourek, R. Kazda and P. Suchan, Fast isolation of hydrophobic organic environmental contaminants from exposed semipermeable membrane devices (SPMDs) prior to GC analysis, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 170-181.
- [Silgoner 1998]** I. Silgoner, R. Krska, E. Lombas, O. Gans, E. Rosenberg and M. Grasserbauer, Microwave assisted extraction of organochlorine pesticides from sediments and its application to contaminated sediment samples, *Fresenius, J. Anal. Chem.* 362 (1998) 120-124.

- [Sparks 2003]** R. Sparks, Environmental soil chemistry, Elsevier, Amsterdam Holland (1993).
- [Sparr Eskilsson 2000]** C. Sparr-Eskilsson and E. Björklund, Analytical-scale microwave-assisted extraction, J. Chromatogr. A 902 (2000) 227-250.
- [Stefani 1997]** R. Stefani, M. Buzzi and R. Grazi, Supercritical fluid extraction of pesticide residues in fortified apple matrices, J. Chromatogr. A 782 (1997) 123-132.
- [Stout 1996]** S.J. Stout, A.R. daCunha and D.G. Allardice, Microwave-assisted extraction coupled with gas chromatography - electron capture negative chemical-ionization mass spectrometry for the simplified determination of imidazolinone herbicides in soil at the ppb level, Anal. Chem. 68 (1996) 653-658.
- [Stout 1998]** S.J. Stout, B.W. Babbitt, A.R. DaCunha and M.M. Safarpour, Microwave-assisted extraction coupled with gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection or electron capture negative chemical ionization mass spectrometry for determination of dimethomorph residues in soil, J. AOAC Int. 81 (1998) 1054-1059.
- [Tsuda 2000]** T. Tsuda, K. Suga, E. Kaneda and M. Ohsuga, Determination of 4-nonylphenol, nonylphenol monoethoxylate, nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, J. Chromatogr. B 746 (2000) 305-309.
- [Tsunoi 2002]** S. Tsunoi, T. Matoba, H. Shioji, L.T.H. Giang, H. Harino and M. Tanaka, Analysis of organotin compounds by grignard derivatization and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 962 (2002) 197-206.
- [Tuerk 2006]** J. Tuerk, M. Reinders, D. Dreyer, T.K. Kiffmeyer, K.G. Schmidt and H.M. Kuss, Analysis of antibiotics in urine and wipe samples from environmental and biological monitoring—Comparison of HPLC with UV-, single MS- and tandem MS-detection, J. Chromatogr. B 831 (2006) 72-80.

- [**Ueno 2003**] E. Ueno, H. Oshima, I. Saito and H. Matsumoto, Determination of nitrogen- and phosphorus-containing pesticide residues in vegetables by gas chromatography with nitrogen-phosphorus and flame photometric detection after gel permeation chromatography and a two-step minicolumn cleanup, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 1241-1251.
- [**University of Bristol**] Mass spectrometry resource. University of Bristol (Reino Unido), <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/mshome.html>.
- [**Vázquez Blanco 2000**] E. Vázquez Blanco, P. López Mahía, S. Muniategui Lorenzo, D. Prada Rodríguez and E. Fernández Fernández, Optimization of microwave-assisted extraction of hydrocarbons in marine sediments: comparison with the Soxhlet extraction method, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 283-288.
- [**Voie 2002**] Ø.A. Voie, A. Johnsen and H.K. Rossland, Why biota still accumulate high levels of PCB after removal of PCB contaminated sediments in a Norwegian fjord, *Chemosphere* 46 (2002) 1367-1372.
- [**Vreuls 1996**] J.J. Vreuls, R.J.J. Swen, V.P. Goudriaan, M.A.T. Kerckhoff, G.A. Jongenotter and U.A.Th. Brinkman, Automated on-line gel permeation chromatography-gas chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in olive oil, *J. Chromatogr. A* 750 (1996) 275-286.
- [**Wang 1998a**] J.H. Wang, Q. Xu and K. Jiao, Supercritical fluid extraction and off-line clean-up for the analysis of organochlorine pesticide residues in garlic, *J. Chromatogr. A* 818 (1998) 138-143.
- [**Wang 1998b**] T. Wang, T. Kadlac and R. Lenahan, Persistence of fenthion in the aquatic environment, *Bull. Environ. Cont. Toxicol.* 42 (1989) 389-394.
- [**Ware 1994**] G.W. Ware, *The pesticide Book*, W.H. Freeman, Fresno (1994) EEUU.
- [**Weichbrodt 2000**] M. Weichbrodt, W. Vetter and B. Luckas, Microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction with ethyl acetate-cyclohexane before determination of organochlorines in fish tissue by gas

chromatography with electron-capture detection, *J. AOAC Int.* 83 (2000) 1334-1343.

- [Welthagen 2004]** W. Welthagen, J. Schnelle-Kreis and R. Zimmermann, Group classification method for pm 2.5 aerosols analysed with Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC TOF MS), *J. Aerosol Science* 35 (2004) 17-28.
- [Wenzel 2004]** Wenzel, K.-D.; Vrana, B.; Hubert, A.; Schuurmann, G, Dialysis of Persistent Organic Pollutants and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Semipermeable Membranes. A Procedure Using an Accelerated Solvent Extraction Device, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5503-5509.
- [WHO 1999]** Environmental Health Criteria, World Health Organization (1999) Geneva.
- [Wiley]** John Wiley & Sons, Ltd (Hoboken, NJ, E.E.U.U.) <http://www.wiley.com>.
- [Xcalibur 2000]** Xcalibur manuals, Thermo Finnigan (2000), San Jose, CA, USA
- [Xiong 1998]** G. Xiong, J. Liang, S. Zou and Z. Zhang, Microwave-assisted extraction of atrazine from soil followed by rapid detection using commercial ELISA kit , *Anal. Chim. Acta* 371 (1998) 97-103.
- [Yasin 1996]** M. Yasin, P.J. Baugh, G.A. Bonwick, D.H. Davies, P. Hancock and M. Leinoudi, Analytical method development for the determination of synthetic pyrethroid insecticides in soil by gas chromatography-mass spectrometry operated in negative-ion chemical-ionization mode, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 235–243.
- [Yusà 2005a]** V. Yusà, A. Pastor and M. de la Guardia, Microwave-assisted extraction of OCPs, PCBs and PAHs concentrated by semi-permeable membrane devices (SPMDs), *Anal. Chim. Acta*, 540 (2005) 355-366.
- [Yusà 2006a]** V. Yusà, O. Pardo, A. Pastor and M. de la Guardia, Optimization of a microwave-assisted extraction large-volume injection and gas chromatography–ion trap mass spectrometry procedure for the determination of polybrominated diphenyl ethers, polybrominated biphenyls and polychlorinated naphthalenes in sediments, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 304-313.

- [Yusà 2006b]** V. Yusà, A. Pastor and M. de la Guardia, Microwave-assisted extraction of polybrominated diethyl ethers and polychlorinated naphthalenes concentrated on semipermeable membrane devices, *Anal. Chim. Acta* 565 (2006) 103-111.
- [Yusà 2006c]** V. Yusà, G. Quintas, O. Pardo, A. Pastor and M. de la Guardia, Determination of PAHs in airborne particles by accelerated solvent extraction and large-volume injection–gas chromatography–mass spectrometry, *Talanta* 69 (2006) 807-815.
- [Zehringer 2001]** M. Zehringer and A. Herrmann, Analysis of polychlorinated biphenyls, pyrethroid insecticides and fragrances in human milk using a laminar cup liner in the gas chromatography injector, *Eur. Food Res. Technol.* 212 (2001) 247-251.
- [Zhang 1993]** Z. Zhang and J. Pawliszyn, Headspace solid-phase micro-extraction, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1843-1852.
- [Zuloaga 2000]** O. Zuloaga-Zubieta, Development of methods for the extraction of some organic pollutants from soils, Tesis Doctoral Universidad del País Vasco (2000).