



Universitat Jaume I
Departament de Química Física i Analítica
Institut Universitari de Plaguicides i Aigües

**APLICACIÓN DE CROMATOGRAFÍA/ESPECTROMETRÍA
DE MASAS (GC-MS Y LC-MS) A LA DETERMINACIÓN DE
RESIDUOS DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS
EN SEGURIDAD ALIMENTARIA Y ACUICULTURA MARINA**

Tesis Doctoral

MERCEDES BARREDA PORTALÉS

2011

Dr. Félix Hernández Hernández, Catedrático de Química Analítica, y **Dr. Roque Serrano Gallego**, Profesor Titular de Química Analítica, de la Universitat Jaume I de Castelló,

CERTIFICAN: que la Tesis Doctoral “Aplicación de cromatografía/espectrometría de masas (GC-MS y LC-MS) a la determinación de residuos de contaminantes orgánicos en seguridad alimentaria y acuicultura marina” ha sido desarrollada bajo su dirección, en el Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas, Departamento de Química Física i Analítica de la Universitat Jaume I de Castelló, por **Mercedes Barreda Portalés**.

Lo que certificamos para los efectos oportunos en Castelló de la Plana, a 21 de Febrero de 2011.

Fdo. Dr. Félix Hernández Hernández

Fdo. Dr. Roque Serrano Gallego

Esta Tesis ha sido realizada, y consecuentemente será defendida, con el propósito de obtener el título de Doctorado en Química de la Universitat Jaume I.

Previamente a la defensa de la Tesis Doctoral, este trabajo ha sido evaluado por tres censores independientes directamente relacionados con el área de investigación:

- **Dr. Ramón J. Barrio Díez-Caballero**, Catedrático de Universidad, Departamento de Química Analítica, Universidad del País Vasco, UPV/EHU.
- **Dr. Jordi Mañes i Vinuesa**, Catedrático de Nutrició i Bromatologia, Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Universitat de València.
- **Dr. Juan Carlos Navarro Tárrega**, Investigador Científico, Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Als meus pares

Als meus germans, Ivana i Jose

A Pedro

A Laia

I com no, a tots vosaltres (família, companys, amics.
Tots els que d'una manera o altra heu estat sempre
ahí durant tot el procés d'aquest treball)

Gràcies a tots per tot.

Mercedes

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se ha estudiado el potencial analítico del acoplamiento cromatografía-espectrometría de masas con empleo de diferentes analizadores, en el campo del análisis de residuos de plaguicidas. Dependiendo del problema analítico abordado se han desarrollado aplicaciones empleando la técnica LC-MS/MS o GC-MS(MS). Todos los métodos de análisis desarrollados se han validado siguiendo los criterios de calidad recogidos en las guías europeas, desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, con el fin de que los datos obtenidos sean altamente fiables.

La investigación realizada en esta Tesis Doctoral se estructura en dos grandes bloques. Esta estructura se ha elegido para agrupar los trabajos según el campo de aplicación y el tipo de muestras estudiadas. En el **Bloque 1** se han desarrollado aplicaciones para el análisis de residuos de plaguicidas en muestras vegetales. En el primero de los trabajos se desarrolla metodología multiresidual empleando la técnica de LC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo para la determinación de 52 compuestos con características físico-químicas muy diversas en 4 matrices vegetales. El criterio general para la selección de los analitos ha sido su dificultad para los análisis por GC. El segundo de los trabajos explora las ventajas obtenidas en el anterior análisis multiresidual al emplear la técnica UHPLC-MS/MS (QqQ). Este primer bloque termina con el desarrollo de un método capaz de determinar, conjuntamente, dos fungicidas problemáticos desde el punto de vista analítico: *captan* y *folpet*, dada su inestabilidad química y térmica. Para ello, se ha usado GC-MS con analizador de cuadrupolo simple.

En el **Bloque 2**, se emplea la técnica GC-MS con analizador de cuadrupolo simple y GC-MS/MS con analizador de trampa de iones para la determinación de plaguicidas organoclorados (OCs) y bifenilos policlorados (PCBs) en muestras procedentes de la acuicultura marina, como son los piensos utilizados en piscicultura así como diversos tejidos de los peces cultivados. En el segundo de los trabajos de este bloque se aplica la metodología analítica desarrollada para evaluar las diferencias en los niveles de

concentración así como en el perfil de los contaminantes en peces cultivados y salvajes procedentes de la costa de Castellón. Por último, se ha realizado un estudio del crustáceo, *Artemia sp*, de gran interés en la acuicultura por servir de alimento para larvas de peces. En concreto se ha evaluado el efecto barrera del *corion* de *Artemia sp* en la exposición de este organismo al insecticida *clorpirifos*, por ser ampliamente empleado en nuestra agricultura.

ÍNDICE GENERAL

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	1	
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9	
 BLOQUE 1. APLICACIÓN DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS A ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS VEGETALES		
 1.1. Métodos multiresiduales para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos de origen vegetal basados en HPLC y/o UHPLC acopladas a espectrometría de masas en tándem (analizador de triple cuadrupolo).....		41
1.1.1. Introducción.....	43	
1.1.2. Artículo científico 1.....	47	
Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography–amenable pesticides and metabolites in different food commodities. Journal of Chromatography A (2006) 1109, 242-252		
1.1.3. Artículo científico 2.....	71	
Multiresidue pesticide analysis of fruits by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry Analytical and Bioanalytical Chemistry (2007) 389, 1765-1771		
1.1.4. Discusión de los resultados obtenidos.....	87	
1.1.5. Referencias.....	101	

1.2. Aplicación de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la determinación de plaguicidas problemáticos en muestras vegetales.....	105
1.2.1. Introducción.....	107
1.2.2. Artículo científico 3.....	111
Residue determination of captan and folpet in vegetable samples by gas chromatography/negative chemical ionization-mass spectrometry	
Journal of AOAC International (2006) Vol 89, No.4, 1080-1087	
1.2.3. Discusión de los resultados obtenidos.....	131
1.2.4. Referencias.....	137

BLOQUE 2. Determinación de contaminantes orgánicos en muestras procedentes de acuicultura marina mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

2.1. Estudio de los niveles de compuestos organoclorados (plaguicidas y PCBs) en peces (salvajes y cultivados) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem	143
2.1.1. Introducción.....	145
2.1.2. Artículo científico 4.....	151
Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry	
Journal of Separation Science (2003) 26, 75-86	
2.1.3. Artículo científico 5.....	177
Investigating the presence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in wild and farmed gilthead sea bream (<i>Sparus aurata</i>) from the Western Mediterranean sea	
Marine Pollution Bulletin (2008) 56, 963-972	

2.1.4. Discusión de los resultados obtenidos.....	201
2.1.5. Referencias.....	208
2.2. Estudio del comportamiento del insecticida organofosforado clorpirifos en quistes de <i>Artemia</i> (<i>Artemia</i> sp). Efectos sobre la biología (eclosión y supervivencia).....	215
2.2.1. Introducción.....	217
2.2.2. Artículo científico 6.....	221
Assessment of the efficacy of <i>Artemia</i> sp (crustacea) cysts chorion as barrier to chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) exposure. Effect of hatching and survival.	
Science of the Total Environment (2006) 366, 148-153	
2.2.3. Discusión de los resultados obtenidos.....	237
2.2.4. Referencias.....	241
CONCLUSIONES.....	243
RELACIÓN DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS.....	249



OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

OBJETIVOS

El *objetivo principal* de la presente Tesis Doctoral es la aplicación de técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas, empleando distintos analizadores, para desarrollar, validar y aplicar metodología analítica que resulte útil y eficaz para el análisis de contaminantes orgánicos en diferentes matrices de interés alimentario.

El trabajo se divide en dos grandes bloques, que se diferencian principalmente por la naturaleza de las matrices tratadas. En el **Bloque 1** se aplican técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas para la determinación de residuos de plaguicidas en muestras de origen vegetal, eligiendo entre LC-MS/MS (UHPLC-MS/MS) o GC-MS en función de los compuestos a determinar. En el **Bloque 2** se desarrollan métodos para la determinación de contaminantes orgánicos apolares en muestras procedentes de la acuicultura marina mediante GC-MS/MS.

Toda la metodología desarrollada se ha validado atendiendo a los criterios establecidos en las guías europeas de control de análisis de residuos de plaguicidas, para así asegurar la calidad de los resultados obtenidos.

Los trabajos incluidos en cada uno de los bloques se han llevado a cabo atendiendo a unos *objetivos específicos*, que se detallan a continuación.

1. Desarrollo y validación de metodología analítica basada en LC-MS/MS con analizador QqQ para la determinación multiresidual de plaguicidas, que no resultan fáciles de determinar mediante GC-MS, en vegetales haciendo uso de SPE como técnica de purificación y preconcentración.
2. Estudio preliminar para evaluar el potencial de la técnica UHPLC-MS/MS en el análisis multiresiduo de plaguicidas.

3. Desarrollo y validación de metodología analítica basada en GC-MS para la determinación de los fungicidas *captan* y *folpet* en muestras vegetales procedentes de cultivos menores, como caqui y coliflor, teniendo en cuenta su difícil determinación analítica debido a su baja estabilidad, tanto térmica como en solución acuosa.
4. Análisis de muestras vegetales procedentes de ensayos de campo realizados con los fungicidas *captan* y *folpet*, para la obtención de curvas de disipación, en estudios de residuos realizados en cumplimiento con los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio.
5. Desarrollo y validación de metodología analítica basada en GC-MS/MS para la determinación de bajos niveles de contaminantes orgánicos (plaguicidas organoclorados y PCBs) en piensos utilizados en piscicultura y en productos procedentes de la acuicultura marina, prestando una especial atención a las etapas de purificación debido al elevado contenido lipídico que presentan este tipo de matrices.
6. Análisis de muestras reales de pienso empleado en actividades acuícolas. Análisis de diferentes tejidos de peces, tanto cultivados en piscifactoría como de origen salvaje.
7. Estudio comparativo de los niveles de concentración y perfil de plaguicidas organoclorados y PCBs presentes en peces salvajes y cultivados procedentes de las Costas de Castellón.
8. Estudio de la exposición del crustáceo, *Artemia sp*, al insecticida *clorpirifos*. Determinación de la viabilidad y supervivencia de quistes y adultos de *Artemia sp* a diferentes niveles de concentración de *clorpirifos* en el medio.

9. Estudio de la eficacia del corion de los quistes (formas de resistencia) de *Artemia sp* como barrera protectora frente a la penetración del insecticida organofosforado *clorpirifos*.

PLAN DE TRABAJO

El *plan de trabajo* seguido en la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado según el siguiente esquema:

1. Revisión bibliográfica sobre los métodos de análisis existentes para la determinación multiresidual de plaguicidas en muestras vegetales mediante LC-MS/MS.
2. Selección de compuestos a estudiar, en función de las dificultades que presenten para su análisis mediante GC-MS.
3. Optimización de las condiciones de MS mediante infusión de patrones para establecer el ion precursor de cada compuesto y sus correspondientes iones producto para así poder determinar las transiciones SRM más adecuadas.
4. Selección de transiciones SRM adicionales para poder aplicar un método de confirmación en la determinación multiresidual mediante LC-MS/MS.
5. Optimización de la separación cromatográfica (HPLC) mediante inyección de patrones.
6. Estudio del efecto matriz en muestras vegetales mediante el análisis de patrones en solvente y en extractos de muestras fortificados al mismo nivel de concentración.
7. Aplicación de extracción en fase sólida como etapa de purificación y preconcentración de los extractos vegetales.
8. Validación de la metodología desarrollada estudiando los parámetros indicados en las guías europeas (SANCO): linealidad, especificidad, exactitud y precisión.
9. Aplicación de la metodología LC-MS/MS desarrollada al análisis de muestras reales teniendo en cuenta criterios de control de calidad.

10. Re-evaluación y adecuación de las condiciones cromatográficas y de MS, desarrolladas para el método anterior, usando la técnica UHPLC-MS/MS.
11. Validación de metodología UHPLC-MS/MS desarrollada en matrices vegetales y comparación de resultados obtenidos mediante las técnicas HPLC-MS/MS y UHPLC-MS/MS.
12. Evaluación del modo ionización química como alternativa al uso de impacto electrónico en GC-MS, para mejorar la sensibilidad y selectividad en la determinación de plaguicidas problemáticos, como son *captan* y *folpet*.
13. Estudio de métodos de inyección en GC, uso de distintos aditivos y procesos SPE para minimizar los problemas de degradación de los fungicidas, *captan* y *folpet*.
14. Validación de la metodología GC(NCI)-MS desarrollada para la determinación de *captan* y *folpet* y análisis de muestras reales procedentes de ensayos de campo.
15. Revisión bibliográfica sobre métodos más recientes de análisis para la determinación de compuestos organoclorados en organismos marinos y productos procedentes de la acuicultura marina, prestando especial atención a las etapas de purificación empleadas en estos métodos.
16. Optimización de las variables cromatográficas y de MS, mediante inyección de patrones y de extractos de muestras, con el fin de estudiar el efecto matriz existente en el análisis de muestras de origen marino mediante GC-MS.
17. Validación del método GC-(IT)MS/MS desarrollado y análisis de muestras de dorada salvajes y de muestras procedentes de acuicultura marina.

18. Optimización de la determinación del insecticida organofosforado *clorpirifos* mediante GC-MS en los diferentes estadios de desarrollo del crustáceo *Artemia sp.*
19. Estudio del efecto barrera del corion sobre la acumulación del insecticida organoclorado *clorpirifos* en el embrión del quiste *Artemia sp.* A partir de estos experimentos, estudio de variables de relevancia en la supervivencia de la especie, como el porcentaje de eclosión y la supervivencia de las larvas expuestas



INTRODUCCIÓN GENERAL

Los plaguicidas son productos químicos que se han desarrollado con la finalidad de prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier tipo de plaga que afecte a cultivos agrícolas, horticultura, ganadería, higiene pública y en menor medida, al uso doméstico (Marrs, 1993). Estas sustancias proporcionan a los cultivos protección frente al ataque de plagas y son aplicadas en muy diversos estadios de los cultivos, tanto durante su crecimiento como después de la cosecha para preservar la calidad de los productos durante la etapa de almacenamiento.

Dentro de los plaguicidas, se incluyen cientos de ingredientes activos que comprenden muchas familias distintas (Soler et al, 2008), como los insecticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, nematocidas, molusquicidas y acaricidas. Todos ellos presentan características físico-químicas muy diversas y grandes diferencias en polaridad, volatilidad y persistencia. No se incluyen dentro de la definición de plaguicida los medicamentos y productos farmacéuticos, puesto que éstos están destinados a combatir parásitos internos (Barberá, 1989). Tampoco están incluidos, dentro del término plaguicida, los bifenilos policlorados (PCBs) que son una serie de compuestos orgánicos procedentes de combustiones incompletas y de la síntesis de otros compuestos orgánicos

con características de elevada persistencia y liposolubilidad, semejantes a las de los plaguicidas organoclorados.

Los plaguicidas fueron introducidos a escala mundial, de modo masivo, en la década de los 40, coincidiendo con la obtención de los primeros compuestos orgánicos sintéticos. Estos compuestos, contrariamente a lo que ocurre con los plaguicidas inorgánicos, penetran a través de los tejidos de las plantas, con lo que su actuación es mucho más efectiva. En la década de los 60 se empieza a reconocer que un solo plaguicida es, muchas veces, incapaz de eliminar las especies causantes de una plaga, aceptándose el hecho de que una plaga puede volverse resistente a los efectos de un plaguicida después de una exposición más o menos prolongada a su acción. Esto provoca la aparición en el mercado, en las décadas posteriores, de nuevas generaciones de compuestos con el fin de combatir las plagas resistentes (Doménech, 1994).

Sin embargo, el uso de plaguicidas no produce sólo beneficios, sino que plantea una serie de problemas debido a su demostrada toxicidad para especies que no son su objetivo y a la bioacumulación en organismos vivos. Muchas veces presentan neurotoxicidad, mutagénesis, carcinogenia y actividad hormonal, lo que obliga a un estudio exhaustivo de cada una de las nuevas sustancias que aparecen en el mercado. Durante muchos años se han venido realizando prácticas agrícolas con un elevado, a veces desproporcionado, uso de estos productos en todo el planeta. Estas malas prácticas se han traducido, en ocasiones, en concentraciones de contaminantes en todos los compartimentos del Medio Ambiente (agua, aire, suelo...) (Kuster et al, 2006; El-Shahawi et al, 2010) generando problemas tanto ambientales como de salud pública, puesto que existe la posibilidad de contaminación directa de productos de consumo humano, como alimentos y aguas. Por estos motivos se les da un carácter prioritario como contaminante a controlar según la Unión Europea (EU, <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index-en.htm>; Directiva 2008/15/CE) y la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) (<http://www.epa.gov/pesticides/regulating/index.htm>).

En los últimos años, la Química Analítica ha experimentado un gran desarrollo y se ha producido una mejora en las técnicas y métodos de análisis de residuos de plaguicidas debido, en gran parte, a la preocupación mostrada por la comunidad científica acerca de los posibles efectos adversos asociados a la presencia de estos compuestos en el Medio Ambiente (van Leeuwen et al, 2008). En cuanto a los productos destinados al consumo se ha puesto, en las últimas décadas, especial énfasis a nivel internacional (*Codex Alimentarius Commission*) y europeo (*EU Commission*) en el desarrollo de una serie de normativas y legislación que garantice la seguridad para los consumidores (<http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/publications-en.htm>). Se establece la necesidad de disponer de métodos capaces de determinar el límite máximo de residuo (LMR) (Hiemstra et al, 2007), que define el límite legal permitido de plaguicida en productos de origen alimentario (expresado en mg de plaguicida por Kg de producto) (SANCO/10684/2009; SANCO/3029/99; SANCO 825/00; Reglamento (CE) N° 396/2005). Con respecto a ésto, hay que mencionar que estos documentos se han convertido en una herramienta de consulta muy útil para los laboratorios de análisis en temas de seguridad alimentaria, ya que incluyen las definiciones y descripción de los requisitos necesarios para el análisis en cuanto a identificación y detección de compuestos preestablecidos (*target*) (Malik et al, 2010).

A. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

Los métodos de análisis de residuos de plaguicidas (ARP) han sufrido enormes cambios en las últimas décadas. Durante muchos años, la mayor parte de estos análisis se han realizado empleando la técnica de cromatografía de gases (GC) acoplada a detectores de captura de electrones (ECD), nitrógeno-fósforo (NPD) y fotométrico de llama (FPD). Las aplicaciones que se llevaban a cabo mediante cromatografía líquida (LC) eran menos habituales debido a que los detectores habitualmente utilizados de ultravioleta (UV), diodos y fluorescencia presentaban una menor sensibilidad y selectividad que los empleados en GC. El desarrollo que ha experimentado la espectrometría de masas (MS) ha supuesto una revolución en este campo, de modo que, hoy en día, no puede concebirse el ARP sin el uso del acoplamiento cromatografía/espectrometría de masas. Actualmente, pueden alcanzarse a detectar con relativa facilidad niveles de concentración por debajo de partes por billón (ppb) e incluso partes por trillón (ppt) (Koester, 2005). El uso de MS como técnica de detección aporta a los métodos una sensibilidad y poder de confirmación mucho más elevados, que no era posible conseguir con los detectores tradicionales. Todo esto hace que MS sea una herramienta analítica imprescindible que se ha ligado, de forma rutinaria, a las determinaciones realizadas por GC y LC (Alder et al, 2006).

La *cromatografía de gases* es una técnica de separación que resulta adecuada para la determinación de compuestos orgánicos apolares, volátiles y térmicamente estables, mientras que la *cromatografía de líquidos* se emplea para el análisis de compuestos con carácter polar (incluso compuestos iónicos), con una volatilidad baja y termolábiles. La *cromatografía de líquidos* también resulta adecuada para la determinación de metabolitos o productos de transformación (TPs) debido a que suelen tener un carácter más polar que sus compuestos de partida (Reemstma, 2003; Hernández et al, 2004). Muchos de estos compuestos se han venido analizando mediante GC-MS pero haciendo uso de métodos que requieren tratamientos de muestra complejos, con reacciones de derivatización, para así conseguir modificar las características de los compuestos y hacerlos aptos para el uso

de esta técnica. En los últimos años, el elevado número de citas reportadas en la bibliografía (Greulich et al, 2008; Richardson, 2008; Petrovic et al, 2010; Richardson, 2010) demuestra que existe una preferencia en el empleo de LC-MS en detrimento del uso de GC-MS, debido principalmente a que los métodos basados en LC-MS suelen incluir un menor tratamiento de muestra dando lugar a métodos de análisis más sencillos (Hernández et al, 2001; Sancho et al, 2004; Grimalt et al, 2007; Marín et al, 2009). En el caso concreto del análisis de aguas, pueden incluso realizarse inyecciones directas de las muestras sin necesidad de ningún tratamiento previo gracias a la elevada sensibilidad y selectividad alcanzada por LC-MS/MS (Marín et al, 2006 a; Marín et al, 2006 b; Greulich et al, 2008). Teniendo en cuenta que los plaguicidas presentan propiedades físico-químicas muy diversas, con grandes diferencias en la polaridad, volatilidad y persistencia, las técnicas GC y LC son consideradas complementarias, y ambas son necesarias para la determinación de residuos de plaguicidas en todo tipo de matrices (Careri et al, 2002; Soler et al, 2008). Así pues, siempre existirán situaciones en las que por la naturaleza de los compuestos a tratar será necesario el empleo de la técnica GC-MS (Alder et al, 2006).

La aplicación de MS, especialmente tándem MS (MS/MS) en el análisis de residuos de plaguicidas ha supuesto un gran progreso en los últimos años. Las técnicas GC-MS/MS y LC-MS/MS son posiblemente las más adecuadas en el momento actual para la determinación de plaguicidas y sus productos de transformación (TPs). Así, existen métodos modernos que aplican una sola extracción para las muestras seguida de un análisis complementario por LC-MS/MS y por GC-MS/MS (Lehotay et al, 2005; Mol et al, 2007; Pihlström et al, 2007). De este modo, en un solo método se puede incluir un mayor número de compuestos. A modo de ejemplo, se podría citar el método para 309 plaguicidas en varias matrices de origen vegetal desarrollado en la *National Food Administration*, Suecia (Pihlström et al, 2007), que emplea la técnica de LC-MS/MS (tanto en modo positivo como negativo) para la determinación de 187 analitos, mientras que los restantes 122 son determinados mediante la técnica GC-MS/MS. También hay que mencionar el método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) (Lehotay et al, 2005) que permite la determinación de 229 plaguicidas, en dos matrices

vegetales (lechuga y naranja), empleando las técnicas de GC-MS/MS y LC-MS/MS. El método QuEChERS se basa en una extracción de la muestra con acetonitrilo, seguida de una partición líquido-líquido (ELL) adicionando NaCl y MgSO₄. Como método de purificación se realiza una extracción en fase sólida dispersiva (SPDE) que emplea una amina primaria/secundaria (PSA) como fase estacionaria.

B. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Los espectrómetros de masas se pueden clasificar según el modo en que separan los iones generados en la fuente de ionización en función de su relación masa/carga (m/z), es decir, en función del analizador de masa que posean. Se van a comentar a continuación, muy brevemente, las características principales de los analizadores más empleados en el campo de análisis de contaminantes orgánicos: cuadrupolo simple (Q), tiempo de vuelo (TOF), triple cuadrupolo (QqQ) y trampa de iones cuadrupolar (ITQ). Para una descripción más detallada se puede hacer uso de obras específicas, como de Hoffmann (2002), Niessen (2006 a) y Dass (2007).

Cuadrupolo simple (Q)

El analizador Q consiste en cuatro cilindros metálicos dispuestos paralelamente dos a dos. Los cilindros opuestos están conectados entre sí eléctricamente y a éstos se les aplica un voltaje de radiofrecuencia (RF) determinado, de modo que solo los iones con una determinada relación m/z alcanzan al detector, mientras que el resto de iones que no responden a las RF proporcionadas presentan trayectorias inestables y colisionan con los cilindros, siendo expulsados. Esto permite la selección de un cierto número de iones o de un ion en particular mediante variación de los voltajes RF.

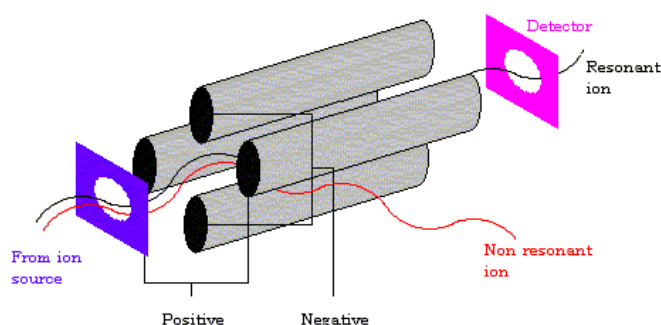


Figura 1. Esquema de un cuadrupolo lineal

Los analizadores Q permiten dos modos de trabajo. En modo *full scan* se obtiene el espectro completo con resolución de un Dalton (Da) del analito de una forma reproducible. Este modo de trabajo proporciona información cualitativa de utilidad, aunque ofrece poca sensibilidad. Para mejorar esta desventaja existe la posibilidad de trabajar en modo *Selected Ion Monitoring* (SIM), donde el Q actúa de filtro de los iones para unas m/z concretas. De este modo se produce un aumento de la selectividad y sensibilidad en el análisis y resulta un modo de trabajo ideal para el análisis cuantitativo de los analitos en modo *target* (preseleccionados con anterioridad). Tradicionalmente, se trata del analizador más ampliamente utilizado para determinar contaminantes orgánicos en todo tipo de matrices (Lehotay et al, 2002; Santos et al, 2003; Jakubowska et al, 2009), aunque debido a las desventajas que presenta en cuanto a baja sensibilidad y poca discriminación entre analitos e interferentes de la matriz a niveles de concentración muy bajos, se opta por sustituirla empleando técnicas cromatográficas de *tándem MS*.

Tiempo de vuelo (TOF)

El analizador TOF separa los iones en función del tiempo que tardan en atravesar un tubo de vuelo de longitud conocida. Este tiempo depende de la relación m/z porque los iones menos pesados llegarán más rápidamente al detector que aquellos que presentan una relación m/z de valor más alto. Los equipos que emplean este tipo de analizadores permiten la medición de la masa exacta de los iones detectados debido a la elevada resolución que alcanzan estos equipos. Solo permite trabajar en modo *full scan* por lo que presenta un elevado poder de trabajo en modo cualitativo y resulta ideal para análisis tipo *post-target* y *non-target* (aplicable para análisis de búsqueda de desconocidos). Los instrumentos más modernos han mejorado el rango lineal de modo que empiezan a aparecer aplicaciones cuantitativas.

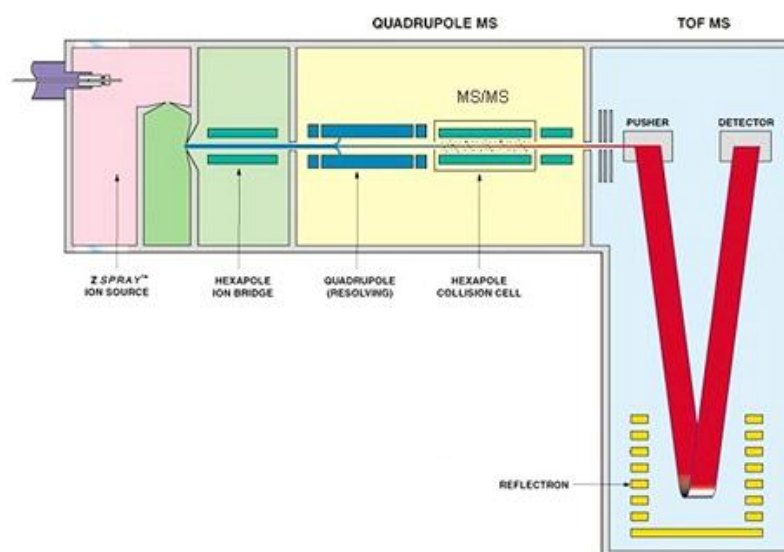


Figura 2. Esquema de espectrómetro TOF con reflectrón

B.1. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

La posibilidad de acoplamiento de dos analizadores de masa aumenta el potencial de las técnicas aplicadas. De este modo, la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) conlleva dos o más etapas de análisis separadas por una reacción o paso de fragmentación. En la primera, se produce la selección de un ion precursor seguida de una ionización de las moléculas mediante un proceso de disociación o por medio de una reacción química. En una segunda etapa se lleva a cabo el análisis de los iones producto obtenidos del proceso de fragmentación. Presenta una serie de ventajas frente al MS simple como la reducción del ruido de fondo (S/N) debido a la elevada especificidad. El MS/MS consigue que los instrumentos posean una gran selectividad que hace que no sea necesaria una completa resolución cromatográfica entre los analitos y los componentes de la matriz, de modo que es posible desarrollar tratamientos con menos pasos dando lugar a métodos más simples (Garrido Frenich et al, 2008). Existen dos configuraciones para este modo de trabajo, *tándem en espacio* y *tándem en tiempo*. La primera presenta un analizador distinto e independiente en diferentes localizaciones del instrumento. En esta

clase de analizadores híbridos se encuentran el de triple cuadrupolo (QqQ) y acoplamiento cuadrupolo-TOF (QTOF). En los analizadores de *tándem en tiempo*, los distintos procesos que ocurren en el analizador tienen lugar en el mismo espacio pero los procesos suceden en distintos tiempos durante el análisis. El ejemplo de este tipo de analizadores es la trampa de iones (IT).

Triple cuadrupolo (QqQ)

Este tipo de analizador es el más empleado para análisis cuantitativo. Proporciona una información adicional que se obtiene de la fragmentación de los iones generados en el proceso de ionización. Esta fragmentación se consigue mediante un proceso denominado disociación inducida por colisión (CID), que hace que el ion precursor colisione con moléculas de gas inerte (nitrógeno o argón) dando lugar a fragmentos más pequeños que conforman los iones producto. Estos fragmentos varían en función de la estructura del analito, de ahí la información útil para la elucidación estructural que se obtiene con la técnica MS/MS. Para poder realizar MS/MS en este tipo de analizadores se acoplan tres cuadrupolos simples distribuidos secuencialmente (**Figura 3**).

En **Q1** se aísla y selecciona un ion con m/z determinada (ion precursor) y se acelera el ion o iones hacia **q2** que actúa como celda de colisión en la que tiene lugar el proceso CID descrito. Estos iones se transmiten de **q2** a **Q3** donde se realiza un barrido o selección de los iones producto generados. Los cuadrupolos **Q1** y **Q3** tienen la función de resolver masas. La geometría de la celda de colisión suele ser hexapolar u octapolar debido a que estos diseños hacen que la transmisión de los iones producto de **q2** a **Q3** sea más eficaz.

El analizador QqQ puede trabajar en distintos modos, tanto en modo MS (como si de un Q simple se tratara) como en modo MS/MS. Cuando trabaja en modo MS/MS se pueden realizar barrido de iones precursores (*precursor ion scan*), barrido de iones producto (*product ion scan*), de pérdidas neutras (*neutral loss scan*) y monitorización de una transición concreta (*Selected Reaction Monitoring, SRM*) (Dass C., 2007), siendo éste último el más común y el empleado en esta Tesis Doctoral. Cuando un QqQ trabaja

en modo SRM, **Q1** proporciona un determinado ion precursor y **Q3** un ion producto, generándose así una transición específica.

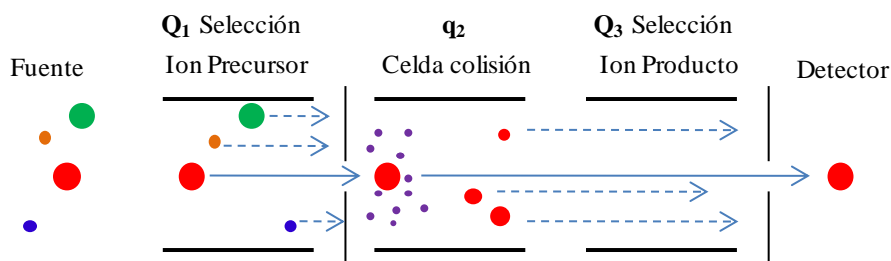


Figura 3. Esquema de un analizador de QqQ en modo SRM

Este modo de trabajo presenta una elevada sensibilidad y selectividad debido a que durante todo el proceso del análisis se está midiendo una o varias transiciones específicas por lo que resulta el más adecuado para el análisis de contaminantes a nivel de trazas. Una de las ventajas de trabajar en modo SRM es la posibilidad de usar tiempos de *dwell* muy bajos y así poder incluir en un solo método un gran número de transiciones, facilitando el desarrollo de métodos multiresiduales que permiten realizar simultáneamente el *screening*, *cuantificación* y *confirmación* de los analitos. La principal desventaja de este modo de adquisición es que no se obtiene el espectro completo, de modo que solo es útil para análisis tipo *pre-target*. El analizador QqQ es ampliamente utilizado tanto en el campo GC-MS/MS como en LC-MS/MS, tal y como se comentará más adelante en el **Apartado 1.1.1**.

Trampa de iones cuadrupolar (ITQ)

Las trampas de iones (IT) están formadas por tres electrodos. Uno de ellos con forma de anillo que se encuentra situado entre dos electrodos hiperbólicos. En este tipo de analizadores, como se comentó con anterioridad, los procesos de aislamiento del ion precursor, fragmentación y análisis de los iones producto tienen lugar en un mismo espacio pero a distintos tiempos. Se crea una diferencia de potencial (ddp) oscilante entre los electrodos que establece la creación de un campo eléctrico. Todos los iones que llenan la trampa estabilizan sus trayectorias y el voltaje que existe en la IT va aumentándose hasta alcanzar un valor crítico (q_z) que produce la desestabilización de una trayectoria de modo que el ion abandona la trampa. Este proceso se realiza ordenadamente según el valor ascendente de m/z . La ventaja principal de este analizador es que es capaz de multiplicar los estadios de análisis del MS y obtener espectros de iones producto MS/MS y MS^n (debido a la preselección y análisis de los fragmentos inducidos). De este modo se permite la elucidación estructural de compuestos a expensas de no disponer de valores de masa exacta. Adicionalmente, resaltar que una de las ventajas más interesantes de los analizadores IT, es su mayor sensibilidad cuando se trabaja en modo *scan*, especialmente comparando con los analizadores QqQ. Los analizadores ITQ son empleados en muy diversos campos de análisis, como el alimentario (Arrebola et al, 2003; Garrido Frenich et al, 2008), ambiental (Guardia et al, 2006; Ruiz-Gil et al, 2008) y biológico (de Saeger et al, 2005; Gómara et al, 2006).

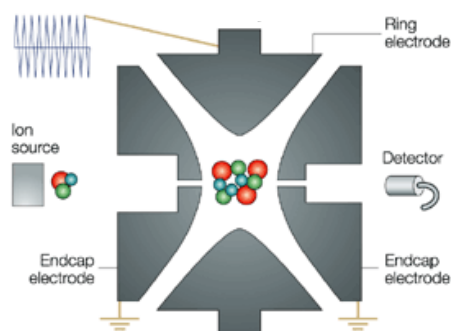


Figura 4. Esquema de un analizador de trampa de iones

A modo de resumen se presenta en la **Tabla 1** las principales aplicaciones, así como los modos de trabajo y técnicas en las que principalmente se hace uso de los analizadores que se han comentado con anterioridad en el presente apartado.

Tabla 1. Resumen de las características de aplicación de los analizadores comentados

Analizador	Modo trabajo	Aplicación	Técnica
<i>Cuadrupolo simple (Q)</i>	scan	cualitativa	GC-MS/MS
	SIM	cuantitativa	
<i>Triple cuadrupolo (QqQ)</i>	SRM	cuantitativa	GC-MS/MS
			LC-MS/MS
<i>Trampa iones (IT)</i>	scan	cualitativa	GC-MS/MS
		cuantitativa	LC-MS/MS
<i>Tiempo de vuelo (TOF)</i>	Espectro completo,	cualitativa	GC-MS/MS
	masa exacta		LC-MS/MS

C. ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS DE INTERÉS ALIMENTARIO

El procedimiento global para la determinación de plaguicidas en muestras de carácter complejo, como pueden ser las muestras de interés alimentario, incluye diferentes etapas: (i) tratamiento de muestra; (ii) purificación de los extractos obtenidos; (iii) determinación analítica mediante técnicas cromatográficas. Todas estas etapas son de especial importancia para poder generar metodología analítica que resulte robusta y fiable.

(i) **tratamiento de muestra** que variará dependiendo del tipo de matriz, los analitos objeto de estudio y la técnica de determinación que se va a aplicar. Generalmente, un tratamiento de muestra general consta de una extracción sólido-líquido (o líquido-líquido (ELL)) con disolvente orgánico o mezcla de disolventes, que se eligen dependiendo del tipo de problema analítico que se tiene que abordar. La extracción, generalmente, se realiza mediante homogeneización del disolvente y la muestra mediante un sistema manual o automático de agitación-homogeneización. También pueden emplearse sistemas de extracción como la extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción con Soxhlet, extracción mediante uso de microondas (MAE), extracción en solvente acelerada (ASE), entre otros (van Leeuwen et al, 2008). Para terminar, mencionar que también existen métodos basados en la adsorción de los analitos en superficies sólidas como los basados en técnicas de extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME), extracción en fase sólida dispersiva (SPDE), o extracción mediante adsorción en *stir-bar* (SBSE) (Fernández Moreno et al, 2008).

En esta etapa del análisis pueden existir etapas de pre-concentración que intenten mejorar la sensibilidad del análisis (típico en análisis realizados mediante GC-MS).

(ii) **purificación de los extractos obtenidos.** Las interferencias ocasionadas por la matriz, conocidas como *efecto matriz* son uno de los principales inconvenientes que presentan los métodos de análisis tanto para GC como LC. Este efecto matriz depende de

la combinación analito-muestra. Aunque los métodos basados en MS y MS/MS tienen una elevada selectividad, en muestras especialmente complejas puede haber componentes de la matriz coextraídos presentes en la muestra inyectada que causen problemas de cuantificación si coeluyen con el analito. También pueden existir componentes de la matriz que pueden competir con el analito en el proceso de ionización alterando la eficacia de la formación de los iones (Qu et al, 2001; Garrido Frenich et al, 2009).

El efecto matriz se traduce en una supresión (o exaltación, en menor número de casos) de la señal que conlleva una disminución de la sensibilidad y un empeoramiento de los límites de detección y hace que peligre la correcta cuantificación de los analitos. Los métodos de purificación se aplican para eliminar sustancias interferentes y minimizar el efecto matriz, pero también pueden emplearse para mejorar los límites de detección, debido a la pre-concentración de los extractos más limpios normalmente asociada a la etapa de purificación.

Para hacer frente a los problemas ocasionados por el efecto matriz se pueden emplear dos tipos de estrategias distintas, unas que *compensan* los efectos ocasionados por la existencia de matriz empleando métodos de calibración adecuados, aunque también es posible emplear estrategias que *eliminen* los interferentes, previa determinación analítica, mediante etapas de purificación o *clean-up* (Garrido-Frenich et al, 2009).

Entre las estrategias que *compensan* la existencia del efecto matriz, se pueden distinguir:

- a. Uso de patrones en solvente, mediante empleo de factores de corrección para transformar los resultados y de esta forma contrarrestar los efectos de la matriz. También es posible emplear aditivos o protectores de analito que se añaden a los patrones preparados en solvente e impiden el efecto matriz bloqueando los sitios activos del inyector.
- b. Uso de patrones preparados en matriz, mediante calibrados preparados en matriz blanco, o aplicando el método de adiciones estándar.

- Calibrado en matriz. Haciendo uso de este método de compensación, todos los analitos sufren por igual el efecto matriz tanto en las muestras analizadas como en los patrones de la curva de calibración, por lo que la cuantificación se realiza teniendo en cuenta este efecto. Tiene como inconveniente que la preparación resulta más laboriosa que para patrones en solvente y que no existe siempre matriz blanco disponible, que sea representativa (como ocurre en los casos de análisis de muestras ambientales) para la preparación de los calibrados. En el análisis de muestras vegetales, las muestras blanco se pueden obtener a partir de ensayos de campo con muestras control o puede seleccionarse una matriz representativa procedente de agricultura biológica dentro de un grupo de matrices (las matrices están clasificadas según las guías SANCO (SANCO/10684/2009) en cuatro grupos que son: elevado contenido en agua, elevada acidez, elevado contenido graso y cultivos secos o cereales. (Garrido Frenich et al, 2009)).
- Método de las adiciones standard. Resulta una forma de trabajo útil cuando no existe matriz blanco disponible. Como inconveniente se puede indicar que es muy tedioso ya que es necesario un mayor número de inyecciones por muestra y, además, para poder realizar las adiciones correctamente, es necesario hacer, una previsión del nivel de concentración del residuo que se espera obtener.
- c. Uso de patrones internos. Su uso es el más aconsejable puesto que minimiza las etapas de pre-tratamiento de las muestras, permitiendo incluso la inyección directa de algunos tipos de muestras como es el caso de muestras de agua. El compuesto utilizado como patrón interno debe tener estructura y tiempo de retención similares a las del analito para que la ionización afecte por igual a los interferentes de la matriz, al analito y al propio patrón interno (de aquí la dificultad que existe en su empleo para métodos multiresiduales). La circunstancia ideal es el empleo del mismo compuesto a analizar, pero marcado isotópicamente, aunque tiene la limitación de que no existe disponibilidad

comercial para todos los compuestos y, en el caso de que existan, suelen ser sustancias con un coste muy elevado.

- d. Dilución de las muestras. Se emplea cuando no existe un patrón interno adecuado o tampoco es posible realizar un calibrado en matriz porque no existe muestra blanco. Para poder efectuar estas etapas de dilución es necesario que la sensibilidad del analito no sea un problema, ya que los interferentes producidos por la matriz se minimizan al diluir los extractos en el mismo solvente en que han sido preparados los patrones.

Por otro lado, están las estrategias que eliminan los interferentes previa inyección de los extractos en los sistemas cromatográficos. En estos métodos, la cantidad de matriz que se introduce en el sistema se reduce de modo que se minimiza el daño instrumental que producen los interferentes (Hajšlová et al, 2003, Niessen et al, 2006 b). Muchos laboratorios tienden a evitar, en la medida de lo posible, estas etapas extra en los métodos ya que son tediosas y consumen una cantidad de tiempo considerable. Además, al elevar el número de etapas del procedimiento es mayor el riesgo de pérdida de analitos o contaminación de las muestras. De todos modos, en muchos procedimientos de análisis de muestras complejas como pueden ser los vegetales o las muestras con elevado contenido en grasa, como los organismos marinos y sus derivados, estas etapas son de vital importancia y la aplicación de procedimientos de purificación adicionales es necesaria. Los más aplicados suelen ser la *cromatografía de permeación en gel* (GPC) y/o *extracción en fase sólida* (SPE).

La GPC es un método de purificación basado en la separación de los componentes del extracto por tamaño mediante paso de la muestra a través de un gel polimérico poroso. Este procedimiento de purificación elimina muchos tipos de interferentes como lípidos, proteínas, polímeros, componentes celulares, entre otros y es apropiado para todo tipo de analitos. El problema que presenta la GPC en el análisis de extractos con elevado contenido graso es que a menudo es necesario aplicar un segundo proceso de GPC o una

etapa adicional de SPE para eliminar lípidos residuales u otros componentes de la matriz (Patel et al, 2005).

En cuanto a los procesos de purificación basados en SPE, éstos se basan en el fraccionamiento de los analitos e interferentes presentes en el extracto mediante retención y posterior elución selectiva del sorbente sólido empleando diferentes disolventes. Existen multitud de sorbentes sólidos que se seleccionan dependiendo del problema analítico al que hay que dar solución. En la **Tabla 2** se muestra una clasificación de los tipos de sorbentes existentes. Unos son de aplicación general, puesto que son aptos para una gran variedad de compuestos, y son ampliamente utilizados en muchas aplicaciones, como es el caso de los sorbentes polares o de fase normal (sílica, alúmina, florisil), las resinas poliméricas apolares (PS-DVB, poliestireno-divinilbenzeno) o los de relleno de base sílica o de fase reversa (C_{18} , C_8 , C_2). También existen numerosos sorbentes que tienen una elevada especificidad, que son empleados en casos más particulares. Dentro de este grupo de sorbentes, están los de intercambio iónico, los inmunosorbentes o los polímeros de impresión molecular (MIPs), entre otros. (Winefordner, 2003).

Tabla 2: Clasificación de los tipos de sorbente más empleados en procedimientos de SPE

Uso	Sorbente	Tipos
<i>General</i>	Polar	Sílica (SiO ₂) _x , Alúmina (Al ₂ O ₃), Florisil (MgSiO ₃)
	Polimérico	PS-DVB
	Relleno base sílica	Octadecil, C ₁₈ ; octil, C ₈ , etil, C ₂ , ciclohexil...
	Carbón grafitizado	GCBs , PGCs
	Resinas poliméricas	Acetil PS-DVB, benzoil PS-DVB...
<i>Específico</i>	Intercambio iónico	Contienen aminas primarias/secundarias, ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos...
	Inmunosorbentes	
	MIPs	

(iii) determinación analítica mediante técnicas cromatográficas. Durante esta etapa es necesario optimizar las condiciones cromatográficas y del sistema de detección con el objetivo de obtener una separación satisfactoria entre los componentes de la matriz y los analitos y así obtener una respuesta apropiada en el sistema. Como se ha comentado anteriormente, en las determinaciones de plaguicidas y sus TPs realizadas tanto por LC como por GC, se prefieren los acoplamientos que emplean un sistema de detección de MS, especialmente de MS/MS. El uso de MS/MS hace que la especificidad del análisis sea muy elevada, de modo que se aumenta la selectividad y sensibilidad del método. El empleo de esta técnica resulta de gran utilidad en los análisis a nivel de trazas debido a que permite realizar de modo simultáneo la identificación, cuantificación, e incluso confirmación de los analitos estudiados.

En la presente Tesis Doctoral se han empleado tanto la técnica de análisis de GC-MS/MS como LC-MS/MS, haciendo uso de diferentes analizadores.

En el caso de las aplicaciones desarrolladas para análisis de contaminantes en muestras vegetales (**Bloque 1**) se ha desarrollado metodología multiresidual y se han empleado las técnicas de LC-MS/MS y UHPLC-MS/MS con analizador QqQ (**Artículos científicos 1 y 2**). En el caso particular de la determinación de los compuestos problemáticos *captan* y *folpet* se empleó la técnica GC-MS con analizador Q simple (**Artículo científico 3**).

En el **Bloque 2** los métodos desarrollados para la determinación de plaguicidas organoclorados (OCs) y bifenilos policlorados (PCBs) en muestras con origen en la acuicultura, en concreto para los piensos empleados en la alimentación de los peces cultivados y para los tejidos de estos peces, se empleó la técnica GC-MS con analizador de Q simple y GC-MS/MS con analizador de ITQ (**Artículo científico 4**). También se ha empleado esta técnica, en el **Artículo científico 5**, para evaluar los patrones de contaminación en peces de origen salvaje y cultivados, capturados en el Mediterráneo. En el **Artículo científico 6** se hace uso de la técnica GC-MS para evaluar el efecto protector del corion durante la exposición de los quistes de *Artemia sp* al compuesto *clorpirifos*.

Esta variedad de técnicas y analizadores empleados viene a corroborar el comentario realizado anteriormente sobre la no universalidad en el uso de una sola técnica cromatográfica ni en el empleo de un único analizador. En el campo del análisis de residuos de plaguicidas resulta necesario combinar técnicas y analizadores distintos dependiendo del tipo de estudio analítico al que hay que dar solución.

D. REFERENCIAS

- Alder L., Greulich K., Kempe G., Vieth B. (2006). “*Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS?*”. *Mass Spectrometry Reviews* 25, 838-865.
- Arrebola F.J., Martínez Vidal J.L., Mateu-Sánchez M., Álvarez-Castellón F.J. (2003). “*Determination of 81 multiclass pesticides in fresh foodstuffs by a single injection analysis using gas chromatography-chemical ionization and electron ionization tandem mass spectrometry*”. *Analytica Chimica Acta* 484, 167-180.
- Barberá C. (1989). “*Plaguicidas Agrícolas*”. Ediciones Omega, 4ª edición, Barcelona.
- Careri M, Bianchi F., Corradini C. (2002). “*Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis*”. *Journal of Chromatography A* 970, 3-64.
- Dass C. (2007). “*Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. Chapter 4: Tandem Mass Spectrometry*”. Wiley Interscience Series on Mass Spectrometry.
- de Hoffmann de E. , Stroobant V. (2002). “*Mass Spectrometry. Principles and applications*”. 2nd Edition. John Wiley & Sons.
- de Saeger S., Sergeant H., Piette M., Bruneel N., van de Voorde W., van Peteghem C. (2005). “*Monitoring of polychlorinated biphenyls in Belgian human adipose tissue samples*”. *Chemosphere* 58, 953-960.
- Directiva 2008/15/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. Diario Oficial de la Unión Europea 24.12.2008.
- Doménech X. (1994). “*El Impacto ambiental de los residuos*”. 2ª edición. Ediciones Miraguano .

- El-Shahawi M.S., Hamza A., Bashammakh A.S. Al-Saggaf W.T. (2010). “*An overview on the accumulation, distribution, transformation, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants*”. *Talanta* 80, 1587-1597.
- Fernández Moreno J.L., Garrido Frenich A., Plaza Bolaños P., Martínez Vidal J.L. (2008). “*Multiresidue method for the analysis of more than 140 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*”. *Journal of Mass Spectrometry* 43, 1235-1254.
- Garrido Frenich A., Plaza-Bolaños P., Martínez Vidal J.L. (2008). “*Comparison of tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry in gas chromatography determination of pesticides: application to simple and complex food samples*”. *Journal of Chromatography A* 1203, 229-238.
- Garrido Frenich A., Martínez Vidal J.L., Fernández Moreno J.L., Romero-González R. (2009). “*Compensation for matrix effects in gas chromatography-tandem mass spectrometry using a single point standard addition*”. *Journal of Chromatography A* 1216, 4798-4808.
- Gómara B., Herrero L., Bordajandi L.R., González M.J. (2006). “*Quantitative analysis of polybrominated diphenyl ethers in adipose tissue, human serum and foodstuff samples by gas chromatography with ion trap tandem mass spectrometry and isotope dilution*”. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 69-74.
- Greulich K., Alder L. (2008). “*Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC-MS/MS*”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 183-197.
- Grimalt S., Pozo O.J., Sancho J.V., Hernández F. (2007). “*Use of liquid chromatography coupled to Quadrupole Time-of-Flight mass spectrometry to investigate pesticide residues in fruits*”. *Analytical Chemistry* 79 (7), 2833-2843.

- Guardia Rubio M., Ruiz Medina A., Molina Díaz A., Fernández de Córdoba M.L. (2006). “*Determination of pesticides in washing waters of olive processing by gas chromatography-tandem mass spectrometry*”. *Journal of Separation Science* 29, 1578-1586.
- Hajšlová J., Zrostlíková J. (2003). “*Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices*”. *Journal of Chromatography A* 1000, 181-197.
- Hernández F., Sancho J.V., Pozo O.J., Lara A., Pitarch E. (2001). “*Rapid direct determination of pesticides and metabolites in environmental water samples at sub-ppb level by on line solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*”. *Journal of Chromatography A* 939, 1-11.
- Hernández F., Ibáñez M., Sancho J.V., Pozo O.J. (2004). “*Comparison of different mass spectrometric techniques combined with liquid chromatography for confirmation of pesticides in environmental water based on the use of identification points*”. *Analytical Chemistry* 76, 4349-4357.
- Hiemstra M., de Kok A. (2007). “*Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*”. *Journal of Chromatography A* 1154, 3-25.
- Jakubowska N., Zygmunt B., Polkowska Z., Zabiegala B., Namieśnik J. (2009). “*Sample preparation for gas chromatographic determination of halogenated volatile organic compounds in environmental and biological samples*”. *Journal of Chromatography A* 1216, 422-441.
- Koester C.J. (2005). “*Trends in Environmental Analysis*”. *Analytical Chemistry* 77, 3737-3754.

- Kuster M., López de Alda M., Barceló D. (2006). “*Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques*”. *Mass Spectrometry Reviews* 25, 900-916.
- Lehotay S.J., Hajšlová J. (2002). “*Application of gas chromatography in food analysis*”. *Trends in Analytical Chemistry* 21, 686-697.
- Lehotay S.J., de Kok A., Hiemstra M., van Bodegraven P. (2005). “*Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection*”. *Journal of AOAC International* 88, 595-614.
- Marrs T.C. (1993). “*Organophosphate poisoning*”. *Pharmacology and Therapeutics* 58(1), 51-66.
- Malik A. K., Blasco C. Picó Y. (2010). “*Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety*”. *Journal of Chromatography A* 1217, 4018-4040.
- Marín J.M., Sancho J.V., Pozo O.J., López F.J., Hernández F. (2006 a). “*Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry*”. *Journal of Chromatography A* 1133, 204-214.
- Marín J.M., Pozo O.J., Sancho J.V., Pitarch E., López F.J., Hernández F. (2006 b). “*Study of different atmospheric-pressure interfaces for LC-MS/MS determination of acrylamide in water at sub-ppb levels*”. *Journal of Mass Spectrometry* 41, 1041-1048.
- Marín J.M., Gracia-Lor E., Sancho J.V., López F.J., Hernández F. (2009). “*Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multiclass pesticides in environmental and wastewater samples: Study of matrix effects*”. *Journal of Chromatography A* 1216, 1410-1420.

- Mol H.G., Rooseboom A., van Dam R., Roding M., Arondeus K., Sunarto S. (2007). *“Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticide in produce”*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 389, 1715-1754.
- Niessen W.M.A. (2006 a). *“Liquid Chromatography Mass Spectrometry”*. Third Edition. Chromatographic Science Series 97. Ed. Marcel Dekker.
- Niessen W.M.A., Manini P., Andreoli R. (2006 b). *“Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid-chromatography-mass spectrometry”*. Mass Spectrometry Reviews 25, 881-899.
- Patel K., Fussell R.J., Hetmanski M., Goodall D.M., Keely B.J. (2005). *“Evaluation of gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry for the determination of organochlorine pesticides in fats and oils”*. Journal of Chromatography A 1068, 289-296.
- Petrovic M., Farré M., López de Alda M., Pérez S., Postigo C., Köck M., Radjenovic J., Gros M., Barceló D. (2010). *“Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples”*. Journal of Chromatography A 1217, 4004-4017.
- Pihlström T, Blomkvist G., Friman P., Pagard U., Österdahl B-G. (2007). *“Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection”*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 389, 1773-1789.
- Qu J., Wang Y., Luo G. (2001). *“Determination of scutellarin in Erigeron breviscapus extract by liquid chromatography-tandem mass spectrometry”*. Journal of Chromatography A 919 (2), 437-441.
- Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de Febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y

piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea. Septiembre 2008.

Reemstma T. (2003). “*Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants*”. Journal of Chromatography A 1000, 477-501.

Richardson S.D. (2008). “*Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues*”. Analytical Chemistry 80, 4373-4402.

Richardson S.D. (2010). “*Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues*”. Analytical Chemistry, 82, 4742-4774.

Ruiz-Gil L., Romero-González R., Garrido Frenich A., Martínez Vidal J.L. (2008). “*Determination of pesticides in water samples by solid phase extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry*”. Journal of Separation Science 31, 151-161.

Sancho J.V., Pozo O., Hernández F. (2004). “*Liquid chromatography and tandem Mass Spectrometry: a powerful approach for the sensitive and rapid multiclass determination of pesticides and transformation products in water*”. The Analyst 129, 38-44.

SANCO/10684/2009. “*Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*”. European Commission. Directorate General Health and Consumer Protection.

SANCO/3029/99. “*Residues Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414*”. European Commission. Directorate General Health and Consumer Protection.

SANCO 825/00. “*Guidance document on residue analytical methods*”. European Commission. Directorate General Health and Consumer Protection. Rev.7

- Santos F.J., Galcerán M.T. (2003). “*Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis*”. *Journal of Chromatography A* 1000, 125-151.
- Soler C., Mañes J., Picó Y. (2008). “*The role of the liquid chromatography- mass spectrometry in pesticide residue determination in food*”. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 38, 93-117.
- van Leeuwen S.P.J., de Boer J. (2008). “*Advances in the gas chromatographic determination of persistent organic pollutants in the aquatic environment*”. *Journal of Chromatography A* 1186, 161-182.
- Winefordner J.D. (2003). “*Chemical Analysis: A series of monographs on Analytical Chemistry and its applications. Sample preparation techniques in Analytical Chemistry*”. Wiley Interscience

BLOQUE 1:

Aplicación de técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas para la determinación de residuos de plaguicidas en muestras vegetales

1.1. Métodos multiresiduales para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos de origen vegetal basados en HPLC y/o UHPLC acopladas a espectrometría de masas en tándem (analizador de triple cuadrupolo, QqQ)

1.1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 1

Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography–amenable pesticides and metabolites in different food commodities.

Journal of Chromatography A. (2006). 1109, 242-252

1.1.3. ARTÍCULO CIENTÍFICO 2

Multiresidue pesticide analysis of fruits by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Analytical and Bioanalytical Chemistry. (2007). 389,1765-1771

1.1.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

1.1.5. REFERENCIAS

1.1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos multiresiduo para la determinación de contaminantes basados en MS/MS deberían ser capaces de detectar el mayor número posible de compuestos a nivel de trazas de un modo rápido y fiable (Hajšlová et al, 1998; Hiemstra et al, 2007), así como disponer de un amplio ámbito de aplicación debido a la diversidad de matrices a tratar. La excelente selectividad y sensibilidad que se consigue con el empleo de MS/MS hace que esta técnica sea atractiva para la cuantificación y correcta identificación de los compuestos detectados en las muestras. Los métodos analíticos desarrollados deben ser capaces de cuantificar y confirmar de modo inequívoco los contaminantes presentes en las muestras. El elevado número de plaguicidas existentes hace necesaria la determinación simultánea de varios compuestos en un solo análisis mediante métodos multiresiduales (MRM). Hasta ahora, estos métodos no incluían más de unas decenas de analitos, pero con el desarrollo de los instrumentos de QqQ de nueva generación, el número de compuestos *target* puede superar fácilmente los 100 ó 200.

El desarrollo de un MRM conlleva una serie de dificultades: (i) la inclusión en un solo método de análisis de pesticidas con propiedades físico-químicas muy diversas y distintas polaridades, ya que pueden encontrarse en las muestras en forma neutra, aniónica o catiónica, (ii) la posible presencia de productos de transformación (TPs) que suelen ser más polares que aquellos productos de los que provienen, (iii) la complejidad y diversidad de las matrices objeto de análisis, ya que éstas pueden ser de muchos tipos: aguas (Greulich et al, 2008), suelos (Fenoll et al, 2009), productos vegetales (Okihashi et al, 2007; Pihlström et al, 2007; Fernández-Moreno, 2008; Lehotay et al, 2010), alimentos (Leandro et al, 2005; Wang et al, 2009) y (iv) los bajos niveles máximos de concentración requeridos por la legislación.

Debido a que en este tipo de análisis la respuesta debe ser lo más rápida posible es deseable la aplicación de métodos de *screening* que permiten descartar en un solo análisis las muestras con niveles de residuos no detectables (negativas) de aquellas en las que se detectan posibles contaminantes que será necesario confirmar y/o cuantificar en un posterior análisis. Los métodos analíticos desarrollados en esta Tesis, e incluidos como Artículos científicos en este bloque, podrían ser considerados, como de *screening* rápido que permiten descartar, en un primer análisis, las muestras negativas, aunque en el **Artículo científico 1** se indica la estrategia empleada para crear un método de confirmación para el análisis de las muestras positivas.

Así pues para el análisis completo de las muestras, incluyendo la cuantificación y confirmación, serían necesarias dos inyecciones. En la primera inyección, se emplea una sola transición (Q), la más selectiva posible para cada compuesto, que proporciona la información de si los compuestos *target* se encuentran en la muestra por encima de un nivel de concentración establecido *a priori* (Garrido Frenich et al, 2005). Una vez realizado este *screening*, sólo las muestras con un resultado positivo deben re-analizarse para confirmar la identidad del compuesto detectado en un segundo método que contiene transiciones SRM adicionales (q) para cada uno de los compuestos analizados. De este modo, se obtienen las relaciones Q/q para los analitos estudiados, que se comparan con los obtenidos para los patrones, pudiendo calcular las desviaciones entre éstos y

evaluarlas según los criterios de las diferentes guías de confirmación (FDA, 2001; EU 2002/657/EC; WADA, 2004). El hecho de aplicar un método de screening y otro de confirmación, favorece al adquirir sólo una transición para cada compuesto, que se pueda monitorizar un número mayor de plaguicidas en el método sin repercutir en la calidad de los datos obtenidos en cuanto a sensibilidad y forma de pico, puesto que al disminuir el número de iones que el instrumento debe medir de modo secuencial se puede obtener un mayor número de puntos para una óptima definición del pico cromatográfico. Por otro lado, en el método confirmativo se puede incluir un elevado número de transiciones para una mejor confirmación de los analitos detectados, ya que el análisis estaría focalizado en unos pocos plaguicidas, que pudieran estar presentes en la muestra.

Aunque la tendencia en los últimos años es la aplicación de métodos de control de contaminantes basados en LC-MS/MS y/o GC-MS/MS en modo SRM, cabe señalar que no siempre es posible el uso de estos métodos, puesto que existen compuestos con características especiales que requieren de métodos individuales para su análisis, como más adelante se comentará en el **Apartado 1.2**.

Los trabajos que se presentan en este bloque aportan un método capaz de determinar un número considerable de compuestos de muy diversas familias en matrices vegetales de interés alimentario. Los plaguicidas incluidos en el método se han seleccionado por las dificultades, ya conocidas, de su determinación mediante GC. En el **Artículo científico 1** se muestra la optimización de las condiciones referentes al método cromatográfico, parámetros del MS, así como el tratamiento de las distintas muestras para así abarcar la totalidad del proceso analítico. Una vez optimizados todos los parámetros, se realiza la validación del método atendiendo a las directrices marcadas por la Guía Europea SANCO (SANCO/10476/2003) para así asegurar la calidad del procedimiento analítico desarrollado.

En el **Artículo científico 2** se muestra la aplicación de una metodología semejante, pero haciendo uso ahora de la técnica de cromatografía líquida de ultra resolución (UHPLC), para así poder comprobar las ventajas que ofrece esta técnica.

UHPLC es una técnica de separación cromatográfica que ha sido desarrollada en los últimos años con el fin de desarrollar métodos más rápidos, sensibles y selectivos. Esta técnica consigue una mejora tecnológica respecto a la técnica HPLC, basada a grandes rasgos, en el empleo de columnas de fase estacionaria con relleno de partículas porosas con un diámetro inferior a 2 μm y sistemas capaces de soportar las elevadas presiones generadas (Mellors, 2004; Neue, 2005; Swartz, 2005). Las elevadas velocidades lineales a las que trabaja UHPLC permiten obtener picos cromatográficos más estrechos (con anchuras entre 2-8 s), un aumento en la resolución de los picos y una mejora en la sensibilidad y selectividad de los métodos, que puede traducirse en una disminución del efecto matriz habitualmente presente en la técnica de LC-MS/MS. El empleo de UHPLC hace necesario disponer de analizadores de masas capaces de aumentar la rapidez en la adquisición mediante la aplicación de tiempos de *dwell* más bajos (5 ms) que en los equipos convencionales de HPLC-MS/MS para no desmejorar la resolución de los picos cromatográficos. Haciendo uso de esta técnica se consigue reducir el tiempo de análisis multiresiduo a unos minutos o menos sin perjudicar la calidad de los datos generados ni la separación de los compuestos (Wren et al, 2006; Richardson, 2010). En los últimos años, existen múltiples referencias sobre el empleo de esta técnica en muy diversos campos de aplicación como análisis de alimentos, muestras medioambientales, fluidos biológicos, extractos de origen vegetal (Beltrán et al, 2009; Bijlsma et al, 2009; Ibáñez et al, 2009; Gracia-Lor et al, 2010; Grimalt et al, 2010; Guillaume et al, 2010).

1.1.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 1

Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography–amenable pesticides and metabolites in different food commodities

F. Hernández , O.J. Pozo, J.V. Sancho, L. Bijlsma, M. Barreda, E. Pitarch

Journal of Chromatography A. (2006). 1109, 242-252

Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities ☆

F. Hernández, O.J. Pozo, J.V. Sancho, L. Bijlsma, M. Barreda and E. Pitarch

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón, Spain

Abstract

A multiresidue method is developed for the screening, quantification and confirmation of 43 pesticides, belonging to different chemical families of insecticides, acaricides, fungicides, herbicides and plant growth regulators, and 9 pesticide metabolites in four fruit and vegetable matrices. Pesticide residues are extracted from the samples with MeOH:H₂O (80:20, v/v) 0.1% HCOOH, and then a cleanup step using OASIS HLB SPE cartridges is applied. The SPE eluate is concentrated and the final volume adjusted to 1 mL with MeOH:H₂O (10:90, v/v) before injection into LC–MS/MS. Analyses are performed using electrospray ionization (ESI) and triple quadrupole (QqQ) analyzer. The method has been validated based on the SANCO European Guidelines for representative samples that were chosen to study the influence of different matrices: high water content (tomato), high acidic content (lemon), high sugar content (raisin) and high lipidic content (avocado). Special attention has been given to minimize the degradation of some pesticides into their metabolites and the losses observed in the evaporation step. Under the optimized conditions, the recoveries were, with a few exceptions, in the range 70–110% with satisfactory precision ($CV \leq 15\%$). The quantification of analytes was carried out using the most sensitive transition for every compound and by “matrix-matched” standards calibration. The method can be used for the accurate determination of 52 pesticides and metabolites in one single determination step at the 0.01 mg/kg level. Confirmation of residues detected in samples is performed by an independent injection into the LC–MS/MS system by acquiring additional MS/MS transitions to that used for quantification. The acquisition of the highest number of available transitions is suggested for unequivocal confirmation of the analyte.

Keywords: *Pesticides; Metabolites; Multiresidue analysis; Food analysis; LC–MS/MS; SPE*

1. Introduction

The application of multiresidue methods for pesticides determination in foodstuff is normally preferred in most of laboratories due to the simplicity of determining several pesticides after a single extraction, facilitating the demands of more efficient and rapid monitoring. The multiresidue determination of pesticides in vegetable and fruit samples has been traditionally carried out by gas chromatography (GC), normally coupled to mass spectrometry (MS), due to its excellent characteristics of efficient chromatographic separation, sensitivity and confirmation power based on electron impact (EI) ionization mass spectra.

Until now, the majority of pesticides investigated in food samples have been insecticides, acaricides and fungicides, which normally are GC amenable. However, an important amount of well-known and frequently used pesticides is gradually being retired in the EU as a consequence of the Council Directive 91/414/EEC [1] concerning the placing of plant protection products on the market. Thus, new active ingredients are being developed in the last decennia, with physico-chemical characteristics that fit better with liquid chromatography (LC) analysis. Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) allows the rapid and efficient determination of many compounds that have been scarcely investigated in food until now, or determined with some difficulties by using laborious and time-consuming GC or conventional LC procedures. Additionally, LC-MS is an appropriate technique for the residue determination of herbicides and most of pesticide metabolites, together with some groups of compounds such as insecticides of natural origin, like abamectin, azadiractin or spinosad [2], [3] and [4]. Although GC-MS and LC-MS are complementary techniques, there is a clear trend nowadays to increase the number of applications of LC-MS in pesticide residue analysis (PRA), both in specific/individual and in multiresidue methods.

More recently, LC tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is becoming a powerful tool for PRA in a variety of complex matrices, due to its inherent advantages: selectivity and sensitivity are notably improved, the sample pre-treatment steps can be minimized, and reliable quantification and confirmation can be easily achieved at the low concentration levels required. After the first publications in PRA using this technique, dated in the early 2000s [5] and [6], several multiresidue LC-MS/MS methods in food commodities have been described [7], [8], [9], [10], [11], [12], [13], [14] and [15], very few in comparison to the extended

scientific literature on GC–MS in this field. In the last 2 years, some LC–MS/MS methods have been developed for the determination of more than 50 multi-class pesticides in fruits and vegetables [16], [17], [18], [19] and [20]. These papers illustrate the great potential of this technique in PRA that starts to be comparable to GC–MS in its scope and application range. However, there are still some lacks and problematic aspects in relation to both quantitative and confirmative applications, which have to be still evaluated in order to consolidate this technique and to get a realistic overview of its application potentiality.

The use of LC–MS/MS for quantitative purposes can be hampered by the presence of co-eluting matrix compounds, which might interfere the ionization of the target analytes (ion enhancement or suppression) [21] and [22]. Besides, its application is restricted to compounds that are ionized in atmospheric pressure ionization (API) interfaces (the most widely used) and the fragmentation is usually more limited compared to EI used in GC–MS. Other important aspect is the need of unequivocal confirmation of the analytes detected in samples. The confirmation of positive findings is required, specially in violative cases, i.e. where the analyte concentration is above the maximum residue level (MRL). Different approaches can be used for confirmation, all of them based on the collection of analyte mass information. One of the most frequently criterium used is based on the collection of identification points (IPs), which are obtained depending on the mass analyzer used. According to the EU Decision [23], the minimum number of IPs needed for confirmation of positive findings can be achieved by the acquisition of two transitions in tandem MS methods using low resolution instruments as QqQ. This decision was actually defined for organic contaminants in animal food, but it is also being applied to other fields, such as environmental, due to the absence of unified criteria to perform confirmation [24]. In this way, false positives might be reported if only one transition is acquired [25], making necessary the use of two or more transitions for confirmation. Despite this recommendation, the confirmation of analytes detected has been scarcely treated in the LC–MS/MS methods proposed for multiresidue determination of pesticides in vegetables and fruits. Some software limitations have been reported, which hampered the acquisition of two transitions [19], and very few authors included the acquisition of two transitions in a second injection for the confirmation of positive findings [16].

In this paper, a rapid multiresidue method is developed by LC–MS/MS with electrospray interface (ESI), using a cleanup step based on off-line solid phase extraction (SPE) to improve the method robustness for a variety of sample matrices. The procedure has been applied to the screening, quantification and unequivocal confirmation of 52 multi-class pesticides and metabolites in four foodstuff matrices (lemon, raisin, tomato and avocado). Analytes have been chosen as being representative of compounds with physico-chemical properties that do not fit well with GC analysis (polarity, volatility, easy thermal degradation, etc.). Sample matrices are representative of a variety of fruits and vegetables with regard to their pH or water, lipid or sugar contents, based on the recommendation of SANCO European Guidelines [26] for developing multiresidue methods in PRA.

2. Experimental

2.1. Reagents and chemicals

Pesticides reference standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) or Riedel-de Haën (Seelze, Germany). HPLC-grade acetone, acetonitrile, methanol (MeOH), methyl *tert* buthyl ether (MTBE) and analytical-grade formic acid (HCOOH, content >98%) were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA, USA).

Standard stock solutions were prepared dissolving 50 mg, accurately weighted, in 100 mL of HPLC grade organic solvent obtaining a final concentration of 500 µg/mL. For LC–MS analysis and sample fortification, the stock solutions were mixed and diluted with methanol (0.1% HCOOH) or HPLC-grade water. For infusion experiments, standards were prepared in acetonitrile/H₂O (50:50, v/v) 0.1% HCOOH.

Disposable solid-phase extraction (SPE) cartridges containing 200 mg of a copolymer designed to have a Hydrophilic–Lipophilic Balance (Oasis HLB, 30 µm) were obtained from Waters (Milford, MA, USA).

2.2. Liquid chromatography

A high-performance liquid chromatography (HPLC) system Waters Alliance 2695 (Waters, Milford) was interfaced to a Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). Chromatographic separation was achieved using an Atlantis C₁₈ 5 µm particle size analytical column 2.1 mm × 100 mm from Waters, at a flow-rate of 200 µl/min with mobile phases consisting of methanol—0.01% HCOOH and water—0.01% HCOOH.

2.3. Mass spectrometry

A Quattro Micro API mass spectrometer with an orthogonal Z-Spray-electrospray interface (Waters) was used. Drying gas as well as nebulizing gas was nitrogen generated from high purity nitrogen generator NM30LA Gas Station from Peak Scientific (Inchinnan, Scotland). For ESI, the desolvation gas flow and cone gas flow were selected approximately to 600 and 60 L/h, respectively. Infusion experiments were performed using the built-in syringe pump, directly connected to the interface, at a flow rate of 10 µL/min.

For operation in MS/MS mode, collision gas was Argon 99.995% (Carbueros Metálicos, Valencia, Spain) with a pressure of 6×10^{-3} mbar in the collision cell. Capillary voltages of 3.5 kV were used in the positive ionization mode. The interface temperature was set to 350 °C and the source temperature to 120 °C. Dwell times of 0.1 s/scan were selected. A solvent delay of 2.5 min was chosen in order to have an additional clean-up using the built-in divert valve controlled by the Masslynx NT v. 4.0 software. The application manager Quanlynx was used to process the quantitative data obtained from the calibration standards and from the samples.

2.4. Sample procedure

For the development of a multiresidue method applicable to a variety of vegetable matrices, four types of food commodities were selected: lemon (high acidity), raisin (high sugar content), tomato (high water content) and avocado (high lipid content). The samples were purchased from an organic farming grocery.

Samples (with the exception of raisin) were cut into small pieces without any pre-treatment, such as washing or removing their peel, and were triturated. A 20 g portion of

homogenized sample was accurately weighed (precision of 0.1 mg) and mixed with 60 mL MeOH:H₂O (80:20, v/v) 0.1% HCOOH. The mixture was extracted for 2 min with a high-speed Ultra-Turrax T25 blender (Janke & Kunkel GmbH & Co., Staufen, Germany) at 8000 rpm and the entire extract was filtered through a filter paper (raisin and avocado samples were filtered under vacuum); the solid material was washed and the filtrate was diluted with MeOH:H₂O (80:20, v/v) 0.1% HCOOH to a final volume of 100 mL. Afterwards, the extract was eight fold diluted with LC-grade water (0.1% HCOOH), taking an aliquot of 2.5 mL and diluting to 20 mL. Then, 5 mL of the diluted extract was passed through a solid phase extraction cartridge.

The SPE cartridges were preconditioned with 5 mL of MeOH, 5 mL of MeOH:MTBE (10:90, v/v) 0.1% HCOOH, 5 mL of MeOH 0.1% HCOOH and finally 5 mL of acidified water (0.1% HCOOH). After loading the sample, the cartridge was dried by passing air for approximately 1 h and they were eluted by means of gravity with 5 mL of MeOH:MTBE (10:90, v/v) 0.1% HCOOH. Then, 0.5 mL of water was added and the extract was evaporated under a gentle nitrogen stream at 40 °C until 0.5 mL, adjusting the final volume to 1 mL with MeOH:H₂O (10:90, v/v). Finally, the compounds were determined by injecting a 20 µL aliquot into the LC-MS/MS system.

2.5. LC procedure

For all sample extracts, the mobile phase used was methanol–water (both 0.01% HCOOH) gradient in which the percentage of methanol was changed linearly as follows: 0 min, 5%; 1 min, 5%; 8.5 min, 50%; 25 min, 90%; 28 min, 90%; and 29 min, 5%.

2.6. Validation study

The validation study was carried out based on the European SANCO guidelines [26], and the method was tested to assess for sensitivity, mean recovery (as a measure of trueness), precision and specificity. This requires performing recovery experiments with spiked blank samples to estimate the accuracy of the method. A minimum of five replicates is required (to check also precision) at both the reporting limit (to check the sensitivity), and at least another higher level.

Linearity was studied using matrix-matched calibrations by analyzing in triplicate six concentration levels, between 10 and 500 ng/mL

Mean recoveries and precision (repeatability, expressed as coefficient of variation (in %) were determined by analyzing spiked tomato, lemon, raisin and avocado samples in quintuplicate at two spiking levels each, 0.01 and 0.1 mg/kg.

The limit of quantification (LOQ) was established as the lowest concentration assayed, which gave satisfactory recovery (70–110%) and precision (<20% RSD).

2.7. Confirmation

The potential to confirm positive findings by the developed method was studied by a second injection under the chromatographic conditions described above. Individual MS/MS methods including the highest number of available transitions for each analyte were developed and used for confirmation purposes. Then, an independent confirmation injection was performed for every analyte. Blank and spiked samples at different levels were injected using individual confirmatory methods. The minimum analyte concentration able to be confirmed was predicted by comparison of ion ratios obtained for every transition selected.

3. Results and discussion

3.1. Pesticide selection

In this work, we initially selected 60 non-easily GC-amenable compounds to be investigated. The high multiresiduality and multiclass character expected for the analytical method made that the initial list of candidates included compounds with quite distinct physico-chemical characteristics, from anionic to cationic compounds, from small to high molecular weight, and from highly polar to non-polar molecules. The analytes selected included 26 insecticides/acaricides, 13 fungicides, 11 herbicides, 1 plant growth regulator and 9 metabolites. They belonged to quite different chemical families, as *N*-methyl carbamates, sulfonyleureas, phenylureas, strobilurines, fenoxiacids, organophosphorus, benzimidazoles, neonicotinoids, macrocyclic lactones, and others.

Two of the compounds selected were discarded without performing previous experiments as their determination did not fit within a multiresidue/multiclass analytical approach: (a) fosetyl, as it was the only analyte present as an anionic form and it would require a specific

method, e.g. based on ion pairing chromatography with TBA[27], and (b) abamectin, as it is a non-easily ionisable molecule in API and it would require adduct formation, e.g. with Li^+ , Na^+ or NH_4^+ for a robust and sensitive determination [3]. After a few preliminary experiments, formetanate and dithianon were also removed from the list of candidates as they were found to be non-easily ESI ionisable. Regarding formetanate, low sensitivity and poor chromatography was observed. In the case of dithianon, the use of APCI in negative mode was found to be much more appropriate than ESI. Therefore, in our work we developed analytical methodology for the multi-residue determination of the remaining 56 pesticides in food based on the use of ESI LC–MS/MS with QqQ analyzer.

However, four of the analytes were present as cationic forms. They were three quats (diquat, paraquat and cloromequat), and also cyromazine, that was protonated under the experimental conditions selected (extraction in acidic medium). The simultaneous multiresidue determination of these cationic analytes together with the rest of pesticides was not feasible, both from the sample preparation point of view and also because of chromatographic optimization reasons. Therefore, the analytical approach used in our work was the development of two multiresidue LC–MS/MS methods: one for the determination of 52 pesticides (including 9 metabolites among of them), and the other for the determination of three quats and cyromazine. The last analyte, together with its main metabolite melamine, has already been satisfactorily determined in our laboratory by ion pairing LC coupled to MS/MS in chard samples [28]. In this paper, we present the results for the multiresidue method developed for 52 pesticides, while the development of the method for the remaining four cationic compounds is under study at present.

3.2. MS optimization

Individual standard solutions of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were prepared in acetonitrile/ H_2O (50:50) 0.1% HCOOH for MS optimization by infusion experiments. The full-scan mass spectra and the MS/MS spectra were acquired in order to obtain the maximum number of available transitions for each compound. The best results in terms of sensitivity were always obtained with ESI in the positive ionization mode, using the $[\text{M} + \text{H}]^+$ as precursor ion in the 90% of the cases studied. Working in selected reaction monitoring (SRM), the most sensitive transition was selected for quantification in the screening method whereas the rest ones available were taken

as confirmation transitions. As an example, Fig. 1 shows the results obtained for three selected compounds, carbendazim and diuron (precursor ion $[M + H]^+$) as well as oxamyl (precursor ion $[M + Na]^+$). It is pointed out the amount of information obtained in the case of carbendazim, where a high number of transitions could be monitored, using both the protonated ion (m/z 192) and an ion-source fragment (m/z 160) as precursor ions. Oxamyl, together with aldicarb and its sulfone and sulfoxide metabolites, and 3-hydroxycarbofuran, where the only ones monitored by selecting the sodium adduct as precursor ion. It can also be pointed out, that diuron could easily be confirmed by monitoring the transition $233 > 46$, where the abundant product ion with low m/z 46 was selected. This illustrates the advantage of using QqQ as there were no restrictions regarding the m/z of the fragment ions in contrast to quadrupole ion trap analyzers. Table 1 shows the MS/MS transitions selected for screening and quantification together with the optimized parameters for all the compounds studied. Table 2 shows the different MS/MS transitions chosen to perform confirmation of suspected positive samples for four selected pesticides.

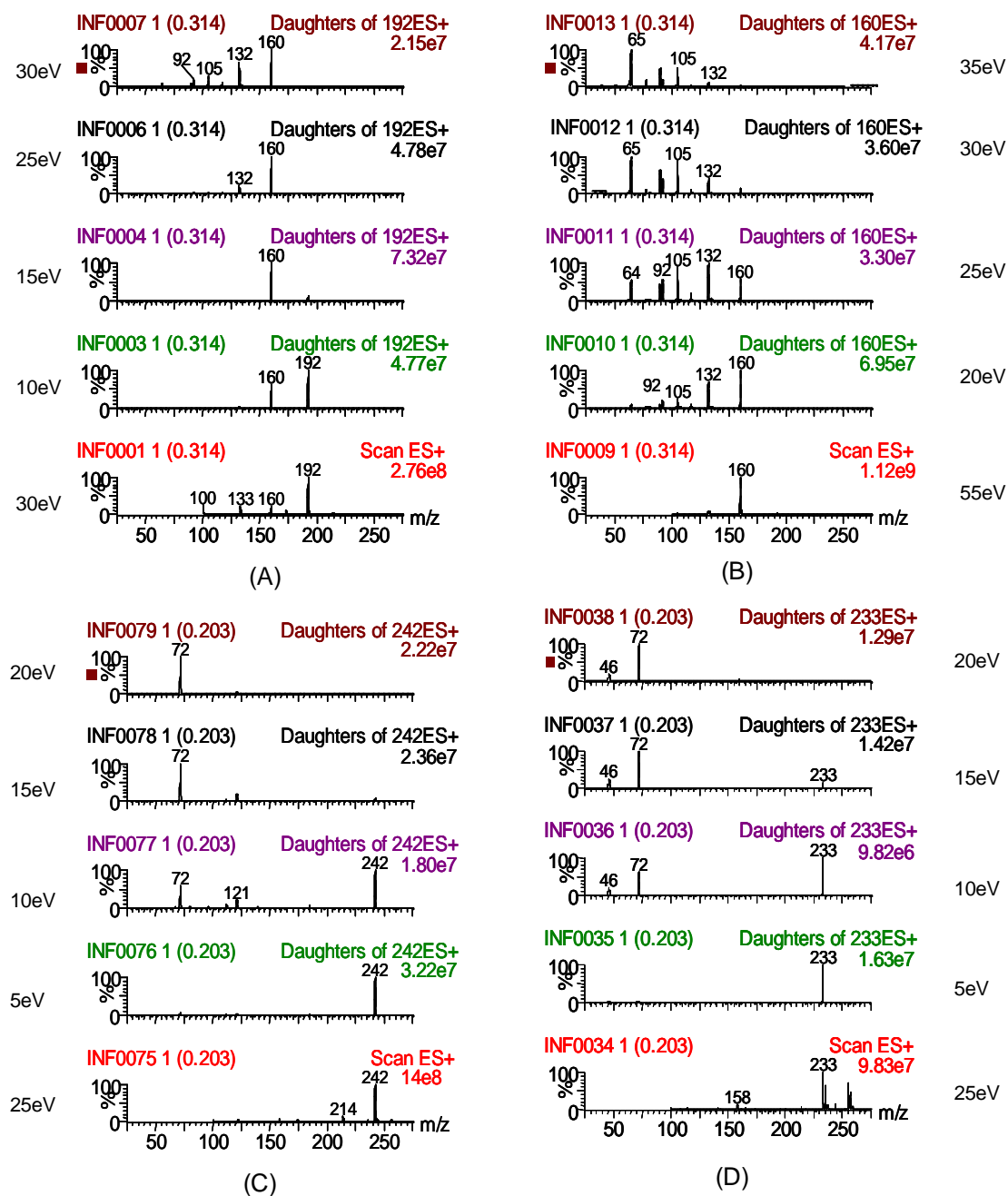


Fig. 1. Full scan and MS/MS spectra corresponding to different collision energies optimized for (A) carbendazim at 30 V, (B) carbendazim at 55 V, (C) oxamyl at 25 V and (D) diuron at 35 V.

Table 1. Mass spectrometry parameters for the LC-MS/MS determination of selected pesticides

Compound	t _R (min)	Transition	Cone (V)	Collision (eV)
Methamidophos	3.79	142.3>93.8	20	15
Omethoate	8.77	214.2>183.1	25	10
Aldicarb sulfoxide	9.72	229.3>166.2	20	10
Aldicarb sulfone	10.45	245.3>166.2	25	15
Oxamyl	10.65	242.2>71.8	25	15
Carbendazim	10.89	192.3>160.2	30	15
Methomyl	11.31	163.3>87.7	10	10
Thiabendazole	12.17	202.2>175.2	45	25
Desisopropilatrazine	12.53	174.3>96.0	35	20
Ethiofencarb sulfone	12.63	258.2>107.0	25	15
Ethiofencarb sulfoxide	12.77	242.2>106.9	25	15
Imidacloprid	13.03	256.3>209.2	30	15
Methiocarb sulfoxide	13.38	242.2>185.2	20	15
3-Hydroxycarbofuran	13.64	260.2>260.2	35	15
Acetamiprid	13.87	223.2>126.1	30	20
Methiocarb sulfone	14.27	258.3>122.0	20	15
Desethylatrazine	14.48	188.3>146.1	35	15
Thiacloprid	14.84	253.2>125.9	30	20
Aldicarb	15.38	213.2>88.9	30	15
Oxadixyl	15.89	279.4>219.3	15	10
Imazalil	16.63	297.1>159.1	35	20
Propoxur	16.84	210.3>110.9	15	15
Carbofuran	17.02	222.3>165.3	25	15
Chlorsulfuron	18.60	358.2>141.1	25	20
Ethiofencarb	18.38	226.2>107.1	15	15
Thiodicarb	19.24	355.1>87.7	15	20
Atrazine	19.39	216.3>174.2	35	20
Spiroxamine	19.39	298.5>144.1	30	20
Isoproturon	19.76	207.4>71.8	30	15
Diuron	20.28	233.2>71.7	35	15
Triforine*	20.82/21.52	435.0>389.9/435.0>389.9	10	15
Azoxystrobin	21.82	404.2>372.2	20	15
Linuron	21.82	249.3>160.1	20	20
Methiocarb	21.99	226.3>169.1	15	10
Dimetomorph*	21.87/22.52	388.2>301.2/388.2>301.2	30	20
Pyrifenox*	22.18/23.03	295.2>92.8/295.2>92.8	30	20
Cyprodinil	24.14	226.5>92.9	45	30
Spinosad (spinosin A)	24.69	732.7>142.2	35	35
Fenoxycarb	24.90	302.3>87.8	20	20
Tebufenozide	24.91	353.3>133.0	10	20
Diflubenzuron	24.95	311.1>158.2	25	20
Haloxifop-methyl	27.19	376.2>316.2	30	20
Triflumizole	27.47	346.2>278.2	15	10
Hexaflumuron	28.08	461.1>158.1	25	15
Haloxifop-2-ethoxyethyl	28.22	434.2>316.2	25	20
Quizalofop-ethyl	28.26	373.2>299.2	30	20
Fluazifop-P-butyl	28.42	384.3>282.2	30	20
Pyriproxyfen	29.20	322.3>95.8	20	15
Teflubenzuron	29.37	381.1>158.1	20	20
Hexythiazox	29.51	353.1>168.2	25	25
Lufenuron	29.72	511.1>158.1	25	20
Flufenoxuron	30.43	488.9>158.2	30	20

*Two peaks, corresponding to geometric isomers

Table 2. Mass spectrometry parameters for the LC–MS/MS confirmation of carbendazim, carbofuran, thiodicarb and fenoxycarb

Precursor ion (m/z)	Cone voltage (V)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Relative abundance (%)	
Carbendazim 192 ^a	30 ^a	160 ^a	15 ^a	100	
		132	30	19	
		105	35	14	
		92	35	7	
		90	40	7	
	160	55	65	45	8
			132	20	91
			105	25	63
			92	25	32
			90	30	35
Carbofuran 222 ^a	25 ^a	165 ^a	15 ^a	100	
		123	20	95	
		91	35	6	
		54	25	9	
		165	15	67	
	165	45	123	15	67
			54	15	7
			54	15	7
	Thiodicarb 355 ^a	15 ^a	88 ^a	20 ^a	100
			108	15	54
149			10	18	
163			10	22	
Fenoxycarb 302 ^a	20 ^a	88 ^a	20 ^a	100	
		43	35	8	
		116	10	99	
		256	15	16	

^a Quantification transition.

3.3. LC optimization

Regarding to LC separation, the gradient was optimized in order to render a rough separation between the 52 selected analytes, obtaining less than 10 compounds monitored simultaneously per a 3–4 min time window. In this way, using a dwell time of 0.1 s per transition, we obtained satisfactory peak shape for all analytes. Distributing the analytes along 30 overlapping functions allowed us to center the chromatographic peak in the time window, minimizing the risk of peak loss due to unexpected slight changes in retention time. The retention times are shown in Table 1 and they corresponded to analytes from high polarities, as metamidophos ($t_R = 3.8$ min) to non-polar, as flufenoxuron ($t_R = 30.4$ min). The gradient

used (see Section 2) gave satisfactory separation and also resolved adequately geometric isomers present for three analytes, triforine, dimetomorph and pyrifenox.

3.4. Sample treatment optimization

The general analytical methodology applied for sample preparation was a conventional extraction with organic solvent followed by extract purification with SPE.

In the SPE step, Oasis HLB cartridges were selected due to their reversed-phase capabilities combined with a special polar-hook for enhanced capture of polar analytes and excellent wettability. Due to the high polarity of some compounds, 200 mg sorbent was selected to minimize breakthrough. The loading of cartridges was performed using aqueous standard solutions containing 20% of different organic solvents (acetonitrile, acetone and MeOH). After selecting MeOH, which gave the minimum breakthrough, different percentage of MeOH were studied, obtaining the best results for 10% MeOH.

The extraction step was not thoroughly optimized and it was performed using a mixture MeOH:H₂O, (80:20, v/v) for all samples selected. As the initial sample extract contained high percentage of MeOH, a dilution step was required before loading the sample onto the cartridge. An eight-fold dilution factor was selected to decrease the methanol content down to 10% in order to minimize breakthrough for the most polar analytes in the subsequent SPE cleanup step. This sample dilution together with the effectiveness of Oasis HLB clean up was an efficient way to homogenize samples from different origin, minimizing the possible variability between samples, which can compromise the quantification as observed by Jansson et al. [18]. In addition, the volume adjustment of sample extract up to 100 mL MeOH:H₂O (80:20, v/v) and the subsequent eight-fold dilution with water of an aliquot minimized possible variations in matrix water content.

Several problems were observed along sample treatment, such as the degradation of some analytes (aldicarb, ethiofencarb and methiocarb), partial losses during the evaporation step for the late eluting compounds and the not complete SPE elution for spiroxamine. The degradation of carbamates was not observed by Jansson et al. [18] which used ethyl acetate for extraction; therefore, this degradation might be associated to the use of methanol as extracting solvent. This problem was minimized by acidification of the extraction solvent, which also served to improve the SPE elution of spiroxamine. Finally, partial losses were

observed when the SPE eluate (MTBE/MeOH 0.1% HCOOH, 9:1) was evaporated to dryness at 40 °C under a gentle nitrogen stream. This effect has been scarcely reported until now despite the common use of a evaporation step in previously reported methods. In our case, losses were observed mainly for the ten late-eluting analytes (see Table 1). The addition of 0.5 mL of water as a holder before evaporation, allowed us to minimize these problems.

3.5. Validation

The method developed was validated for the four matrices studied in this work: raisin, tomato, avocado and lemon. The validation scheme followed was based on the SANCO European Guidelines [26].

Matrix-matched calibration curves prepared in every type of sample showed good linearity between 10 and 500 ng/mL, with a correlation coefficient ≥ 0.99 . The specificity of the method was tested by the analysis of blank samples. The absence of any chromatographic peak in every matrix, at the same retention times as target pesticides, indicated that there were no matrix compounds that might give a false positive signal in these blank samples. However, in real unknown samples, the risk of reporting false positives still exists and an additional confirmation step would be necessary.

The accuracy of the method was estimated by means of recovery experiments at two concentration levels (0.01 and 0.1 mg/kg). All experiments were carried out in quintuplicate at each level (Table 3). For all matrices, the results obtained for most of the compounds were satisfactory, with recoveries between 70–110% and coefficients of variation (CV) below 15%. Only three pesticides presented lower recoveries in the four matrices studied: the high polar methamidophos, due to the breakthrough in the SPE process, and aldicarb and ethiofencarb owing to their partial degradation during sample pre-treatment.

As it can be observed in Table 3, several of the less polar compounds (the late eluting analytes) showed low recoveries (<60%) mainly in avocado samples, probably due to its high lipid content which makes more difficult to extract this type of pesticide from the sample with the used mixture (MeOH:H₂O, 80:20, v/v). The poor recoveries for some less polar analytes also illustrate the difficulties of development a unique multiresidue method for the determination of a number of pesticides with a wide range of polarities. For those compounds with poor recoveries, the method could be used for screening and confirmation of all analytes

in all matrices. But, even quantification would be feasible in the light of the satisfactory precision by applying the adequate correction factors. The lowest level validated, i.e. 0.01 mg/kg, was taken as the LOQ value.

As an example, Fig. 2 shows the LC–MS/MS chromatograms for ten representative analytes with quite different polarities at the LOQ level in lemon sample. It can be observed the excellent sensitivity for all these compounds and some interesting aspects of the developed method, such as the detection of methamidophos at the 0.01 mg/kg level despite its low recovery or the chromatographic resolution of the two isomers of triforine.

In relation to quantification, several experiments were also performed to check for matrix interferences. After the sample treatment performed, no significant matrix effects were observed for any of the vegetable matrices analysed. In spite of this, we preferred to perform the quantification using calibration with matrix-matched standards to prevent slight variations in the MS signal for some analytes and unexpected enhancement or signal suppressions in real samples.

According to our data, the LC–MS/MS method developed allows the rapid screening and quantification of 52 pesticides and metabolites in a variety of food matrices. These results are in the line of others reported in recent methods published in the literature [16], [17], [18], [19] and [20] and confirm that LC–MS/MS is an attractive and powerful technique for the quantitative determination of pesticide residues.

Table 3. Mean recoveries and coefficients of variation in brackets (n=5) obtained after applying the LC-MS/MS procedure to different samples spiked at two concentration levels.

Compound	Tomato		Lemon		Raisin		Avocado	
	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg
Methamidophos	33 (11)	38 (11)	23 (9)	35 (7)	40 (10)	28 (14)	41 (8)	42 (4)
Omethoate	93 (6)	91 (8)	87 (8)	89 (4)	81 (8)	67 (5)	81 (4)	84 (4)
Aldicarb sulfoxide	131 (7)	119 (8)	95 (7)	103 (2)	99 (11)	98 (13)	107 (5)	111 (6)
Aldicarb sulfone	96 (9)	97 (7)	85 (8)	85 (7)	90 (15)	76 (11)	87 (6)	92 (13)
Oxamyl	94 (8)	94 (4)	89 (6)	86 (3)	88 (4)	76 (7)	87 (6)	90 (8)
Carbendazim	96 (6)	87 (7)	82 (6)	82 (2)	89 (6)	72 (9)	85 (9)	84 (8)
Methomyl	94 (12)	85 (4)	81 (12)	85 (5)	80 (7)	63 (3)	105 (4)	90 (11)
Thiabendazole	95 (8)	103 (7)	85 (6)	85 (6)	84 (11)	70 (6)	75 (6)	133 (5)
Desisopropilatrazine	88 (10)	86 (6)	81 (8)	87 (7)	84 (4)	70 (8)	80 (11)	90 (5)
Ethiofencarb sulfone	130 (9)	101 (6)	87 (8)	88 (6)	93 (7)	75 (6)	86 (8)	84 (9)
Ethiofencarb sulfoxide	115 (10)	119 (6)	109 (9)	105 (5)	107 (10)	97 (6)	89 (5)	91 (5)
Imidacloprid	96 (14)	87 (7)	100 (11)	93 (4)	88 (11)	67 (4)	87 (9)	88 (4)
Methiocarb sulfoxide	104 (11)	92 (6)	94 (8)	90 (2)	95 (7)	74 (6)	85 (10)	85 (3)
3-Hydroxycarbofuran	89 (15)	92 (6)	86 (16)	87 (7)	103 (16)	75 (15)	92 (11)	79 (8)
Acetamiprid	95 (6)	87 (6)	93 (6)	87 (2)	90 (4)	72 (4)	84 (2)	84 (5)
Methiocarb sulfone	96 (4)	90 (5)	92 (10)	87 (3)	91 (7)	77 (4)	87 (10)	84 (5)
Desethylatrazine	83 (11)	83 (5)	84 (5)	84 (6)	106 (11)	73 (5)	93 (24)	87 (7)
Thiacloprid	95 (14)	87 (5)	89 (7)	88 (4)	88 (6)	73 (6)	84 (5)	85 (7)
Aldicarb	31 (16)	45 (4)	58 (8)	71 (4)	58 (10)	42 (9)	60 (10)	61 (7)
Oxadixyl	89 (11)	80 (6)	96 (11)	92 (8)	89 (6)	76 (7)	90 (8)	92 (4)
Imazalil	95 (12)	74 (6)	106 (6)	83 (11)	84 (5)	66 (5)	85 (14)	75 (6)
Propoxur	76 (12)	72 (10)	83 (6)	84 (7)	77 (8)	60 (7)	78 (12)	74 (6)
Carbofuran	81 (11)	75 (6)	90 (5)	85 (4)	82 (8)	67 (5)	81 (6)	79 (6)
Chlorsulfuron	43 (11)	58 (7)	115 (2)	83 (4)	80 (8)	84 (4)	88 (5)	88 (7)
Ethiofencarb	31 (6)	23 (5)	106 (4)	38 (8)	27 (15)	13 (13)	47 (13)	34 (9)
Thiodicarb	85 (13)	61 (8)	76 (7)	63 (6)	95 (5)	75 (5)	72 (9)	66 (10)
Spiroamine	72 (7)	64 (6)	83 (5)	89 (6)	82 (6)	73 (5)	85 (7)	82 (6)
Atrazine	81 (5)	78 (3)	84 (3)	85 (4)	86 (3)	71 (6)	83 (4)	85 (7)
Isoproturon	87 (8)	81 (1)	90 (5)	87 (3)	88 (7)	73 (5)	87 (7)	86 (4)
Diuron	95 (15)	82 (4)	88 (7)	87 (5)	91 (9)	72 (6)	88 (10)	86 (5)
Triforine 1	58 (15)	71 (10)	75 (14)	82 (6)	91 (15)	75 (7)	86 (9)	89 (5)
Triforine 2	84 (14)	74 (11)	88 (19)	83 (9)	98 (13)	75 (6)	81 (8)	84 (4)
Azoxystrobin	95 (7)	83 (5)	95 (5)	88 (4)	94 (8)	76 (6)	94 (7)	87 (2)
Dimethomorph 1	108 (15)	92 (4)	111 (7)	103 (4)	105 (5)	86 (7)	100 (6)	96 (1)
Dimethomorph 2	101 (10)	76 (4)	93 (6)	83 (4)	91 (7)	73 (6)	90 (7)	84 (3)
Linuron	86 (12)	75 (6)	94 (7)	86 (5)	85 (9)	71 (5)	78 (13)	77 (3)
Methiocarb	81 (8)	73 (8)	92 (7)	85 (5)	83 (5)	68 (7)	80 (9)	77 (2)
Pyrifenoxy 1	86 (11)	76 (5)	83 (4)	79 (7)	79 (5)	68 (5)	79 (8)	78 (3)
Pyrifenoxy 2	86 (6)	75 (6)	87 (4)	83 (6)	82 (10)	71 (4)	83 (5)	77 (4)
Cyprodinil	86 (9)	74 (7)	88 (4)	82 (7)	84 (8)	73 (1)	50 (7)	55 (5)
Spinosad (spinosin A)	137 (8)	67 (20)	113 (12)	99 (7)	86 (12)	68 (12)	122 (2)	89 (4)
Fenoxycarb	89 (5)	76 (2)	101 (6)	90 (2)	88 (9)	86 (7)	47 (15)	64 (9)
Tebufenozide	104 (14)	77 (4)	100 (15)	85 (11)	91 (6)	80 (4)	92 (6)	84 (3)
Diflubenzuron	101 (12)	77 (3)	101 (13)	88 (4)	82 (14)	83 (9)	60 (18)	64 (9)
Haloxyfop-methyl	85 (3)	71 (11)	90 (8)	89 (2)	86 (11)	78 (7)	37 (23)	48 (10)
Triflumizole	12 (15)	30 (10)	14 (18)	79 (8)	71 (14)	98 (6)	20 (16)	72 (6)
Hexaflumuron	50 (30)	55 (20)	129 (15)	120 (9)	92 (15)	125 (9)	96 (12)	57 (7)
Haloxyfop-2-ethoxyethyl	101 (5)	74 (10)	100 (6)	97 (3)	78 (16)	80 (8)	48 (9)	49 (8)
Fluazifop-P-butyl	98 (10)	64 (14)	131 (6)	108 (5)	102 (3)	95 (10)	56 (11)	48 (8)
Quizalofop-ethyl	78 (12)	67 (8)	91 (4)	92 (2)	74 (5)	86 (9)	29 (14)	39 (7)
Pyriproxyfen	53 (21)	60 (13)	74 (12)	83 (4)	72 (6)	85 (10)	14 (15)	38 (4)
Lufenuron	102 (15)	45 (11)	146 (6)	113 (7)	111 (12)	112 (13)	128 (14)	72 (7)
Teflubenzuron	70 (9)	69 (6)	96 (16)	100 (9)	78 (16)	94 (6)	121 (12)	46 (7)
Hexythiazox	66 (13)	56 (3)	92 (8)	101 (7)	74 (7)	102 (14)	19 (35)	38 (6)
Flufenoxuron	101 (10)	43 (10)	117 (7)	105 (10)	122 (28)	108 (17)	77 (22)	57 (3)

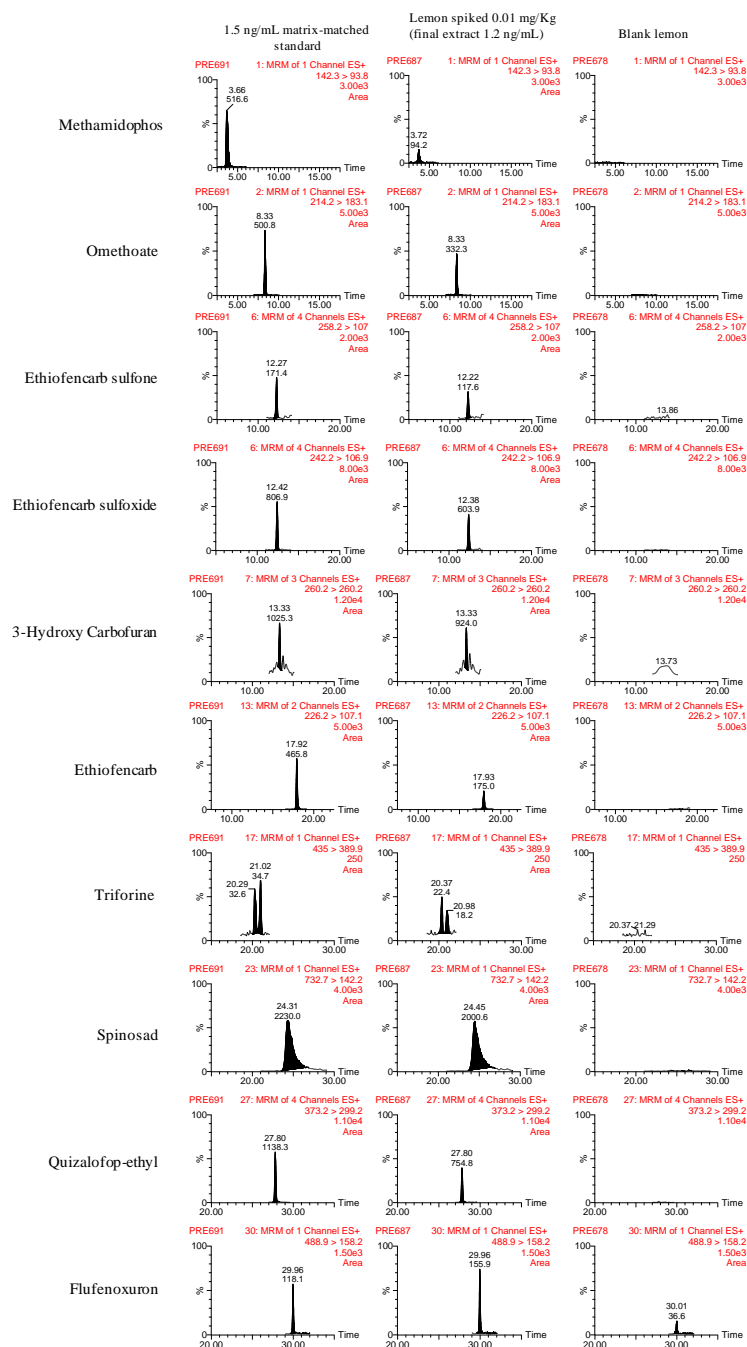


Fig. 2. LC-MS/MS chromatograms for ten representative pesticides studied in lemon spiked at 0.01 mg/kg.

3.6. Confirmation

Despite the high specificity of LC–MS/MS, there is still a risk of reporting false positives when analyzing real samples owing to the acquisition of only one MS/MS transition. The complexity of vegetable matrices might make feasible the occurrence of other compounds sharing the same precursor and product ion with a similar retention time. Moreover, the absence of any peak in a specific blank sample cannot be taken as an unequivocal way to discard false positive findings due to high variability observed even in a same type of sample [18]. The confirmation of positive findings is needed mainly in violative cases, i.e. samples where the analyte concentration is above the MRL.

The acquisition of at least two transitions is required for reliable confirmation and it has been proved as a good approach for this purpose [16]. The confirmation performed in this way usually requires an additional injection due to the high number of transitions needed for the simultaneous quantification and confirmation. This was our case, where the simultaneous acquisition of two transitions for each compound would lead to a method monitoring more than hundred transitions, which would reduce the number of points per peak leading to unsatisfactory peak shapes. This limitation might be overcome by the use of new generation instruments, which can reduce the dwell time for each transition without any loss in sensitivity allowing to increase the number of transitions acquired simultaneously.

The acquisition of two transitions allows reaching four or five IPs, which is accepted as sufficient for the confirmation of registered and even banned compounds [23]. However, if one of the transitions is interfered by a matrix component, the calculated ion ratio in the sample would be different to that of the reference standard making the confirmation troublesome. This situation is undoubtedly minimized by the acquisition of more transitions, if available. Therefore, we decided to use the maximum number of available transitions for each compound in order to have an ultimate confirmation of the presence of the analyte. Thus, the cone voltage and collision energy were optimized for each available transition, generating a specific confirmation method for each selected compound. As an example, Fig. 1A and B show the optimization of fragmentation for carbendazim. From these data a confirmatory method for this analyte was set up as can be seen in Table 2. This is one of the most favorable cases, where up to 11 transitions could be optimized including 5 obtained from an in-source fragment (used a parent ion) at m/z 160.

Fig. 3 shows the chromatograms for a blank raisin sample spiked at 0.01 mg/kg level with carbendazim. Despite the low abundance for some selected confirmatory transitions (<10%), the high sensitivity of the method allowed the detection of all selected transitions even at this low concentration level. Additionally, the ion ratios calculated for the spiked sample were similar to those of the reference standard at all concentrations checked. Thus, the presence of carbendazim residues can be easily and unequivocally confirmed by a second injection reaching a number of IPs as high as 18.5, even at the LOQ level.

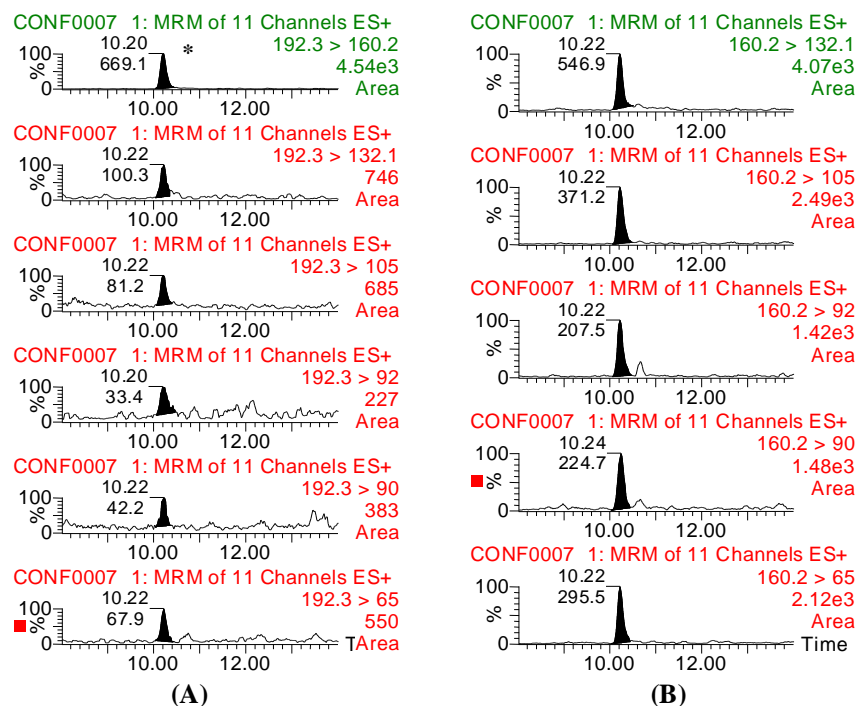


Fig. 3. LC–MS/MS chromatograms obtained from a blank raisin sample spiked at 0.01 mg/kg level with carbendazim. (A) Chromatograms corresponding to SRM optimized with cone value of 30 V. (B) Chromatograms corresponding to SRM optimized with cone value of 55 V (* used for quantification).

Obviously, not all the analytes presented so abundant fragmentation as carbendazim. Thus, fenoxycarb presented lower fragmentation and only four transitions could be monitored in the confirmatory method (see Table 2). Although four transitions allowed us to reach seven IPs, the lower abundance for two of them hindered the ultimate confirmation of fenoxycarb at low concentration levels. However, for most of selected analytes, we optimized at least four transitions, making their confirmation extremely confident.

The only analyte that could not be confirmed was 3-hydroxycarbofuran, as its $[M + Na]^+$ precursor ion did not present any abundant selective fragment. With the aim to confirm this type of analytes, ammonium acetate could be added into the mobile phase in order to promote the $[M + H]^+$ or $[M + NH_4]^+$ formation, favoring its fragmentation and the number of available transitions.

4. Conclusions

A multiresidue method has been developed for the reliable screening, quantification and confirmation of 52 pesticides and metabolites in different food commodities by LC–MS/MS using a triple quadrupole analyzer. The procedure, based on a SPE step using Oasis HLB cartridges previously to the determination by LC–MS/MS, has been validated based on the SANCO European Guidelines for representative species from different commodity groups (tomato, lemon, raisin and avocado), obtaining satisfactory accuracy and precision for most of analyte/matrix combinations. A value of 0.01 mg/kg has been established as LOQ (the lowest concentration level fully validated using the overall analytical procedure), although several pesticides could be quantified at lower levels if required.

The proposed LC–MS/MS methodology allows the simultaneous determination of pesticides and their metabolites of very different chemical families and physico-chemical properties in one single determination step, monitoring the most sensitive transition for every compound. Confirmation of pesticides detected in samples is performed by an independent second injection into the LC–MS/MS system by acquiring the highest number of MS/MS transitions available.

As a result of its high sensitivity and selectivity, LC–MS/MS has shown its strong potential in the field of pesticide residue analysis. This technique is gaining interest and popularity within this field as a powerful analytical tool in multiresidue methods. A drastic growth in the applications and on the use of LC–MS/MS in pesticide residue laboratories is expected in the near future.

Acknowledgements

The Quattro Micro LC–MS/MS was funded by the European Union (Fondos Feder-Reino de España, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Ref: UNJM-E004). This work forms a part of the project “Determination of pesticide residues in fruit and vegetables” developed with the financial support of Waters Cromatografía S.A. (Barcelona, Spain).

References

- [1] Directive 91/414/EEC, Off. J. Eur. Commun., 14 July 1991.
- [2] O.J. Pozo, J.M. Marin, J.V. Sancho and F. Hernández, *J. Chromatogr. A* **992** (2003), p. 133.
- [3] S. Grimalt, O.J. Pozo, J.M. Marín, J.V. Sancho and F. Hernández, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16** (2005), p. 1619.
- [4] D.A. Schwedler, A.D. Thomas and L.T. Yeh, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000), p. 5138.
- [5] A.C. Hogenboom, M.P. Hofman, S.J. Kok, W.M.A. Niessen and U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* **892** (2000), p. 379.
- [6] K. Bester, G. Bordin, A. Rodriguez, H. Schimmel, J. Pauwels and G. van Vyncht, *Fresenius J. Anal. Chem.* **371** (2001), p. 550.
- [7] D. Perret, A. Gentili, S. Marchese, M. Sergi and G. D’Ascenzo, *J. AOAC Int.* **85** (2002), p. 724.
- [8] M.J. Taylor, K. Hunter, K.B. Hunter, D. Lindsay and S.L. Bouhellec, *J. Chromatogr. A* **982** (2002), p. 225.
- [9] H.G.J. Mol, R.C.J. van Dam and O.M. Steijger, *J. Chromatogr. A* **1015** (2003), p. 119.
- [10] A. Garrido, J.L. Martínez, T. López, S. Cortés and I. Martínez, *J. Chromatogr. A* **1048** (2004), p. 199.
- [11] A. Aguera, S. López, A.R. Fernández-Alba, M. Contreras, J. Crespo and L. Piedra, *J. Chromatogr. A* **1045** (2004), p. 125.
- [12] K. Granby, J.H. Andersen and H.B. Christensen, *Anal. Chim. Acta* **520** (2004), p. 165.
- [13] T. Zamora, O.J. Pozo, F. López and F. Hernández, *J. Chromatogr. A* **1045** (2004), p. 137.
- [14] A. Sannino, L. Bolzoni and M. Bandini, *J. Chromatogr. A* **1036** (2004), p. 161.
- [15] S.J. Lehotay, K. Mastovska and S.J. Yun, *J. AOAC Int.* **88** (2005), p. 630.

- [16] D. Ortelli, P. Edler and C. Corvi, *Anal. Chim. Acta* **520** (2004), p. 33.
- [17] L. Alder, S. Luderitz, K. Lindtner and H.J. Stan, *J. Chromatogr. A* **1058** (2004), p. 67.
- [18] C. Jansson, T. Pihlström, B.-G. Österdahl and K.E. Markides, *J. Chromatogr. A* **1023** (2004), p. 93.
- [19] C.L. Hetherington, M.D. Sykes, R.J. Fussell and D.M. Goodall, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18** (2004), p. 2443.
- [20] S.J. Lehotay, A. de Kok, M. Hiemstra and P. van Bodegraven, *J. AOAC Int.* **88** (2005), p. 595.
- [21] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer and C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* **70** (1998), p. 882.
- [22] J.V. Sancho, O.J. Pozo, F.J. López and F. Hernández, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16** (2002), p. 639.
- [23] European Commission Decision 2002/657/EC, Off. J. Eur. Commun., 21 August 2002.
- [24] F. Hernández, M. Ibáñez, J.V. Sancho and O.J. Pozo, *Anal. Chem.* **76** (2004), p. 4349.
- [25] F. Hernández, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, J.M. Marín and M. Ibáñez, *Trends Anal. Chem.* **24** (2005), p. 596.
- [26] European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Commission working document SANCO/10476/2003, Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis, 5 February 2004.
- [27] F. Hernández, J.V. Sancho, O. Pozo, C. Villaplana, M. Ibáñez and S. Grimalt, *J. AOAC Int.* **86** (2003), p. 832.
- [28] J.V. Sancho, M. Ibáñez, S. Grimalt, O. Pozo and F. Hernández, *Anal. Chim. Acta* **530** (2005), p. 237.

☆ Presented at the 1st International Workshop on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Screening and Trace Level Quantitation in Environmental and Food Samples, Barcelona, Spain, 20–21 June 2005.

1.1.3. ARTÍCULO CIENTÍFICO 2

Multiresidue pesticide analysis of fruits by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

O.J. Pozo, M. Barreda, J.V. Sancho, F. Hernández, J. Ll. Lliberia, M.A. Cortés, B. Bagó

Analytical and Bioanalytical Chemistry. (2007). 389, 1795-1771

Multiresidue pesticide analysis of fruits by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Pozo, O.J.^a, Barreda, M.^a, Sancho, J.V.^a, Hernández, F.^a, Lliliberia, J.^b, Cortés, M.A.^b, Bagó, B.^b

^a Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón, Spain

^b Waters Corporation, Spain, Parc Tecnològic del Vallès, Ronda de Can Fatjó, 7-A, 08290 Cerdanyola del Vallès,

Abstract

Ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC–MS–MS) has been used for screening and quantification of 32 pesticides and metabolites in two fruit matrices. The compounds investigated belonged to different chemical families of insecticides, acaricides, fungicides, and herbicides; several metabolites were also included. Quantification was conducted using matrix-matched standards calibration; response was a linear function of concentration in the range tested (10–500 ng mL⁻¹). The method was validated with blank samples of lemon and raisin spiked at 0.01 and 0.1 mg kg⁻¹, and recoveries were satisfactory, between 70 and 110%, for most of the pesticides tested and relative standard deviations were below 15% ($n = 5$ at each spiking level). Excellent sensitivity resulted in limits of detection for all compounds well below 0.01 mg kg⁻¹, with the limit of quantification being validated at 0.01 mg kg⁻¹. The UPLC system generates narrow peaks (approx. 5 s), thus increasing peak height and improving sensitivity. This improved separation efficiency facilitates adequate resolution not only of the analytes but also of matrix interferences compared with conventional HPLC. The method developed could also resolve some geometric isomers. The main advantage of this approach is the high sample throughput achieved because of the short analysis time, which enables satisfactory separation of all the compounds in less than 5 min per sample.

Keywords: *UPLC, Pesticides, Metabolites, Multiresidue analysis, Tandem mass spectrometry, Fruits*

Introduction

In recent years LC tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) has become a powerful tool for pesticide-residue analysis (PRA) in a variety of complex matrices, because of its already known advantages—high selectivity and sensitivity, substantial reduction of sample-treatment steps compared with other, more conventional, techniques, for example GC–MS, LC–UV, or LC–FD, and reliable quantification and confirmation at the low concentrations required [1–4]. There is a growing demand for high sample throughput, so some strategies have been developed to reduce separation time without compromising separation quality and the quantity of the analytical data generated [5, 6]. In this way, some technological developments have been introduced to achieve these objectives, and systems using smaller stationary phase particles (<1.7 μm), different bridging structure of the column packing and high-pressure systems have become commercially available. This new technology has been called ultra-performance liquid chromatography (UPLC) [7–9]. It uses higher linear velocities, and therefore faster run times, and increased sensitivity and improved peak resolution are achieved, which are of particular interest in the analysis of complex matrices [5, 10]. The only requirement when coupling to tandem mass spectrometry is to achieve rapid data acquisition, so the improved resolution is not degraded.

Although UPLC technology was launched only recently, many applications can be found in the literature, which illustrates the interest in this technique. These applications have covered different fields, for example pharmaceutical analysis [11, 12] and drug metabolism, in which identification of metabolites is rather complicated because it involves analysis of analytes at low concentration in complex matrices, for example biological fluids [13–15].

Petrovic et al. [16] recently showed the advantages of use of UPLC in combination with tandem MS for environmental analysis of pharmaceuticals—screening and confirmation of 29 analytes in wastewater samples could be achieved in merely ten minutes. This high sample throughput has also been proved for PRA in water [17]—nine priority pesticides were separated in less than ten minutes. Pesticide residue analysis in food can also benefit from the high sample throughput attainable by UPLC methods, keeping the high multi-residue

capability required for such applications; this was recently demonstrated in two studies comparing UPLC and LC for PRA in baby foods [6, 18].

The objective of the work discussed in this paper was to perform a preliminary study to evaluate the potential of UPLC in combination with MS–MS in PRA. Two fruit samples (lemon and raisin) were chosen and a multiresidue method was used for screening and quantification of 35 multi-class pesticides and metabolites. The analytes were chosen from compounds with physicochemical properties incompatible with GC analysis (high polarity, low volatility, readily thermally degraded).

Experimental

Reagents and chemicals

Pesticides were selected as a variety of multiclass compounds from different families and as insecticides, acaricides, fungicides, and herbicides. Several relevant metabolites were also included in the study. Reference standards were purchased from Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) or Riedel–de Haën (Seelze, Germany). HPLC-grade acetone, acetonitrile, methanol (MeOH), methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and analytical-grade formic acid (HCOOH, content >98%) were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA, USA).

Standard stock solutions were prepared dissolving 50 mg, accurately weighed, in 100 mL HPLC-grade organic solvent to furnish a final concentration of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. For UPLC–MS analysis and sample fortification the stock solutions were mixed and diluted with methanol (0.1% HCOOH) or HPLC-grade water.

Disposable solid-phase extraction (SPE) cartridges containing 200 mg of a copolymer designed to have a hydrophilic–lipophilic balance (Oasis HLB, 30 μm) were obtained from Waters (Milford, MA, USA).

Ultra-performance liquid chromatography

A Waters (Milford, MA, USA) Acquity ultra-performance liquid chromatography (UPLC) system was interfaced to a triple-quadrupole mass spectrometer (LC-MS-MS).

Chromatographic separation was achieved on a 2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm particle size, Acquity BEH C₁₈ analytical column (Waters). The mobile phase was a gradient prepared from 0.01% HCOOH methanol and 0.01% HCOOH water in which the amount of methanol was changed linearly as follows: 0 min, 5%; 0.5 min, 5%; 1.8 min, 50%; 4.6 min, 90%; 5.1 min, 90%; and 5.3 min, 5% until 6 min. The flow-rate was 0.6 mL min⁻¹.

Mass spectrometry

A Waters (Manchester, UK) Quattro Premier mass spectrometer with an orthogonal Z-Spray-electrospray interface was used. Drying gas and nebulizing gas was nitrogen Altagaz B50 (99.999%) from Air Liquide (Madrid, Spain). Desolvation gas flow and cone gas flow were 650 and 60 L h⁻¹, respectively.

For operation in MS-MS mode the collision gas was argon C50 (99.999%) from Air Liquide at a pressure of 6 × 10⁻³ mbar in the collision cell. A capillary potential of 3.5 kV was used in positive ionization mode. The desolvation temperature was set to 350 °C and the source temperature to 120 °C. Dwell times of 50 ms were selected. The system was controlled by Masslynx software (version 4.1). The application manager Quanlynx was used to process the quantitative data obtained from the calibration standards and from the samples.

Sample procedure

For development of the method two fruit matrices were selected—lemon and raisin. Samples were purchased from an organic farming grocery.

The sample-treatment procedure has previously been used in our laboratory and is described elsewhere [4]. Briefly, samples were cut into small pieces and chopped and 20 g was extracted with MeOH-H₂O, 80:20 (v/v) containing 0.1% HCOOH. The extract was filtered and conveniently diluted, and an aliquot of the diluted extract was passed through a

polymeric Oasis HLB SPE cartridge. Analysis was performed by injecting 20 μL into the UPLC–MS–MS system.

Validation study

The validation study was performed on the basis of the European SANCO guideline [19]. Analytical characteristics evaluated were sensitivity, mean recovery (as a measure of accuracy), precision (expressed as repeatability), and specificity. With this objective, recovery experiments with spiked blank lemon and raisin samples were performed at two concentrations. Five replicates were used for each sample matrix and at each spiking level (0.01 and 0.1 mg kg^{-1}). Linearity was studied using matrix-matched standards, analyzing each of them in triplicate at six concentrations between 0.5 and 30 ng mL^{-1} .

The limit of quantification (LOQ) was established as the lowest concentration tested for which recovery and precision were satisfactory (70–110% and < 20% RSD, respectively) in accordance with the criteria established for analysis of pesticide residues in foods [19].

Results and discussion

MS optimization

Individual standard solutions (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared in acetonitrile– H_2O , 50:50 containing 0.1% HCOOH for MS optimization. Both full-scan and MS–MS spectra were acquired to obtain information about the maximum number of transitions available for each compound. Typically, the quantification transition was selected to achieve maximum sensitivity, i.e. selecting the most sensitive but also trying to avoid transitions generated by general, non-specific, losses, for example $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ or $\text{M}-\text{CO}_2$, to improve selectivity. All the compounds were determined with the ESI in positive-ion mode. The most sensitive results were always obtained by using $[\text{M} + \text{H}]^+$ as the precursor ion.

Table 1 shows the MS–MS transitions selected for screening and quantification, with the most relevant MS settings used for the compounds investigated in this work.

Table 1. Mass spectrometry conditions for the UPLC-MS-MS determination of the pesticides

Compound	t _R (min)	Precursor ion	Product ion	Cone (V)	Collision (eV)
Aldicarb sulfoxide	1.25	229	166	20	10
Aldicarb sulfone	1.34	245	166	25	15
Oxamyl	1.39	242	72	25	15
Carbendazim	1.50	192	160	30	15
Methomyl	1.39	163	88	10	10
Thiabendazol	1.64	202	175	45	25
DIA	1.60	174	96	35	20
Imidacloprid	1.72	256	209	30	15
Methiocarb sulfoxide	1.79	242	185	20	15
Acetamiprid	1.86	223	126	30	20
Methiocarb sulfone	1.91	258	122	20	15
DEA	1.96	188	146	35	15
Thiacloprid	1.98	253	126	30	20
Aldicarb	2.08	213	89	30	15
Oxadixyl	2.17	279	219	15	10
Imazalil	2.59	297	159	35	20
Propoxur	2.28	210	111	15	15
Carbofuran	2.31	222	165	25	15
Chlorsulfuron	2.42	358	141	25	20
Thiodicarb	2.47	355	88	15	20
Spiroxamine	3.10	298	144	30	20
Atrazine	2.59	216	174	35	20
Isoproturon	2.66	207	72	30	15
Diuron	2.69	233	72	35	15
Azoxystrobin	2.94	404	372	20	15
Dimetomorpha	3.01/3.14	388	301	30	20
Methiocarb	2.94	226	169	15	10
Pyrifenoxa	3.00/3.10	295	93	30	20
Cyprodinil	3.29	226	93	30	20
Spinosad	3.86	732.4	142	35	35
Fenoxycarb	3.51	302	88	20	20
Tebufonozide	3.48	353	133	10	20
Haloxfop-methyl	3.90	376	316	30	20

^aTwo peaks corresponding to geometric isomers

Method development and validation

The main objective of this work was to perform a preliminary study to evaluate the potential of UPLC in combination to tandem MS for multiresidue pesticide analysis in complex samples. Considering the advantages of this technology, it was expected that a rapid method, with improved sensitivity and possibly selectivity, would be developed.

The optimized method led to superb resolution between the analytes selected. Use of the UPLC system enabled analysis of 32 pesticides in less than 5 min (Table 1 and Fig. 1). The peaks were very narrow (approx. 5 s), in comparison with conventional HPLC, with good shape, despite the low dwell time selected. This short analysis time results in a method with high sample throughput.

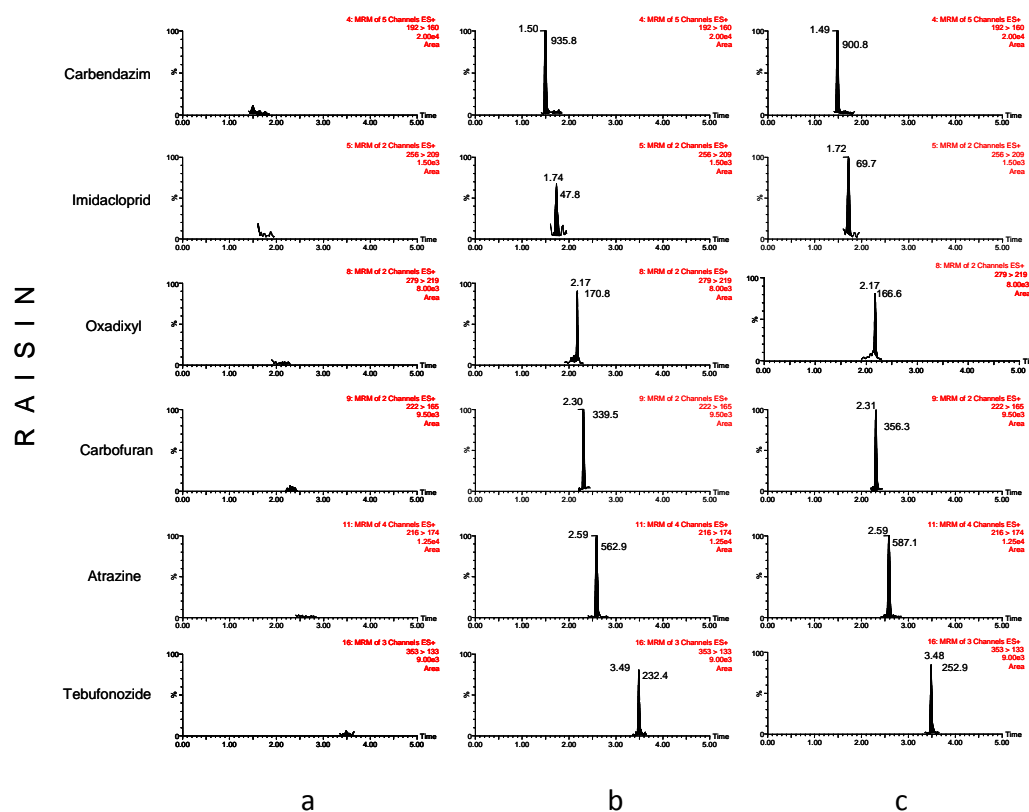


Fig. 1 UPLC–MS–MS chromatograms obtained from six representative pesticides: (a) blank sample (b) sample spiked at 0.01 mg kg^{-1} (1.25 ng mL^{-1} in the final extract) (c) matrix-matched standard (1.5 ng mL^{-1})

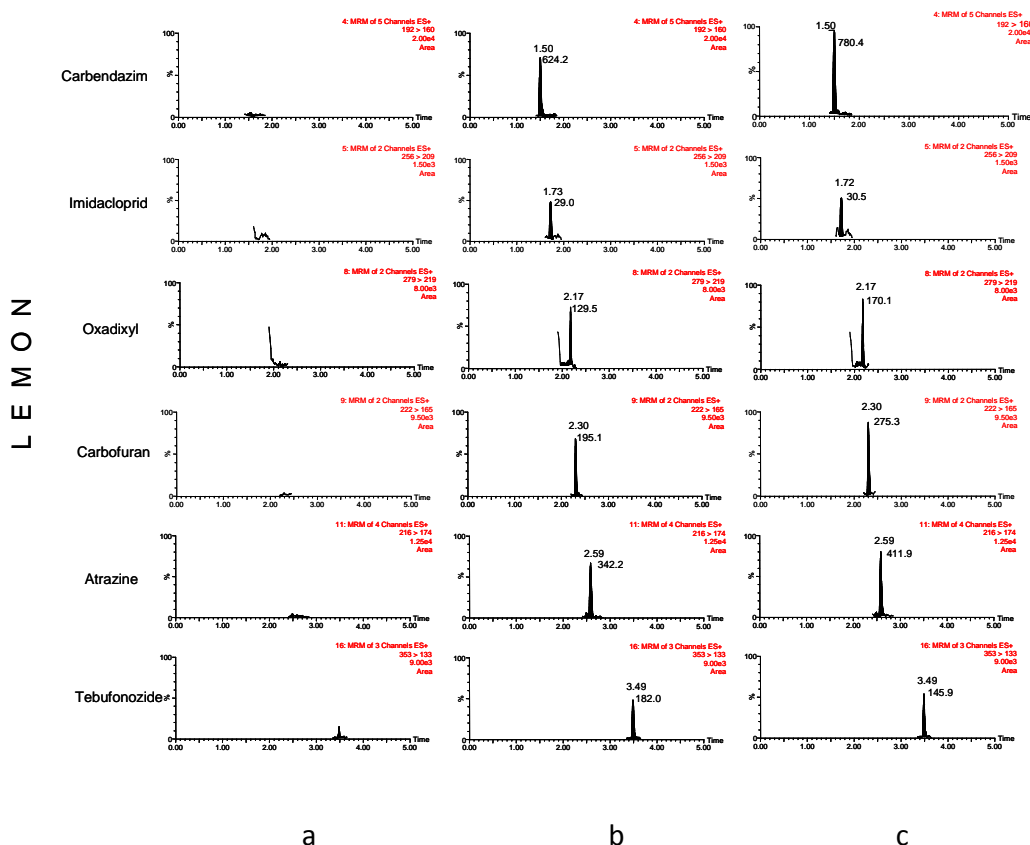


Fig. 1 (continued)

Different dwell times were tested between 10 and 100 ms. When 100 ms was used the number of data points acquired was not enough to define a good chromatographic peak. When the dwell time was 10 ms all the compounds could be acquired in one time window only but with increased background noise. As a compromise which enabled all the compounds studied to be distributed along several acquisition functions, 50 ms was finally selected. Distributing the analytes into 20 overlapping functions (each approx. 0.6 min wide) enabled us to centre the chromatographic peak in the time window to minimize the risk of peak loss because of to unexpected slight changes in retention time.

Figure 2 shows the separation efficiency achievable by UPLC which revealed, for example, that a peak observed in blank lemon when screening for diuron was not a real positive but an interfering compound present in the lemon matrix. In fact, when lemon was

spiked, UPLC could resolve this interference from the diuron peak. This was not observed when HPLC was used, although this interferent did not affect quantification, because matrix-matched standard calibration was used [4]. The optimized gradient also adequately resolved the geometric isomers of dimetomorph and pyrifenoxy (Table 1).

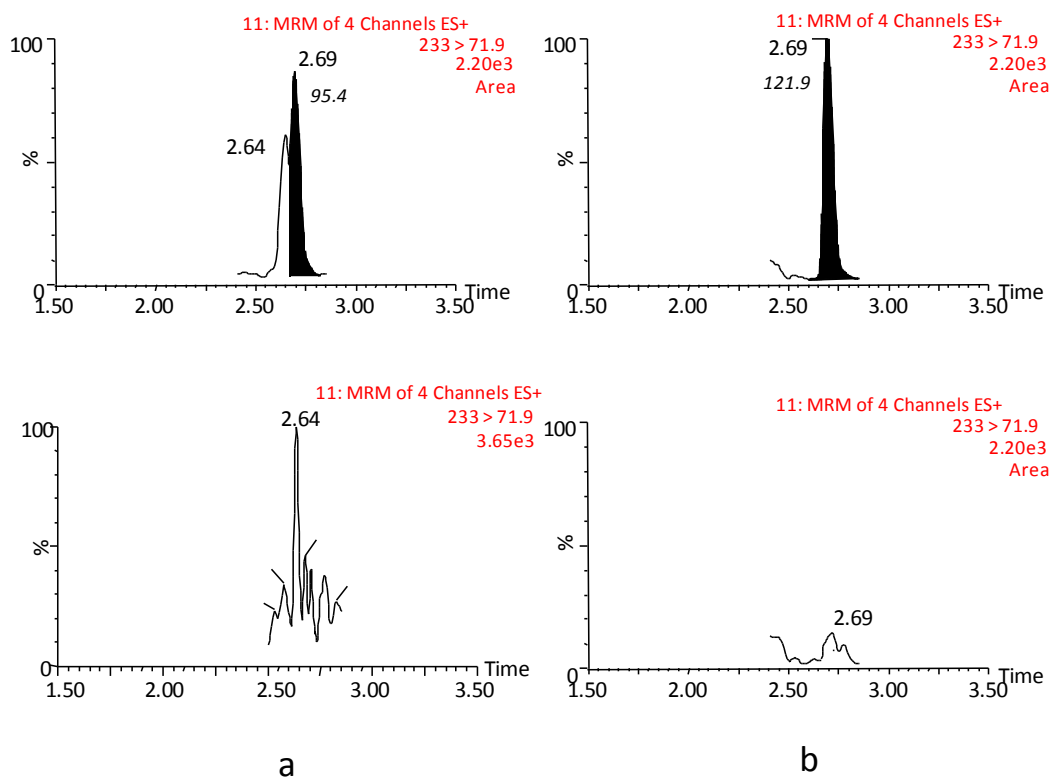


Fig. 2 UPLC–MS–MS chromatograms obtained from: (a) lemon spiked with diuron at 0.01 mg kg^{-1} (top) and blank lemon (bottom); (b) raisin spiked with diuron at 0.01 mg kg^{-1} (top) and blank raisin (bottom)

In relation to quantification, several experiments were performed to check for matrix effects. Our results showed that after the sample treatment performed, including SPE clean-up, no significant matrix effects were observed for any pesticide–matrix combination. Although standards in solvent could, in principle, be used for quantification, we preferred to perform quantification using calibration with matrix-matched standards to prevent slight variations in the MS signal for some analytes and unexpected enhancement or suppression of

the signal from real samples. The ready availability of blank samples from organic farming grocery also made it easy to apply this approach, which is more problematic in other fields, for example environmental analysis, when finding a representative blank with matrix composition similar to that of samples is often troublesome.

Matrix-matched calibration plots were highly linear between 0.5 and 30 ng mL⁻¹, with correlation coefficients > 0.99 for both lemon and raisin matrices. The specificity of the method was tested by analysis of blank samples. The absence of any chromatographic peak in every matrix, at exactly the same retention time as target pesticides, indicated there were no matrix compounds that might give a false positive signal in these samples.

The accuracy of the method was estimated by means of recovery experiments at two spiking levels (0.01 and 0.1 mg kg⁻¹). All experiments were performed in quintuplicate at each level (Table 2). Most recoveries were satisfactory, with mean values ranging from 70 to 110%, and coefficients of variation (CV) below 15%. Lower recoveries were observed for haloxyfop-methyl in lemon, possibly because of losses as a result of breakthrough during the SPE process, and for aldicarb, surely as a consequence of its partial degradation during sample pre-treatment. The latter explanation is supported by the observation that recovery of its metabolite (aldicarb sulfoxide) was notably higher than expected.

Table 2 Mean recoveries and coefficients of variation (in parentheses; $n = 5$) after application of UPLC–MS–MS to different samples spiked at two concentrations

Compound	Lemon		Raisin	
	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg
Aldicarb sulfoxide	126(17)	150(3)	159(19)	158(4)
Aldicarb sulfone	84(10)	74(4)	115(13)	112(3)
Oxamyl	80(12)	96(5)	112(13)	113(6)
Carbendazim	82(12)	94(3)	107(9)	98(3)
Methomyl	78(13)	96(6)	119(8)	117(2)
Thiabendazol	70(12)	87(2)	97(9)	76(3)
DIA	77(16)	86(3)	99(15)	80(7)
Imidacloprid	106(20)	82(10)	87(15)	82(6)
Methiocarb sulfoxide	84(7)	89(5)	95(12)	115(1)
Acetamiprid	90(7)	97(3)	97(6)	83(3)
Methiocarb sulfone	72(6)	84(4)	104(18)	96(5)
DEA	82(17)	84(4)	101(13)	95(3)
Thiacloprid	83(16)	93(3)	94(13)	75(2)
Aldicarb	41(19)	52(15)	67(17)	40(21)
Oxadixyl	84(8)	95(3)	100(12)	86(3)
Imazalil	70(15)	76(3)	101(16)	91(4)
Propoxur	76(6)	91(2)	89(10)	96(2)
Carbofuran	75(6)	86(2)	94(13)	87(1)
Chlorsulfuron	103(23)	85(8)	108(16)	105(10)
Thiodicarb	80(11)	77(3)	86(15)	88(3)
Spiroxamine	70(13)	70(1)	86(12)	94(1)
Atrazine	81(10)	97(3)	97(13)	91(2)
Isoproturon	71(8)	80(3)	85(7)	89(2)
Diuron	72(8)	73(4)	97(10)	85(6)
Azoxystrobin	76(11)	76(3)	90(3)	96(1)
Dimetomorph 1	77(23)	71(5)	104(18)	100(8)
Dimetomorph 2	86(10)	72(3)	92(16)	97(6)
Methiocarb	76(11)	76(3)	90(3)	97(3)
Pyrifenox 1	80(19)	75(4)	89(17)	87(5)
Pyrifenox 2	75(14)	75(3)	97(16)	85(3)
Cyprodinil	72(16)	70(7)	93(14)	96(3)
Spinosad	62(12)	73(11)	116(11)	97(9)
Fenoxycarb	94(20)	70(3)	94(14)	105(10)
Tebufonozide	73(4)	70(4)	93(12)	99(1)
Haloxifop-methyl	45(22)	51(12)	77(18)	90(9)

The lowest concentration that was validated for the samples with satisfactory recovery and precision, 0.01 mg kg^{-1} , was taken as the LOQ of the method. Figure 1 shows UPLC–MS–MS chromatograms obtained for six representative analytes, distributed along the chromatogram, for raisin and lemon, both spiked at the LOQ level. It is apparent all the analytes are separated in less than 4 min with typical peak widths of 5 s. From these narrow peaks, limits of detection well below 0.01 mg kg^{-1} can be easily estimated; values of approximately $1 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ are achieved for most pesticides.

Only one SRM transition (Q) has been used in this work; this enables rapid screening and quantification of low levels of analyte. Confirmation of positives in real samples would require acquiring, at least, one additional SRM transition (q) per analyte and the evaluation of Q/q ratio deviation in relation to a reference standard. The method proposed should be seen as a rapid screening that enables discarding of negative samples.

Conclusions

Use of ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry enabled the development of a rapid multiresidue method for screening and quantification of 32 pesticides and metabolites in fruit samples. Owing to the high sensitivity of the method it could be satisfactorily validated at the 0.01 mg kg^{-1} level, which was the LOQ objective in this work. From the data available, however, it is predicted that this value could, if required, be reduced for most of the compounds investigated. The main advantage of using UPLC is its excellent chromatographic separation efficiency, which enables analysis to be performed with very short chromatographic runs (less than 5 min per sample to determine 32 pesticides). High sample throughput can therefore be achieved (more than 240 injections per day), which is useful in monitoring food programs in which a large number of samples is normally analyzed.

The UPLC–MS–MS method proposed in this paper could be easily upgraded to determine more compounds by selecting lower dwell times to maintain adequate peak shape. Confirmation of positive findings could be achieved simultaneously with the screening and quantification if, at least, two SRM transitions were taken for each compound. Acquiring as

many MS–MS transitions as possible for each analyte is, however, recommended to improve reliability when confirming the identity of the compounds detected in samples [20, 21].

Acknowledgements Authors acknowledge Waters Cromatografía S.A. for technical and financial support.

References

1. Alder L, Greulich K, Kempe G, Vieth B (2006) *Mass Spectrom Rev* 25:838–865
2. Picó Y, Font G, Ruiz MJ, Fernández M (2006) *Mass Spectrom Rev* 25:917–960
3. Lehotay SJ, de Kok A, Hiemstra M, van Bodegraven P (2005) *J AOAC Int* 88:595–614
4. Hernández F, Pozo OJ, Sancho JV, Bijlsma R, Barreda M, Pitarch E (2006) *J Chromatogr A* 1109:242–252
5. Wren S, Tchelitcheff P (2006) *J Chromatogr A* 1119:140–146
6. Kovalczuk T, Jech M, Poustka J, Hajšlová J (2006) *Anal Chim Acta* 577:8–17
7. Neue U (2005) *J Chromatogr A* 1079:153–161
8. Swartz ME (2005) *J Liq Chromatogr Related Technol* 28:1253–1263
9. Nováková L, Matysová L, Solich P (2006) *Talanta* 68:908–918
10. Apollonio LG, Whittall IR, Pianca DJ, Kyd JM, Maher WA (2006) *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:2259–2264
11. Li R, Dong L, Huang J (2005) *Anal Chim Acta* 546:167–173
12. Wren S, Tchelitcheff P (2006) *J Pharm Biomed Anal* 40:571–580
13. Castro-Pérez J, Plumb R, Granger J, Beattie I, Joncour K, Wright A (2005) *Rapid Commun Mass Spectrom* 19:843–848
14. Dear GJ, James AD, Sarda S (2006) *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:1351–1360
15. O'Connor D, Mortishire-Smith R, Morrison D, Davies A, Dominguez M (2006) *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:851–857
16. Petrovic M, Gros M, Barcelo D (2006) *J Chromatogr A* 1124:68–81

17. Mezcua M, Agüera A, Lliberia JL, Cortés MA, Bagó B, Fernández-Alba AR (2006) *J Chromatogr A* 1109:222–227
18. Leandro CC, Hancock P, Fussell RJ, Keely BJ (2006) *J Chromatogr A* 1103:94–101
19. Guidance document on residue analytical methods SANCO 825/00 rev7, 17/03/2004, 15 p, European Commission
20. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide_doc_825-00_rev7_en.pdf
21. Pozo OJ, Sancho JV, Ibáñez M, Hernández F, Niessen WMA (2006) *Trends Anal Chem* 25:1030–1042

1.1.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

El proyecto objeto de esta investigación surge por la colaboración de nuestro laboratorio con la empresa Waters ® con el fin de desarrollar un método analítico para matrices vegetales capaz de monitorizar y cuantificar plaguicidas de muy diversa naturaleza en un mismo análisis. Se buscaba, a su vez, que fueran compuestos que presentaran una dificultad expresa en el análisis mediante cromatografía de gases.

Las matrices vegetales empleadas se seleccionaron de modo que tuvieran características bien diferenciadas entre sí. Así, se escogieron como representativas las siguientes: *tomate* por su elevado contenido en agua, *limón* por su acidez, *aguacate* por el contenido en grasa, y *pasas* por los azúcares que poseen.

En cuanto a la selección de los plaguicidas objeto de análisis, se hizo un especial hincapié en que pertenecieran a familias distintas de compuestos y también que fueran moléculas con diferentes propiedades físico-químicas, que estuvieran en un rango de peso molecular variado, con polaridades muy diversas (se escogieron moléculas de polaridad elevada hasta llegar a moléculas relativamente apolares). Todas estas consideraciones hacen que la creación de un único método analítico, tanto de tratamiento de muestra como de determinación cromatográfica, sea dificultosa. La primera selección de compuestos incluía 60 plaguicidas distribuidos entre las familias que se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Clasificación de los compuestos incluidos en el proyecto

INSECTICIDAS/ACARICIDAS (26)		
Lactonas macrocíclicas		
Abamectina	Spinosad	
Carbamato		
Aldicarb	Propoxur	Fenoxycarb
Ethiofencarb	Thiodicarb	Methiocarb
Methomyl	Carbofuran	Oxamyl
Derivado de la hidracida		
Tebufenozide		
Mímicos de la hormona juvenil		
Pyriproxyfen		
Neonicotinoide		
Acetamiprid	Thiacloprid	Imidacloprid
Benzoilurea		
Diflubenzuron	Teflubenzuron	Lufenuron
Hexaflumuron	Flufenoxuron	
Organofosforado		
Methamidophos		
Omethoate		
Formamidina		
Formeanate		
Regulador del crecimiento		
Hexythiazox		
Triazina		
Ciromazina		
FUNGICIDAS (13)		
Estrobilurina		
Azoxystrobin		
Benzimidazol		
Carbendazima	Thiabendazol	
Conazol		
Imazalil	Triflumizol	
Anilida, Oxazol		
Oxadixyl		
Piridina		
Pyrifenox		
Amida		
Triforine		
Sin clasificar		
Spiroxamina		
Pirimidina		
Cyprodinil		
Morfolina		
Dimetomorf		
Quinona		
Ditianon		

HERBICIDAS (11)		
<i>Sulfonilurea</i>		
Clorosulfuron		
<i>Fenilurea</i>		
Diuron	Linuron	Isoproturon
<i>Amina cuaternaria</i>		
Diquat	Paraquat	
<i>Aryloxyphenoxy propionic</i>		
Haloxifop-methyl	Haloxifop-2-ethoxyethyl	Quizalofop-ethyl
Fluazipop-P-buthyl		
<i>Triazina</i>		
Atrazina		
REGULADOR DEL CRECIMIENTO (1)		
<i>Amina cuaternaria</i>		
Clormequat		
METABOLITOS (9)		
Aldicarb sulfona	Aldicarb	
Aldicarb sulfoxido	Aldicarb	
Des-isopropilatrazina	Atrazina y otras triazinas	
Desetilatrazina	Atrazina	
Ethiofencarb sulfona	Ethiofencarb	
Ethiofencarb sulfoxido	Ethiofencarb	
Methiocarb sulfona	Methiocarb	
Methiocarb sulfoxido	Methiocarb	
3-hidroxicarbofuran	Carbofuran	

Una vez realizada la primera selección, se descartaron varios compuestos debido a los resultados obtenidos en investigaciones anteriores, realizadas en nuestro laboratorio, y que demostraban que no todos ellos eran factibles de ser incluidos en un método multiresidual, pues se necesita hacer uso de métodos individuales adecuados a sus características especiales (Ver **Apartado 1.2.**). Un ejemplo de esto es el *fosetyl*, que por sus características ácidas se encuentra en forma aniónica en las muestras de modo que requiere de una cromatografía con formación de pares iónicos para una correcta retención y determinación cromatográfica (Hernández et al, 2003). También se descartó la inclusión de la *abamectina*, pues se trata de un compuesto que no es fácilmente ionizable en modo electrospray (ESI), que necesita de la formación de aductos con sales de amonio o litio para favorecer su ionización en esta fuente (Grimalt et al, 2005). Se descartó también la inclusión en el método multiresidual del grupo de las sales de amonio cuaternarias (*clormequat*, *diquat* y *paraquat*) debido a su carácter catiónico, y también de la *ciromazina*, por tratarse de un compuesto que requiere, de nuevo, la formación de pares iónicos para una correcta cromatografía (Sancho et al, 2005). Después de realizar algunos ensayos previos se descartaron 2 compuestos más: el *ditianon*, por ser un compuesto que

no se ioniza con facilidad en la fuente de ESI, y el *formetanate*, por presentar una mala retención cromatográfica y muy baja sensibilidad. Para el análisis de estos dos compuestos se considera que es más conveniente el empleo de la fuente de APCI.

Una vez descartados los 8 compuestos comentados, estuvimos en condiciones de empezar a optimizar las variables cromatográficas y espectrométricas para desarrollar un único método MRM con el uso de la misma fuente de ionización (ESI) para todos los analitos. Para ello, se infusieron patrones individuales de cada plaguicida con el objetivo de obtener los espectros en modo *full scan* y *MS/MS* de cada uno de los compuestos y se recabó información sobre el mayor número posible de transiciones, para así disponer de la máxima información de cada compuesto y poder realizar un segundo análisis de confirmación en caso necesario. Se empleó la transición más sensible para la cuantificación y las restantes se emplearon para la confirmación de los analitos. Los iones precursores seleccionados fueron en el 90% de los casos el $[M+H]^+$, mientras que para los compuestos *oxamilo*, *aldicarb* (y su correspondiente sulfona y sulfóxido) y también para el *3-hidroxicarbofuran* fueron los iones sodiados, $[M+Na]^+$. Se descartó, en lo posible, el uso de transiciones poco específicas, como es el caso de las pérdidas de agua $[M-H_2O]$ o CO_2 $[M-CO_2]$.

La separación cromatográfica se realizó haciendo uso de una columna Atlantis C₁₈ (Waters). Los detalles del método cromatográfico aparecen en el **Apartado 2.5 del Artículo científico 1**. El método desarrollado permitió la separación de los 52 compuestos estudiados haciendo uso de 30 funciones de adquisición que se solapan en el tiempo, consiguiendo que el pico cromatográfico quede centrado en mitad de la función de adquisición y así se evite la pérdida del analito si existiera una inesperada fluctuación en el tiempo de retención. En cada una de las funciones se incluyeron como máximo 4 compuestos, y se puso la restricción de que no se midieran más de 10 compuestos simultáneamente para tener la mayor sensibilidad posible en todos los casos. Se empleó un tiempo de *dwell* de 100 ms con el que se obtuvieron suficientes puntos cromatográficos para tener una buena forma de pico para todos los compuestos. En la

Figura 1 se muestra una captura de pantalla en la que aparecen las distintas funciones del método anteriormente mencionadas.

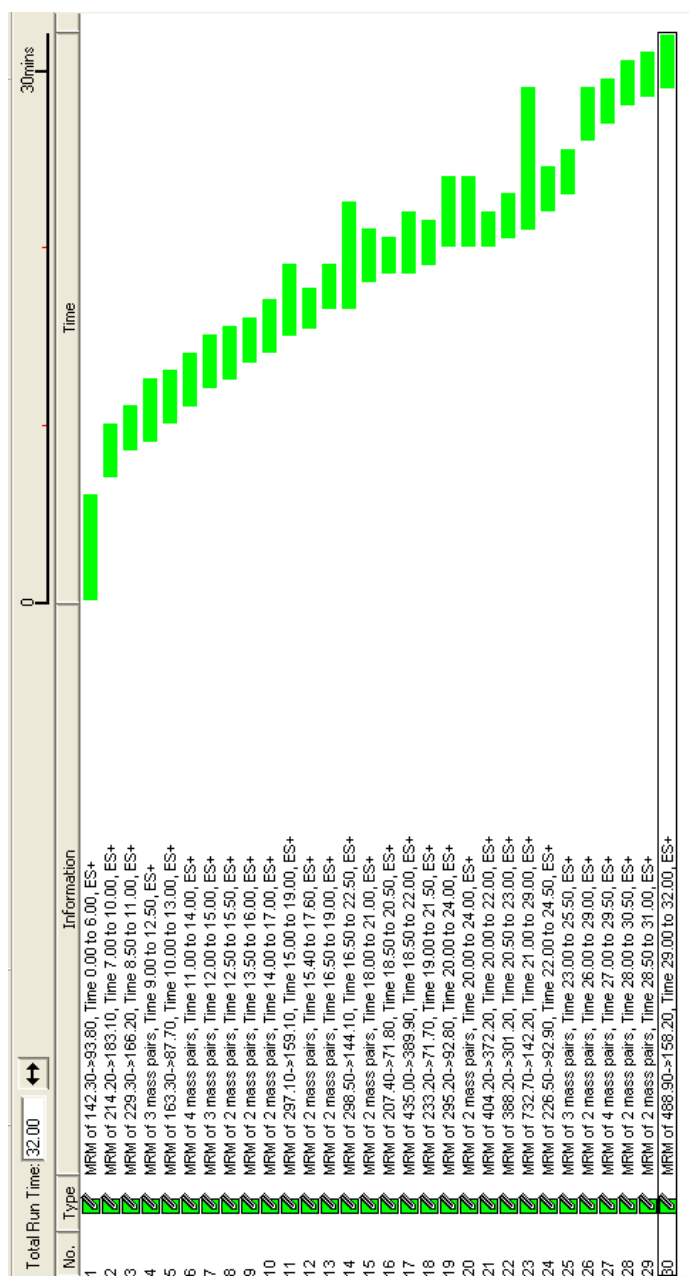


Figura 1: Captura de pantalla del método de masas empleado en la determinación analítica en el que aparece la distribución de las 30 funciones de adquisición.

Cabe destacar que el gradiente empleado en el método cromatográfico permitió la resolución de los isómeros geométricos de varios compuestos: *triforine*, *dimetomorf* y *pyrifenox* (ver **Figura 2**).

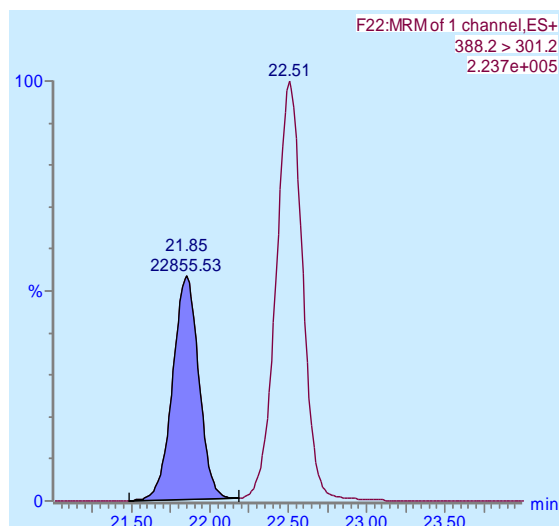


Figura 2: Cromatograma correspondiente a un patrón de dimetomorf. Se observan dos picos debido a la resolución cromatográfica de los isómeros geométricos del compuesto.

El procedimiento desarrollado se basa en una extracción convencional con disolvente orgánico seguida de una etapa de purificación mediante SPE, tal como se detalla en el **Apartado 2.4 del Artículo científico 1**.

Para la etapa de SPE se escogieron los cartuchos Oasis HLB (Waters) debido a que la fase reversa con características hidrofílicas-lipofílicas resultó adecuada para todos los compuestos. Además, cabe esperar que no se obtengan recuperaciones bajas debidas a la actividad no deseada de los silanoles, el secado de los sorbentes, las limitaciones de pH, y la degradación de los metabolitos y los compuestos polares. La variedad de compuestos incluidos en el método y la diversidad de las matrices hizo aconsejable la utilización de estos cartuchos, que presentan un amplio rango de aplicación. Una vez seleccionado el tipo de cartucho a emplear se escogieron los de 200 mg de fase para evitar al máximo las pérdidas por *breakthrough*. Se realizaron pruebas con diferentes disolventes orgánicos para optimizar la etapa de carga del extracto de muestra. Se probaron extractos con un

contenido orgánico del 20% en acetona, acetonitrilo y metanol, obteniéndose los mejores resultados para el extracto en metanol puesto que las pérdidas por *breakthrough* para los compuestos más polares fueron menores, tal como puede observarse en la **Figura 3**.

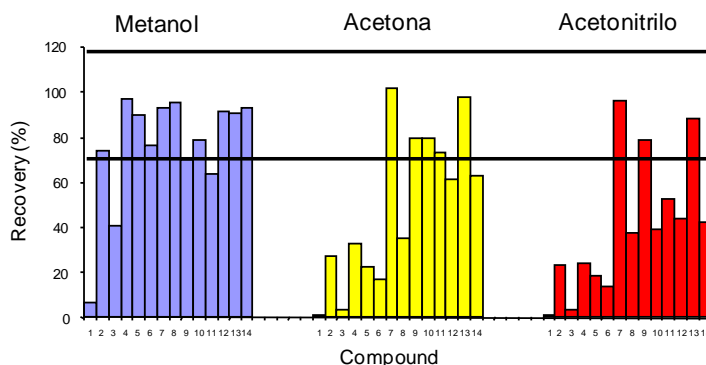


Figura 3: Recuperaciones obtenidas para los 15 compuestos más polares según el uso de diferentes disolventes orgánicos (20% en todos los casos) en la etapa de carga del cartucho de SPE.

Una vez seleccionado el metanol, como disolvente del extracto, se optimizó el porcentaje de disolvente orgánico para tener las menores pérdidas posibles por *breakthrough* para los compuestos más polares. Se hicieron pruebas con carga de 5, 10 y 20% de metanol (**Figura 4**). Se consideró como óptima la carga en el cartucho de un extracto con un 10% de contenido máximo en metanol.

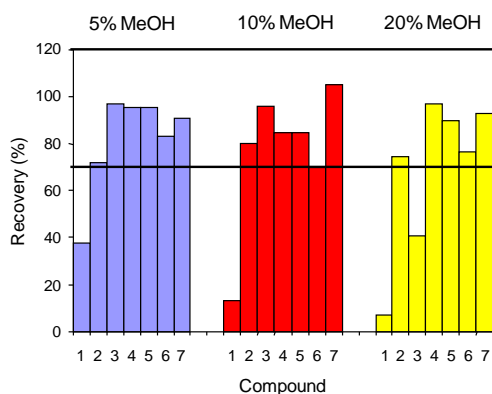


Figura 4: Resultados de recuperación para los 7 compuestos más polares al variar el porcentaje de MeOH en la carga del cartucho de SPE.

Se observaron problemas de degradación en los carbamatos, que no habían sido recogidos en la bibliografía por otros autores, como Jansson (2008), por lo que se asoció al uso del metanol como disolvente de extracción. Como puede observarse en la **Figura 5**, en el caso del *ethiofencarb*, existe una disminución de la señal cuando se compara un patrón en solvente frente a un patrón sometido al proceso de extracción. Si esta misma comparación se realiza para un patrón de *ethiofencarb sulfóxido*, el efecto observado es inverso, la señal aumenta para el patrón sometido al proceso de extracción. Esto sugiere que el disolvente empleado en la extracción produce una oxidación del *ethiofencarb* para dar *ethiofencarb sulfóxido* y justificaría las bajas recuperaciones obtenidas para este compuesto así como el elevado valor que se tiene para su correspondiente sulfóxido y sulfona. Para minimizar este efecto se optó por acidificar el disolvente de extracción, consiguiéndose de este modo una estabilización de la señal, tal como se observa en la **Figura 6**.

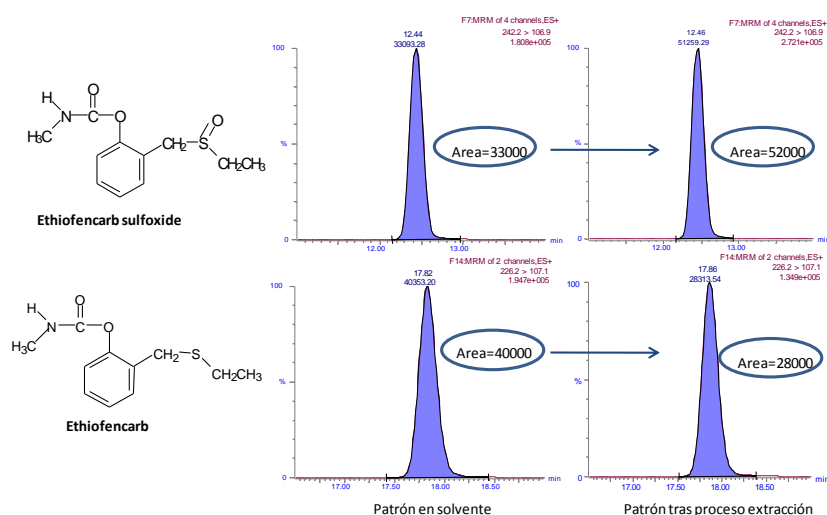


Figura 5: Cromatograma LC-MS/MS correspondiente a un patrón en solvente (izquierda) y después del procedimiento de extracción (derecha) de ethiofencarb (abajo) y ethiofencarb sulfóxido (arriba).

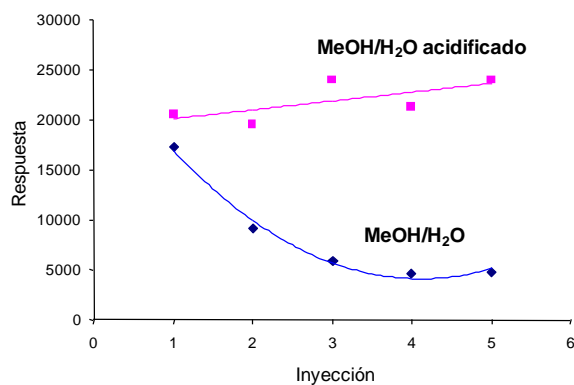
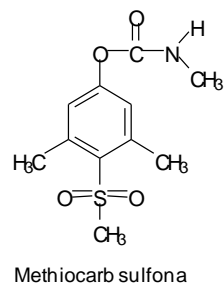


Figura 6: Inyecciones consecutivas (n=5) de un patrón de methiocarb sulfona preparado en metanol y del mismo compuesto preparado en metanol acidificado.

También se observaron, para algunos compuestos, problemas de recuperación que pudieron ser asociados a la etapa final de evaporación de los extractos. Estos problemas de degradación en la etapa de evaporación eran más evidentes para los diez compuestos más apolares. Se pudieron solventar (**Figura 7**), añadiendo previamente a la evaporación un volumen conocido de agua que actuaba como protector de los analitos.

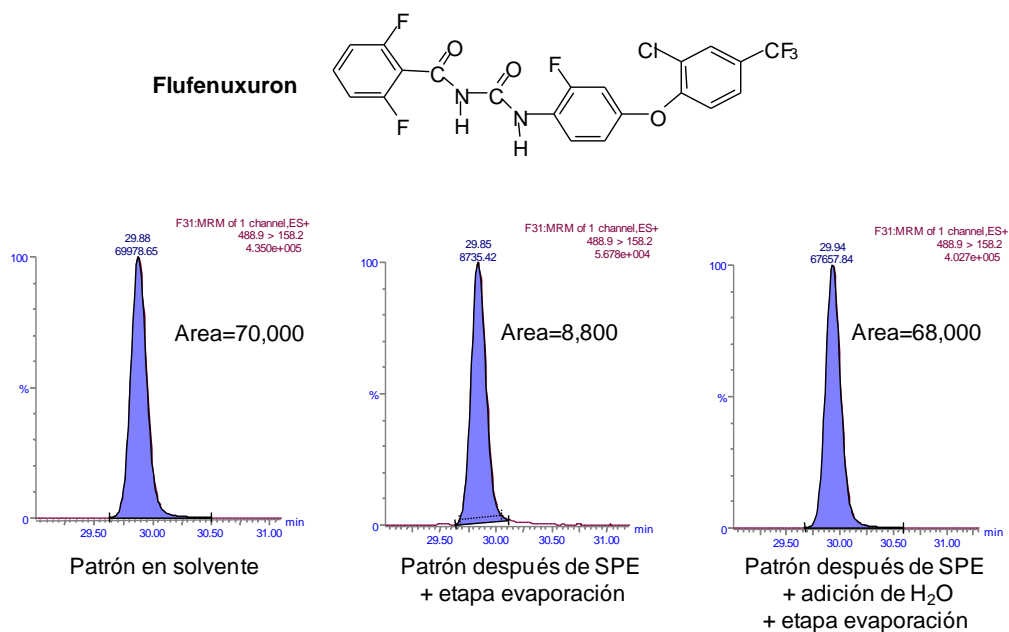


Figura 7: Cromatogramas correspondientes a un patrón de flufenuxuron en el que se aprecia la degradación de este según las condiciones de evaporación.

Después de realizar todas las pruebas, el método óptimo de análisis consiste, a grandes rasgos, en la extracción de las muestras empleando 60 mL de una mezcla MeOH-H₂O (80:20, v/v) con un contenido del 0.1% de HCOOH. A los extractos resultantes se les realiza una dilución por un factor de 8 con H₂O acidificada con 0.1% de HCOOH. Estos extractos se someten al proceso de SPE con cartuchos Oasis HLB que se eluyen con 8 mL de una mezcla MeOH-MTBE (10:90). Todos los detalles de este método se pueden encontrar en el **Apartado 2.4** del **Artículo científico 1**.

Validación del método analítico

Una vez optimizadas las variables experimentales que afectan al método, se realizó la validación del mismo, siguiendo las directivas de las guías europeas (SANCO/10476/2003), considerando como parámetros esenciales el rango de linealidad, la exactitud y la precisión, así como la especificidad del método. La cuantificación se realizó mediante calibrado en matriz a pesar de haber comprobado que el efecto matriz después del tratamiento de muestra realizado era irrelevante. Aún así, se empleó este tipo de calibrado para prevenir cualquier variación en la señal que se pudiera producir con el cambio de alguna característica de las muestras (cambio de variedad, grado de madurez...) en el análisis de muestras reales. Los resultados obtenidos para la linealidad y especificidad fueron satisfactorios. La exactitud y precisión se evaluaron mediante ensayos de recuperación, cuyos resultados se pueden observar en la **Tabla 3 del Artículo científico 1** y, de un modo más esquemático, en la **Figura 8**, presentada a continuación.

Las recuperaciones se encuentran dentro del rango 70-120% para la mayoría de los compuestos analizados. Los únicos compuestos que presentan resultados no satisfactorios para todas las matrices estudiadas son *methamidophos*, *aldicarb* y *ethiofencarb*. Se observa, por otro lado, que las matrices en las que se obtienen más resultados fuera del rango satisfactorio son tomate y aguacate. En el caso concreto de aguacate, se observa que los resultados menos satisfactorios se producen en los compuestos más apolares, probablemente debido a que el porcentaje de disolvente orgánico, empleado en la extracción, no es del todo adecuado para extraer estos compuestos en esta matriz con elevado contenido de lípidos. La dificultad de obtener resultados óptimos para todos los analitos incluidos en un método MRM, debido a las grandes diferencias en sus propiedades físico-químicas, ya ha sido mencionada en la bibliografía (Hajšlová et al, 1998).

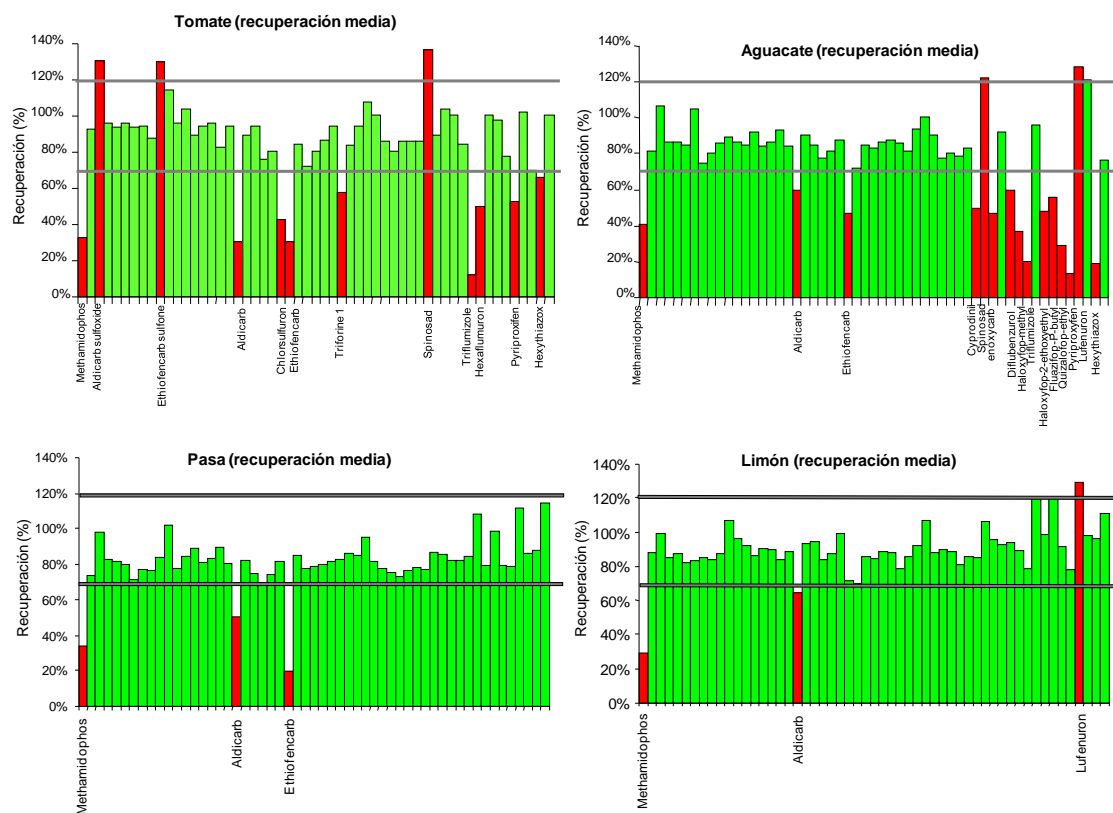


Figura 8: Resultados de recuperación para las 4 matrices objeto de estudio. En rojo se muestran los compuestos cuyo valor de recuperación queda fuera de los límites considerados aceptables.

Como ya se ha comentado anteriormente, en el método MRM solo se adquiere una transición por compuesto, empleada para la cuantificación. La confirmación de los analitos se realiza en una segunda inyección del extracto adquiriendo todas las transiciones MS/MS que, para tal fin, se obtuvieron en las experiencias de infusión realizadas durante la optimización del método.

En el **Artículo científico 2** se realiza un estudio para evaluar las ventajas que puede aportar el empleo de la técnica UHPLC-MS/MS en el análisis de plaguicidas en matrices vegetales. El estudio se realiza aplicando el mismo procedimiento desarrollado en el **Artículo científico 1** para dos de las matrices anteriormente estudiadas: limón y pasas. A la vista de los resultados obtenidos en el **Artículo científico 1** se redujo el número de compuestos de 52 a 35, porque se descartaron aquellos que habían dado resultados poco satisfactorios en la validación.

Se reoptimizaron las condiciones cromatográficas, acorde a las características de UHPLC-MS/MS. Se consiguieron separar los 35 compuestos empleando 20 funciones de adquisición de no más de 30 s cada una, en las que el pico cromatográfico queda centrado en la función para prevenir posibles pérdidas de éstos por fluctuaciones inesperadas, como ya se comentó con anterioridad.

El tiempo de *dwell* fue de 50 ms, de modo que todos los picos disponen de un número de puntos adecuado para una buena definición, así como una adecuada relación S/N. Se realizaron pruebas con diferentes tiempos de *dwell*, entre 100 ms (típicamente empleado en HPLC-MS/MS) y 10 ms. Con *dwell* de 100 ms, los picos cromatográficos no estaban bien definidos puesto que no se realizaba la adquisición de suficientes puntos. Sin embargo, cuando el tiempo de *dwell* se bajaba hasta 10 ms, aunque todos los compuestos podían ser adquiridos dentro de una misma función, se producía un aumento notable del ruido de fondo de modo que la sensibilidad del método se veía perjudicada.

Aplicando UHPLC-MS/MS se consigue la correcta separación y cuantificación de todos los compuestos en un tiempo inferior a 4 minutos (frente a los 31 minutos del método HPLC-MS/MS), con picos con una anchura aproximada de 5 s. Este método es capaz de resolver isómeros geométricos (caso del *dimetomorph* y *pyrifenox*). Además, se observó que la técnica UHPLC fue capaz de resolver el pico de un interferente, causado por la matriz de limón, del analito (*diuron*), que en el método de HPLC no se había observado (**Figura 2, Artículo científico 2**).

Este método también fue validado siguiendo los mismos criterios, descritos anteriormente. Los resultados, satisfactorios para la mayor parte de los compuestos, se muestran en la **Tabla 2** del **Artículo científico 2**.

Así pues, se comprobó que haciendo uso de la técnica UHPLC-MS/MS se consigue una mejora en cuanto a la separación de los analitos y tiempo de análisis con respecto al método anterior desarrollado basado en HPLC-MS/MS.

1.1.5. REFERENCIAS

- Beltrán E., Ibáñez M., Sancho J.V., Hernández F. (2009). " *Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*". Rapid Communications in Mass Spectrometry 23 (12), 1801-1809.
- Bijlsma, L., Sancho J.V., Pitarch E., Ibáñez M., Hernández F. (2009). " *Simultaneous ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of amphetamine and amphetamine-like stimulants, cocaine and its metabolites, and a cannabis metabolite in surface water and urban wastewater*". Journal of Chromatography A 1216 (15), 3078-3089.
- European Commission Decision 2002/657/EC, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of European Communities 2002, L221,8.
- European Commission, directorate General Health and Consumer Protection, Commission working document SANCO/10476/2003. " *Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis*". 5th February 2004.
- FDA. (2001). " *Guidance for Industry: Mass Spectrometry for confirmation of the identity of animal drugs residues*". Draft Guidance 118, Food and Drug Administration.
- Fenoll J., Hellín P., Martínez C.M., Flores P. (2009). " *Multiresidue analysis of pesticides in soil by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*". Journal of AOAC International 92 (5), 1566-1575.
- Fernández-Moreno J.L., Garrido Frenich A., Plaza-Bolaños P., Martínez Vidal J.L. (2008). " *Multiresidue method for the analysis of more than 140 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*". Journal of Mass Spectrometry 43, 1235-1254.

- Garrido Frenich A., González- Rodríguez M.J., Arrebola F.J., Martínez Vidal J.L. (2005). "*Potential of gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry in vanguard and rearguard methods of pesticide residues in vegetables*". Analytical Chemistry 77, 4640-4648.
- Gracia-Lor E., Sancho J.V., Hernández F. (2010). "*Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*". Journal of Chromatography A 1217 (5), 622-632.
- Greulich A., Alder L. (2008). "*Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC-MS/MS*". Analytical and Bioanalytical Chemistry 391, 183-197.
- Grimalt S., Pozo O.J., Marín J.M., Sancho J.V., Hernández F. (2005). "*Evaluation of different quantitative approaches for the determination of non easily ionizable molecules by different atmospheric pressure interfaces used in liquid chromatography tandem mass spectrometry: Abamectin as case of study*" Journal of the American Society for Mass Spectrometry 16 (10), 1619-1630.
- Grimalt S., Sancho J.V., Pozo O.J., Hernández F. (2010). "*Quantification, confirmation and screening capability of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis*". Journal of Mass Spectrometry 45 (4), 421-436.
- Guillarme D., Schappler J., Rudaz S., Veuthey J. (2010). "*Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry*". Trends in Analytical Chemistry 29, 15-27.
- Hajšlová J., Holadová K., Kocourek V., Poustka J., Godula M., Cuhra P., Kempný M. (1998). "*Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues*". Journal of Chromatography A 800, 283-295.

- Hernández F., Sancho J.V., Pozo O.J., Villaplana C., Ibáñez M., Grimalt S. (2003). “*Rapid determination of Fosetyl-Aluminum residues in lettuce by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry*”. *Journal of AOAC International* 86 (4), 832-838.
- Hiemstra M., de Kok A. (2007). “*Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*”. *Journal of Chromatography A* 1154, 3-25.
- Ibáñez M., Guerrero C, Sancho J.V., Hernández F. (2009). “*Screening of antibiotics in surface and wastewater samples by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry*” *Journal of Chromatography A* 1216, 2529–2539.
- Jansson C., Pihlström T., Österdahl B.-G., Markides K.E. (2008). “*A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*”. *Journal of Chromatography A* 1023 (1), 93-104.
- Leandro C.C., Fussell R.J., Keely B.J. (2005). “*Determination of priority pesticides in baby foods by gas chromatography tandem quadrupole mass spectrometry*”. *Journal of Chromatography A* 1085 (2), 207-212.
- Lehotay S.J., Son K.A., Kwon H., Koesukwiwat U., Fu W., Maštovska K., Hoh E., Leepipatpiboon N. (2010). “*Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruit and vegetables*”. *Journal of Chromatography A* 1217, 2548-2560.
- Mellors J.S., Jorgeson J.W. (2004). “*Use of 1.5µm porous ethyl-bridged hybrid particles as a stationary phase support for reversed-phase ultra high-pressure liquid-chromatography*”. *Analytical Chemistry* 75, 5441-5450.

- Neue U.D. (2005). “*Theory of peak capacity in gradient elution*”. Journal of Chromatography A 1079,153–161.
- Okishashi M., Takatori S., Kitagawa Y., Tanaka Y. (2007). “*Simultaneous analysis of 260 pesticide residues in agricultural products by gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry*”. Journal of AOAC International 90, 1165-1179.
- Pihlström T., Blomkvist G., Friman P., Pagard U., Österdahl B-G. (2007). “*Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*”. Analytical and Bioanalytical Chemistry 389, 1773-1789.
- Richardson S. (2010). “*Environmental Mass Spectrometry: Emerging contaminants and current issues*”. Analytical Chemistry 82, 4742-4774.
- Sancho J.V., Ibáñez M., Grimalt S., Pozo O.J., Hernández F. (2005). “*Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry*”. Analytica Chimica Acta 530 (2), 237-243.
- Swartz M.E. (2005). “*UPLC: An introduction and review*”. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 28, 1253–1263.
- WADA. (2004). “*Identification criteria for qualitative analysis*”. Technical Document TD2003IDCR 1.2.
- Wang J., Leung D. (2009). “*Determination of 142 pesticides in fruit- and vegetable-based infant foods by liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry and estimation of measurement uncertainty*”. Journal of AOAC International 92 (1), 279-301.
- Wren S., Tchelitcheff P. (2006). “*Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development*”. Journal of Chromatography A 1119, 140-146.

1.2. Aplicación de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la determinación de plaguicidas problemáticos en muestras vegetales

1.2.1. INTRODUCCIÓN

1.2.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 3

Residue determination of captan and folpet in vegetable samples by gas chromatography/negative chemical ionization-mass spectrometry

Journal of AOAC International. (2006). Vol 89, No. 4, 1080-1087

1.2.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS

1.2.4. REFERENCIAS

1.2.1. INTRODUCCIÓN

Captan, [*N*-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide] y folpet [*N*-(trichloromethylthio)phthalimide] son dos fungicidas que pertenecen a la familia de las ftalimidias. Estos compuestos actúan por medio de reacciones con los grupos tiol y deshabilitan los procesos metabólicos que permiten la división celular y los procesos de respiración de un amplio espectro de microorganismos, proporcionando acciones curativas o de protección a las plantas. El *captan* es empleado en agricultura puesto que favorece el crecimiento sano de las hojas, proveyendo a éstas de más superficie fotosintética. El empleo de este fungicida hace que se obtenga una mayor producción de carbohidratos en las plantas, que conlleva una mayor calidad de los frutos. También puede tener usos post-cosecha, ya que es un producto que favorece la conservación de la fruta en las etapas de almacenamiento y transporte. A su vez, es un compuesto empleado, también, para el tratamiento de semillas, puesto que aporta protección adecuada contra

procesos denominados del “mal del complejo de hongos del suelo” y sobre aquellos hongos que se encuentren normalmente en las semillas (Fernández-Cruz et al, 2006).

Por su parte, el *folpet* también favorece el crecimiento sano de las hojas. Se emplea como fungicida en bayas, flores, plantas ornamentales, cultivos de diversas frutas y verduras, y en tratamientos de semillas. También tiene otros usos fuera del campo de la agricultura en el que se emplea como fungicida en pinturas y plásticos para tratamientos estructurales de diversas superficies o construcciones.

A pesar de los avances que se han registrado en los últimos años en tratamiento de muestra e instrumentación, las características físico químicas especiales de algunos pesticidas hacen que la inclusión de éstos en métodos multiresiduales sea prácticamente imposible, puesto que los resultados obtenidos al aplicar los métodos MRM desarrollados no son satisfactorios. Esto hace que resulte necesario desarrollar métodos individuales con tratamiento de muestra o condiciones cromatográficas específicas que se adecúen a sus características especiales. Como ejemplos de estos compuestos, que no resultan factibles de ser incluidos en métodos MRM, pueden citarse en el campo de LC-MS, el *fosetyl-aluminio* (Hernández et al, 2003), *etefón* (Marín et al, 2006), *melamina* y su producto de transformación *ciromazina* (Sancho et al, 2005) y el *glifosato* (Ibáñez et al, 2005). En el campo de GC-MS, mencionaríamos algunos compuestos a modo de ejemplo, como son *captan*, *folpet* (que nos ocupan en este Apartado), *captafol*, *clorotalonil*, *dicofol* y el grupo de los *ditiocarbamatos*. En el caso de *captan* y *folpet*, su determinación resulta especialmente problemática debido a su inestabilidad química y térmica.

El objetivo del trabajo presentado en el **Artículo científico 3** es desarrollar un nuevo método capaz de determinar conjuntamente los fungicidas *captan* y *folpet*, debido a las exigencias de la definición de residuo para estos compuestos (Real Decreto 280/1994), en matrices vegetales procedentes de cultivos menores que resultan de especial interés para la agricultura española. Se muestra la optimización de las condiciones referentes al método cromatográfico, parámetros de MS, así como del tratamiento de las distintas muestras a analizar. Una vez optimizados todos los

parámetros, se realiza la validación del método atendiendo a las directrices marcadas por la Guía Europea SANCO (SANCO/10476/2003) para así asegurar la calidad del procedimiento analítico desarrollado. También se realiza el análisis de muestras reales procedentes de estudios de campo realizados por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) con el objetivo de establecer los LMR para estos dos fungicidas en las matrices de caqui y coliflor. Todos estos análisis se han realizado en cumplimiento de los principios establecidos por las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

1.2.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 3

Residue determination of captan and folpet in vegetable samples by gas chromatography/negative chemical ionization-mass spectrometry

M.Barreda, F.J. López, M. Villarroya, J. Beltran, J.M. García-Baudín, F. Hernández

Journal of AOAC International. (2006). Vol 89, No. 4, 1080-1087

Residue Determination of Captan and Folpet in Vegetable Samples by Gas Chromatography/Negative Chemical Ionization–Mass Spectrometry

Mercedes Barreda^a, Francisco J. López^a, Mercedes Villarroya^b, Joaquim Beltran^a,
Jose María García-Baudín^b, Felix Hernández^a

^a Universidad Jaume I, Research Institute for Pesticides and Water, 12071, Castellón, Spain

^b Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Protección Vegetal, Carretera de la Coruña Km 7.5, 28040 Madrid, Spain

Abstract

A gas chromatography/negative chemical ionization-mass spectrometry (GC/NCI-MS) method has been developed for the simultaneous determination of the fungicides captan and folpet in khaki (persimmon; flesh and peel) and cauliflower. Samples were extracted with acetone in the presence of 0.1 M zinc acetate solution in order to avoid degradation of fungicides and were purified using solid-phase extraction with divinylbenzene polymeric cartridges. Purified extracts were evaporated and dissolved in hexane prior to injection into the GC/NCI-MS system. Isotope-labeled captan and folpet were used as surrogate/internal standards, and quantification was performed using matrix-matched calibration. The method showed linear response in the concentration range tested (50–2500 ng/mL). The method was fully validated with untreated blank samples of khaki (flesh and peel) and cauliflower spiked at 0.05 and 0.5 mg/kg. Satisfactory recoveries between 82 and 106% and relative standard deviations lower than 11% in all cases ($n = 5$) were obtained. The limit of detection for both compounds were estimated to be 0.01 mg/kg. The developed method has been applied to treated and untreated samples collected from residue trials.

Captan [*N*-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2- dicarboximide] is a fungicide of the phthalimide group (*N*-trihalomethylthio derivative) with protective and curative action by inhibiting some process of respiration and metabolism of fungi as a nonspecific thiol reactant. Captan is widely used in many countries around the world. In Spain, it is applied for the control of anthracnose, brown rot, and scab in fruit trees and for the control of anthracnose, *Botrytis* spp., and mildew in vegetables. Folpet [*N*-(trichloromethylthio) phthalimide] is also a fungicide of the phthalimide group with protective action by inhibiting respiration as a nonspecific thiol reactant, and it is used for control of mildew, leaf spot diseases, scab, etc., in several crops (1–3).

Determination of captan and folpet residues in plant materials is usually performed by gas chromatography (GC) using electron capture detector (ECD; 2, 4–6) or mass spectrometry (MS) detection, which is used for confirmation (7, 8) or quantification (9–11).

Most of references dealing with GC/MS analysis described use electron impact (EI) mode (7–10), although GC/MS in the chemical ionization (CI) mode (12–14) has been used to determine these pesticides in vegetable samples. Typically, chromatograms obtained using GC/CI-MS are cleaner due to the minimization of background interferences and because there is less chance for interferences from ions derived from the sample matrix than when using EI.

Folpet has been usually determined by GC, although liquid chromatography (LC/MS) with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) has also led to satisfactory results for its residue determination in some crops (14).

There is a shortage of specific analytical methods for captan and folpet determination (2, 4, 10, 15, 16) because most references deal with multiresidue methods (MRM) based on GC/MS. Surprisingly, satisfactory recoveries have been reported in several multiresidue, multiclass methods, in spite of obvious analytical problems for captan and folpet. Lehotay et al. (17) summarized their wide experience with these analytes, considering them as problematic pesticides that easily degrade during sample preparation, GC injection, and/or in solution. Thus, it is not surprising that <70% recoveries were obtained for these analytes.

Several problems have been described for the determination of captan and folpet by different authors, which illustrates the difficulties involved in the determination of these compounds at the residue level. The main problems deal with the degradation and instability

of these compounds due to the *N*-trihalomethylthio functional group. The instability can be due to several factors: (1) instability due to sunlight (15), which degrades folpet by a first-order kinetics with a half-time ($t_{1/2}$) of approximately 19 days to unknown products that are not assignable to phthalimide, phthalamic, and phthalic acids (the same behavior is supposed for captan). (2) effect of different solvents, including variability due to the lot. Mařtovská and Lehotay (18) have recently studied the effect of different solvents in the analysis of several pesticides, including the group of *N*-trihalomethylthio fungicides. Among others, the stability of captan and folpet under different conditions was discussed, and important factors were found to be the light, pH, and GC conditions. (3) Hydrolysis of captan and folpet in aqueous media depending on the pH has been reported by several authors (2, 15). Thus, a pH-dependent pseudo-first-order rate reaction for captan in water was reported for a pH range between 2 and 6. For alkaline hydrolysis (pH between 7 and 9), a second-order rate reaction was found. Besides, it is already known that at basic pH in certain solvent and matrix environments, captan and folpet degrade to the corresponding phthalimides (19). (4) Captan degradation under certain GC conditions has also been reported (16). The same problem may occur for folpet, so LC methods might be more convenient for this compound. Noticing the possibility of degradation during the sample preparation or GC analysis, GC-amenable degradation products were monitored to help with the identification. Their presence was taken as indicative of parent compounds (9).

The Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) has performed several residue trials for captan in 2 minor crops that are of special interest in Spain, khaki (persimmon *Diospyros kaki L.f.*) and cauliflower (*Brassica oleracea* convar. *Botrytis L.*), in order to establish the maximum residue level (MRL) for this fungicide. Because the residue amount for captan in fruits and vegetables is given as the sum of captan + folpet, the application of reliable analytical methodology for the simultaneous determination of both captan and folpet was necessary. Besides, the chromatographic response detected in the developed method should be truly due to the analyte included in the residue definition, rather than to a degradation product generated during the analytical process (20).

Given the well-documented problems of lack of stability of captan and folpet under typical GC temperature conditions and the degradation processes observed in some aqueous/organic solutions, the aim of this work was to develop a sensitive and reliable

analytical GC/MS method for determination of these problematic compounds in khaki (flesh and peel) and cauliflower. The proposed method has been validated in compliance with good laboratory practices (GLP) and following the European SANCO guidelines (20, 21).

Experimental

Reagents and Chemicals

(a) *Pesticide standards.*—98–99.5% purity captan and folpet reference standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Promochem, Wesel, Germany). Individual stock solutions (ca 500 µg/mL) were prepared by dissolving the standards in acetone and then stored at –20°C. Working standard solutions of pesticide mixtures for sample fortification and calibration were prepared by diluting stock solutions in acetone and then stored at 4°C.

(b) *Internal standards.*—Captan-D₆ and folpet-D₄ (Dr. Ehrenstorfer) were used as surrogate/internal standards. Individual stock and working solutions of labeled standards were prepared by diluting commercially available standards (ca 100 µg/mL) in acetone and stored at –20°C.

(c) *Acetone, hexane, and dichloromethane.*—Ultratrace analysis quality (Scharlab, Barcelona, Spain).

(d) *Zinc acetate dihydrated.*—Extra pure grade (Scharlab).

(e) *Water.*—HPLC grade; obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II System (Barnstead, Newton, MA).

(f) *Solid-phase extraction (SPE) cartridges.*—Supelclean EnviChrom P (500 mg, 6 mL; Supelco, Bellefonte, PA).

Samples

Fresh khaki and cauliflower samples from field residue trials were collected by INIA. Peel and flesh were separated manually in khaki samples. All samples (khaki peel, khaki flesh, and cauliflower) were thoroughly triturated using a K55 Homogenizer (Dito Sama, Aubussen, France) and stored at –20°C. Homogenized blank samples from untreated plots were used for method validation and preparation of quality control (QC) samples.

GC Analysis

Chromatographic analysis was performed using an Agilent 6890 Series gas chromatograph equipped with a CIS-4 programmed temperature vaporizer (PTV) injector

(Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Germany), a Multipurpose SamplerMPS2 (GerstelGmbH&Co. KG), and a single quadrupole mass spectrometer (Model No. 5973N; Agilent Technologies, Wilmington, DE) working in the negative chemical ionization (NCI) mode using methane as the reagent gas. The injector temperature program started at 40°C, and then it was raised at 10°C/s to 150°C (0.5min).The oven temperature was programmed as follows: 90°C (1min), 30°C/min to 200°C, 4°C/min to 250°C, and a final hold for 4.83 min. Pulsed splitless injections were done with an initial pressure of 25.0 psi (1.5 min) and a constant pressure of 8.74 psi for the rest of the analysis using a CIS4 glass liner baffled and deactivated (Gerstel GmbH & Co. KG). A simple volume of 2 µL was injected onto a 30 m × 0.25 mm id, 0.25 µm HP-5MS (5% phenyl methyl siloxane) column (J&W Scientific, Folson, CA). Helium was used as the carrier gas.

MS Analysis

Experimental MS parameters were the following: source and transfer line temperatures 150 and 250°C, respectively; electron multiplier potential 3000 V; and multiplier gain 2732. Ions selected from NCI-MS spectra for quantification were m/z 150 (captan), 156 (captan-D₆), 146 (folpet), and 150 (folpet-D₄).

Sample Preparation

Homogenized sample (20 g cauliflower or khaki flesh and 10 g khaki peel) was accurately weighed, and 10 mL 0.1 M zinc acetate dihydrate solution (15mL for cauliflower in order to cover completely the whole sample) and 1 mL of mixed solution of internal standards (500 ng/mL) were added. The sample was extracted with 60 mL acetone for 2 min using a high-speed blender (Ultraturrax T25, Janke & Kunkel, Staufen, Germany) at 8000 rpm. The entire extract was passed through filter paper and washed with 25 mL acetone, and the final volume was adjusted to 100 mL with acetone. Then, the raw acetone extract was diluted 5-fold with water (i.e., a 20 mL aliquot was diluted to 100 mL with HPLC water).

The diluted extract (100 mL) was passed through an SPE cartridge previously conditioned by passing 4mL acetone and 4 mL water. The cartridges were dried by passing nitrogen for 30 min, and then they were eluted with 8 mL dichloromethane. The eluate was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream at 40°C, and the residue was dissolved in 1 mL hexane. Finally, a 2 µL aliquot was injected into the GC/MS system. Captan and folpet quantification was performed by the internal standard method using their respective labeled

internal standards (captan-D₆ and folpet-D₄). Calibration was performed with matrix-matched standards prepared from a blank matrix.

Validation Study

The analytical method developed was fully validated for the vegetable matrixes studied: peel khaki, flesh khaki, and cauliflower. The matrix-matched calibration curve was obtained by analyzing in triplicate 8 standard solutions at concentrations between 50 and 2500 ng/mL for both fungicides. Matrix-matched standards were prepared using blank untreated samples that were extracted accordingly to the sample preparation procedure. After extraction, 1 mL of the internal standard solution (100 ng/mL) and 1 mL of different standard solutions of captan and folpet were added to 20 mL of blank raw extract, diluting finally with water to 100 mL. Then, the diluted extract was submitted to SPE as indicated above.

The selectivity of the method was evaluated by injecting in turn a procedure blank; peel and flesh khaki and cauliflower blank samples; and blank samples spiked at the lowest fortification level assayed (i.e., 0.05 mg/kg). The response obtained for the blank samples should not exceed 30% of the response corresponding to the limit of quantification (LOQ).

The accuracy of the method was estimated by means of recovery experiments, which were performed at 2 concentration levels (0.05 and 0.5 mg/kg). All experiments were carried out with 5 replicates. Fortification of samples was performed by delivering appropriate volumes of mixed standard solutions in acetone to blank samples. The spiked samples were then equilibrated for 1 h prior to the extraction procedure. Precision of the method (repeatability) was evaluated within the same day at each recovery level, and it was calculated in terms of relative standard deviation (RSD) for 5 replicates.

The limit of detection (LOD), defined as the minimum concentration or mass of the analyte that can be detected with acceptable certainty but not quantifiable with acceptable precision, was estimated as the quantity of analyte that generated a response 3 times greater than the noise level (20). It was estimated from the chromatogram corresponding to the lowest point used in the matrix-matched calibration.

The LOQ was established as the lowest concentration that was validated in the samples with acceptable recoveries (between 70 and 110%) and precision (lower than 15%; 20).

Results and Discussion

According to our experience, we can corroborate that stability and degradation problems for captan and folpet exist, and they depend in a great deal on minor changes in the experimental conditions. The effects on method robustness lead to satisfactory recoveries in a set of experiments while in others the results are unsatisfactory with unacceptable, high RSD values. We studied in depth the analytical parameters that could affect this problematic determination. Not only were MS conditions studied and optimized but also, and particular, GC and sample preparation conditions in order to develop a robust method that could be used to measure their residues in selected minor crops and to establish the MRLs in this type of vegetable matrix.

Method Optimization

Chromatographic and MS conditions.—According to the literature available, the first approach used for the determination of captan and folpet was based on the use of GC/MS in the EI mode (70 eV). Chromatographic conditions used were similar to those described in other papers (7–9). From these preliminary experiments, it seemed evident that captan and folpet were degraded both by chemical processes (when dissolved in methanol) and/or by thermal degradation (when heated to 250°C in the gas chromatograph injection port). In both cases, captan and folpet were degraded to their correspondent phthalimides according to the reactions shown in Figure 1, which fit with the mass spectra obtained after injection of standards under these conditions.

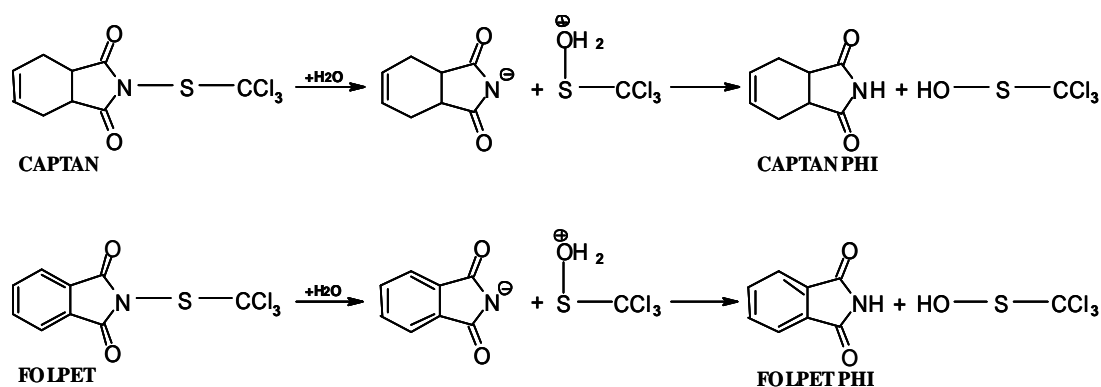


Figure 1: Structures for captan and folpet and their corresponding phthalimides (PHI) (main degradation products)

As a consequence, all pesticide standard solutions (stock and working solutions) were prepared in acetone, and the effect of the injection port temperature (working in the splitless mode) was studied. Repeated injections of a mixed standard of captan and folpet at 2.5 µg/mL using different injection temperatures (150–250°C) were made. Chromatograms obtained showed that at higher temperatures peaks for captan and folpet still could be observed, but the corresponding phthalimides were also present. With decreasing injection temperature, degradation of pesticides became negligible, and it was not observed at 150°C (Figure 2).

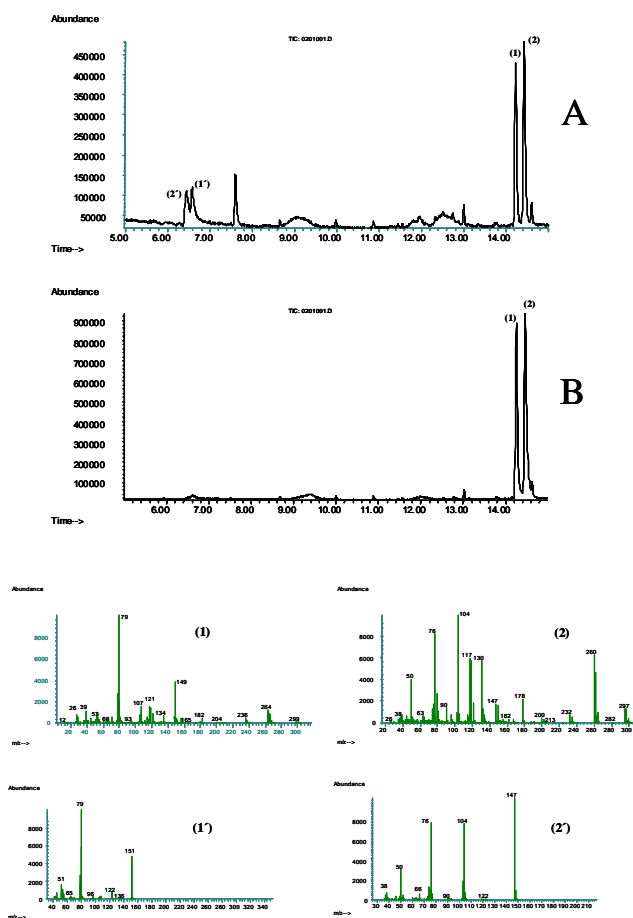


Figure 2: Effect of GC injection temperature on captan and folpet degradation. GC/EI-MS chromatograms [total ion current (TIC)] for captan and folpet standard solutions (2.5 µg/mL) with an injection temperature of 250°C (A) and 150°C (B). At the bottom, the full-scan spectra confirming the peak identity of (1) captan, (2) folpet, (1') captan PHI, and (2') folpet PHI.

Even with injection at 150°C, several problems still remained, mainly the poor repeatability of standard injections that led to RSD around 20% ($n = 10$), which was unacceptable. Precision was improved by using a pulsed splitless injection mode (initial pressure 25 psi, initial time 1.5 min, then constant pressure at 8.8 psi), which lowered the RSD to around 10% ($n = 10$). The pressure pulse used allowed a quicker and more efficient transfer of the analytes to the chromatographic column, thereby decreasing thermal degradation and improving repeatability. In a latter experiment, the chromatographic system was equipped with a PTV injector that was operated in the pulsed-splitless mode (vent valve closed during injection) at an initial temperature of 40°C (obtained with a Peltier cooling system) and then, immediately after injection, heated at 10°C/s until 150°C. Using this system, we obtained the recognized advantages of PTV injection regarding the adequate transfer of thermally unstable compounds without (or with negligible) degradation in the injection step (11, 13). The use of PTV injection was found to be the most convenient option and led to satisfactory results in terms of repeatability.

Once the injection conditions were optimized for both captan and folpet, the sensitivity was still not sufficient to achieve the required LOQ, which was initially established at 0.05 mg/kg for the vegetable matrixes studied. Considering the chemical structures of these pesticides, the use of NCI seemed to be an attractive option in order to improve the signal-to-noise ratio. Optimum conditions for NCI-MS using methane were selected according to the information provided by the GC/MS instrument (*see Experimental*). Using NCI, the sensitivity of the GC/MS determination was increased by a factor of 15 compared to EI (Figure 3).

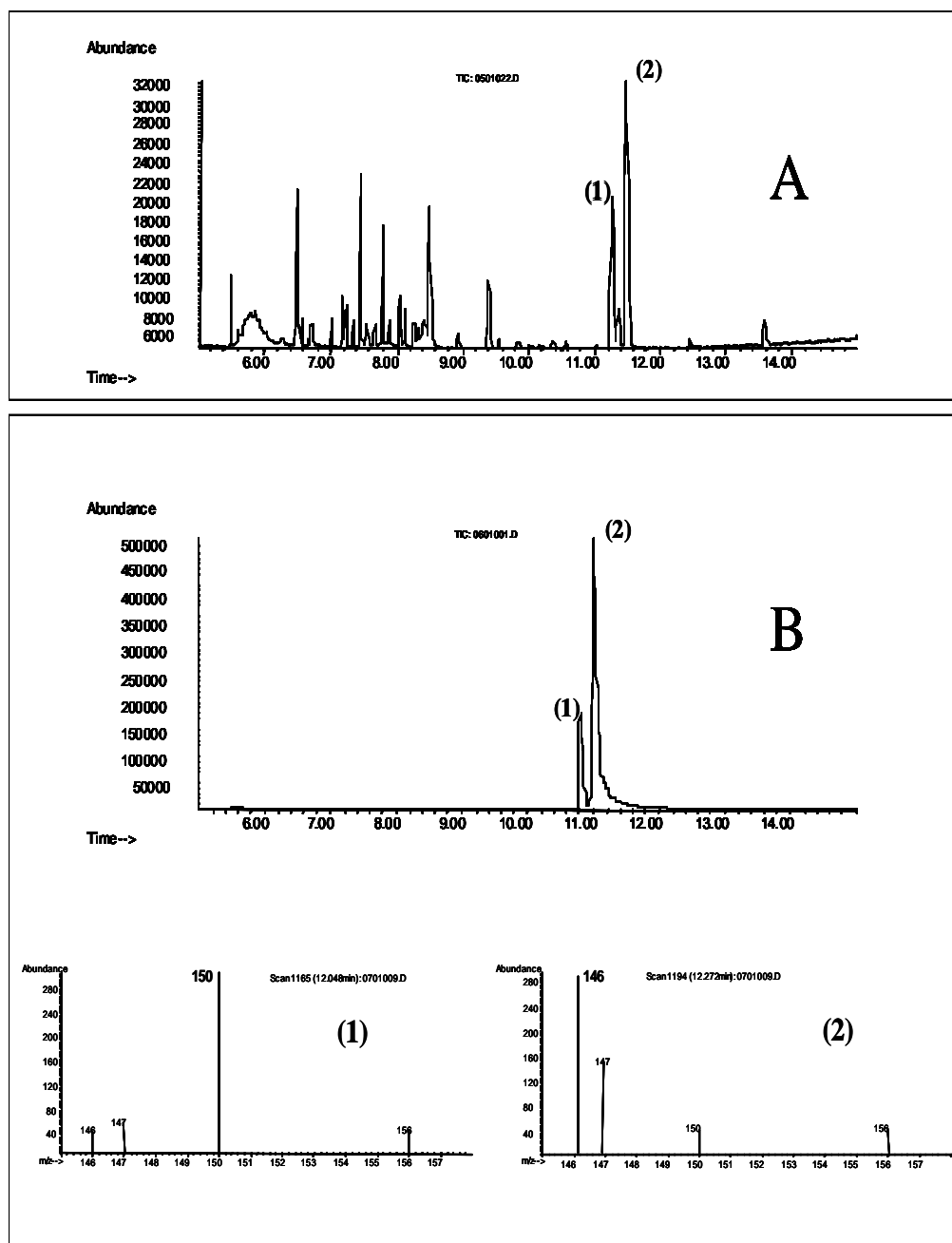


Figure 3: GC/EI-MS (A) and GC/NCI-MS (B) chromatograms (TIC) with the corresponding full-scan spectra of captan (1) and folpet (2) standard solutions (500 ng/mL). See the abundance response.

Sample preparation.—The sample preparation step also proved to be critical for the accurate determination of residues of captan and folpet in vegetables. First, an extraction with acetone (blending) followed by extract purification by liquid–liquid extraction (LLE) in a 3-phase system of acetone–water–dichloromethane was studied. Unsatisfactory results were obtained due to the well-described problems associated to LLE (22). The production of emulsions that could not be properly eliminated led to low recoveries, especially when dealing with khaki flesh extracts. As an alternative, the use of SPE was tested as a cleanup procedure. Preliminary experiments, carried out with standard solutions in hexane using silica gel cartridges, led to poor recoveries for both compounds, probably due to their chemical characteristics. Because the sample extract solvent was acetone with a high water content, the use of divinylbenzene polymeric cartridges was chosen as a better option after dilution of the acetone extract with HPLC grade water. The optimization of the SPE step was first carried out with standards in aqueous solutions considering several parameters: percentage of acetone in the extract (10 and 20% of acetone in water); eluting solvent (hexane and dichloromethane); maintaining a fixed cartridge mass (500 mg) and type (Supelclean ENVI-Chrom P SPE Tubes, 6mL); sample volume (100 mL of acetone extract diluted with water); and elution volume (8 mL).

No differences were observed when using 10 or 20% acetone in the diluted extracts. Thus, 20% acetone was selected because better sensitivity could be achieved as a result of the lower dilution factor. This acetone percentage was reached by diluting 20 mL of the acetone sample extract to 100 mL with water. The use of dichloromethane as the eluting solvent led to better recoveries (nearly 100%) than hexane (50–80%).

After the sample treatment for standards was optimized, it was applied to spiked samples (khaki and cauliflower), but the recoveries obtained were low (about 40%). Similar results have been reported by Tonogai et al. (23), who suggested that low recoveries for these pesticides were not related to the extraction methodology but the degradation of analytes during the spiking step. These authors recommended the addition of zinc acetate to the sample in order to avoid degradation of captan and folpet. Therefore, we added zinc acetate dihydrate solution (0.1M) to the homogenized sample immediately before spiking the sample with the pesticide standard solutions (prepared in acetone; Figure 4).

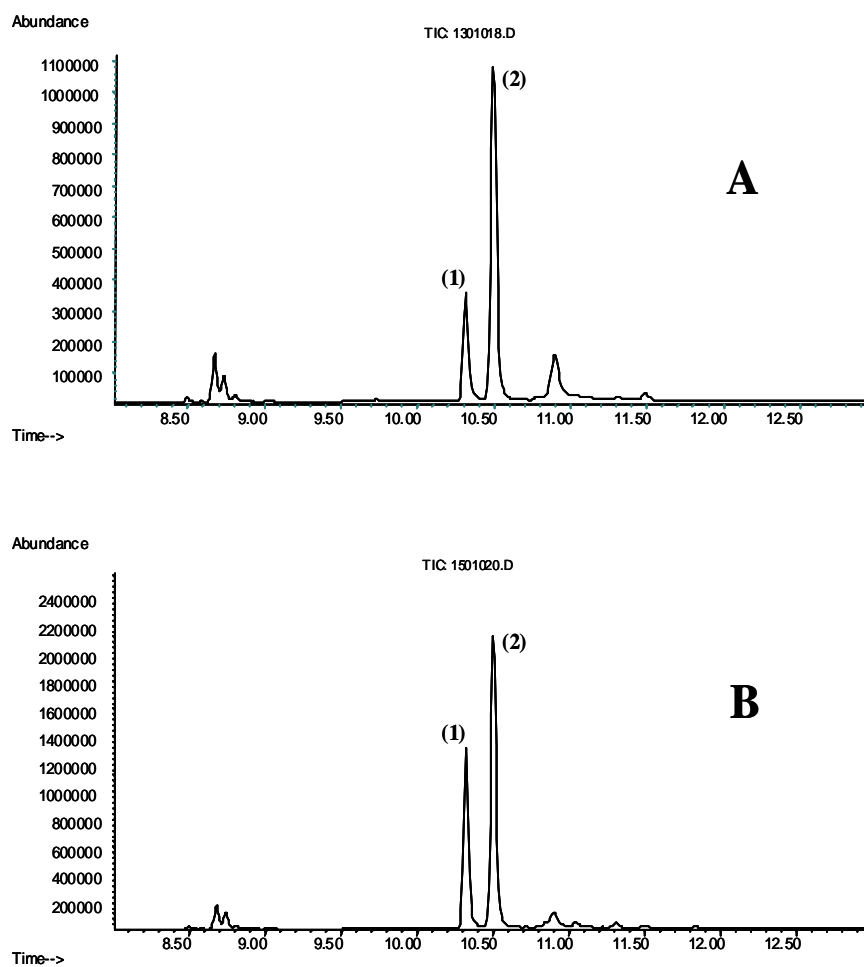


Figure 4: Effect of zinc acetate on captan and folpet degradation. Chromatograms (TIC) for khaki flesh samples spiked with captan (1) and folpet (2) obtained in the EI mode without adding 0.1 M zinc acetate to the sample extract (A) and with addition of 0.1 M zinc (B). See the abundance response.

Unfortunately, the samples were chopped immediately when arriving at the laboratory, so the effect of adding zinc acetate before/during chopping could not be evaluated. To avoid possible degradation during sample preparation, it is best to add the preservative during the chopping process, as in the Japanese official analytical method for captan, captafol, and folpet in fruits and vegetables (24). Under these conditions, and using the recommended procedure indicated in the *Sample Preparation* section above, the recoveries of the overall analytical procedure were satisfactory. The use of labeled internal standards allowed us to improve the

overall precision of the method, and it was found to be convenient and produced reliable results.

Method Validation

The proposed method was validated for the 3 matrixes studied in this work: cauliflower, khaki flesh, and khaki peel. The validation scheme followed was that of our standard operation procedure (SOP), which is based on the SANCO European Guidelines (20). The validation study was performed in compliance with the principles of good laboratory practices (OECD).

Linear calibration curves were obtained for matrix-matched standards of captan and folpet in the range of 50–2500 ng/mL, with correlation coefficients higher than 0.99. Regarding selectivity, no responses were detected for either the procedure blank or the sample matrix blanks. As Table 1 shows, the method had satisfactory precision (RSD <4% for captan and RSD <8% for folpet) and accuracy, with recoveries near 100% for both compounds in all matrixes studied and for both fortification levels (average recovery between 82–107%). The LOQ corresponded to the lowest fortification level that was validated (0.05 mg/kg) for both fungicides. LOD was estimated from the lowest concentration point used in the matrix-matched calibration, and it was found to be 0.01 mg/kg.

Table 1: Analytical characteristics of the GC/NCI-MS method developed

Fungicide		Khaki flesh		Khaki peel		Cauliflower	
		0.05 mg/Kg	0.5 mg/Kg	0.05 mg/Kg	0.5 mg/Kg	0.05 mg/Kg	0.5 mg/Kg
Captan	Recovery ^a	98	94	100	97	85	87
	Precision, % ^b	3	1	4	1	2	2
	Reproducibility ^c	102 (6)	102 (11)	106 (8)	101 (11)	101 (6)	91 (119)
Folpet	Recovery	107	105	97	93	82	104
	Precision, %	4	2	2	7	3	8
	Reproducibility	112 (13)	106 (14)	103 (5)	105 (9)	106 (8)	110 (10)

a Mean recovery (%), *n* = 5.

b Expressed as repeatability (RSD, %), *n* = 5.

c Estimated from the quality control samples (LOQ and 10 x LOQ) analyzed in every series of samples. Expressed as average recovery and RSD (%), *n* = 8.

Analysis of Real Samples

Once the method was validated, it was applied to the analysis of 56 khaki (28 peel and 28 flesh) and 28 cauliflower samples from different field residue trials carried out by INIA. In spite of the residue definition (captan + folpet), folpet was not detected in any sample because the test item applied in the field studies was a captan-formulated product. Every 4 samples (8 injections as every sample was injected in duplicate), 2 QC samples (1 at the LOQ level and the other at $10 \times \text{LOQ}$) were included in the analysis sequence. Satisfactory QC recoveries were obtained, showing the robustness of the method during several days of analysis (*see* Table 1). Figure 5 shows selected chromatograms for all of the matrixes analyzed. As expected, captan was not detected in samples from untreated plots, and the results in treated samples were in accordance with the postharvest intervals in the experiments corresponding to dissipation curves. Average residues (mg/kg) in samples collected at harvest were 0.13 (khaki flesh), 5.75 (khaki peel), and 0.23 (cauliflower).

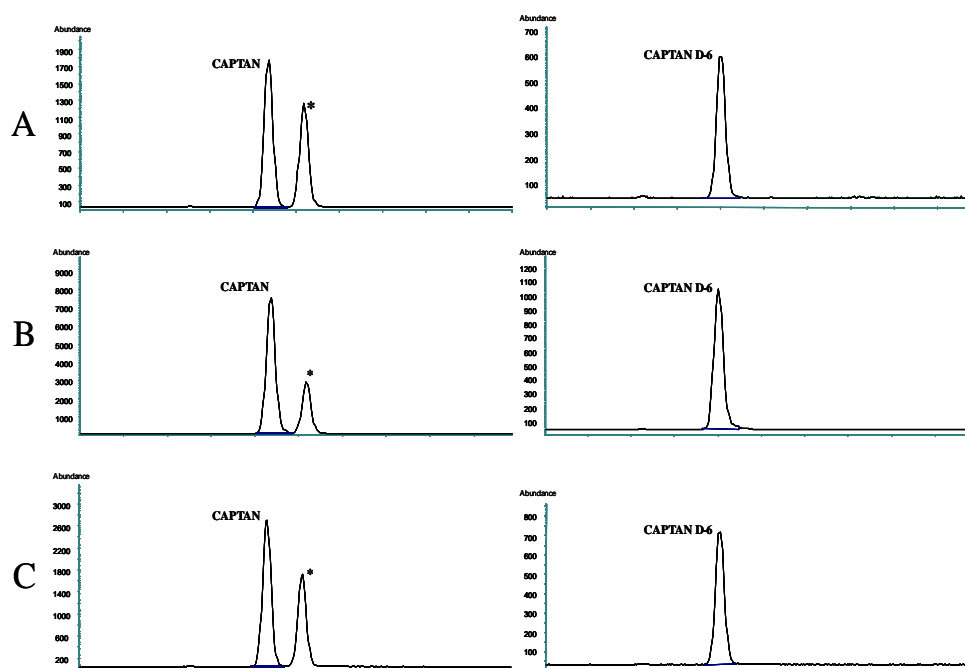


Figure 5: GC/NCI-MS chromatograms (TIC) obtained in the analysis of treated samples from field residue trials: (A) cauliflower, (B) khaki peel, and (C) khaki flesh. The peak marked “*” corresponds to folpet-D₄. Both captan-D₆ (m/z 156) and folpet-D₄ (m/z 150) were added as surrogates in the analysis of real samples. The ion selected for monitoring folpet-D₄ was the same as for captan (m/z 150).

Conclusions

This work has shown the difficulties associated with the residue determination of captan and folpet in vegetables, mainly due to the degradation of these compounds during the analytical procedure. The use of GC with conventional injection facilitated thermal degradation of the pesticides in the injector. In the method developed, the use of PTV injection allowed the accurate determination of both compounds by GC/MS without thermal degradation. As well, the use of the NCI-MS mode increased the sensitivity of the method compared with the EI mode, providing the sensitivity required to easily reach the required LOQ (0.05 mg/kg). Additionally, it was necessary to add the preservative zinc acetate to the samples in order to avoid degradation of the fungicides during the extraction process.

The method developed allowed the simultaneous residue determination of captan and folpet in the 3 vegetable matrixes studied (khaki flesh and peel and cauliflower) with satisfactory recoveries and precision. It has been applied to the analysis of khaki and cauliflower samples from residue trials, proving its robustness and adequacy for establishing the MRLs in these minor crops.

References

- (1) British Crop Protection Council (1997) *The Pesticide Manual*, 11th Ed., C.D.S. Tomlin (Ed.), Farnham, UK
- (2) Frank, R., Northover, J., & Braun, H.E. (1985) *J. Agric. Food Chem.* **33**, 514–518
- (3) U.S. Environment Protection Agency (1999) *Prevention Pesticides and Toxic Substances (7508C)*, EPA-738-F99-015 and EPA-738-F99-016
- (4) Cabras, P., Angioni, A., Caboni, P., Garau, V.L., Melis, M., Pirisi, F.M., & Cabitza, F. (2000) *J. Agric. Food Chem.* **48**, 915–916
- (5) Kiigemagi, U., Inman, R.D., Mellenthin, W.M., & Deinzer, M.L. (1991) *J. Agric. Food Chem.* **39**, 400–403
- (6) Sannino, A., Bandini, M., & Bolzoni, L. (1999) *J. AOAC Int.* **82**, 1229–1238
- (7) Columé, A., Cárdenas, S., Gallego, M., & Valcárcel, M. (2001) *Anal. Chim. Acta.* **436**, 153–162
- (8) Taube, J., Vorkamp, K., Förster, M., & Herrmann, R. (2002) *Chemosphere* **49**, 1357–1365
- (9) Štajnbaher, D., & Zupan_i_-Kralj, L. (2003) *J. Chromatogr. A* **1015**, 185–198
- (10) Angioni, A., Garau, V.L., Aguilera del Real, A., Melis, M., Minelli, E.V., Tuberoso, C., & Cabras, P. (2003) *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6761–6766
- (11) Mattern, G.C., Singer, G.M., Louis, J., Robson, M., & Rosen, J.D. (1990) *J. Agric. Food Chem.* **38**, 402–407
- (12) Niessner, G., Buchberger, W., & Eckerstorfer, R. (1999) *J. Chromatogr. A* **846**, 341–348
- (13) Mattern, G.C., Liu, C.H., Louis, J.B., & Rosen, J.D. (1991) *J. Agric. Food Chem.* **39**, 700–704
- (14) Gimeno, R.A., Aguilar, C., Marcé, R.M., & Borrull, F. (2001) *J. Chromatogr. A* **915**, 139–147
- (15) Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Melis, M., Pirisi, F.M., Farris, G.A., Sotgiu, C., & Minelli, E.V. (1997) *J. Agric. Food Chem.* **45**, 476–479
- (16) Büttler, B., & Hörmann, W.D. (1981) *J. Agric. Food Chem.* **29**, 257–260
- (17) Lehotay, S.J., Kok, A., Hiemstra, M., & van Bodegraven, P. (2005) *J. AOAC Int.* **88**, 595–614

- (18) Maštovská, K., & Lehotay, S.J. (2004) *J. Chromatogr. A* **1040**, 259–272
- (19) Lehotay, S.J., Maštovská, K., & Lightfield, A.R. (2005) *J. AOAC Int.* **88**, 615–629
- (20) *Quality Control Procedures for Pesticide Residue* (2004) European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Commission Working Document SANCO/10476/2003
- (21) *Residues: Guidance for Generating and Reporting Methods of Analysis in Support of Preregistration Data Requirements, Annex II and Annex III of Directive 91/414* (2000) European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Commission Working Document SANCO/3029/99
- (22) *Official Methods of Analysis* (2000) 17th Ed., W. Horwitz (Ed.), AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, Chapter 10, p. 5
- (23) Tonogai, Y., Tsumura, Y., Nakamura, Y., Matsuki, H., & Ito, Y. (1992) *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* **38**, 270–281
- (24) Japanese Official Analytical Method for Captan, Captafol, and Folpet in Fruits and Vegetables (November 2005) (in Japanese)
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/2-045.html>

1.2.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

El principal problema al que hubo que hacer frente en el presente estudio fueron los problemas de estabilidad que presentaron los fungicidas estudiados, lo cual está bien documentado en la bibliografía (Cabras et al, 1997; Štajnbaher et al, 2003; Lehotay et al, 2005; Bailey et al, 2007). Resulta necesario resolver estos problemas si atendemos a la definición de residuo de estos compuestos, ya que la respuesta final en el análisis de *captan* y *folpet* debe ser procedente de los compuestos originales y no de sus productos de degradación (SANCO/10476/2003). Aunque existen métodos en la bibliografía en los que se determinan estos compuestos (incluso forman parte de métodos multiresiduo) y en más de una ocasión no se reportan problemas asociados a su análisis, obteniendo buenos resultados de recuperación. Sin embargo, al examinar los trabajos se observa que los resultados reportados corresponden generalmente a los productos de degradación del *captan* y *folpet* que son los que realmente se determinan en los métodos basados en GC.

Las primeras experiencias que se realizaron fueron para desarrollar y optimizar el método cromatográfico. Se inyectaron patrones individuales de cada uno de los compuestos haciendo uso de GC-MS en modo EI para así obtener los espectros en modo *full scan*. Estas experiencias se realizaron empleando unas condiciones típicas de GC como son una energía de 70 eV y una inyección tipo *splitless* con una temperatura del inyector de 250°C. En esta primera aproximación ya se pudo observar la degradación debida a la alta temperatura del inyector, pues los cromatogramas obtenidos presentaban picos correspondientes a los productos de degradación de los compuestos, sus ftalimidas (**Figura 2 del Artículo científico 3**). Para evitar estos problemas de degradación térmica, se realizaron diferentes pruebas disminuyendo la temperatura del inyector hasta 150°C. A esta temperatura ya no se observaron en el cromatograma los picos correspondientes a los productos de degradación de los analitos, por lo que se consideró como temperatura óptima de inyección. Al comprobar la reproducibilidad de los resultados inyectando el mismo patrón 10 veces seguidas se observó que no era adecuada ya que la desviación standard era demasiado elevada. Por ello, se cambió el modo de inyección (*splitless*), y se

optó por el empleo de un pulso de presión, de modo que la transferencia de los analitos a la cabeza de columna se realizase de una manera más rápida y eficaz, minimizando también el tiempo de residencia de los analitos en el inyector. De este modo, se evitaban también los problemas de degradación térmica que se han comentado anteriormente. Llegados a este punto, los problemas de degradación térmica parecían estar solventados. No obstante, se pudo emplear un inyector PTV (*Programmable Temperature Vaporization*) recientemente adquirido en nuestro laboratorio, capaz de realizar una inyección inicialmente en frío ($T=40^{\circ}\text{C}$), mediante un sistema de enfriamiento tipo Peltier, aumentando la temperatura rápidamente, ($v=10^{\circ}\text{C/s}$), hasta llegar a 150°C . Este modo de inyección fue considerado el más adecuado para solventar los problemas de inestabilidad térmica y reproducibilidad que se habían presentado. También, puesto que los compuestos marcados isotópicamente de estos analitos se encontraron disponibles comercialmente, se decidió emplearlos como patrones internos, de modo que ayudaron a mejorar la precisión del método.

Aparte de los problemas de degradación térmica ya comentados, también se hizo patente la degradación química de los compuestos al emplear metanol como disolvente de preparación de los patrones, dando lugar a la obtención de picos cromatográficos de las ftalimidas correspondientes. Finalmente, el disolvente escogido para la preparación de los patrones fue acetona. Por ello, se descartó el uso de metanol en cualquier paso del procedimiento analítico para así evitar la degradación química observada.

Para la optimización del método se realizaron pruebas de extracción en pulpa de caqui empleando diferentes disolventes orgánicos o mezclas de éstos, como son acetona, hexano, mezclas acetona:hexano y mezclas acetonitrilo:agua. Se pretendía desarrollar un método que consistiera en una extracción con disolvente orgánico seguida de una etapa de purificación basada en partición líquido-líquido, pero ninguna de las pruebas realizadas dio resultados satisfactorios debido a la formación de emulsiones como consecuencia de la naturaleza y composición de la matriz estudiada. Así pues, se optó por realizar pruebas basándose en una extracción con disolvente orgánico (acetona) seguida de una etapa de SPE.

Para la optimización de la etapa de SPE se realizaron experiencias preliminares empleando cartuchos de sílica en los que se cargaron disoluciones patrón preparadas en hexano. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios para ninguno de los dos compuestos en ninguna de las variaciones ensayadas. Se optó por cambiar el tipo de sorbente escogiendo cartuchos de tipo polimérico, en concreto con fase divinilbenceno ya que este tipo de resina en comparación con la sílica presenta una mayor capacidad de retención de compuestos con carácter hidrofóbico, y tiene menor limitación en cuanto al pH de los extractos (Winefordner, 2003). Este tipo de sorbente también resultaba adecuado y compatible con el disolvente de extracción escogido (acetona) y con el elevado contenido en agua que presentaban los extractos de muestra. Se escogieron como condiciones fijas el tipo de sorbente (Supelclean ENVI-Chrom P SPE, SUPELCO) y la cantidad de éste, 500mg. También se mantuvieron como valores fijos el volumen de muestra (100 mL de extracto de acetona diluido con agua) y el volumen de disolvente de elución. Para optimizar la etapa de carga, se probaron extractos con contenido orgánico del 10% y del 20% en acetona. No se observaron diferencias considerables en los resultados obtenidos al emplear los diferentes porcentajes de acetona, por lo que se descartaron posibles pérdidas por *breakthrough* y se escogió el del 20% ya que suponía un factor de dilución menor de los extractos, con la consecuente mejora en la sensibilidad del método. También se realizaron ensayos evaluando diferentes disolventes de elución. Se realizaron pruebas con diclorometano y hexano, obteniendo mejores resultados al emplear el primero.

Una vez optimizada la etapa de extracción con patrones, se reprodujeron las condiciones con las matrices objeto de estudio, (pulpa de caqui, piel de caqui y coliflor). Se fortificaron alícuotas de extractos de muestras a los niveles de LOQ y 10 LOQ y se aplicó el método desarrollado y probado satisfactoriamente para patrones. Las recuperaciones no superaron el 40% en ninguna de las réplicas analizadas. De este modo, se comprobó que los analitos al entrar en contacto con la matriz sufrían una importante degradación, tal como indican algunos autores (Alary et al, 1995; Akiyawa et al, 1998) pues las bajas recuperaciones obtenidas al analizar estos fungicidas no se debían a

problemas en la metodología de extracción, sino a la degradación sufrida por contacto con la matriz procesada. Esta degradación podría ser solventada mediante el empleo a lo largo del proceso de análisis de ciertas sustancias que actúan como protectores de los analitos. Esta estrategia es empleada para minimizar los efectos de degradación que ocurren en algunos métodos de GC, de modo que los protectores añadidos compiten con el analito, de forma eficaz, ocupando los sitios activos presentes en los sistemas de inyección de GC (Anastassiades et al, 2003; Maštovska et al, 2005). Tonogai *et al* (1992) mencionan que ciertos componentes presentes en la matriz ocasionan la degradación de *captan*, *folpet* y *captafol* obteniendo para éstos unas recuperaciones muy bajas. Estos autores proponen un método de purificación que consiste en adicionar, previo tratamiento de la muestra, una cantidad de acetato de zinc de modo que produce un precipitado que reduce la cantidad de ciertos componentes de la matriz y elimina los ácidos grasos presentes en la muestra. Se optó por realizar un ensayo que consistió en la adición de acetato de zinc 0.1 M a muestras fortificadas. Pasado un tiempo de contacto de una hora entre el analito y la matriz se realizó la extracción anteriormente optimizada para las muestras. Se observó que la adición de acetato de zinc hizo que las recuperaciones fueran satisfactorias, estando entre los límites de 70-110% establecidos por las guías (SANCO/10476/2003).

Así pues, el método de análisis definitivo para los compuestos *captan* y *folpet* en las tres matrices estudiadas consiste en la extracción-homogeneización de las muestras con 60 mL de acetona, previa adición de 10 mL de acetato de zinc 0.1 M y 1 mL de la mezcla de patrones marcados de *captan* y *folpet* (*captan-D₆* y *folpet-D₄*). El extracto resultante después de filtrar se enrasa a 100 mL con acetona, tomando posteriormente una alícuota, que se diluye por un factor de cinco con H₂O. El extracto diluido se somete al proceso de SPE optimizado anteriormente. Se pueden encontrar los detalles de este método en el apartado de “*Preparación de muestra*” del **Artículo científico 3**.

Validación del método analítico

Una vez optimizadas las variables experimentales que afectan al método, se realizó la validación del mismo, siguiendo las directrices de las guías europeas (SANCO/10476/2003), para las tres matrices estudiadas (coliflor, pulpa y piel de caqui), considerando como parámetros esenciales el *rango de linealidad*, estudiado entre 50-2500 ng·mL⁻¹, la *exactitud* y la *precisión*, que se evaluaron mediante ensayos de recuperación a los niveles 0.05 mg·kg⁻¹ y 0.5 mg·kg⁻¹. Los resultados se pueden observar en la **Tabla 1** del **Artículo científico 3**. También se estudió la *especificidad* del método, preparando un blanco de procedimiento, muestras blanco de las matrices estudiadas y muestras fortificadas al nivel más bajo validado y comprobando que la respuesta del blanco no supere el 30% de la respuesta obtenida para el LOQ. La cuantificación se realizó con curva de calibrado preparada en matriz utilizando extracto blanco procedente de muestras no tratadas.

Los resultados obtenidos para la linealidad y especificidad fueron satisfactorios. Las recuperaciones calculadas en los ensayos de exactitud y precisión se encuentran dentro del rango 70-120% con RSD menores al 15%.

Análisis de muestras reales

El método desarrollado se aplicó al análisis de muestras reales procedentes de ensayos de residuos en campo que formaban parte de un estudio BPL. En concreto se analizaron 56 muestras de caqui (28 de pulpa y 28 de piel) y 28 muestras de coliflor procedentes de varios ensayos de campo realizados por el INIA. Los resultados obtenidos en el análisis de estas muestras no se pueden reportar en esta Memoria debido a la cláusula de confidencialidad que existe en este tipo de estudios. No obstante, cabe indicar que con los datos generados en nuestro laboratorio se han podido proponer, por parte del Ministerio de Agricultura, límites máximos de residuos (LMRs) para cultivos menores, como el caqui y la coliflor.

En cada secuencia de muestras analizadas se incluyeron muestras control de calidad (QC) para evaluar el buen funcionamiento del método. Los resultados de

recuperación para los QC fueron satisfactorios en todos los casos. En la **Figura 5** del **Artículo científico 3** se pueden ver los cromatogramas GC-NCI-MS obtenidos para una muestra positiva de cada una de las tres matrices estudiadas. Se observa la existencia de los picos cromatográficos de *captan*, así como los correspondientes a los dos patrones internos (*captan-D₆* y *folpet-D₄*), añadidos para mejorar la robustez y exactitud del método. Cabe mencionar que en ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de *folpet*. Esto se justifica debido a que el producto formulado aplicado en los ensayos de campo solo contenía *captan* en su composición.

1.2.4 REFERENCIAS

- Alary J., Bescos D., Monge M.C., de Brauwer I., Bories G.F. (1995). "*Laboratory simulation of captan residues degradation during apple processing*". Food Chemistry 54(2), 205-211.
- Anastassiades M., Maštovska K., Lehotay S.J. (2003). "*Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides*". Journal of Chromatography A 1015, 163-184.
- Akiyawa Y., Yoshioka N., Tsuji M. (1998). "*Studies on pesticide degradation products in pesticide residue analysis*". Journal of Food Hygienic Society of Japan 39(5), 303-309.
- Bailey R., Belzer W. (2007). "*Large volume cold on-column injection for gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry analysis of selected pesticides in air samples*". Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(4), 1150-1155.
- Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Melis M., Pirisi F.M., Farris G.A., Sotgiu C., Minelli E.V. (1997). "*Persistence and metabolism of folpet in grapes and wine*". Journal of Agricultural and Food Chemistry 45, 476-479.
- Fernández-Cruz M.L., Barreda M., Villarroya M., Peruga A., Llanos S., García-Baudín J.M. (2006). "*Captan and Fenitrothion dissipation in field-treated cauliflowers and effect of household processing*". Pest Management Science 62, 637-645.
- Hernández F., Sancho J.V., Pozo Ó.J., Villaplana C., Ibáñez M., Grimalt S. (2003). "*Rapid determination of Fosetyl-Aluminum residues in lettuce by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry*". Journal of AOAC International 86 (4), 832-838.

- Ibáñez M., Pozo, O.J., Sancho, J.V., López, F.J., Hernández, F. (2005). “*Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry*”. *Journal of Chromatography A* 1081 (2), 145-155.
- Lehotay S.J., Kok A., Hiemstra M., van Bodegraven P. (2005). “*Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection*”. *Journal of AOAC International* 88, 595-614.
- Marín J.M., Pozo Ó.J., Beltrán J., Hernández F. (2006) “*An ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of ethephon residues in vegetables*”. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20 (3), 419-426.
- Maštovska K., Lehotay S.J., Anastassiades M. (2005). “*Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrixes*”. *Analytical Chemistry* 77, 8129-8137.
- 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. (BOE núm. 53 de 3 de marzo).
- Sancho J.V., Ibáñez M., Grimalt S., Pozo Ó.J., Hernández F. (2005). “*Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry*”. *Analytica Chimica Acta* 530 (2), 237-243.
- “*Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis*”. (2004). European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Commission Working Document SANCO/10476/2003.

- Štajnbaher D., Zupančič-Kralj L. (2003). “*Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*”. *Journal of Chromatography A* 1015, 185-198.
- Tonogai, Y., Tsumura, Y., Nakamura, Y., Matsuki, H. & Ito, Y. (1992). “*Studies on simultaneous determination of 12 kinds of fungicides containing unstable captan, captafol etc. In preparation of test solution*”. Japanese Journal. *Toxicology Environmental Health* 38, 270–281.
- Winefordner J.D. (2003). “*Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*”. Wiley Interscience.

BLOQUE 2:

Determinación de contaminantes orgánicos en muestras procedentes de acuicultura marina mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

2.1. Estudio de los niveles de compuestos organoclorados (plaguicidas y PCBs) en peces (salvajes y cultivados) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem

2.1.1. INTRODUCCIÓN

2.1.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 4

Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry

Journal of Separation Science. (2003). 26, 75-86

2.1.3. ARTÍCULO CIENTÍFICO 5

Investigating the presence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean sea

Marine Pollution Bulletin. (2008). 56, 963-972

2.1.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

2.1.5. REFERENCIAS

2.1.1. INTRODUCCIÓN

Los contaminantes orgánicos persistentes (COPs) son compuestos químicos procedentes de actividades humanas diversas, incluyendo las agrícolas, urbanas e industriales. Estos contaminantes se han producido en grandes cantidades durante ciertos periodos de tiempo y debido a su producción, uso y escasa degradación se encuentran presentes desde hace décadas en el medio ambiente. Los COPs se pueden clasificar, según los acuerdos adoptados en el Convenio de Estocolmo, en varias familias de compuestos: 8 plaguicidas organoclorados (*dieldrin*, *endrin*, *aldrin*, *chlordane*, *heptachlor*, *DDT* y sus derivados, *mirex* y *toxafeno*), varias familias de compuestos generados de forma no intencionada (*hexaclorobenceno* y *bifenilos policlorados* (PCBs)), así como *dibenzoparadioxinas* (PCDDs), *dibenzofuranos policlorados* (PCDFs). Además de todos estos compuestos mencionados existen otros muchos que se encuentran pendientes de inclusión en la lista de contaminantes orgánicos persistentes que continuamente emergen de la industria química, cuyo destino final es el medio ambiente y, en especial, el medio marino. Estos compuestos se detallan en la lista de contaminantes

orgánicos persistentes registrados en el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) bajo el Convenio de Estocolmo (van Leeuwen et al, 2008; Plan Nacional aplicación Convenio de Estocolmo, 2004), que busca la identificación y regulación global de estos compuestos, prioritarios desde el punto de vista medioambiental, ya que cumplen los cuatro criterios básicos exigidos: persistencia en el ambiente, bioacumulación, toxicidad y transporte a grandes distancias (Rodan et al, 1999; Brown et al, 2008).

Los COPs son introducidas en el Medio Ambiente a través de distintas fuentes y son transportados a través de diferentes vías, como pueden ser el aire, el agua o las especies migratorias, hasta alcanzar su compartimento final en el ecosistema. Los contaminantes organoclorados se encuentran, a pesar de que su uso está prohibido o en casos excepcionales restringido, ampliamente distribuidos por todas las latitudes, desde los trópicos hasta el Ártico y la Antártida (Hernández et al, 2000; Pandit et al, 2001; Hoekstra et al, 2003; Bocquene et al, 2005; Yang et al, 2007). Estos compuestos presentan una elevada tendencia a incorporarse en el compartimento biótico del ecosistema, debido a su elevada lipofilia, y permanecen en él durante largos periodos de tiempo como consecuencia de su lenta degradación; además, la mayoría de ellos son semivolátiles y presentan una alta toxicidad crónica (Schüürmann et al, 1998; Mackay et al, 2001; Breivik et al, 2002).

El transporte de los compuestos orgánicos persistentes se produce tanto por la atmósfera como a través de los océanos. Éstos últimos juegan un papel importante en el control del transporte medioambiental y posterior destino de los contaminantes, tanto a nivel local como a escala global (Dachs et al, 2002). Wania y Mackay (1996) sugirieron que la temperatura tiene un papel importante en el transporte y posterior deposición de los COPs en los océanos ya que la mayoría son semivolátiles, por lo que en su transporte se produce una deposición repetida desde la atmósfera al agua y una nueva movilización a la atmósfera. Estos fenómenos son los que hacen que exista una vía de entrada de compuestos que han sido generados a largas distancias y depositados en zonas remotas como ocurre en las zonas polares, mientras que otros compuestos menos volátiles son

depositados cerca de sus fuentes de emisión. De todos modos, solo una fracción muy pequeña de la cantidad total de contaminante se encuentra en la atmósfera, ya que los océanos y otras masas de agua, así como el compartimento terrestre, son medios de almacenaje que se encuentran en continuo intercambio con la atmósfera. Los océanos son una gran reserva de estos compuestos, donde se encuentran cantidades mucho más elevadas que en el aire (Burkow et al, 2000; Jurado et al, 2004).

La procedencia de una gran parte de los contaminantes que llegan a los ecosistemas acuáticos es a través de descargas directas, debido a procesos hidrogeológicos, como la lixiviación de suelos contaminados, o a la deposición debida al transporte atmosférico (Jacobs et al, 2002). En el medio marino estos contaminantes sufren una redistribución entre sus distintos compartimentos: el agua, los sedimentos, el aire circundante y los componentes bióticos del sistema, las plantas y los animales (Edwards, 1978).

Los COPs son compuestos perdurables en el medio marino y que, como se ha indicado anteriormente, debido a su estructura y a su carácter lipofílico son capaces de acumularse en la fracción lipídica de los organismos vivos. La presencia continuada de estos contaminantes en el medio ambiente, es también consecuencia de su larga vida media así como de ser continuo vertido en el medio ambiente marino (Ozmen et al, 2008).

En cuanto a los mecanismos de acumulación de estos compuestos en los organismos acuáticos, pueden ser muy diversos, siendo los más frecuentes la difusión pasiva del agua a través de las agallas o de los tejidos epiteliales (bioconcentración), a través de la ingestión de partículas suspendidas contaminadas o, en mayor proporción (90%), por la ingesta de alimento contaminado (bioacumulación) (van der Oost et al, 2003). La bioacumulación se ve afectada por numerosos procesos biológicos como son la respiración, la habilidad de los organismos tanto de ingerir como de eliminar los compuestos, la fase de desove y el crecimiento de la especie. Las propiedades físico-químicas de los contaminantes también influyen en sus procesos de acumulación en los distintos organismos, puesto que se caracterizan por presentar una baja solubilidad en

agua y una alta solubilidad en los lípidos, que aumenta, en el caso de los organoclorados, con el aumento de la cloración de los compuestos (Loizeau et al, 2001 a; Perugini et al, 2004). La biomagnificación hace referencia a la totalidad de los procesos por los cuales aumenta la concentración en los tejidos de un compuesto bioacumulado a medida que éste pasa a través de dos o más niveles tróficos (Brungs y Mount, 1978). La biomagnificación está limitada a compuestos que tengan gran persistencia en el medio y una lenta degradación, como es el caso de los *DDTs* y sus derivados y los PCBs. Sin embargo, la mayoría de plaguicidas no son biomagnificados en un grado tan elevado debido a su menor tiempo de vida media.

Se han realizado algunos estudios que demuestran que la ingesta de alimentos es la mayor fuente de acumulación de los OCs y PCBs en los organismos marinos (Thomann et al, 1984; Loizeau et al 2001 a, b), si bien también pueden acumular estas sustancias del ambiente que les rodea. Así pues, el uso de los piensos empleados en la acuicultura puede tener una gran influencia en el nivel de contaminantes en los peces cultivados (de Boer et al, 1991; Easton et al, 2002; Serrano et al, 2003; Antunes et al, 2004).

Son varios los factores que explican el almacenamiento y eliminación de los contaminantes en los organismos marinos: el hábitat, los factores fisiológicos, el contenido lipídico, el origen geográfico y el comportamiento de alimentación (Perugini et al, 2004). Algunos autores han comprobado el aumento de concentración de compuestos organoclorados en la cadena trófica formada desde los crustáceos a los peces, de forma que esto soporta la hipótesis sobre la importancia de la contaminación adquirida a través de la dieta (Borga et al, 2001), que hace que los niveles de concentración en los individuos de la parte más alta de la cadena trófica sean mucho más elevados. (Loizeau et al, 2001 b).

Las actividades enmarcadas en la acuicultura marina crean una cadena trófica artificial cuyo último eslabón es el hombre. A través de esta cadena trófica, los compuestos organoclorados pueden bioacumularse y biomagnificarse presentando un riesgo potencial para la salud pública. La ingesta de alimentos de origen marino, tanto de

origen salvaje como cultivado, parece ser la principal vía de entrada de estos contaminantes en el cuerpo humano, los cuales se encuentran a concentraciones notables en los tejidos grasos y en los fluidos de la población (Hernández et al, 2002 a; Pitarch et al, 2003; Hernández et al, 2005). De hecho, el consumo de alimentos de origen marino parece ser la principal vía de exposición no ocupacional de estos contaminantes en comparación con otras vías de contaminación como son el contacto dérmico o la inhalación de estos compuestos (Bordajandi et al, 2006). Algunas investigaciones recientes sugieren que la presencia de organoclorados y PCBs en el pescado puede contrarrestar los beneficios saludables que produce en el sistema cardiovascular la elevada cantidad de aceite omega 3 presente en la parte grasa de los pescados (Hites et al, 2004; Carubelli et al, 2007).

Los piensos utilizados en la piscicultura marina contienen un elevado porcentaje de aceites y proteínas de origen marino, los cuales se obtienen a partir de los recursos pesqueros de dos zonas, principalmente, como sur Americano (costas de Chile y Perú) y Atlántico Norte. Como consecuencia, la pesca utilizada para la elaboración de los piensos presenta un típico perfil de contaminación según su procedencia, el cual se traslada después al resto de la cadena trófica que surge de la acuicultura marina.

La concentración de contaminantes persistentes en el pienso empleado en acuicultura puede disminuirse si se reformula su composición empleando para su preparación aceites vegetales y materias primas de origen marino pero procedentes de zonas menos contaminadas. A su vez, las características nutritivas de estos piensos pueden mejorarse haciendo uso de materias primas con una composición en ácidos grasos que se asemeje lo máximo posible a la dieta natural (Nácher et al, 2009; Saera-Vila et al, 2009).

La acuicultura y la pesca extractiva son dos actividades complementarias que deben hacer frente al reto de la creciente demanda de productos pesqueros, ya que la pesca extractiva no puede cubrirla en su totalidad debido a las limitaciones de la

producción natural, que se ha visto superada en muchas ocasiones, provocando la sobreexplotación de los caladeros.

Los trabajos del **Bloque 2** surgen como respuesta al interés que presenta el ARP en los productos procedentes de la acuicultura marina, así como el estudio del comportamiento de estos compuestos en el ecosistema marino.

En concreto, el objetivo perseguido es el desarrollo de metodología analítica multiresidual que permita la determinación de bajos niveles de plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados en los piensos utilizados en piscicultura así como en los tejidos de los peces cultivados, de una forma fiable y precisa (**Artículo científico 4**).

Se ha prestado especial atención a la etapa de purificación de los extractos, debido a la problemática que presenta el análisis de muestras con un elevado contenido lipídico (hasta un 19% de lípidos en peso húmedo en los piensos).

Además, se ha optimizado la detección mediante GC-MS/MS con analizador de trampa de iones en los diferentes tipos de muestras consideradas.

Por último, la metodología analítica desarrollada se ha validado y aplicado al estudio de los niveles de contaminantes organoclorados tanto en peces cultivados como salvajes procedentes de la costa de Castellón, con el objetivo de discernir posibles diferencias en los niveles de concentración y en el perfil de contaminación en ambos tipos de pesca (**Artículo científico 5**).

2.1.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 4

Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry

R. Serrano, M. Barreda, E. Pitarch, F. Hernández

Journal of Separation Science. (2003). 26, 75-86

Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry

Roque Serrano, Mercedes Barreda, Elena Pitarch, Félix Hernández

Analytical Chemistry. Dept. Experimental Sciences.
University Jaume I. 12004. Castellón. Spain.

Abstract

A sensitive and rapid multiresidual method has been developed for the determination of organochlorine compounds in fish feed and fish tissues. The method is based on automated off-line normal-phase liquid chromatography (NPLC) clean-up prior to GC-MS/MS. Analytes are extracted by refluxing in *n*-hexane and fats present in the hexanic extracts are removed by automated NPLC, using *n*-hexane and ethyl acetate as mobile phase. Both NPLC and acid digestion with sulphuric acid have been evaluated as clean up techniques for the analysis of these kinds of fatty samples. Thus, acid digestion is recommended before NPLC when large amounts of fat are present in the extracts. Purified extracts are then analysed by GC-MS/MS (electron impact, EI) using extracted ion mode. The high efficiency in the elimination of fats from the extracts together with optimised MS/MS detection leads to high sensitivity in the multiresidue determination of analytes, reaching limits of detection at the sub-ppb level in this type of fatty samples (up to 19% lipids fresh weight). The developed procedure represents an improvement over current methodologies for the analysis of organochlorine compounds (OCs) in fatty samples as regards to solvent consumption and automation, allowing the application of automated off-line NPLC (26 min per sample) prior to GC determination. Besides, changes of solvent are not necessary during analysis. The application of the developed procedure to real world samples of fish feed and cultured fish revealed the presence of HCB, DDTs and PCBs at $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ levels.

Keywords: *organochlorine compounds, fatty samples, gas chromatography, tandem mass spectrometry.*

1. Introduction

Aquaculture has expanded considerably during recent decades as a consequence of increased demand by the world's population since fisheries have possibly reached their maximum production level due to over-exploitation. Consumption of the harvest from fish-farming activities by humans creates an artificial food chain.

Organochlorine compounds (OCs), including pesticides and metabolites and other contaminants such as polychlorinated biphenyls (PCBs), are among the most dangerous pollutants because of their high liposolubility and tendency to bioaccumulate along the food chain. As a consequence, they are widespread in the biotic compartment of the environment. Thus, OCs could reach human consumers through the food chain comprising fish feed and cultured fish. Therefore, very sensitive, rapid and accurate analytical methodologies are required to study the levels of these compounds in aquaculture products.

Clean-up is possibly the most important step in the analysis of these types of fatty samples. Fish feed contains up to 19% fats in fresh weight, and cultured fish can reach approximately 2-3 times higher fat contents than wild fish (above 5% fat fresh weight in some organs). Conventional methods for the determination of organochlorine compounds in fatty samples usually involve laborious and time consuming clean-up steps, including multiple digestion of extracts [1,2], acid digestion followed by liquid chromatography [3,4] or gel permeation chromatography (GPC) combined with adsorption liquid chromatography [5,6]. Most of these methods use GC-ECD for analytical determination, reaching detection limits at the $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ level in most cases. In recent years, modern techniques have been applied to the clean-up of fatty samples such as supercritical fluid extraction [7,8]. Normal-phase liquid chromatography (NPLC) has also been applied as an efficient clean-up technique prior to GC determination with good results [9-11] and has been used in our laboratory for the analysis of organochlorine compounds in whale blubber [11,12] and human adipose tissue [13]. This technique offers several advantages such as short clean-up time, high degree of automation, and high efficiency in the elimination of fats, which coupled to a sensitive and selective determination by GC (with MS or MS/MS) leads to a powerful technique, allowing attainment of detection limits at the $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ level in complex matrices.

Techniques currently applied to the analysis of fish and food derivatives include two or

more clean-up steps and GC-ECD detection, reaching limits of detection around $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ [14-16], embracing in some cases traditional techniques as acid digestion with sulphuric acid due to its high efficiency in elimination of fats, both directly [17,18] or through impregnation of the silica layer in adsorption column chromatography [19].

The aim of this work is to develop sensitive and rapid multiresidual analytical methodology for the determination of organochlorine pesticides and PCB residues in fish feed and fish tissues that allows attainment of low limits of detection by means of an efficient clean-up step and GC-MS/MS (EI) detection. Both, NPLC and sulphuric acid clean-up are evaluated for their efficiency in elimination of fats in order to develop an accurate procedure able to detect residues below $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ in this type of difficult matrices characterised by their high fat content. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (MS/MS, EI) has been optimised for the analytical determination of organochlorine compounds to allow the unequivocal identification of the analytes and the high selectivity and sensitivity required in ecotoxicological and environmental studies.

2. Material and Methods

2.1. Reagents

DDTs (p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD), HCB, aldrin, heptachlor, heptachlor epoxide, lindane, mirex, metoxychlor, endosulfan (α and β isomers), endosulfan sulphate, endosulfan ether and PCBs (IUPAC n° 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) were included in this study. In addition, chlorfenson was used as internal standard in the validation study. Reference materials of pesticides and metabolites from Dr S. Ehrenstorfer (Promochem, Wesel, Germany) with a purity 97-99.7% were used for the preparation of stock solutions by dissolving in acetone. These stock solutions (around $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were stored in a freezer at -20°C . Working solutions of pesticides for sample fortification and for injection in the LC and the GC systems were prepared by diluting stock solutions in *n*-hexane. Acetone residues were eliminated from working and standard solutions by evaporation at 40°C under N_2 stream. PCB mix 3 standard from Dr S. Ehrenstorfer ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in isooctane) was used for single quantitation of PCBs congeners IUPAC n° 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180. Working solutions were prepared by dilution in *n*-hexane

Three labelled internal standards were used: HCB- $^{13}\text{C}_6$, 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl- $^{13}\text{C}_{12}$ (PCB 138) (Cambridge Isotope Labs, Inc. Andover, MA) and p,p'-DDE D_8 (Dr Ehrenstorfer). Working solutions of labelled standards (ca. $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were prepared by dilution of commercial solution with hexane and stored at $4\ ^\circ\text{C}$.

Ethyl acetate and *n*-hexane Ultratrace quality and sulphuric acid 95-98% were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Anhydrous sodium sulphate for pesticide residue analysis (Baker, Deventer, Holland) was dried for 18 hours at $300\ ^\circ\text{C}$ before use.

2.2. Samples

Pools of samples of fish feed and fish tissues from cultured *Sparus aurata* were used for the method validation. Real world samples of fish feed and fish tissues (white and red muscle and liver) from aquaculture activities were stored at $-20\ ^\circ\text{C}$ until analysis.

2.3. LC instrumentation

A schematic representation of the LC system is shown in **Figure 1**. It was constructed with the following equipment: *LC Pump*: Master 305 piston pump, Gilson (Middleton, USA); *Valve*: 6 way high-pressure valve VICI Valco (Europe Instruments, Schenk, Switzerland), electronically controlled; *Sampler*: injection valve Rheodyne (Cotati, CA, USA) with 1.0-ml loop; *Column*: 150 x 3.9 mm ID packed with Novapak $4\ \mu\text{m}$ silica (Waters, Milford, MA, USA); *Fraction collector*: Gilson FC 203B (Middleton, USA); *Mobile phases*: *n*-hexane and ethyl acetate; *Flow rate*: $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

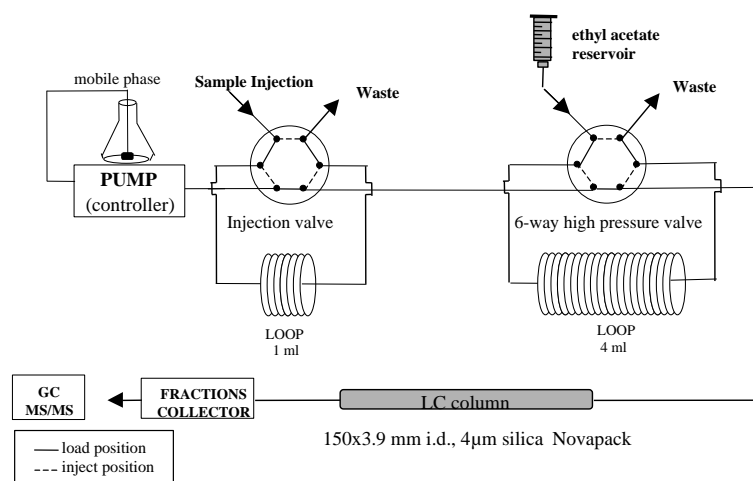


Figure 1. Scheme of the automated NPLC system used in this work.

2.4. GC instrumentation

GC-MS/MS was performed using an ion trap mass spectrometer (Finnigan GCQ, Austin, Texas, USA) operating in the electron impact ionisation mode (EI) at an electron energy of 70 eV and an emission current of 250 μA . The GC 8000 Top (CE Instruments, Milan, Italy) was equipped with an AS 800 autosampler. The injector temperature was 240°C. The oven temperature was programmed as follows: 90°C (4 min), 30°·min⁻¹ to 180°C, 4°·min⁻¹ to 270°C, 30°·min⁻¹ to 300°C with a final hold for 3.5 min. Splitless injections (3 mm ID glass liner) of 2 μl were performed using a fused silica DB-5MS capillary column coated with cross-linked 5% phenyl methyl siloxane with a length of 30 m x 0.25 mm ID. and a film thickness of 0.25 μm . Helium was applied as carrier gas at a flow of 1 mL·min⁻¹.

Experimental mass spectrometer parameters are the following: the source and transfer line temperatures were 220°C and 275°C, respectively; the electron multiplier potential was 1550 V and the multiplier gain was 3.2E5; the values of automatic gain control (AGC) target and trap offset were 50 and 10, respectively. Extracted ions selected from EI-MS/MS spectra used for quantitation are indicated in **Table 1**.

2.5. Validation study

Statistical validation of the method was performed in our own laboratory. The following parameters were evaluated:

Linearity: the calibration curve for MSD was obtained by analysing standard solutions in triplicate at 8 concentrations between 0.5 and 1000 ng·mL⁻¹.

Accuracy: the accuracy was estimated by means of recovery experiments, analysing representative samples (n=6) fortified at three concentrations levels (75, 25 and 5 ng·g⁻¹, fresh weight). The Standard Additions Method was applied for quantitation of HCB, DDTs and PCBs as they were present in all the blank samples studied.

Precision: the precision of the method was determined as the repeatability of the recoveries (n=6) at each fortification level, within and between days.

Selectivity: the selectivity of the method was based on the appropriate selection of ions for the detection of each analyte by mass spectrometry extracted ion mode.

Limit of detection: the LOD was obtained when the signal was three times the background noise in the chromatogram at 4 ng·g⁻¹.

Table 1. Program used for MS/MS detection of the compounds studied in this paper and extracted ions selected from EI-MS/MS spectra for quantitation. OC pesticides and PCB were analysed with different MS/MS programs.

Compound	Parent ion	Time (min)	Window	Mass range	Voltage (V)	Rt ^{a)} (min)	Extracted ions selected
HCB	288	3.50	10	170-295	3.50	7.31	214, 249
HCB- ¹³ C ₆	288	3.50	10	170-295	3.50	7.31	220, 225
Lindane	219	7.50	5	140-225	1.05	7.85	181, 183
Endosulfan ether	241	8.40	8	165-245	1.56	8.84	204-208, 237-241
Heptachlor	337	9.25	8	200-345	1.50	9.56	265
Aldrin	293	10.30	10	145-300	1.75	10.57	220
Heptachlor epoxide	355	11.30	8	175-360	1.60	11.80	265
α -Endosulfan	241	12.65	8	165-245	2.50	12.99	170, 172, 204-208
p,p'-DDE	250	13.60	8	145-260	3.00	13.82	176
p,p'-DDE-D ₈	250	13.60	8	145-260	3.00	13.82	183, 184
β -Endosulfan	241	14.60	8	165-245	2.50	15.02	170, 172, 204-208
p,p'-DDD	235	15.20	8	160-240	1.30	15.44	165, 199
Endosulfan sulphate	289	16.47	8	175-295	1.60	16.63	217, 219, 251-255
p,p'-DDT	235	16.75	8	160-240	1.70	16.83	165, 199
Metoxychlor	227	18.00	4	110-230	1.50	19.21	152, 169
Mirex	272	20.00	8	200-280	1.50	20.5	237
PCB 28	258	3.50	4	140-262	2.00	9.16	186
PCB 52	292	9.80	4	180-295	1.50	10.09	220, 222
PCB 101	326	11.50	4	170-330	2.00	12.85	254, 256
PCB 118	326	11.50	4	170-330	2.00	15.09	254, 256
PCB 153	360	15.60	8	200-380	1.75	15.93	288, 290
PCB 138	360	15.60	8	200-380	1.75	16.99	288, 290
PCB 138- ¹³ C ₁₂	372	15.60	8	200-280	1.75	16.99	302, 337, 372, 374
PCB 180	396	18.50	8	220-402	2.25	19.66	322,324,326

^{a)} Rt: retention time

2.6. Procedure

2.6.1. Sample preparation and extraction

Samples were thawed at room temperature. Approximately 8 g of fish tissues or fish feed were chopped and homogenised in a mortar with the amount of anhydrous sodium sulphate necessary to remove water. Refluxing in *n*-hexane for 4 hours effected extraction. After filtration (0.45 μm), the extract was pre-concentrated using a Kuderna-Danish apparatus until ca. 2 ml. The final residue was adjusted to 2 ml with *n*-hexane (4 g sample per mL hexane).

2.6.2. Recommended clean-up procedure

For the analysis of fish tissues, including white and red muscle and liver, 1 mL of the hexanic extract (4 g sample·mL⁻¹) was injected into the LC system using the 6-way injection valve (IV). The mobile phase (*n*-hexane) was set at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The modifier solvent (ethyl acetate) was loaded in a 25 mL syringe used as reservoir (see **Figure 1**) that fill the 4-mL loop mounted on the HPV1 valve by gravity (ca. 2 mL·min⁻¹) and was introduced into the column at 16 min of elution. LC fractions of 1 mL were first collected in order to know both the fat and pesticide elution patterns after the LC clean-up. Finally, analytes eluted as follows: DDTs, PCBs, mirex, aldrin, heptachlor, α -endosulfan, HCB and lindane between 0-12 minutes (Fraction A), β -endosulfan, endosulfan sulphate, endosulfan ether, metoxychlor and heptachlor epoxide between 12-18 minutes (Fraction B). The silica gel column was regenerated by 4 mL ethyl acetate flush step at 20 minutes. The volume of the fractions collected was adjusted at 1 mL under N₂ stream at 40°C.

The elution pattern of pesticides and lipids was reproducible during at least two months of routine analysis. The overall procedure was controlled from the LC pump programming the times of valve activation (**Figure 1**).

In order to reach detection levels as low as possible in the analysis of fish feed, first, acid digestion was applied to the hexanic extracts (4 g of fish feed per mL hexane), in order to remove most of the fats. Hexanic extracts were digested with two volumes of H₂SO₄ by shaking for 3 min in a Vortex. The operation was repeated three times. The hexanic phases obtained were combined and adjusted to the appropriate volume (4 g·mL⁻¹) at 40°C under gentle N₂ stream. 1-mL of the cleaned up hexanic extract was injected into the LC system,

using *n*-hexane as mobile phase (flow: 1 mL·min⁻¹) and a pulse of 4-mL ethyl acetate at 16 min of elution.

Figure 2 shows a scheme of the overall analytical procedure.

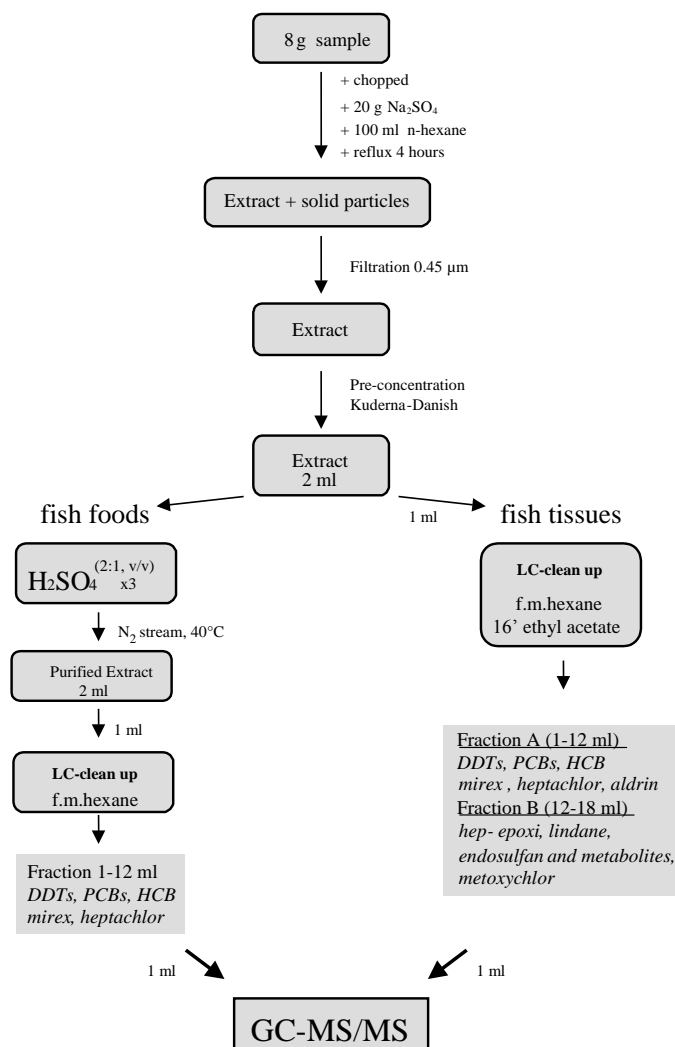


Figure 2. Scheme of the overall analytical procedure applied for the determination of organochlorine compounds in fish food and fish muscle.

2.6.3. GC analysis

1-mL portions of the fat-free LC fractions containing the analytes were injected in the GC system using MS/MS (EI) detection. Linearity of response was proved in a concentration range from 0.5 to 1000 ng·mL⁻¹. In the validation study, chlorfenson was used as internal standard. MS/MS (EI) was also used as confirmation of analytes detected in real samples.

2.6.4. Determination of the fat

The total fat content in the sample extracts was determined by gravimetry, evaporating at 95°C until constant weight. However, the low amount of fat in the LC fractions necessitated the use of a colorimetric method for the determination of fat at μg level. The colorimetric method used for total lipids determination is based on the sulphophosphovainillin reactivity [20]. Triacylglyceride calibration solution (Sigma, St Louis, Missouri, USA) was used as standard. The calibration curve was plotted between 125 and 1000 μg . The LOD was found to be 33 μg .

3. Results and Discussion

3.1. MS/MS optimisation

The MS/MS method applied uses EI ionization mode with automatic gain control (AGC), which is characteristic of ion trap MS analyzer. MS/MS detection was performed by isolation of the corresponding selected parent ion for each compound inside the trap followed by application of an adequate excitation voltage for its subsequent fragmentation. Parent ions were selected from the EI spectra taking into account aspects as high m/z values but also the peak abundance as well as the chromatographic signal obtained after its isolation in the ion trap. Daughter ions obtained were scanned over a characteristic mass range leading to the MS/MS spectrum. The object was to generate MS/MS spectra where the parent ions were, at least, 10-20% of base peak.

In this paper, two MS/MS methods were used, divided into five and fourteen acquisition segments for PCBs and OC compounds, respectively (PCB 101 and 118, and PCB 153 and 138 into the same segment). Three values of the trapping parameter q (0.45, 0.35 and 0.25)

were investigated. The higher response for most compounds were obtained with $q = 0.45$, so this value was selected for the method. Then, isolation and excitation conditions were optimised and selected in order to obtain characteristic MS/MS spectra with fragmentation patterns rich enough to allow the accurate identification of analytes detected.

Table 1 shows the conditions corresponding to the optimised MS/MS method. The highest isolation windows (10 m/z units) used corresponded to HCB and p,p' -DDE as labelled HCB- $^{13}\text{C}_6$ and 4,4'-DDE D_8 were also included in these segments. Selection of the precursor ion and window was undertaken in order to keep an isolation mass range as short as possible, including the pesticide as well as the isotopically labelled compound. In the segment corresponding to the determination of PCB 138 and PCB 138 $^{13}\text{C}_{12}$, it was not feasible to select a single scan for their fragmentation because the difference was 12 units of m/z and the highest window of m/z allowed by the system was ± 5 units. The software of the instrument allows us to programme different *scans* (acquisition of dates) in the same time-window, thus for PCB 153 and 138 a *scan* with the precursor ion 360 was selected, and for PCB 138 $^{13}\text{C}_{12}$ another *scan* using 372 as precursor ion was selected, all of them in the fourth segment.

Extracted ions selected from EI-MS/MS spectra for quantitation are indicated in **Table 1**.

3.2. Study of clean up step

First, normal phase liquid chromatography and acid digestion with sulphuric acid were assayed separately in order to determine their efficiency in the elimination of fat present in hexanic extracts from both fish feed and fish tissues.

3.2.1. NPLC clean up

Our laboratory has previously used NPLC as a clean-up technique, obtaining satisfactory results for marine organisms [10, 11]. The application of this technique removed more than 90% of fats in the extracts, allowing their direct injection in the GC system as the amount of fat injected onto the capillary GC columns was below the maximum recommended for this type of column (600 ng) [10, 21]. In the present work, LC fractions obtained after processing $4 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fish feed contained excessive amount of lipids for their injection in GC system (more than 1000 ng of fats per μL purified extract) due to the high fat content present in the samples (16-19% of fat fresh weight). Assays were repeated processing 1 g of sample per mL

hexane. In this case, the fat remaining in the purified extract (around $300 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) allowed their injection into GC.

On the other hand, the application of normal phase LC clean-up to fish muscle and liver extracts (4 g of sample per mL hexane) allowed their injection into GC system as a consequence of the lower content of fat present in this type of samples (around 5%). **Figure 3** shows extracted ion GC-MS/MS chromatograms corresponding to fish muscle samples (*Sparus aurata*) fortified at $4 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ and underlines the absence of interferences and the high *S/N* obtained.

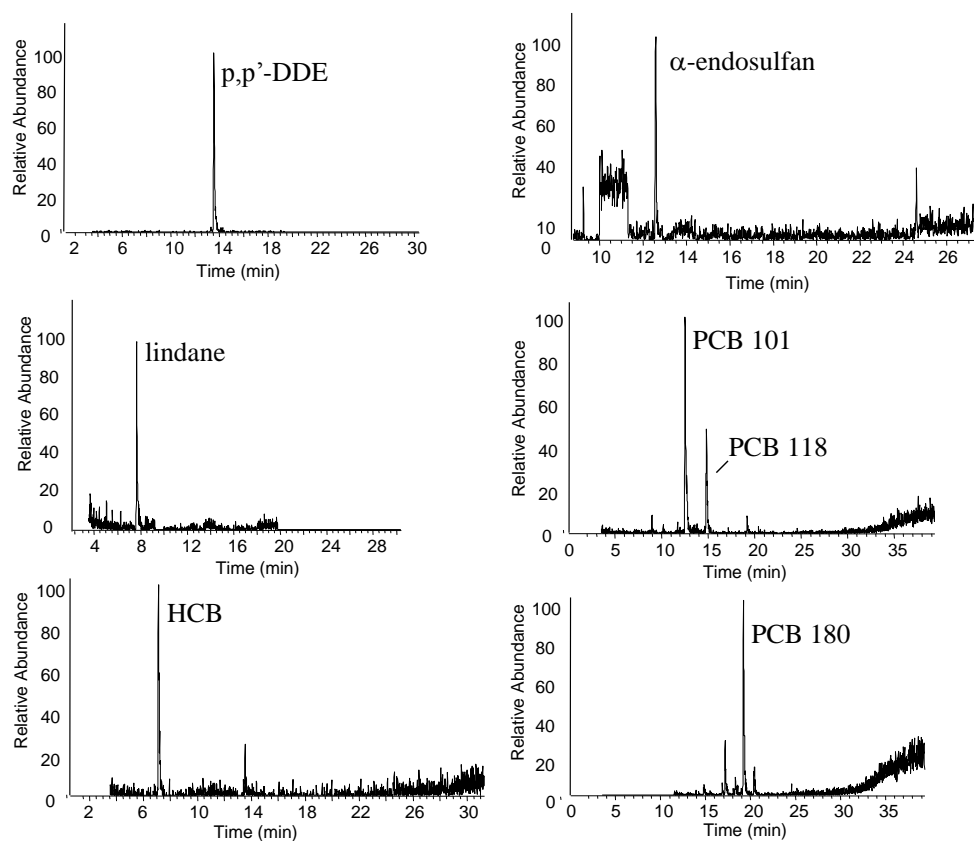


Figure 3. Extracted ion GC-MS/MS chromatograms corresponding to fish muscle samples (*Sparus aurata*) fortified at $4 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$

3.2.2. Acid digestion clean up

Sulphuric digestion was assayed for fish feed as the high lipid content rendered the application of NPLC clean-up inefficient. Data obtained showed that 99.5% of fats were removed by using sulphuric acid clean-up in extracts containing 4 g of sample per mL hexane. However, the amount of lipids remaining in the purified extracts ($640 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, approximately 1300 ng of fat in 2 μL of injection volume) was higher than the maximum recommended for injection in capillary GC columns. Additionally, acid digestion did not allow the analysis of acid labile compounds.

3.2.3. Acid digestion plus NPLC clean up

As a consequence of the previous assays, the two clean-up techniques were combined in order to allow the processing of a sufficient amount of fish feed sample to attain the low limits of detection required.

Results obtained by applying first acid digestion and then NPLC showed the high efficiency of this combined clean-up, there remaining less than 200 μg of fat per mL hexane in LC-fractions (introduction of less than 600 ng in the 2 μL injected into the GC system) on using extracts of 4 g of sample per mL hexane. As a consequence of the efficiency of purification of the extracts, GC chromatograms obtained presented a high S/N ratio leading to low limits of detection.

3.3. Analytical parameters

Table 2 shows the slopes of the direct calibration curve and the standard addition method for those analytes detected in the “blank” samples of fish feed and fish muscle used for the validation study. Values obtained proved the absence of important matrix effects in the determination of HCB, DDTs and PCBs in both, fish feed and muscle, as concentrations calculated by direct calibration and standard addition method were similar in all cases. Therefore, quantitation of fortified samples used in the validation study was carried out by direct calibration, subtracting the area of the peaks of the analytes detected in the blank sample and using chlorfenson as internal standard.

The LOD was obtained when the signal was three times the background noise in the

chromatogram at the lowest concentration assayed ($4 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$). The LOQ was considered as three times the LOD calculated in the validation study. The lowest concentration assayed in recovery experiments was $5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, as fortification levels below $5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ were not investigated due to the presence of most analytes in the “blank” samples at concentration levels below $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (see **Table 2**).

Table 2. Comparison of slopes and concentration found ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) in the fish feed simple used for validation study using direct calibration and standard addition method (calibration range $5\text{-}75\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$).

Compound	Direct calibration				Standard additions					
	Standards in hexane		fish, food		muscle					
	slope	r^2	slope	r^2	DC ^{a)}	SA ^{b)}	slope	r^2	DC ^{a)}	SA ^{b)}
HCB	0.017	0.99	0.015	0.9955	1.08	0.48	-	-	nd	nd
p,p'-DDD	0.135	0.9972	0.121	0.9996	4.27	4.71	0.123	0.9995	d	d
p,p'-DDE	0.119	0.9997	0.128	0.995	8.3	8.21	0.122	0.9952	1.32	1.21
p,p'-DDT	0.082	0.999	0.093	0.9997	d	d	0.083	0.9957	d	d
PCB 28	0.175	0.98	0.183	0.9997	d	d	0.188	0.9999	d	d
PCB 52	0.317	0.9976	0.281	0.9999	0.89	1.0	0.302	0.9924	d	d
PCB 101	0.121	0.9907	0.132	0.9988	3.06	3.02	0.112	0.9923	d	d
PCB 118	0.202	0.9999	0.190	0.9984	1.70	1.76	0.172	0.996	d	d
PCB 153	0.285	0.993	0.312	0.9974	3.22	3.35	0.280	0.9965	d	d
PCB 138	0.283	0.99	0.270	0.9971	3.45	3.04	0.301	0.9959	d	d
PCB 180	0.286	0.997	0.298	0.996	0.55	0.47	0.281	0.9958	d	d

d: detected below limit of quantification; nd: non detected

a) DC: concentration found by direct calibration

b) SA: concentration found by standard addition

3.3.1. Fish feed

The overall analytical procedure, including reflux in hexane for the extraction of OCs, evaporation by Kuderna-Danish, combined clean-up by means of acid digestion and automated NPLC, and final determination by GC-MS/MS (EI), was applied to fish feed samples fortified at 75, 25 and 5 ng·g⁻¹ (fresh weight). **Table 3** shows quantitative recoveries (between 80-120% for the majority of compounds and fortification levels) and a precision between days below 10% at the highest level of fortification and below 18% at the lowest level assayed (5 ng·g⁻¹). Precision within days was similar to between days. Limits of detection were below 1 ng·g⁻¹, except for heptachlor and *p,p'*-DDD.

Table 3. Mean recoveries (%) and relative standard deviations between days (in brackets) after application of the overall analytical procedure to fortified fish feed samples (n=6). LOD in ng·g⁻¹ fresh weight.

	Fortification level (ng·g ⁻¹)			LOD ng·g ⁻¹
	75	25	5	
HCB	85 (10)	98 (12)	80 (13)	0.3
Heptachlor	76 (7)	89 (14)	86 (18)	1.0
Mirex	121 (10)	110 (8)	116 (14)	0.5
<i>p,p'</i> -DDD	95 (6)	90 (10)	86 (8)	1.1
<i>p,p'</i> -DDE	88 (7)	86 (11)	79 (6)	0.5
<i>p,p'</i> -DDT	92 (7)	83 (15)	80 (12)	0.4
PCB 28	78 (7)	89 (15)	86 (15)	0.1
PCB 52	84 (5)	97 (12)	87 (10)	0.2
PCB 101	97 (8)	86 (14)	90 (10)	0.4
PCB 118	94 (6)	105 (8)	84 (11)	0.4
PCB 153	111 (7)	80 (15)	77 (17)	0.4
PCB 138	114 (7)	82 (13)	79 (15)	0.4
PCB 180	120 (8)	89 (12)	91 (17)	0.1

Non-recovered analytes, which were destroyed or lost during the sulphuric acid treatment (metoxychlor, endosulfan and metabolites, aldrin, heptachlor epoxide, lindane) were determined by applying only NPLC in the clean-up step of hexanic extracts containing 1 g of sample per mL hexane. Recoveries were between 87 and 102%, with precision between days lower than 13 % in all cases. However, limits of detection were around 10-fold higher (1-10 ng·g⁻¹) due to the lower amount of sample processed.

3.3.2. Fish tissues

Table 4 shows the recoveries obtained after the application of the method to the determination of OCs in fish muscle and fish liver fortified samples (reflux in hexane, automated NPLC clean-up and GC-MS/MS determination). The majority of recoveries at all fortification levels were between 80 and 110%, with very few exceptions. Precision was better than 15% and around this value at the lowest fortification level (5 ng·g⁻¹).

The limits of detection were below 1 ng·g⁻¹ (except for endosulfan ether, 1.5 ng·g⁻¹) for the analysis of fish muscle, and below 2 ng·g⁻¹ for liver.

As **Tables 3** and **4** show, all compounds were quantitatively recovered at the lowest level of fortification assayed. Consequently, the method can be applied satisfactorily to concentration levels as low as 5 ng·g⁻¹. As regards analysis time, after the extraction step (simultaneous refluxing of a number of samples for 4 hours), sample preparation is simpler and faster than by other methods available in the literature. For example, fish food acid digestion can be carried out for 6 samples in around 2 hours and the subsequent treatment is fully automated (LC clean-up and GC coupled off line).

3.4. Application to real-world samples

The analytical methodology developed in this work was applied to the analysis of fish feed samples used in aquaculture during 2000-01 and tissues from cultured fish (weight: 224 ± 10 g; length: 25 ± 1 cm) from commercial markets. Fish feed is triturated fish (from Moroccan coastal waters) blended with fish oils.

Although satisfactory analytical parameters were obtained in the validated procedure, 50 ng of isotopically labelled standards were added before the extraction as surrogate internal standards for quality control in the analysis of real samples, rendering the use of chlorfenson as internal standard unnecessary. Labelled standards used were HCB-¹³C₆ (for HCB, lindane, endosulfan-ether; heptachlor, aldrin, heptachlor epoxide and α -endosulfan), *p,p'*-DDE-D₈ (for *p,p'*-DDE, β -endosulfan, *p,p'*-DDD, endosulfan sulphate, *p,p'*-DDT, metoxychlor and mirex) and PCB 138-¹³C₁₂ for PCBs.

Table 4. Mean recoveries (%) and relative standard deviations (in brackets) after application of the overall analytical procedure to fortified fish muscle and fish liver samples. LOD in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh weight.

	Fish muscle				Fish liver	
	75 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	25 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	5 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	LOD $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	5 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	LOD $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$
HCB	81 (12)	84 (14)	88 (11)	0.5	85 (15)	0.2
Lindane	104 (7)	91 (13)	75 (14)	0.8	85 (13)	0.1
Endosulfan ether	103 (11)	82 (10)	112 (10)	1.5	102 (12)	1.0
Heptachlor	88 (10)	93 (11)	84 (14)	0.4	90 (15)	0.5
Aldrin	97 (5)	92 (11)	88 (9)	0.5	96 (11)	0.5
Heptachlor epoxide	107 (7)	102 (12)	87 (11)	0.7	78 (13)	0.2
α -Endosulfan	104 (4)	101 (9)	88 (16)	0.5	94 (14)	1.2
<i>p,p'</i> -DDE	92 (9)	98 (4)	92 (10)	0.3	94 (10)	0.4
β -Endosulfan	103 (12)	96 (13)	81 (10)	0.5	85 (16)	1.5
<i>p,p'</i> -DDD	90 (8)	99 (7)	81 (11)	0.4	88 (15)	0.4
Endosulfan sulphate	80 (12)	86 (11)	87 (15)	0.5	81 (14)	1.0
<i>p,p'</i> -DDT	93 (6)	96 (11)	82 (13)	0.5	79 (17)	1.3
Metoxychlor	94 (6)	101 (13)	90 (11)	0.4	97 (10)	1.0
Mirex	90 (15)	103 (7)	91 (13)	0.2	90 (9)	0.1
PCB 28	113 (9)	108 (11)	86 (10)	0.4	85 (11)	0.4
PCB 52	102 (12)	114 (8)	97 (9)	0.5	99 (13)	1.4
PCB 101	97 (7)	71 (11)	83 (12)	0.4	81 (15)	0.2
PCB 118	82 (14)	84 (10)	83 (12)	0.8	93 (15)	0.3
PCB 153	95 (8)	91 (5)	78 (12)	0.3	71 (17)	0.1
PCB 138	88 (11)	91 (5)	79 (10)	0.5	75 (12)	0.2
PCB 180	85 (15)	93 (4)	95 (16)	0.4	93 (13)	0.1

The results obtained are shown in **Table 5**. Fish feed samples analysed contained appreciable amounts of HCB, DDTs and all PCB congeners studied. The highest concentrations corresponded to PCB 153 and 138, and to the main metabolite of DDT, i.e. *p,p'*-DDE. On the other hand, all the DDTs and PCBs investigated were detected at low $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ levels in muscle and liver samples from cultured fish (*Sparus aurata*) obtained from markets. In the fish tissues samples, the highest concentrations corresponded generally to *p,p'*-DDE and PCB 153.

Table 5. Concentrations of organochlorine compounds detected in real world samples of fish feeds and cultured fish tissues (*Sparus aurata*) from aquaculture activities during 2000-01.

Compound	Concentration (ng·g ⁻¹ fresh weight)			
	Fish feed	Cultured fish		
		White muscle	Red muscle	Liver
<i>n</i> ^{a)}	<i>6</i> ^{b)}	3	3	3
HCB	3.7 (16)	nd, nd, nd	d, d, d	nd, nd, nd
p,p'-DDD	9.8 (13)	d, d, d	2.3, 2.3, 2.7	1.3, 1.4, 1.2
p,p'-DDE	40.9 (9)	1.3, 1.2, 1.5	5.2, 5.8, 5.4	2.2, 2.4, 2.3
p,p'-DDT	28.5 (17)	d, d, nd	d, d, d	d, d, d
PCB 28	7.8 (10)	d, d, d	d, d, d	d, d, d
PCB 52	14.5 (17)	d, d, d	d, d, d	d, d, d
PCB 101	37.9 (9)	d, d, d	2.8, 2.5, 2.3	12.8, d, nd
PCB 118	17.1 (20)	d, d, d	2.4, d, d	14.6, d, nd
PCB 153	57.2 (8)	d, d, d	1.2, 1.0, 1.3	1.1, 1.0, 1.0
PCB 138	51.4 (4)	d, d, d	d, d, d	3.2, d, d
PCB 180	4.4 (14)	d, d, d	d, d, d	2.5, d, d

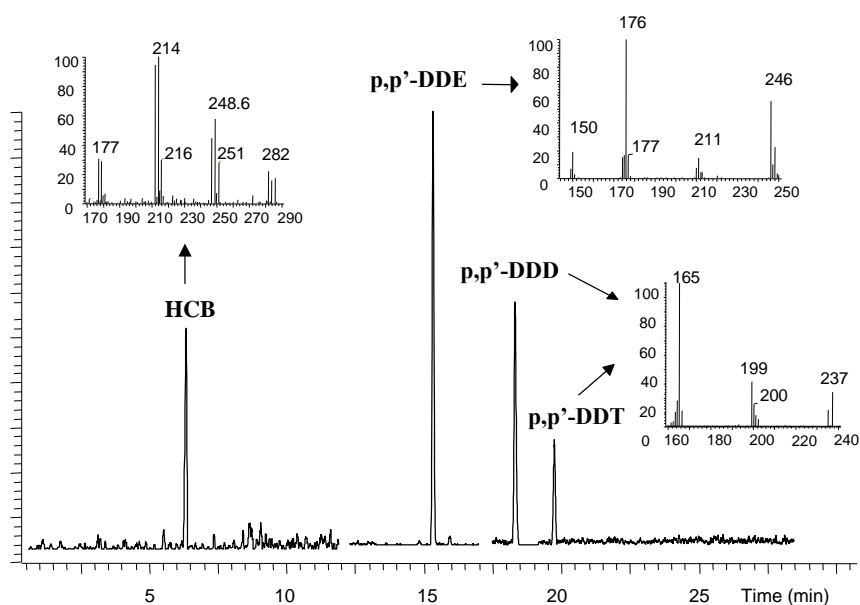
^{a)} n = number of samples analysed. Every sample was a pool of 2-4 individuals

^{b)} mean concentration and relative standard deviation in brackets

d= *detected*, nd= *non detected*,

As an example, **Figure 4** and **Figure 5** show the GC-MS/MS chromatograms obtained after the application of the developed procedures to the analysis of fish feed (**Figure 4**) and fish liver (**Figure 5**). As can be observed, the spectrum of each peak obtained by MS/MS confirms the identity of the organochlorine compounds detected in the samples.

A



B

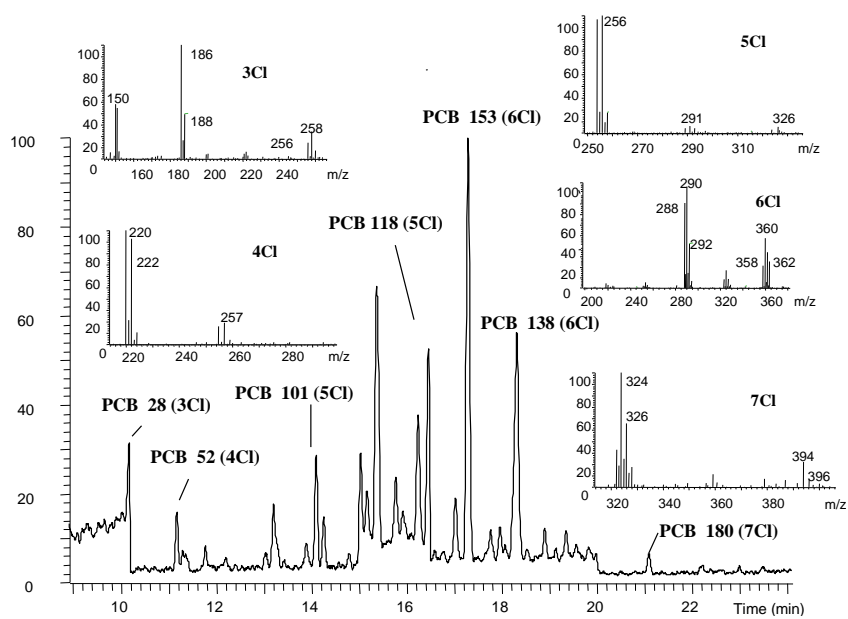


Figure 4. GC-MS/MS chromatograms of a fish food sample analysed, and MS/MS spectra of the compounds detected. A- organochlorine pesticides (extracted ion). B- PCBs (total ion current).

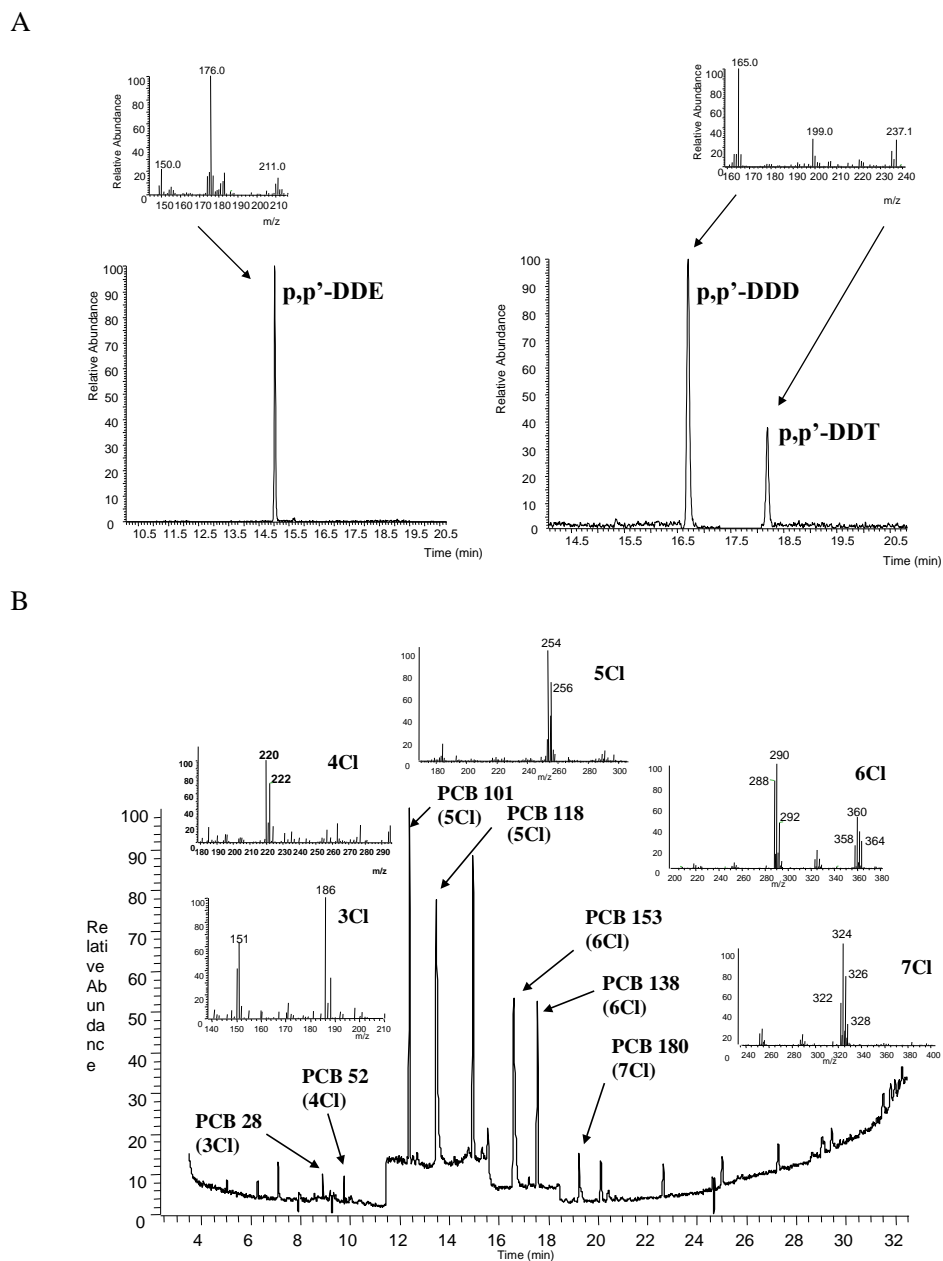


Figure 5. GC-MS/MS chromatograms for a fish liver sample analysed (*Sparus aurata*) and MS/MS spectra of the compounds detected. A- organochlorine pesticides (extracted ion). B- PCBs (total ion current).

4. Concluding remarks

It can be concluded that application of the optimised method for MS/MS detection (extract ion mode) to extracts of fatty samples purified by automated NPLC allowed the unequivocal identification of the analytes and to reach limits of detection below $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

As a consequence of the results obtained in the analysis of real samples, more data are needed in order to trace the behaviour of the organochlorine compounds through the marine food chain of wild and cultured products, in order to foresee risks to the human population, the final fate of these contaminants.

Acknowledgments

We thank the Generalitat Valenciana (Conselleria de Cultura y Educación, Project GV00-019-2) for their financial support of this study.

References

- [1] M. Blanchard, M.J. Teil, A.M. Carru, A. Chesterikoff, M. Chevrenil, *Wat. Res.* **1997**, 31(6), 1455-1461.
- [2] H. Yamada, K. Takayanagi, T. Masahiro, H. Tagata, K. Ikeda, *Environ. Pollut.* **1997**, 96(2), 217-226.
- [3] S. Focardi, C. Fossi, C. Leonzio, S. Corsolmi, O. Parra, *Environ. Monitor. Asses.* **1996**, 43, 73-92.
- [4] M.N. Jacobs, P.A. Johnston, C.L. Wyatt, D. Santillo, M.C. French, *Int. J. Environ. Pollut.* **1997**, 8, 74-92.
- [5] P.J. Marquis, R.L. Hanson, M.L. Larsen, W.M. DeVita, B.C. Butterworth, D.W. Kuehl, *Chemosphere.* **1994**, 29, 509-521.
- [6] L. Brown, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1997**, 33, 357-368.
- [7] J.H. Wang, Q. Xu, K. Jiao, *J. Chromatogr. A.* **1998**, 818(1), 138-143.
- [8] M.L. Hopper, *J. Chromatogr. A.* 1999. **840(1)**, 93-105.
- [9] G.R. van der Hoff, A.C. van Beuzekom, V.A. Brinkman, R.A. Bauman, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A.* **1996**, 754(1-2), 487-496.
- [10] F. Hernández, R. Serrano, E. Pitarch, F.J. López, *Anal. Chim. Acta.* **1998**, 374, 215-229.

- [11] R. Serrano, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A*. **1999**, 855, 633-643.
- [12] F. Hernández, R. Serrano, A.F. Roig-Navarro, Y. Martínez-Bravo, F.J. López, *Mar. Pollut. Bull.* **2000**, 40 (5), 426-433.
- [13] F. Hernandez, E. Pítarch, R. Serrano, J.V. Gaspar, N. Olea, *J. Anal. Toxicol.* **2002**, (in press).
- [14] C.R. Santerre, R. Ingram, G.W. Lewis, J.T. Davis, L.G. Lane, R.M. Grodner, C.I. Wei, P.B. Bush, D.H. Xu, J. Shelton, E.G. Alley, J.M. Hinshaw, *J. Food Science*. **2000**, 65(2), 231-235.
- [15] D. Berglund, P. Larsson, G. Ewald, L. Okla, *Can J. Fish Aquat. Sci.* **2000**, 57, 1160-1168.
- [16] K.A. Kidd, H.A. Bootsma, R.H. Nessler, D.C.G. Muir, R.E. Hecky, *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, 14-20.
- [17] M. Solé, C. Porte, D. Barcelo, J. Albaiges, *Mar. Pollut. Bull.* **2000**, 40(9), 746-753.
- [18] K. Borga, G.W. Gabrielsen, J.V. Skaare, *Env. Pollut.* **2001**, 113, 187-198.
- [19] G. Asmund, M. Cleemann, *Sci. Total Environ.* **2000**, 245: 203-219.
- [20] N. Zöllner, K.Z. Kirsch, *Ges. Exp. Med.* **1962**, 135: 545-548.
- [21] K. Grob, I. Kalin, A. Artho, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1991**, 14: 373-376.

2.1.3. ARTÍCULO CIENTÍFICO 5

Investigating the presence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean sea

R. Serrano, M. Barreda, M.A. Blanes

Marine Pollution Bulletin. (2008). 56, 963-972

Investigating the presence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean sea

Roque Serrano, Mercedes Barreda and Miguel A. Blanes

Research Institute for Pesticides and Water (IUPA), Avda Sos Baynat, s/n.

University Jaume I, 12071 Castellón, Spain

Abstract

The presence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean, Spain, is investigated. These pollutants were determined in white and red muscle and liver by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Contaminant profiles present in both wild and farmed fish tissues include DDTs, PCBs and HCB. The highest concentrations of contaminants were found in liver, and an increase in pollutant levels was observed in autumn, before spawning. This fact is explained in light of increased food intake when sea water temperatures increase. Gilthead sea bream from Western Mediterranean populations showed significantly higher concentrations of DDTs and PCBs than farmed fish from the same area. This fact is attributed to the low level of organochlorine contaminants present in fish feed supplied to the cultured fish. The diet is highlighted as an important factor in understanding differences observed in organochlorine pollutants levels of fish tissues.

Keywords: *Organochlorine pesticides; Polychlorinated biphenyls; Wild fish; Farmed fish; Western Mediterranean; Gilthead sea bream*

1. Introduction

Marine aquaculture has seen strong development in the last few decades as a consequence of increased fish consumption by the world population and decreasing wild stocks. Fish culture has also increased in the Western Mediterranean, where it is mainly focused on two species: gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish culture operates in parallel to traditional fisheries and nowadays both cultured and wild fish are important components of the Mediterranean diet.

Polychlorinated biphenyls (PCB) and organochlorine pesticides (OCP) are non-polar, highly lipophilic and persistent, ubiquitous environmental pollutants. Both are classified as persistent organic pollutants (POP) and are present in the contamination pattern of marine environments world-wide. Organochlorine compounds (OC) are dangerous pollutants due to their toxicity and stability, long biological half life and high liposolubility. These factors result in high bioaccumulation and biomagnification in the food chain, involving a wide range of trophic levels (Borga et al., 2001; Kidd et al., 2001; Serrano et al., 2003 a; Hoekstra et al., 2003 and Konwick et al., 2006).

As the human population is at the top of the artificial food chain that arises from aquaculture activities (composed of fish feed and farmed fish), a possible source of accumulation of OC in human beings exists. In fact, dietary intake, especially of marine organisms, is considered the most important source of OC in humans (Bjerregard et al., 2001; Johansen et al., 2004; Naso et al., 2005 and Bordajandi et al., 2006) and as a consequence, organochlorine compounds are frequently detected in human lipid tissues and fluids of people who have consumed seafood (Porta et al., 1999; Hernández et al., 2002a; Hernández et al., 2002b; Pitarch et al., 2003; Cruz et al., 2003; De Felip et al., 2004; De Saeger et al., 2005 and Withcomb et al., 2005).

Previous works have detected these pollutants in fish feed used in aquaculture and in cultured fish (Santerre et al., 2000; Easton et al., 2002 and Serrano et al., 2003a). Specifically, fish feed used in fish production on the Spanish Mediterranean Coast has been analysed by (Serrano et al., 2003 a) and (Serrano et al., 2003 b) who found appreciable concentrations of DDTs and PCBs.

Recently a controversy has arisen from the study carried out by Hites et al. (2004) on OC levels in farmed and wild salmon. Results of this study showed that concentrations of OC pollutants were significantly higher in farmed salmon than in wild salmon.

The high load of pollutants, including organochlorine compounds, in farmed salmon was also highlighted in a preliminary study performed by Easton et al. (2002). The feed used in the culture of these carnivorous fish was identified as the main source of organic persistent pollutants.

In this paper the levels of PCB and OCP in wild and cultured sea bream from the Western Mediterranean are investigated. Specimens were collected over two years (2001 and 2002) before and after spawning (autumn and winter, respectively). Liver, white muscle and red muscle were analysed using gas chromatography (GC) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS), after automated purification of sample extracts by normal phase liquid chromatography (NPLC). Data obtained from wild and cultured fish are compared to provide information on possible differences in their organochlorine levels, and to assist with information that may impact on public health.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Authentic samples of wild and cultured gilthead sea bream (*S. aurata*) came from populations located off the Castellon Coast (Spanish Mediterranean Coast) (**Fig. 1**) either from trawl catch, or from sea cage farms located in the same area (around longitude 0° latitude 40°N). They were purchased from commercial markets, dissected, the target tissues separated, and stored at -20 °C until analysis. The development state of oocytes was checked in each sample. Samples were collected in winter (after spawning) and autumn (before spawning) in both 2001 and 2002. The composite samples were made up of three individual specimens (female specimens around 500 g) that were pooled in order to obtain homogeneous composite samples of each tissue studied. At each sampling time, three composite samples were prepared, and all were analysed in triplicate.

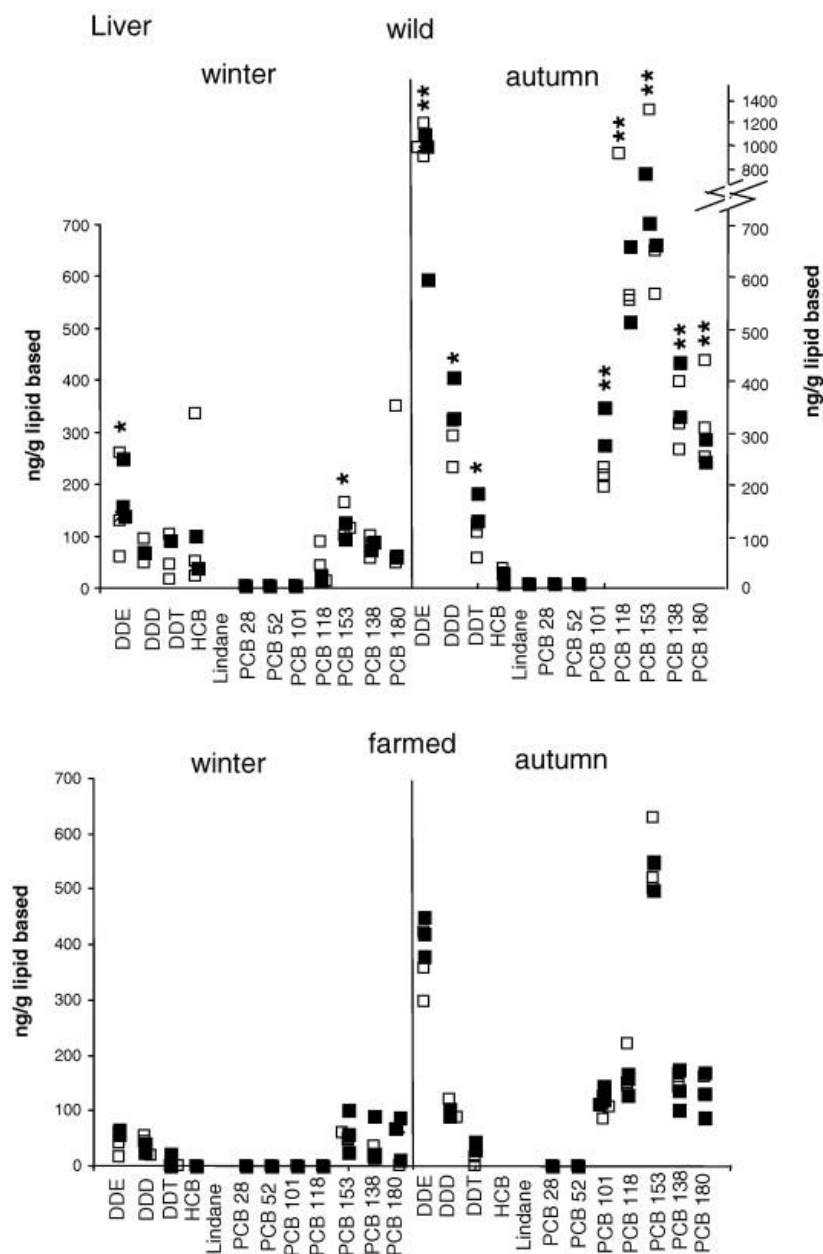


Fig. 1. Comparison between organochlorine compounds concentrations in liver from wild and cultured gilthead sea bream from the Western Mediterranean area. ■ Average concentrations corresponding to the analysis of composite samples ($n = 3$) 2001. □ id 2002. Signify differences between wild and farmed fish * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2.2. Analytical methodology

Organochlorine compounds, including pesticides and derivatives (DDTs – p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD –, HCB, heptachlor, heptachlor epoxide, lindane, mirex, metoxychlor, endosulfan (α and β isomers), endosulfan sulphate and endosulfan ether) and the polychlorinated biphenyls usually used as indicators IUPAC No. 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180, were determined in fish tissues (white and red muscle, and liver) following the method described by Serrano et al. (2003 b).

In brief, extraction from muscle and liver was carried out by refluxing ca. 8 g homogenized thawed sample in *n*-hexane for 4 h. Clean up of fish extracts was performed by HPLC, injecting 1 mL hexanic extract (4 g sample per mL) into an HPLC system using a silica-gel column. LC system used is composed by an LC Pump Master 305 piston pump, Gilson (Middleton, USA), with a column 150 × 3.9 mm i.d. packed with 4 μ m silica Novapack (Waters, Milford, MA, USA); mobile phases were *n*-hexane and ethyl acetate for column regeneration after a clean up cycle; flow rate was 1 ml min⁻¹. Analysis of the fat-free LC fractions collected was performed by gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) using an ion trap mass spectrometer (Finnigan GCQ, Austin, Texas, USA) operating in the electron impact ionisation mode (EI). The GC 8000 Top (CE Instruments, Milan, Italy) was equipped with an AS 800 autosampler. The oven temperature was programmed as follows: 90 °C (4 min), 30 °C to 180 °C min⁻¹, 4 °C to 270 °C min⁻¹, 30 °C to 300 °C min⁻¹ with a final hold for 3.5 min. Splitless injections (3 mm i.d. glass liner) of 2 μ l were performed using a fused silica DB-5MS capillary column coated with cross-linked 5% phenyl methyl siloxane with a length of 30 m × 0.25 mm i.d. and a film thickness of 0.25 μ m. Helium was applied as carrier gas at a flow of 1 ml min⁻¹. The injector temperature was 240 °C. Experimental mass spectrometer conditions are listed in **Table 1** (more details reported in Serrano et al., 2003 b).

Table 1. Program used for MS/MS detection of PCB and OC and extracted ions selected for quantitative determination

Compound	Parent ion	Time (min)	Window	Mass range	Voltage (V)	Rt ^a (min)	Extracted ions selected
HCB	288 ^b	3.50	10	170–295	3.50	7.31	214, 249
<i>HCB-¹³C₆</i> ^d	288 ^b	3.50	10	170–295	3.50	7.31	220, 225
Lindane	219	7.50	5	140–225	1.05	7.85	181, 183
Endosulfan ether	241	8.40	8	165–245	1.56	8.84	204–208, 237–241
Heptachlor	337	9.25	8	200–345	1.50	9.56	265
Heptachlor epoxide	355	11.30	8	175–360	1.60	11.80	265
α -Endosulfan	241	12.65	8	165–245	2.50	12.99	170, 172, 204–208
p,p'-DDE	250 ^c	13.60	8	145–260	3.00	13.82	176
<i>p,p'-DDE-D₈</i> ^d	250 ^c	13.60	8	145–260	3.00	13.82	183, 184
β -Endosulfan	241	14.60	8	165–245	2.50	15.02	170, 172, 204–208
p,p'-DDD	235	15.20	8	160–240	1.30	15.44	165, 199
Endosulfan sulphate	289	16.47	8	175–295	1.60	16.63	217, 219, 251–255
p,p'-DDT	235	16.75	8	160–240	1.70	16.83	165, 199
Metoxychlor	227	18.00	4	110–230	1.50	19.21	152, 169
Mirex	272	20.00	8	200–280	1.50	20.5	237
PCB 28	258	3.50	4	140–262	2.00	9.16	186
PCB 52	292	9.80	4	180–295	1.50	10.09	220, 222
PCB 101	326	11.50	4	170–330	2.00	12.85	254, 256
PCB 118	326	11.50	4	170–330	2.00	15.09	254, 256
PCB 153	360	15.60	8	200–380	1.75	15.93	288, 290
<i>PCB 138-¹³C₁₂</i> ^d	372	15.60	8	200–280	1.75	16.99	302, 337, 372, 374
PCB 138	360	15.60	8	200–380	1.75	16.99	288, 290
PCB 180	396	18.50	8	220–402	2.25	19.66	322, 324, 326

OC and PCB were analysed with different MS/MS programs. The isotopic labelled compounds used as surrogate internal standards (modified from Serrano et al., 2003b) are shown in italic letters.

^a Rt: retention time.

^b The total m/z range selected to carry out fragmentation (283–293) covers the individual parent ions of HCB (284) and HCB 13C6 (290).

^c The total m/z range selected to carry out fragmentation (245–255) covers the individual parent ions of p,p'-DDE (246) and p,p'-DDE D₈ (254).

^d Isotopically labelled compounds used as surrogate internal standards.

The analytical method applied showed excellent sensitivity and selectivity, as a consequence of the use of tandem mass spectrometry. It was satisfactorily validated by recovery experiments down to 5 ng g^{-1} . Lower spiked levels were not checked due to the presence of DDTs and PCBs in the “blank” samples and the background levels found in all fish analysed. However, the powerful analytical characteristics of GC–MS/MS together with the efficiency of the HPLC clean up in removing fat allowed us to detect the analytes at concentrations as low as 0.1 ng g^{-1} (estimated as the limit of detection, except for endosulfan ether, 0.2 ng g^{-1}). The limit of quantification was estimated as three times the detection limit (i.e. nine times the background noise in the chromatograms), resulting in values of 0.3 ng g^{-1} , except for endosulfan ether (0.6 ng g^{-1}). All analytes detected in the samples were confirmed by tandem mass spectrometry.

In regard to fish feed, an additional clean up step with concentrated sulphuric acid was necessary prior to normal phase HPLC clean up as a consequence of its high lipid content (around 20% fresh weight) (Serrano et al., 2003 b). Limits of detection were below 1 ng g^{-1} , except for heptachlor and p,p'-DDD. Analytes lost or destroyed in the acid treatment were analysed applying only normal phase HPLC clean up, with limits of detection around 10 ng g^{-1} , due to the lower amount of sample processed.

For quality control of real sample analysis, 50 ng of isotopically labelled standards were added before extraction as surrogates. Labelled standards used were HCB- $^{13}\text{C}_6$ (for the determination of HCB, lindane, endosulfan ether, heptachlor, heptachlor epoxide, and α -endosulfan); p,p' DDE- D_8 (for DDTs, β -endosulfan, endosulfan sulfate, metoxychlor, and mirex), and PCB138- $^{13}\text{C}_{12}$ (for PCBs).

Biomagnification factors (BMF) were calculated as the ratio between lipid-based concentrations of organochlorine compounds in fish tissues and fish feed (Serrano et al., 2003 a) using data obtained before and after spawning (autumn and winter, respectively).

2.2.1. Determination of fat

The total fat content in the sample extracts was determined gravimetrically after evaporation at 95°C to constant weight.

2.2.2. Data analysis

OC concentrations in tissues are expressed on a fresh weight and lipid weight basis (ng g^{-1} fresh weight and ng g^{-1} lipid weight). Data were converted to $\log(\text{ng g}^{-1} \text{ lipid weight} + 1)$ to correct for the dependence between arithmetic means and standard deviations. Homoscedasticity of variances was tested by means of Barlett's test ($p < 0.05$). Levels of OC in wild and cultured fish tissues were compared by *t*-Student test. All the statistical tests were conducted using STATGRAPHICS Version 7.0 (Statistical Graphics Corporation).

3. Results

3.1. Seasonal and tissue variation of PCB and OC concentration

The analysis of liver and muscle from wild, commercially caught, gilthead sea bream showed the presence of p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD, HCB, lindane and all the PCBs studied (**Table 2**). The highest concentrations corresponded to the sum of DDTs (especially p,p'-DDE) and the biphenyls with a higher degree of chlorine substitution (PCBs number 118, 138, 153, 180).

With regard to the presence of OC and PCB in muscle, white muscle presented low levels of DDTs, and PCBs were detected at concentrations below the limit of quantification (**Table 2**). Red muscle showed higher levels of contaminants than white muscle over winter, although both muscle tissues did not present significant seasonal variations. In contrast to muscle tissues, liver clearly presented higher concentrations of pollutants in autumn (**Table 2** and **Table 3**).

Table 2. Annual range of organochlorine compounds concentrations (ng g⁻¹ lipid weight) in wild commercial gilthead sea bream liver from the Western Mediterranean area

Liver		Concentration range (ng g ⁻¹ lipid weight) ^a													
		Red muscle						White muscle							
		Autumn		Winter		Autumn		Winter		Autumn		Winter		Autumn	
Year	Season	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002
p,p'-DDE		132-233	54.3-256	588-1058	915-1158	321-436	286-348	176-254	134-401	13.2-71.6	35.5-58.6	130-168	82.5-168		
p,p'-DDD		63.3-116	42.6-89.2	322-415	226-316	48.2-984	67.8-124	69.4-121	88.5-130	19.8-31.5	28.5-32.6	56-102	42.0-101		
p,p'-DDT		17.5-88.1	10.8-98.6	114-175	48.2-114	41.5-68.6	28.5-50.5	82.2-131	102-129	19.8-32.2	12.1-35.5	61.3-86.5	61.3-86.5		
HCB		24.0-96.8	10.8-330	d-20.4	18.5-28.3	65.2-102	46.5-173	d-8.4	d-11.0	-	-	-	-		
Lindane		-	-	-	-	19.8-36.2	27.1-37.3	-	-	-	-	-	-		
PCB 28		d	d	d	d	16.5-36.5	12.6-31.7	d	d	d	d	-	-		
PCB 52		d	d	d	d	29.2-52.4	37.4-48.6	-	-	d	d	-	-		
PCB 101		d	d	268-343	187-225	45.3-66.8	58.6-71.6	19.4-36.9	9.0-41.2	d	d	d	d		
PCB 118		12.8-101	8.1-85.6	506-653	549-876	60.2-79.0	51.8-64.3	26.3-44.2	19.2-37.0	d	d	d	d		
PCB 153		88.8-123	97.3-159	655-790	559-1282	77.6-124	86.2-104	226-312	185-401	d	d	d	d		
PCB 138		70.6-136	52.3-94.5	323-428	259-390	21.5-58.7	39.2-56.2	78.6-102	12.5-121	d	d	d	d		
PCB 180		55.0-85.8	44.2-346	235-280	245-431	8.3-40.3	4.6-24.6	142-202	124-248	d	d	d	d		

-: not detected; d: detected at a concentration level between LOD and LOQ.

^a Average values, n=3.

Table 3. Sum of concentrations of DDTs (p,p'-DDT, p,p'-DDD and p,p'-DDE), PCBs, other organochlorine pesticides and total of pollutants quantified in the samples analysed in this work.

	Liver		Red muscle		White muscle	
	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn
<i>Sum of concentrations (ng g⁻¹ fresh weight (ng g⁻¹ lipid based))</i>						
2001						
Wild fish						
Σ DDTs	15 (303)	84 (1395)	7.6 (950)	3.1 (307)	16 (527)	17 (418)
Σ PCBs	16 (312)	133 (2217)	d	d	11 (358)	23 (584)
Σ Others	2.5 (50)	d	-	-	3.2 (107)	d
Σ Total	33 (665)	217 (3618)	7.6 (950)	3.1 (307)	30 (9929)	40 (1005)
Farmed fish						
Σ DDTs	7.9 (99)	50 (552)	1.4 (69)	1.8 (61)	8.8 (161)	16 (271)
Σ PCBs	13 (158)	96 (1073)	d	2.2 (73)	3.7 (67)	34 (566)
Σ Others	d	-	-	-	0.8 (15)	-
Σ Total	21 (258)	146 (1626)	1.4 (69)	4.0 (134)	13 (243)	50 (837)
<i>Sum of concentrations (ng g⁻¹ fresh weight (ng g⁻¹ lipid based))</i>						
2002						
Wild fish						
Σ DDTs	10 (260)	69 (1383)	8 (995)	2.7 (270)	14 (460)	19 (468)
Σ PCBs	15 (387)	117 (2342)	d	d	11 (352)	23 (589)
Σ Others	5 (125)	6.5 (13)	-	-	4.2 (139)	d
Σ Total	31 (772)	187 (3738)	8 (995)	2.7 (270)	28 (951)	42 (1061)
Farmed fish						
	Jan	Oct	Jan	Oct	Jan	Oct
Σ DDTs	6.3 (79)	47 (518)	8.7 (58)	1.9 (62)	8.7 (158)	18 (304)
Σ PCBs	6.5 (81)	11 (125)	d	2.1 (72)	3 (54)	39 (647)
Σ Others	-	-	-	-	1.3 (23)	-
Σ Total	13 (159)	58 (643)	8.7 (58)	4.0 (134)	13 (236)	57 (951)

(d: detected; -: not detected).

3.2. Comparison between PCB and OCP levels in wild and farmed fish

The comparison between PCB and OCP levels in tissues of wild and farmed fish can be seen in **Fig. 1**, **Fig. 2** and **Fig. 3**. PCB and OCP concentrations in the tissues analysed were higher in wild than in farmed fish for most of the samples collected. The differences observed were statistically significant (t-Student test, $p < 0.01$ and $p < 0.05$) for DDTs and PCBs quantified in liver, especially in autumn (**Fig. 1**). Red and white muscle generally presented the same tendency as that of liver (**Fig. 2** and **Fig. 3**), except for PCB congeners 138 and 153 in white muscle which presented higher concentrations in farmed fish in winter. The highest concentration levels in both wild and farmed fish correspond to p,p'-DDE followed by PCB 153, and none of the individual data exceeded $1.2 \mu\text{g g}^{-1}$ (lipid based) using average values. **Table 3** shows the sum of concentrations of DDTs, PCBs and other organochlorine pesticides detected in the samples analysed, as well as the total load of organochlorine pollutants in wild and farmed specimens expressed on fresh weight and on a lipid basis. As can be observed, the results obtained showed a higher load of organochlorine contaminants in wild fish than in farmed fish.

Table 4 shows the organochlorine pollutants determined in fish feed batches purchased during 2001–2002. As can be seen, the load of organochlorine compounds in the fish feed supplied to farmed fish in the Western Mediterranean confirms the low levels found in other studies (Serrano et al., 2003 a and Serrano et al., 2003 b).

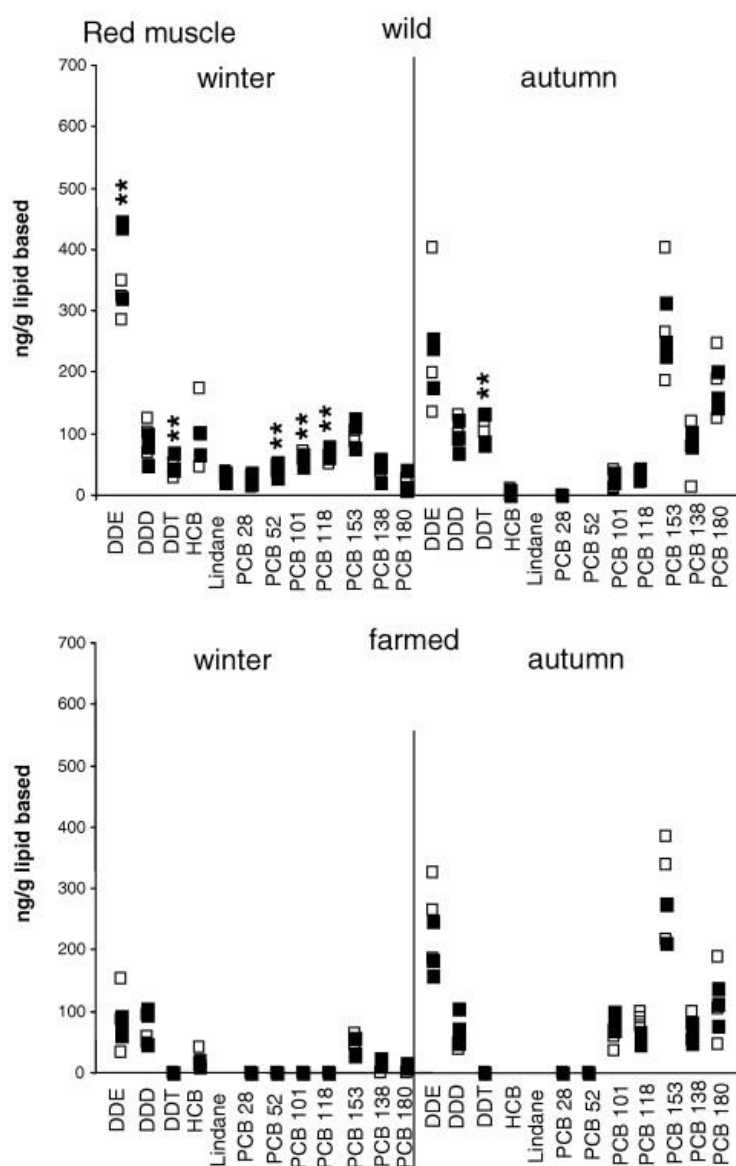


Fig. 2. Comparison between organochlorine compounds concentrations in red muscle from wild and cultured gilthead sea bream from the Western Mediterranean area. ■ Average concentrations corresponding to the analysis of composite samples ($n = 3$) 2001. □ id 2002. Signify differences between wild and farmed fish * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

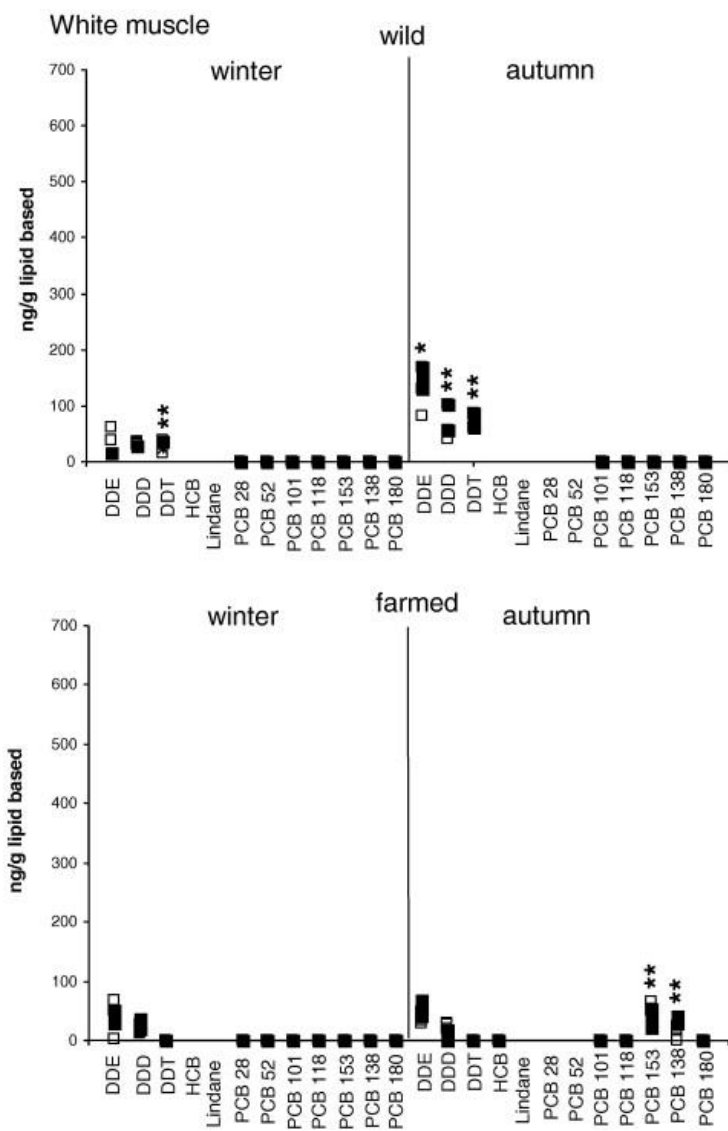


Fig. 3. Comparison between organochlorine compounds concentrations in white muscle from wild and cultured gilthead sea bream from the Western Mediterranean area. ■ Average concentrations corresponding to the analysis of composite samples ($n = 3$) 2001. □ id 2002. Signify differences between wild and farmed fish * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Table 4. Concentrations of organochlorine compounds (ng g^{-1} fresh weight and lipid weight) in fish feed batches supplied to fish during 2001–2002

Compound	Concentration of organochlorine pollutants			
	Fresh weight (ng g^{-1})		Lipid weight (ng g^{-1})	
	Mean	s.d.	Mean	s.d.
p,p'-DDE	5.3	1.0	57.3	10.7
p,p'-DDD	1.6	0.2	17.3	1.9
p,p'-DDT	1.2	0.2	12.7	2.3
HCB	0.9	0.3	10.1	3.1
Lindane	0.3	0.0	3.3	0.2
PCB 28	d	–	d	–
PCB 52	0.5	0.1	5.7	1.5
PCB 101	1.2	0.3	12.8	3.2
PCB 118	1.4	0.3	15.3	3.4
PCB 153	2.6	0.3	28.2	3.6
PCB 138	1.2	0.2	12.7	2.3
PCB 180	0.9	0.1	10.1	1.2
Σ OCs	9.1	1.1	97.4	11.6
Σ PCBs	7.9	0.6	84.8	6.6
Σ Total	17.0	1.2	182.2	13.3

^a Mean of six batches supplied to farmed fish during 2001–2002.

Biomagnification factors (BMF) were calculated for each tissue and season in wild and farmed fish (**Table 5**).

Table 5. Biomagnification factors (BMF) calculated for the tissues studied before and after spawning (average values from 2001 to 2002)

	Autumn	Winter
Liver	6.2	1.4
Red muscle	4.9	1.3
White muscle	0.7	0.3

4. Discussion

4.1. Seasonal and tissue variation of PCB and OC concentration

The profile of contaminants determined in the samples studied are in agreement with the contamination pattern observed in marine ecosystems around the world, as pointed out by several authors (Borga et al., 2001; Hernández et al., 2000; Ueno et al., 2003; Naso et al., 2005 and Johnson et al., 2007).

Seasonal changes observed in the concentrations of organochlorine compounds could be explained in light of the biological cycle. Wild gilthead sea bream normally lives in a marine environment where temperatures range from 11 °C (winter) to 23 °C (late summer), without any apparent problems (Gallardo et al., 2003). On the Western Mediterranean Coast, sea water temperature varies within that range. The uptake of food increases from winter to autumn when seawater temperatures increase. The most obvious effect of this increased food intake is the accumulation of lipids before the spawning season, and the risk of associated increased uptake of non-polar pollutants.

It is known that factors such as diet lipid level (Hemre and Sandness, 1999), ration level (Hillestad et al., 1998 and Johansson et al., 1995] and the weight of the fish (Lie et al., 1990) increase the body lipid composition and, consequently can account for an increase in the accumulation of lipophilic contaminants. Recently, Zhou et al. (2007) have found significant correlations between DDTs and OCPs concentrations and lipid content in different fish. Nevertheless, Antunes and Gil (2004) describe that normalized data for lipid weight reduced differences found between organochlorine concentrations in wild and farmed sea bass, but cannot explain the differences between two different farms in dry weight concentrations of contaminants. Our results support the hypothesis that considers lipid storage as the carrier of hydrophobic contaminants, as the highest concentrations of organochlorines in liver, the main target organ of lipid storage in Sparid fish, coincide with the increasing of sea water temperatures on the Spanish Mediterranean Coast. In contrast the load of organochlorine contaminants is lower in winter when the food uptake decreases due to the low temperatures. Seasonal variations detected could not be explained in this case by different lipid contents in liver during the year, as concentrations were normalized for lipid content. Fresh weight concentrations of pollutants follow the same profile (**Table 3**).

4.2. Comparison between PCB and OCP levels in wild and farmed fish

Conversely to our study, a recent paper from Antunes and Gil (2004) pointed out that wild sea bass (*D. labrax*) collected from the Northern Portuguese Coast showed lower fresh weight concentrations of PCB and DDT than fish from farms sited in the same area. The authors suggested the commercial diet as a source of PCB.

Several data on the presence of xenobiotics in cultured fish have been recently reported. Santerre et al. (2000) noticed a contrast in contaminant levels between aquaculture products and wild fish. The results of the analysis of farmed channel catfish, rainbow trout and red swamp crayfish from Southern USA sources revealed absence or low levels of OC, and were lower than the concentration levels reported in wild fish. However, Easton et al. (2002) assessed the risk of the organochlorine contaminants in wild and farmed salmon, indicating higher levels of PCB and OC in cultured fish as a consequence of the presence of these contaminants in fish feed. This fact has been confirmed in a recent study carried out by Hites et al. (2004), also suggesting the feed fish consume as the cause of the high levels of contaminants in farmed salmon, especially in Northern Europe. In these samples, the levels of organic compounds were higher than those found in farmed fish from North and South America.

The feed used in the culture of carnivorous fish is identified as the main source of organic persistent contaminants, a fact that was supported by the concentrations found in the samples analysed (up to 90 ng g⁻¹ total PCBs), especially in Northern Europe farms (Hites et al., 2004). Possibly, the high concentrations found in this fish feed are a consequence of the raw material used in its manufacture (fish from the North Sea, a highly polluted marine area). In fact, Antunes and Gil (2004) have noticed relationship between PCB profiles presented in farmed fish and their diets.

With regard to gilthead sea bream from the Western Spanish Mediterranean Coast, feed used in these farms is made from fish landed on the South American Coast (Chile, Peru). These fish are processed (chopped and dried) and mixed with fish oils to provide enrichment in essential fatty acids (ω 3). In accordance with our previous results on fish feed (Serrano et al., 2003 a), levels of contaminants in the feed supplied to the farmed fish studied in this paper, manufacturing feeds from fish from South America fishing areas would result in low PCB and

OCP content (**Table 4**), and consequently in the final aquaculture product as well, as the main organochlorine input for farmed fish appears to be the feed.

Biomagnification factors (BMF) calculated for each tissue and season in wild and farmed fish (**Table 5**) show values close to 1 in winter, similar to BMF calculated for cultured sea bass at 12 and 24 months of fist feeding (Serrano et al., 2003 a). BMF in autumn are clearly higher, especially in liver and red muscle, tissues with high metabolic activity, that would be due to the increasing food uptake in this season, supporting the idea that lipid metabolism is related to non-polar pollutant accumulation in fish.

It is interesting to remark that the lowest contaminants levels have been found in white muscle, the part of the fish usually consumed, minimizing the human health risk. Fresh weight concentrations of pollutants in muscle tissues, the edible part of fish or carcase, are below 10 ng g^{-1} in both wild and farmed fish.

In the light of data available and recognising the difficulties for accurate comparison between different studies performed on OC and PCB contents in wild and farmed fish (e.g. peculiarities of the different species and habitats, proper characterization of fish feed, concentrations expressed in different units), it can be deduced that the load of organochlorine pollutants in fish tissues is related to seasonal changes in the feeding behaviour of these marine organisms. The diet is highlighted as an important factor in understanding the different levels found of organochlorine pollutants in wild and farmed fish tissues.

Acknowledgment

We thank the Generalitat Valenciana (Conselleria de Cultura y Educación, Project GV00-019-2) for financial support of this study.

References

- Antunes and Gil, 2004 P. Antunes and O. Gil, PCB and DDT contamination in cultivated and wild sea bass from Ria Aveiro, Portugal, *Chemosphere* **54** (2004), pp. 1503–1507.
- Bjerregard et al., 2001 P. Bjerregard, E. Dewailly, P. Ayotte, T. Parrs, L. Ferron and G.J. Mulvad, Exposure of Inuit in Greenland to organochlorines through the marine diet, *Toxicology and Environmental Health* **62** (2001), pp. 69–81.
- Bordajandi et al., 2006 L.R. Bordajandi, I. Martín, E. Abad, J. Rivera and M.J. Gonzalez, Organochlorine compounds (PCBs, PCDDs and PCDFs) in sea fish and seafood from the Spain Atlantic Southwest coast, *Chemosphere* **64** (2006), pp. 1450–1457.
- Borga et al., 2001 K. Borga, G.W. Gabrielsen and J.U. Skaare, Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain, *Environmental Pollution* **113** (2001), pp. 187–198.
- Cruz et al., 2003 S. Cruz, C. Lino and M.I. Silveira, Evaluation of organochlorine pesticide residues in human serum from an urban and two rural populations in Portugal, *Science of the Total Environment* **317** (2003), pp. 23–35.
- De Felip et al., 2004 E. De Felip, A. Di Domenico, R. Miniero and L. Silvestroni, Polychlorobiphenyls and other organochlorine compounds in human follicular fluid, *Chemosphere* **54** (2004), pp. 1445–1449.
- De Saeger et al., 2005 S. De Saeger, H. Sergeant, M. Piette, N. Bruneel, W. Van de Voorde and C. Van Peteghem, Monitoring of polychlorinated biphenyls in Belgian human adipose tissue samples, *Chemosphere* **58** (2005), pp. 953–960.
- Easton et al., 2002 M.D.L. Easton, D. Luszniak and E. Von der Geest, Preliminary examination of contaminant loadings in farmed salmon, wild salmon and commercial salmon feed, *Chemosphere* **46** (2002), pp. 1053–1074.
- Gallardo et al., 2003 M.A. Gallardo, M. Sala-Rabanal, A. Ibarz, F. Padrós, J. Blasco, J. Fernández-Borrás and J. Sánchez, Functional alterations associated with “winter syndrome” in gilthead sea bream (*Sparus aurata*), *Aquaculture* **223** (2003), pp. 15–27.
- Hemre and Sandness, 1999 G.I. Hemre and K. Sandness, Effect of dietary lipid level on muscle composition in Atlantic salmon *Salmo salar*, *Aquaculture Nutrition* **5** (1999), pp. 9–16.

- Hernández et al., 2000 F. Hernández, R. Serrano, F. Roig-Navarro, Y. Martínez-Bravo and F.J. López, Persistent organochlorines and organophosphorus compounds and heavy elements in common whale (*Balaenoptera physalus*) from the western Mediterranean sea, *Marine Pollution Bulletin* **40** (2000), pp. 426–433.
- Hernández et al., 2002a F. Hernández, E. Pitarch, R. Serrano, J.V. Gaspar and N. Olea, Multiresidue determination of endosulfan and metabolic derivatives in human adipose tissue using automated liquid chromatography clean up and gas chromatography analysis, *Journal of Analytical Toxicology* **26** (2002), pp. 94–103.
- Hernández et al., 2002b F. Hernández, E. Pitarch, R. Serrano and C. Guerrero, Determination of organochlorine compounds in human adipose tissue using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatography–tandem mass spectrometry, *Chromatographia* **55** (2002), pp. 715–722.
- Hillestad et al., 1998 M. Hillestad, F. Johnsen, E. Austreng and T. Asgard, Long-term effects of dietary fat level and feeding rate on growth, feed utilization and carcass quality of Atlantic salmon, *Aquaculture Nutrition* **4** (1998), pp. 89–97.
- Hites et al., 2004 R.A. Hites, J.A. Foran, D.O. Carpenter, M.C. Hamilton, B.A. Knuth and S.J. Schwager, Global assessment of organic contaminants in farmed salmon, *Science* **303** (2004), pp. 226–229.
- Hoekstra et al., 2003 P.F. Hoekstra, T.M. O'Hara, A.T. Fisk, K. Borga, K.R. Solomon and D.C.G. Muir, Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort–Chukchi Seas, *Environmental Pollution* **124** (2003), pp. 509–522. Johansen et al., 2004 P. Johansen, D. Muir, G. Asmund and F. Riget, Human exposure to contaminants in the traditional Greenland diet, *Science of the Total Environment* **331** (2004), pp. 189–206.
- Johansson et al., 1995 L. Johansson, A. Kiessling, T. Asgard and L. Berglund, Effects of ration level in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, (Walbaum), on sensory characteristics, lipid content and fatty acid composition, *Aquaculture Nutrition* **1** (1995), pp. 59–66.
- Johnson et al., 2007 L.L. Johnson, G.M. Ylitalo, C.A. Sloan, B.F. Anulacion, A.N. Kagley, M.R. Arkoosh, T.A. Lundrigan, K. Larson, M. Siipola and T.K. Collier, Persistent

- organic pollutants in outmigrant juvenile chinook salmon from the Lower Columbia Estuary, USA, *Science of the Total Environment* **374** (2007), pp. 342–366.
- Kidd et al., 2001 K.A. Kidd, H.A. Bootsma, R.H. Hesslein, D.C.G. Muir and R.E. Hecky, Biomagnification of DDT through the benthic and pelagic food webs of Lake Malawi, East Africa: importance of trophic level and carbon source, *Environmental Science and Technology* **35** (2001), pp. 14–20.
- Konwick et al., 2006 B.J. Konwick, A.W. Garrison, M.C. Black, J.K. Avants and A.T. Fisk, Bioaccumulation, biotransformation and metabolite formation of fibronil and chiral legacy pesticides in rainbow trout, *Environmental Science and Technology* **40** (2006), pp. 2930–2936.
- Lie et al., 1990 O. Lie, G.I. Hemre and G. Lambertsen, A comparison of the composition of cultured and wild caught European eel (*Anguilla anguilla*), particularly regarding lipids, *Fiskeridirektorates Skrifter, Serie Ernaering* **2** (1990), pp. 3–11.
- Naso et al., 2005 B. Naso, D. Perrone, M.C. Ferrante, M. Bilancione and A. Lucisano, Persistent organic pollutants in edible marine species from the Gulf of Naples, Southern Italy, *Science of the Total Environment* **343** (2005), pp. 83–95.
- Pitarch et al., 2003 E. Pitarch, R. Serrano, F.J. López and F. Hernández, Rapid multiresidue determination of organochlorine and organophosphorus compounds in human serum by solid phase extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **376** (2003), pp. 189–197.
- Porta et al., 1999 M. Porta, N. Malats, M. Jarrod, J.O. Grimalt, J. Rifá, A. Carrato, L. Guarner, A. Salas, M. Santiago-Silva, J.M. Corominas, M. Andreu and F.X. Real, Serum concentrations of OC compounds and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer, *The Lancet* **354** (1999), pp. 21–25.
- Santerre et al., 2000 C.R. Santerre, R. Ingram, G.W. Lewis, J.T. Davis, L.G. Lane, R.M. Grodner, C.-I. Wei, P.B. Bush, D.H. Xu, J. Shelton, E.G. Alley and J.M. Hinshaw, Organochlorines, organophosphates and pyrethroids in channel catfish, rainbow trout, and red swamp crayfish from aquaculture facilities, *Food Chemistry and Toxicology* **65** (2000), pp. 231–235.
- Serrano et al., 2003 a R. Serrano, A. Simal-Julian, E. Pitarch, F. Hernández, I. Varo and J.C. Navarro, Biomagnification study on organochlorine compounds in marine aquaculture:

- the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model, *Environmental Science and Technology* **37** (2003), pp. 3375–3381.
- Serrano et al., 2003 b R. Serrano, M. Barreda, E. Pitarch and F. Hernández, Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry, *Journal of Separation Science* **26** (2003), pp. 75–86.
- Ueno et al., 2003 D. Ueno, S. Ionue, K. Ikeda, H. Tanaka, H. Yamada and S. Tanabe, Specific accumulation of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in Japanese common squid as a bioindicator, *Environmental Pollution* **125** (2003), pp. 227–235.
- Withcomb et al., 2005 B.W. Withcomb, E.F. Schisterman, G.M. Buck, J.M. Weiner, H. Greicerstein and P.J. Kostiniak, Relative concentrations of organochlorines in adipose tissue and serum among reproductive age women, *Environmental Toxicology and Pharmacology* **19** (2005), pp. 203–213.
- Zhou et al., 2007 R. Zhou, L. Zhu and Q. Kong, Persistent chlorinated pesticides in fish species from Qiantang River in East China, *Chemosphere* **68** (2007), pp. 838–847.

2.1.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

En una primera fase, se ha desarrollado un método eficiente y sensible, que permite alcanzar bajos límites de detección a pesar de la complejidad de las matrices estudiadas, con un alto contenido lipídico (**Artículo científico 4**). Las muestras biológicas grasas son una de las matrices que más dificultades crean en la determinación de residuos de plaguicidas. Esto se debe a que en la fase de extracción, junto con los plaguicidas, se extraen gran cantidad de compuestos, como los lípidos, que pueden interferir en la determinación analítica o simplemente deteriorar los equipos instrumentales (columnas y detectores del sistema cromatográfico). Así, para el análisis de residuos de plaguicidas, es necesario la eliminación de los compuestos interferentes presentes en los extractos (especialmente grasas co-extraídas) haciendo uso de métodos eficaces de purificación.

La técnica empleada para la determinación instrumental de los compuestos considerados (plaguicidas organoclorados y sus derivados y PCBs) es la GC-MS/MS con un analizador de trampa de iones (IT) en modo impacto electrónico (EI). Esta técnica permite alcanzar una elevada selectividad, así como la confirmación fiable de los analitos junto a unos límites de detección bajos, adecuados para la caracterización del perfil de contaminación de las muestras exigido en estudios de carácter ecotoxicológico y ambiental. Usando columnas cromatográficas capilares, el nivel de grasa inyectado no debería ser superior a 600 ng por inyección, por lo que se requieren métodos de purificación con una elevada eficacia en la eliminación de las grasas. Las muestras de organismos marinos analizadas presentan un alto contenido en grasas, tanto neutras (colesterol y sus ésteres, ceras, triglicéridos) como polares (fosfolípidos) (Serrano, 1990).

En la presente investigación se han utilizado dos técnicas de purificación: la cromatografía líquida en fase normal (NPLC), que permite un alto grado de automatización, y el tradicional tratamiento ácido con H₂SO₄ concentrado.

Se ha estudiado la eficacia de los dos métodos de purificación mediante su aplicación a extractos hexánicos conteniendo 4 gramos de muestra fresca por mililitro.

Los resultados obtenidos mostraron que NPLC es capaz de purificar muestras con contenidos de grasa de, aproximadamente, un 5 % en peso fresco, como es el caso de los tejidos musculares de pescado. Sin embargo, esta técnica no consigue una purificación suficiente en extractos de muestras más problemáticas como los piensos utilizados en piscicultura, con un contenido graso del 20%. En estos casos, sólo cuando la concentración del extracto se bajó hasta 1 g de muestra por mL se pudo rebajar el nivel de grasa en el extracto purificado lo suficiente como para ser inyectado en el sistema cromatográfico. Sin embargo, esto impediría alcanzar límites de detección por debajo de $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de compuesto OC en pienso, objetivo de esta parte del trabajo.

La aplicación del tratamiento ácido como método de purificación de los extractos de pienso demostró la destrucción de más del 99% de las grasas presentes, pero, aún así, el contenido graso del extracto purificado fue excesivo para su inyección en el sistema cromatográfico. Por otra parte, un inconveniente del tratamiento ácido es la degradación de algunos de los analitos estudiados, lo que ocurre con *metoxiclor*, *endosulfan* y sus metabolitos, *aldrin*, *heptacloro-epóxido* y *lindano* (Hernández et al, 2002 b).

Finalmente, puesto que ninguno de los dos métodos de purificación por separado proporcionó resultados totalmente satisfactorios, se optó por combinar ambos métodos, realizando primero el tratamiento por digestión ácida seguido del clean-up por NPLC. Los resultados obtenidos al aplicar este proceso de purificación combinado a extractos de pienso (4 g de muestra por mL de disolvente) mostraron que la cantidad de grasa en las fracciones de LC obtenidas fue inferior a $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, por lo que su inyección en la columna de gases fue viable (en una inyección de $1\ \mu\text{L}$ en el sistema GC-MS, la cantidad estimada de grasa sería de 200 ng). La eficacia de estos procedimientos de purificación ensayados hizo que los cromatogramas obtenidos presentaran una relación señal-ruido (S/N) elevada y unos límites de detección muy bajos.

Para evaluar la fiabilidad de los procedimientos de análisis desarrollados se realizó una validación en la que se estimaron los siguientes parámetros: linealidad, efecto matriz, exactitud y precisión, límite de cuantificación y límite de detección, según las recomendaciones de la guía SANCO/825/00.

La respuesta fue lineal para los compuestos estudiados en todo el rango de concentración ensayado ($0.5-1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), con coeficientes de correlación mayores a 0.999 y niveles de significación de la regresión altamente favorables, no observándose tendencias significativas en los residuos.

El efecto matriz se estudió por comparación de las pendientes mediante calibración directa y las obtenidas por el método de las adiciones estándar. Para la mayoría de los casos, las concentraciones resultantes mediante calibrado directo y adiciones estándar fueron similares por lo que se comprobó la ausencia de efecto matriz, lo que es indicativo de la eficiente purificación llevada a cabo. El método de adiciones estándar sólo se pudo llevar a cabo en pienso y tejido muscular de pescado y no para hígado debido a la pequeña cantidad de muestra de la que se dispuso.

Los estudios de recuperación se realizaron para los tres tipos de muestras estudiados. Se ensayaron tres niveles de fortificación en el caso de músculo y pienso (5, 25 y $75 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$), mientras que para hígado sólo se estudió el nivel de $5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. Los valores de recuperación obtenidos oscilaron entre 70-120% con una desviación estándar inferior al 20%. La precisión se evaluó en estos mismos ensayos obteniéndose resultados similares tanto en los ensayos de precisión intermedia como en los de repetibilidad (**Tabla 4 del Artículo científico 4**).

Los límites de detección del método se calcularon como la concentración correspondiente a un pico tres veces mayor al ruido de fondo. Para su obtención se realizó el análisis de 10 réplicas de una muestra fortificada al nivel más bajo ensayado, $5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. No se pudo realizar a un nivel de concentración más bajo debido a la no disponibilidad de muestras blanco ya que todas las muestras estudiadas contenían varios de los analitos.

Puesto que el nivel más bajo validado fue el de $5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, éste se consideró como el LOQ objetivo, que se estableció como la concentración más baja de analito para la cual el método fue validado satisfactoriamente. Los analitos no resistentes al ataque ácido se determinaron en extractos 4 veces más diluidos purificados únicamente mediante NPLC, lo que condujo a límites de detección de $1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. En el caso de las muestras de músculo

de pescado, los niveles de detección fueron de alrededor de $0.1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, lo que permitió la detección de los contaminantes resistentes al tratamiento ácido presentes en las muestras a niveles de sub-ppb.

Los procedimientos desarrollados mejoran, en general, las metodologías analíticas existentes para el análisis de compuestos organoclorados en muestras con alto contenido de grasas en cuanto a límites de detección y de cuantificación gracias, por un lado, a la eficacia de la etapa de purificación de los extractos, lo que permite la obtención de óptimos resultados, así como a la determinación mediante GC-MS/MS, por otro lado.

El método desarrollado se aplicó al estudio de los niveles de contaminantes organoclorados presentes en peces salvajes y cultivados procedentes de las Costas de Castellón, concretamente en especies de interés comercial en la zona, como son la dorada (*Sparus aurata*), y la lubina (*Dicentrarchus labrax*), que son parte importante de la dieta mediterránea del área (**Artículo científico 5**).

Actualmente, este tema crea cierta polémica, especialmente entre la piscicultura nórdica y norteamericana, dedicada a los salmónidos, y la mediterránea que, como se ha indicado, se dedica principalmente al cultivo de dorada y lubina. Mientras los salmónidos cultivados presentan niveles de contaminación alarmantes en algunos casos (Hites et al, 2004), los productos de la acuicultura mediterránea presentan una mejor calidad, incluso frente a especies salvajes.

Para la obtención de datos representativos se muestrearon especímenes recolectados en dos periodos relevantes de su ciclo biológico, como son el otoño, por producirse el desove de los peces y presentar éstos una mayor acumulación de lípidos debido al aumento en la ingesta de alimento que se ha producido en los meses anteriores, y el invierno, por ser la etapa posterior a estos fenómenos biológicos. Esto se realizó durante dos años consecutivos (2001-2002). Los resultados obtenidos para cada muestra, compuesta de tres especímenes, se presentaron individualmente ($n=6$). Este diseño en el muestreo nos permitió comprobar los cambios debidos al ciclo biológico y a los posibles cambios climáticos anuales.

A su vez, se diseccionó cada una de las muestras extrayendo diferentes tejidos; dos tipos de músculo (blanco y rojo) e hígado, con el objeto de conocer la distribución de los contaminantes en los diferentes tejidos del pez. Se estudiaron estos tejidos debido a las diferencias en composición lipídica y a la importancia que presentan algunos de ellos, en la dieta humana puesto que normalmente sólo se consume el filete (músculo) del pescado.

Los resultados obtenidos en el análisis de los diferentes tejidos mostraron la presencia de *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, HCB, lindano y todos los congéneres seleccionados para los PCBs. El perfil de contaminación coincide con el encontrado por otros autores en el compartimento biótico del ecosistema marino por todo el mundo (Deudero et al, 2007). Los niveles más altos correspondieron a compuestos de la familia de los DDTs, en especial el *p,p'*-DDE (hasta 1158 ng·g⁻¹, peso lipídico (p.l.) en hígado), junto con los congéneres de PCBs con mayor nivel de cloración, como son los PCBs 118, 138, 153 y 180 (hasta 1282 ng·g⁻¹ p.l.).

Si se realiza una comparación de nivel de contaminantes según los distintos tejidos, se observa que en el músculo blanco los niveles de concentración son los más bajos, estando siempre por debajo del límite de cuantificación, tanto para DDTs como para PCBs. Los niveles de contaminantes en el músculo rojo son más altos que en el blanco, como cabría esperar si se tiene en cuenta que la cantidad de grasa es mayor que la del músculo blanco en el que existen mayor número de lípidos pero de tipo estructural. Así pues, el almacenaje lipídico que se observa en las muestras conlleva un almacenamiento de contaminantes. Esto se pone de especial manifiesto cuando se tienen en cuenta los resultados obtenidos para el hígado, ya que la concentración de compuestos organoclorados en este órgano es mucho más elevada que en otros tejidos de los peces. De esta forma, se puede considerar al hígado como el principal órgano diana para estos contaminantes. En resumen, los tejidos más grasos presentaron concentraciones más altas de contaminantes, siguiendo la secuencia hígado > músculo rojo > músculo blanco, tal como otros autores han encontrado (Blanes et al, 2009).

En cuanto a la variación estacional, se verificó que la concentración más elevada de contaminantes coincide con el otoño, tras un periodo estival en el que sube la temperatura del agua y se produce un aumento de la ingesta, en preparación de la etapa de puesta en Noviembre-Diciembre. Tras el desove y la llegada de las temperaturas más bajas, la ingesta baja, lo que coincide con los niveles más bajos de contaminantes encontrados en los diferentes tejidos.

Como consecuencia de estas variaciones estacionales, los valores de biomagnificación calculados a partir de los niveles de contaminantes en el pienso y en los peces cultivados mostraron valores cercanos a 1 en invierno y mucho más elevados en otoño, sobre todo en los órganos o tejidos con mayor actividad metabólica, como el hígado y el músculo rojo. A su vez, en esta estación el valor de biomagnificación para el músculo blanco es muy bajo (0.7), como consecuencia de las bajas temperaturas que se producen en el agua y la disminución en la ingesta de comida. Este dato es sumamente positivo puesto que como ya se ha mencionado, el músculo es generalmente la parte comestible del pescado.

Cabe destacar que la variación de las concentraciones de contaminantes de una estación a otra no se pueden explicar como resultado de la variación en el contenido lipídico de los diferentes tejidos, puesto que los resultados están normalizados en base al contenido graso. Aunque si se tienen en cuenta los datos referidos a peso fresco, se observa que éstos siguieron la misma tendencia.

Finalmente, la comparación de los niveles de contaminantes en doradas salvajes y cultivadas mostró que las primeras presentaron en otoño valores significativamente más altos que las cultivadas. Este hecho está en contradicción con otros trabajos realizados en salmónidos (Easton et al, 2002; Hites et al, 2004), e incluso con algún trabajo con especies templadas (Antunes et al, 2004). Sin embargo, estudios posteriores (Serrano et al, 2008 a; Blanes et al, 2009) confirman los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Las causas de estas diferencias tienen dos posibles explicaciones. Por una parte, el pienso utilizado en la cría de salmónidos contiene un mayor porcentaje de aceite de

pescado y de otros derivados marinos (alrededor de un 5%) en comparación con los piensos utilizados en piscicultura mediterránea. Los derivados marinos utilizados en la fabricación de los piensos son la principal fuente de contaminantes organoclorados que aparecen en los piensos y que acaban acumulándose en los tejidos de los peces cultivados (Nácher et al, 2009; Serrano et al, 2008 a). Por otra parte, los derivados marinos utilizados en la mayoría de granjas situadas en la costa mediterránea proceden del cono sur americano, con niveles de compuestos organoclorados más bajos en comparación con los procedentes del Atlántico norte (Nácher et al, 2009; Serrano et al, 2008 b).

El análisis de los datos, al comparar los niveles de contaminantes en peces de origen salvaje y de origen cultivado, demuestra que la carga de contaminantes en peces salvajes es mayor que la que existe en peces cultivados para la mayoría de las muestras analizadas. Estos datos están en concordancia con los bajos niveles de contaminación obtenidos para los piensos que se han empleado en la alimentación de las muestras cultivadas objeto de estudio.

Podemos concluir que en el presente trabajo se demuestra la calidad de los productos de la acuicultura mediterránea, especialmente de la piscicultura dedicada al cultivo de dorada y lubina, como consecuencia de la utilización de piensos de alta calidad respecto a la presencia de contaminantes organoclorados, lo que redundará en la disminución de riesgos para la Salud Pública.

2.1.5. REFERENCIAS

- Antunes P., Gil O. (2004). “*PCB and DDT contamination in cultivated and wild sea bass from Ria de Aveiro, Portugal*”. *Chemosphere* 54, 1503-1507.
- Blanes M.A., Serrano R., López F.J. (2009). “*Seasonal trends and tissue distribution of organochlorine pollutants in wild and farmed gilthead sea bream (Sparus aurata) from the western Mediterranean sea and their relationship with environmental and biological factors*”. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 57(1), 133-144.
- Bocquene G., Franco A. (2005) “*Pesticide contamination of the coastline of Martinique*”. *Marine Pollution Bulletin* 51, 612-619.
- Bordajandi L.R, Martín I., Abad E., Rivera J., González M.J. (2006). “*Organochlorine compounds (PCBs, PCDDs and PCDFs) in seafish and seafood from Spanish Atlantic Southwest Coast*”. *Chemosphere* 64, 1450-1457.
- Borga K., Gabrielsen G.W., Skaare J.U. (2001). “*Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain*”. *Environmental Pollution* 113, 187-198.
- Breivik K., Alcock R. (2002). “*Emission imposible? The challenge of quantifying sources and releases of POPs into the environment*”. *Environment International* 28, 137-138.
- Brown T.N., Wania F. (2008). “*Screening chemicals for the potential to be persistent organic pollutants: A case study of Arctic contaminants*”. *Environmental Science Technology* 42, 5202-5209.
- Brungs W.A., Mount D.I. (1978). “*Introduction to the discussion of the use of aquatic toxicity test for evaluation of the effects of toxic substances. Estimating the Hazard of Chemical Substances to Aquatic Life*”. Cairns J., Dickson K.L., Maki A.W. (eds). ASTM STP 657, pp. 15-26, American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

- Burkow I.C., Kallenborn R. (2000). “*Sources and transport of persistent pollutants to the Arctic*”. Toxicology Letters 112-113, 87-92.
- Carubelli G., Fanelli R., Mariani G., Nichetti S., Crosa G., Calamari D., Fattore E. (2007). “*PCB contamination in farmed and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from a coastal wetland area in central Italy*”. Chemosphere 68, 1630-1635.
- Dachs J., Lohmann R., Ockenden W.A., Méjanelle L., Eisenreich S.J., Jones K.C. (2002). “*Oceanic biogeochemical controls on global dynamics of persistent organic pollutants*”. Environmental Science Technology 36, 4229-4237.
- de Boer J., Pieters H. (1991). “*Dietary accumulation of polychlorinated biphenyls, chlorinated pesticides and mercury by cultivated eels, *Anguilla anguilla* L.*”. Aquaculture Fishery Management 22, 329-334.
- Deudero S., Box A., March D., Valencia J.M., Grau A.M., Tintore J., Benedicto J. (2007) “*Organic compounds temporal trends in some invertebrate species from the Balearics, Western Mediterranean*”. Chemosphere 68, 1650–1659.
- Easton M.D.L., Lusznik D., Von der Geest E. (2002). “*Preliminary examination of contaminants loadings in farmed salmon and comercial salmon feed*”. Chemosphere 46, 1053-1074.
- Edwards C.A. (1978). “*Occurrence and persistence of pesticides in the physical environment and occurrence and persistence of pesticides in the biota*”. Persistent Pesticides in the Environment, 2nd ed. 1-104, C.R.C. Press, Ohio.
- European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection, Residues: Guidance document on residue analytical methods. Document SANCO/825/00 rev. 7th
- Hernández F., Serrano R., Roig-Navarro A.F., Martínez-Bravo Y., López F.J. (2000). “*Persistent organochlorines and organophosphorus compounds and heavy metals*”

in common whale (Balaenoptera physalus) from the western Mediterranean Sea". Marine Pollution Bulletin 40, 426-433.

Hernández F, Pitarch E., Serrano R., Guerrero C. (2002 a). "*Determination of organochlorine compounds in human adipose tissue using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatography-tandem mass spectrometry*". Chromatographia 55 (11-12), 715-722.

Hernández F., Pitarch E., Serrano R., Gaspar, J.V., Olea, N. (2002 b). "*Multiresidue determination of endosulfan and metabolic derivatives in human adipose tissue using automated liquid chromatographic cleanup and gas chromatographic analysis*". Journal of Analytical Toxicology 26 (2), 94-103

Hernández F., Portolés T., Pitarch E., López F.J., Beltrán J. (2005). "*Potential of gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry for quantification and confirmation of organohalogen xenoestrogen compounds in human breast tissues*". Analytical Chemistry, 77, 7662-7672.

Hites R., Foran J.A., Schwager S.J., Knuth B.A., Hamilton M.C., Carpenter D.O. (2004). "*Global assessment of polybrominated diphenyl ethers in farmed and wild salmon*". Environmental Science Technology 38, 4945-4949.

Hoekstra P.F., O'Hara T.M., Fisk A.T., Borga K., Solomon K.R., Muir D.C.G. (2003). "*Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas*". Environmental Pollution 124, 509-522.

Jacobs M.N., Covaci A., Scchepens P. (2002). "*Investigation of selected persistent organic pollutants in farmed Atlantic salmon (Salmo salar), salmon aquaculture feed, and fish oil components of the feed*". Environmental Science Technology 36, 2797-2805.

- Jurado E., Lohmann R., Meijer S., Jones k.C., Dachs J. (2004). “*Latitudinal and seasonal capacity of the surface oceans as a reservoir of polychlorinated biphenyls*” *Environmental Pollution* 128, 149-162.
- Loizeau V., Abarnou A., Menesguen A. (2001 a). “*A steady-state model of PCB Bioaccumulation in the Sea Bass (Dicentrarchus labrax) food web from the Seine Estuary, France*”. *Estuaries* 24, 1074-1087.
- Loizeau V., Abarnou A., Cugier P., Jaouen-Madoulet A., Le Guellec A., Menesguen A. (2001 b). “*A model of PCB Bioaccumulation in the Sea Bass Food Web from the Seine Estuary (Eastern English Channel)*”. *Marine Pollution Bulletin* 43 (7-12), 242-255.
- Mackay D., Webster E., Beyer A., Matthies M., Wania F. (2001). “*Defining the bioaccumulation, persistence, and transport attributes of priority chemicals*”. *ACS Symposium Series Vol: 773*, 14-28.
- Nácher-Mestre J., Serrano R., Benedito-Palos L., Navarro J.C., López F.J., Pérez-Sánchez J. (2009). “*Effect of fish oil replacement and re-feeding on the bioaccumulation of organochlorine compounds in gilthead sea bream (Sparus aurata L.) of market size*”. *Chemosphere* 76, 811-817.
- Ozmen M., Ayas Z., Güngördü A., Ekmekci G.F., Yerli S. (2008). “*Ecotoxicological assessment of water pollution in Sariyar Dam Lake, Turkey*”. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 163-173.
- Pandit G.G., Mohan Rao A.M., Jha S.K., Krishnamoorthy T.M., Kale S.P., Raghu K., Murthy N.B.K. (2001). “*Monitoring of organochlorine pesticide residues in the Indian marine environment*”. *Chemosphere* 44, 301-305.
- Perugini M., Cavaliere M., Giammarino A., Mazzone P., Olivieri V., Amorena M. (2004). “*Levels of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in*

some edible marine organisms from the Central Adriatic Sea". Chemosphere 57, 391-400.

Pitarch E., Serrano R., López F.J., Hernández F. (2003). "*Rapid multiresidue determination of organochlorine and organophosphorus compounds in human serum by solid phase extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*". Analytical and Bioanalytical Chemistry 376, 189-197.

Plan nacional de aplicación Convenio de Estocolmo y el Reglamento 850/2004, sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. (2004). Subdirección General de Calidad del Aire y Prevención de Riesgos del Ministerio de Medio Ambiente.

Rodan B., Pennington D.W., Eckley N., Boethling R.S. (1999). "*Screening for persistent organic pollutants: Techniques to provide a scientific basis for POPs criteria in international negotiations*". Environmental Science Technology 33, 3482-3488

Saera-Vila A., Benedito-Palos L., Sitjà-Bobadilla A., Náchter-Mestre J., Serrano R., Kaushik S., Pérez-Sánchez J. (2009). "*Assessment of the health and antioxidant trade-off in gilthead sea bream (Sparus aurata L.) fed alternative diets with low levels of contaminants*". Aquaculture 271, 87-95.

Schüürmann G., Markert B. (eds). (1998). "*Ecotoxicology: Ecological Fundamentals, Chemical exposure, and Biological Effects*". Wiley.

Serrano R. (1990). "*Análisis de residuos de plaguicidas organofosforados en organismos marinos: Estudio de la etapa de purificación. Aplicación a estudios de bioconcentración*". Tesis Doctoral. Universitat Jaume I.

Serrano R., Barreda M., Pitarch E., Hernández F. (2003). "*Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry*". Journal of Separation Science 26, 75-86.

- Serrano R., Blanes M.A., López F.J. (2008 a) “*Biomagnification of organochlorine pollutants in farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and stable isotope characterization of the trophic chains*”. *Science of the Total Environment* 389, 340-349.
- Serrano R., Nácher-Mestre J., Benedito-Palos L., Pérez-Sánchez J. (2008 b) “*Sea bream toxicology*”. En: <http://www.aquamax.org>.
- Thomann R.V., Conolly J.P. (1984). “*Model of PCB in the Lake Michigan lake trout food chain*”. *Environmental Science Technology* 18, 65-71.
- van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. (2003). “*Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*”. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- van Leeuwen S.P.J., de Boer J. (2008). “*Advances in the gas chromatographic determination of persistent organic pollutants in the aquatic environment*”. *Journal of Chromatography A* 1186, 161-182.
- Yang R., Yao T., Xu B., Jiang G., Xin X. (2007). “*Accumulation features of organochlorine pesticides and heavy metals in fish from high mountain lakes and Lhasa River in the Tibetan Plateau*”. *Environmental International* 33, 151-156.
- Wania F., Mackay D. (1996). “*Tracking the distribution of persistent organic pollutants*”. *Environmental Science and Technology* 30, 390A-6A.

2.2. Estudio del comportamiento del insecticida organofosforado clorpirifos en quistes de Artemia (*Artemia sp*). Efectos sobre la biología (eclosión y supervivencia)

2.2.1. INTRODUCCIÓN

2.2.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 6

Assessment of the efficacy of Artemia sp (Crustacea) cysts chorion as barrier to chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) exposure. Effect of hatching and survival

Science of the Total Environment. (2006). 366, 148-153

2.2.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

2.2.4. REFERENCIAS

2.2.1. INTRODUCCIÓN

El género *Artemia* (*Crustacea*, *Branqueópoda*, *Anostraca*), está compuesto por diferentes cepas, repartidas por todo el mundo, que prosperan en lagos salados en los que es capaz de soportar condiciones ambientales severas como son valores de salinidad de más de 200 gramos por litro. Estos monocrustáceos son capaces de reproducirse tanto por vía sexual como partenogenética. Una característica importante del ciclo de vida de la *Artemia* es que, bajo condiciones ambientales adversas, el modo de reproducción puede cambiar de ovoviviparismo a oviparismo, de modo que se producen quistes de resistencia que son embriones en diapausa cubiertos por una envoltura característica que les confiere protección. Los quistes preservan a los embriones en un estado de gástrula todo el tiempo que éstos están en estado seco o sometidos a condiciones anóxicas. Una vez hidratados, los embriones retoman su desarrollo dando lugar a un estadio larvario. Debido a su tamaño uniforme y apropiado y a la buena palatabilidad, los nauplios son ampliamente usados como alimento en la acuicultura de larvas de peces y crustáceos.

Los ambientes habitados por la *Artemia* son aguas salinas poco profundas que frecuentemente se encuentran localizadas cerca de zonas agrícolas. Los pesticidas

organofosforados son ampliamente empleados en muchos cultivos, de modo que pueden resultar una amenaza para las poblaciones de *Artemia* debido a la toxicidad que presentan para especies *non-target* y a su capacidad de bioacumulación. Este hecho es de vital importancia debido a que los pesticidas acumulados en los tejidos de *Artemia* pueden alcanzar los productos de la acuicultura a través de la cadena trófica artificial creada, en la que este organismo es uno de sus eslabones.

La *Artemia* fue propuesta como un organismo de ensayo para bioanálisis por Michael et al (1956). El uso de los quistes y de los nauplios elimina la necesidad de mantener cultivos de organismos de ensayo. Sin embargo, el uso de quistes se ha considerado poco ventajoso dada la incapacidad de alterar o perturbar el desarrollo de los embriones, ya que el corion hace que los embriones sean impermeables a casi todos los compuestos externos.

El quiste de *Artemia* es un embrión en estado de blástula o gástrula incipiente protegido por el corion. Después de una desecación efectiva, presenta una forma semiesférica, con un hemisferio casi completamente invaginado en el otro. Cuando se hidrata recupera su forma totalmente esférica.

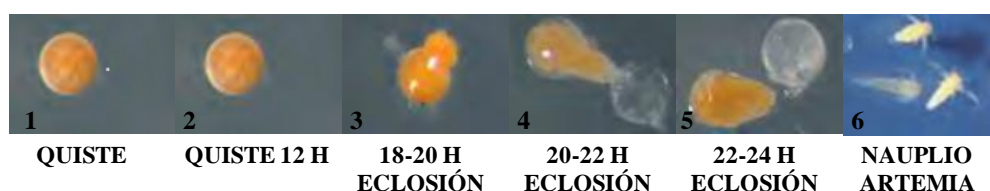
Los quistes son emitidos por las hembras adultas en condiciones críticas para la supervivencia de la población como son la falta de alimento, elevadas salinidades, deficiencias en niveles de oxígeno, entre otras, que pueden darse en los lagos salados y explotaciones salinas donde habitan.

El corion ofrece una importante protección a los quistes de *Artemia*: gran tolerancia a bajas y altas temperaturas, resistencia a la acción de disolventes orgánicos, protección ante radiaciones, resistencia a la ruptura mecánica, etc. Además, el corion presenta gran higroscopicidad, de tal forma que es capaz de captar el agua del ambiente hasta un 200% de su peso, proceso de hidratación tras el cual el quiste pierde flotabilidad y se reinicia el metabolismo que culminará con la rotura del corion y salida al exterior del nauplio.

El desarrollo de preemergencia parte, como antes se ha indicado, del estado de blástula o gástrula, llegando hasta el nauplio parcialmente formado o prenauplio. A partir de entonces, durante el desarrollo emergente, se forma el nauplio estado larvario I que ya nace nadando libremente en el medio. Tras la primera muda accede al estado larvario II, en el que ya empieza a capturar alimento exteno, y con el que se entra a las formas metanaupliares que darán paso a las fases juveniles y adultas.

La *Artemia* habita exclusivamente ecosistemas hipersalinos, caracterizados por su escasa diversidad biológica y por la ausencia de predadores. Los hábitats naturales comprenden salinas y lagos salados, temporales y permanentes, situados en zonas costeras o en entornos continentales.

Según las diferentes especies, la temperatura, la calidad del agua y otros factores, el desarrollo de la *Artemia* podrá darse dentro de los siguientes tiempos:



Este monocrustáceo se caracteriza por soportar un gran intervalo de salinidad comprendido entre 10-20 g/L y más de 300 g/L debido a su gran capacidad de osmorregulación. También es capaz de habitar salmueras con una composición iónica completamente distinta a la existente en los medios marinos.

La *Artemia* es un crustáceo filtrador pasivo que basa su alimentación en la captura de bacterias, algas unicelulares y otros seres vivos del medio en el que vive. Se considera que es un ser filtrador simple, obligado y no selectivo, que ingiere partículas en un tamaño de 1 a 50 μm . De todos modos, se conoce que es capaz de modificar su comportamiento alimenticio dependiendo del hábitat en el que se encuentre.

Los quistes de *Artemia* proceden de poblaciones silvestres desarrolladas en ecosistemas naturales que, en algunos casos, pueden estar intervenidos por la actividad humana como es el caso de las lagunas saladas o salinas dedicadas a la extracción de sal. En los lagos, lagunas o salinas en que se desarrollan las poblaciones de *Artemia*, los quistes flotantes son empujados por el oleaje y los vientos dominantes hacia las orillas. Allí se acumulan en capas de varios centímetros de espesor, ocupando a veces grandes extensiones. La constancia de los vientos facilita la acumulación en la superficie de salmuera o en las orillas, desde donde se procede a su recogida.

El objetivo de este trabajo fue el de obtener información acerca del efecto protector del corion frente a la exposición de los quistes a la acción de un pesticida organofosforado como es el *clorpirifos* mediante experiencias de hidratación e incubación. Para ello, se realizaron ensayos con quistes enteros y descapsulados que fueron expuestos al pesticida y se estudió la incubación y supervivencia de los nauplios. También se determinó la concentración de *clorpirifos* en los quistes expuestos durante el periodo de hidratación. Los quistes fueron recogidos en la Laguna de la Mata (Torrevieja, Alicante) y se procesaron y guardaron deshidratados en el banco de quistes del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Castellón). La determinación de *clorpirifos* se lleva a cabo por GC-MS previa purificación de los extractos de la muestra mediante NPLC.

2.1.2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 6

Assessment of the efficacy of *Artemia sp* (Crustacea) cysts chorion as barrier to chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) exposure. Effect on hatching and survival

I. Varó, F. Amat, J.C. Navarro, M. Barreda, E. Pitarch, R. Serrano

Science of the Total Environment. (2006). 366, 148-153

Assessment of the efficacy of *Artemia* sp (Crustacea) cysts chorion as barrier to chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) exposure. Effect on hatching and survival

I. Varó^a, F. Amat^b, J.C. Navarro^b, M. Barreda^c, E. Pitarch^c and R. Serrano^c

^aDepartamento Biología Funcional y Antropología Física, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universitat de València, C/ Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

^bInstituto de Acuicultura de Torre de la Sal (C.S.I.C.), 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain

^cAnalytical Chemistry, Department of Experimental Sciences,
University Jaume I, P.O. Box 224, 12080 Castellón, Spain

Abstract

In order to reveal the efficacy of the *Artemia* cysts chorion as barrier to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos, whole and decapsulated cysts have been exposed to 10 mg L⁻¹ chlorpyrifos in sea water during hydration and hatching phase, separately. The concentration of chlorpyrifos in capsulated and decapsulated cysts after exposure has been determined in order to elucidate the efficacy of chorion as protection to the embryo.

The results obtained demonstrate the ability of the cysts chorion to obstruct the pass of chlorpyrifos molecules through this protection structure. Thus, the concentration of chlorpyrifos in exposed decapsulated cysts is higher than in exposed whole cysts. Moreover, after removing the chorion of exposed cysts, the concentration of chlorpyrifos in the embryo was lower than that of cysts exposed, what would demonstrate the retention of chlorpyrifos molecules by the shell.

Hatching was not severely affected by exposure to the insecticide whereas survival at 44 h of the nauplii exposed to chlorpyrifos was significantly different from the controls. Survival of nauplii hatched from exposed decapsulated cysts was higher than that from those hatched from exposed whole cysts, probably because of the lower vitality of the latter, due to depletion of energy reserves during hatching.

Keywords: *Artemia*; Cysts chorion; Organophosphorus pesticides; Chlorpyrifos

1. Introduction

The brine shrimp *Artemia* is a small crustacean that thrives in salt ponds where it can stand severe environmental conditions such as water salinity values over 200 g L^{-1} . The genus *Artemia* is able to undergo bisexual and parthenogenetic reproduction. One remarkable characteristic of the life cycle of *Artemia* is that, under adverse environmental conditions, the reproduction mode switches from ovoviviparity to oviparity, producing resistant cysts which are embryos in diapause covered by a characteristic shell or chorion that confers protection. Cysts preserve the embryo in gastrula stage as long as they are kept dry or under anoxic conditions. Upon hydration, the embryos resume their development giving rise to a naupliar larval stage. Due to their uniform appropriate size, lack of escape response and good palatability, nauplii are widely used as larval feed in fish and crustacean aquaculture (Léger et al., 1986).

The environments inhabited by *Artemia* are coastal and inland shallow saline water bodies which frequently are located close to agricultural areas. Organophosphorus pesticides are widely used in farms and, therefore, could be a threat to *Artemia* populations due to their toxicity to non-target species and to their bioaccumulation ability (Varó et al., 1998, Varó et al., 2000 and Varó et al., 2002). This fact is of great concern since pesticides accumulated in *Artemia* tissues can reach aquaculture products via the artificial food chain in which *Artemia* is one of the links.

Artemia has been proposed as a test organism for bioassays by Michael et al. (1956). The use of the cysts and nauplii eliminates the necessity of maintaining cultures of test organisms. However, the use of cysts has also been regarded as disadvantageous given the relative inability to alter or disrupt the development of the embryos since the chorion makes the embryo impervious to nearly all external compounds (Rafiee et al., 1986).

The aim of the present work was to obtain information on the protective effect of the chorion during the exposure of cysts, throughout hydration and hatching, to the organophosphorous pesticide chlorpyrifos. Whole and decapsulated (de-shelled) cysts were exposed to the pesticide and the hatching and survival of the resulting nauplii was monitored. The concentration of chlorpyrifos in cysts (whole and decapsulated) exposed to chlorpyrifos during the hydration period was also determined.

2. Materials and methods

2.1. Origin and processing of the cysts

Cysts of the *Artemia* parthenogenic population (diploid) from the Laguna de la Mata (Torrevieja, Alicante, Spain) were used. They were collected in 1988, processed and kept dehydrated, at 4 °C in the dark, in the cyst bank of the Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal.

Previous to the experiment, the cysts were kept in an oven at 40 °C during 48 h to reduce the potential moisture acquired during their storage.

A subsample of the original cysts was decapsulated, eliminating the chorion with a solution of sodium hypochlorite (Bruggeman et al., 1979 and Lavens and Sorgeloos, 1987). These decapsulated cysts were adequately washed with freshwater, and the potential rests of hypochloride were neutralized with a 0.1 N solution of HCl. They were then washed again with distilled water, and kept in saturated brine (temporal dehydration), in the fridge (4 °C) during one week.

2.2. Treatment and hatching of whole cysts

Triplicate aliquotes of 100 mg of cysts were allocated in a thermostatic bath (28 °C), in cilindroconical glass recipients filled with 1 L of filtered (1 µm) sea water (35 g L⁻¹). Each recipient was supplied with gentle aeration from the bottom. The following treatments were assayed:

- Control: cysts in sea water.
- Treatment with chlorpyrifos during hydration and hatching phase: same as above plus chlorpyrifos (stock solution dissolved in acetone) added at 10 mg L⁻¹. This concentration is within values found in estuarine ecosystems like the river Ebro delta (Tarragona, Spain) after agricultural application of organophosphorous pesticides (Serrano et al., unpublished results).
- Treatment with chlorpyrifos during hydration: same as treatment with chlorpyrifos but only during 8 h (Hontoria, 1990). After this time, cysts were washed during 5 min with abundant freshwater and placed in recipients with clean sea water.

Chlorpyrifos standard (purity 99%) for cyst exposure and analytical procedures was purchased from Dr. Ehrenstorfer Reference Materials (Germany). Chlorpyrifos was dissolved and delivered in 250 mL acetone.

Chlorpyrifos concentration in water was determined at the end of each experiment.

2.3. Treatment and hatching of decapsulated cysts

Two hundred mg aliquots of blotted dry decapsulated cysts (per triplicate) were used. Blotted dry decapsulated cysts weigh twice as much as dry whole cysts, so this amount was estimated to contain a similar amount of cysts than 100 mg of dry whole cysts. The treatments were the same as those described for the whole cysts except for the fact that the decapsulated cysts, exposed to chlorpyrifos and subsequently washed, were only hydrated for 2 h, which is the calculated hydration time for the decapsulated cysts of this strain (Hontoria, 1990).

2.4. Hatching efficiency and survival

After 20 h of hydration, 5 mL samples of each treatment were taken, and the number of embryos or vesiculated (“umbrella stage”) prenaupliae and hatched nauplii was counted. The result was extrapolated to 1 g of cysts (hatching efficiency). The same procedure was carried out at 22, 25, 28, 31 and 44 h.

After the third control (25 h), when the availability of newly hatched nauplii was assured, groups of 50 nauplii from each treatment were isolated and placed in multiwell plates (6 wells per plate, 2 plates per treatment) in sea water. The plates were kept in the dark at 24 °C, and survival was estimated after 48 h.

2.5. Samples for the analysis of chlorpyrifos in the cysts

One g of non-decapsulated (whole) cysts (per triplicate) were hydrated in filtered (1 µm) sea water with 10 mg L⁻¹ of chlorpyrifos during 8 h. After this time, the cysts were decapsulated and stored for analysis.

The same treatment was repeated with previously decapsulated cysts hydrated for 2 h and then washed and stored for analysis.

Besides, 15 mL of filtered sea water (control) and the same amount of 10 mg L⁻¹ chlorpyrifos treated sea water, before and after the hydration of the whole and decapsulated cysts, were sampled to monitor nominal and actual chlorpyrifos concentrations. Actual values varied within 20% of nominal ones.

All the samples were frozen and stored at - 20 °C until they were analyzed.

2.6. Analytical

Chlorpyrifos was determined in *Artemia* cysts following the method described in Hernández et al. (1998).

Briefly, samples were thawed at room temperature. Two g of cysts were pooled and homogenized with 30 g anhydrous sodium sulphate and 1 g Celite, and extracted with 150 ml of acetonitrile:acetone (90 : 10; v/v) in a high speed blender during 3 min (Ultraturrax T 25, Janke and Kunkel, Germany).

After two-step filtration (first with gentle vacuum and second by gravity), the extract was pre-concentrated by means of a Kuderna–Danish until ca. 5 ml, and evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream at 40 °C. The final residue was dissolved in 2 ml of *n*-hexane. Clean up of the hexanic extract was carried out by normal phase liquid chromatography using a silicagel column in order to remove most of the fats. Analysis of the fat-free extracts was performed by gas chromatography with mass spectrometry (details in Hernández et al., 1998).

The analytical method applied to cysts showed recoveries of 90% at concentrations of 50 ng g⁻¹, with a relative standard deviation of 10%. The method showed good sensitivity and selectivity as a consequence of the use of mass spectrometry. The limit of quantitation, considered as the lowest concentration level validated in spiked samples with satisfactory recovery and precision, was 50 ng g⁻¹, and the limit of detection was estimated in 10 ng g⁻¹.

The determination of chlorpyrifos in sea water was performed as follows: a liquid : liquid extraction with dichloromethane (100 + 50 + 50 mL) was applied to extract chlorpyrifos from sea water. Water residues in the extract were eliminated with anhydrous sodium sulfate (pesticide residue analysis quality, Baker). After pre-concentration with Kuderna Danish, the extract was dried under gentle nitrogen stream and dissolved in *n*-hexane for detection with Gas Chromatography (GC) (Hernández et al., 1993). The recovery of chlorpyrifos from sea

water spiked at 1 mg L^{-1} was 90% with a relative standard deviation of 6%. Limits of detection were found to be $0.03 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

2.7. Data analysis

Comparison of means was carried out using Student *t*-test (groups of 2) and ANOVA. Survival results failed normality and homoscedasticity tests even after log or arcsine transformation and data were compared using Kruskal Wallis test.

3. Results and discussion

Fig. 1 shows the effect of chlorpyrifos on the hatching of the *Artemia* cysts. It can be observed that neither whole cysts nor decapsulated cysts present differences on hatching rate and efficiency. The synchronicity of hatching among controls and treatments was high. In deep study on the hatching efficiency at 44 h by means of ANOVA only reveals significant differences between the controls and exposed whole cysts at $\alpha \leq 0.05$, but not at $\alpha \leq 0.01$. Decapsulated cysts did not show significant differences respect the controls ($\alpha \leq 0.14$).

Direct observation of the nauplii hatched from cysts exposed to chlorpyrifos either during hydration or during the whole hatching process, showed conspicuous restricted movement in comparison to the controls.

Restricted movement has been described as a criterion to test the effect of toxicants on adult *Artemia* (Michael et al., 1956), and has also been reported by Go et al. (1990) in nauplii exposed to inorganic mercury. Concentrations as low as $0.01 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ delayed development without affecting the final number of developed brine shrimp. Higher concentrations had a more dramatic effect inhibiting development and complete hatching. Hatched nauplii also displayed deformities. These authors pointed out that the mercury does not exert any influence upon development until the cyst shell is open, thus suggesting a protective or barrier effect of the chorion.

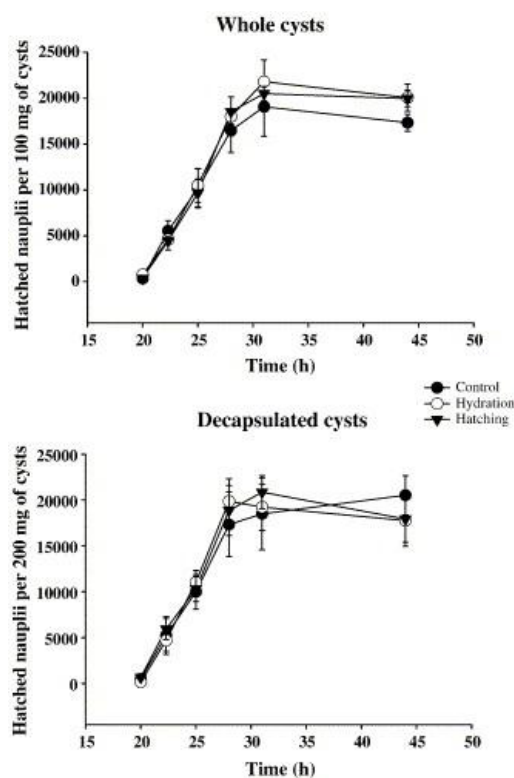


Fig. 1. Hatching of whole and decapsulated *Artemia* cysts exposed to chlorpyrifos during the hydration period (Hydration) or during the entire hatching time (Hatching). Error bars are 1 standard deviation ($n = 3$).

In fact, hatchability seems also to be linked to the kind of toxic used. Kuwabara et al. (1980) examined the hatchability of *Artemia* cysts submitted to several lipophilic compounds and reported that not all the pesticides had an effect on hatchability. Besides, the same authors, concluded that heavy metals affect the hatchability of *Artemia* at lower concentration than that of pesticides.

Fig. 2 shows the survival of the nauplii hatched from whole and decapsulated cysts exposed to chlorpyrifos either during the hydration process or during the whole hatching time. The nauplii hatched from decapsulated cysts showed higher survival as compared to that of nauplii hatched from whole cysts, the differences being more apparent in the nauplii of both groups of treated cysts. Exposure of the cysts to the pesticide significantly decreased

(Kruskall Wallis $\alpha \leq 0.05$) the survival of the nauplii. This was more evident in nauplii from exposed whole cysts.

When exposing *Artemia* cysts and cucumber seeds to alcohols, Smith and Siegel (1975) found that the hatching of the cysts and the germination of the seeds are processes less susceptible to the effects of the alcohols than the normal growth and development of the organisms. In fact, these authors relate the permeation capacity of the alcohol to its hydrocarbon chain length. Absolute methanol penetrates rapidly and ethanol penetrates slowly. However, these authors discarded a molecular sieve effect and suggested that methanol, which is similar to water in many of its characteristics could partially solvate the proteins of the membranes and produce configurational changes and exposure of lipids.

Although in general the effect of chlorpyrifos on the naupliar survival was more apparent in nauplii exposed for longer time to the toxicant, i.e., fully exposed as compared to exposed only during hydration, clearly higher survival was found in nauplii hatched from exposed decapsulated cysts.

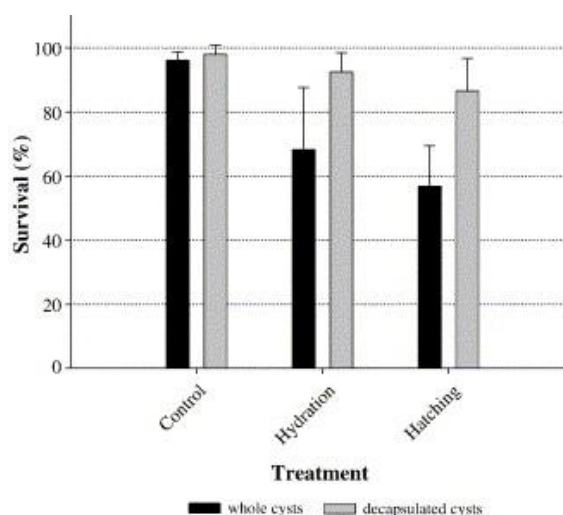


Fig. 2. Survival of *Artemia* nauplii hatched from whole and decapsulated *Artemia* cysts exposed to chlorpyrifos during the hydration period (Hydration) or during the entire hatching time (Hatching). Error bars are 1 standard deviation ($n = 3$).

The transition from the encysted embryo to the free swimming nauplius is critical in terms of development (Clegg and Conte, 1980) and is energetically demanding (Vanhaecke et al., 1983), in such a way that hatchability increases from 1.8% to 23%, together with higher naupliar dry weights, have been reported for cysts of some strains after decapsulation (Bruggeman et al., 1980 and Vanhaecke and Sorgeloos, 1983). Thus, we hypothesize that, aside from the fact that decapsulated cysts incorporate more pesticide, the benefits from decapsulation overcome the toxicological effect of the pesticide. The nervous system disruption effects of the neurotoxic pesticide chlorpyrifos take place in the free swimming nauplii rather than in the embryo, and thus, weaker nauplii hatched from whole cysts may be more prone to the toxic effects of chlorpyrifos than stronger nauplii hatched from decapsulated cysts.

Our results on the concentration of chlorpyrifos in whole, and decapsulated cysts, and in whole cysts decapsulated just after hydration, show that the chorion effectively acts as a barrier retaining the majority of the toxicant. This is clear from the results shown in Fig. 3. After hydration, the pesticide was found in much higher concentration in decapsulated cysts than in whole cysts. When comparing the pesticide concentration of exposed whole cysts with that of exposed cysts decapsulated after hydration, significant differences were found (*t*-test, $\alpha \leq 0.05$). By comparing the means, it was possible to determine that about 67% of the total pesticide detected in the cysts was retained in the chorion.

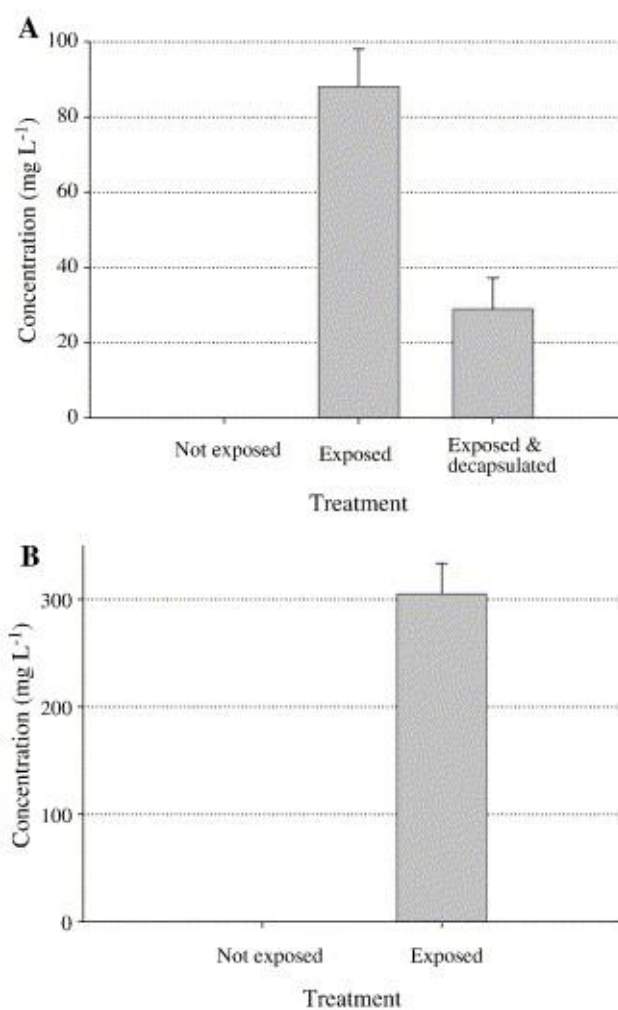


Fig. 3. Concentration of chlorpyrifos during hydration in: A) whole *Artemia* cysts and whole *Artemia* cysts hydrated in chlorpyrifos and then decapsulated, and B) decapsulated *Artemia* cysts. Error bars are 1 standard deviation ($n = 3$).

Sarabia et al. (1998) found no differences in hatching among cysts exposed to several mercury concentrations and controls, and found similar results with cysts exposed to cadmium. On the contrary Bagshaw et al. (1986) reported complete arrest of emergence in cysts exposed to the same or lower cadmium concentrations, and Rafiee et al. (1986) showed that pre-nauplius larvae prior to hatching are more sensitive to cadmium than are hatched

nauplii. These last authors also showed that zinc parallels the effects of cadmium although at a lesser extent at equal concentrations. As discussed by Sarabia et al. (2003) it is then possible that differences in cyst structure, metabolism, and physiology among species can account for these different results. Many previous works on ecotoxicology using *Artemia* cysts and nauplii as test organisms have been carried out without paying attention to the species or strain of *Artemia* used, and this information can be very important for the correct interpretation of the results. In fact the studies mentioned above were carried out using different *Artemia* strains and it is well known that different strains have different chorion thickness (range from 5 to 11 μm , Vanhaecke and Sorgeloos, 1980). The chorion thickness of the cysts of the *Artemia* strains used by Bagshaw et al. (1986) and Rafiee et al. (1986), measures around 7 μm (Vanhaecke and Sorgeloos, 1980), whereas a value of 5 μm is reported by Hontoria (1990) for the cysts of the strain used by Sarabia et al. (1998) in their study. These cysts are the same used in the present work.

This may support the fact that the chorion, acting as a barrier, can account for differences in the effects on hatching found in *Artemia* exposed to the same kind of toxic compounds since breaking thinner chorions at hatching should be less energetically demanding.

However, chain length and permeation through the chorion do not seem to be the only explanations for the toxicological effect of chemicals on *Artemia* cysts. In our study, no clear differences in hatchability were found between exposed whole cysts and decapsulated ones, so the mode of action (toxicity mechanism) of the toxicant should also play a leading role besides any barrier effect of the chorion. Migliore et al., 1993 and Migliore et al., 1997 tested the toxicity of sulphadimethoxine and of two antibiotics, Bacitracin and Flumequin, on cysts. Bacitracin and sulphadimethoxine depressed hatching and had toxicological effects on nauplii, whereas Flumequine mainly affected pigmentation without depressing hatching.

4. Conclusions

The chorion of the *Artemia* cysts acts as a barrier slowing down the entry of chlorpyrifos into the embryo. Chlorpyrifos has little effect on hatching but affects free swimming nauplii survival. In view of these results and taking into account the specific mechanisms of toxicological activity of the different xenobiotics in test, decapsulation of the cysts should be considered when performing toxicological assays with *Artemia*.

References

- J.C. Bagshaw, P. Rafiee, Ch.O. Matthews and T.H. MacRae, Cadmium and zinc reversibly arrest development of *Artemia* larvae, *Bull Environ Comtam Toxicol* **37** (1986), pp. 289–296.
- E. Bruggeman, M. Baeza-Mesa, E. Bossuyt and P. Sorgeloos, Improvements in the decapsulation of *Artemia* cysts. In: E. Styczynska-Jurewicz, T. Backiel, E. Jaspers and G. Persoone, Editors, *Cultivation of fish fry and its live food, Special Publication vol. 4*, European Mariculture Society, Bredene (1979) 534 pp..
- E. Bruggeman, P. Sorgeloos and P. Vanhaecke, Improvements in the decapsulation technique of *Artemia* cysts. In: G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers, Editors, *The brine shrimp Artemia vol. 3. Ecology, culturing, use in aquaculture*, Universa Press, Wetteren (1980), pp. 261–269.
- J.S. Clegg and F.P. Conte, A review of the cellular and developmental biology of *Artemia*. In: G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers, Editors, *The brine shrimp Artemia. Physiology, biochemistry, molecular biology*, Universa Press, Wetteren (1980), pp. 11–54.
- E.C. Go, A.S. Pandey and TH. MacRae, Effect of inorganic mercury on the emergence and hatching of the brine shrimp *Artemia franciscana*, *Mar Biol* **107** (1990), pp. 93–102.
- F. Hernández, I. Morell, J. Beltrán and F.J. López, Multiresidue procedure for the análisis of pesticides in groundwater. Application to samples from the Comunidad Valenciana, Spain, *Chromatographia* **37** (1993), pp. 303–312. View Record in Scopus | Cited By in Scopus (24)

- F. Hernández, R. Serrano, E. Pitarch and F.J. Lopez, Automated sample clean-up procedure for organophosphorus pesticides in several aquatic organisms using normal phase liquid chromatography, *Anal Chim Acta* **374** (1998), pp. 215–229.
- Hontoria, F. Caracterización de tres poblaciones originarias del área levantina española del crustáceo branquiópodo *Artemia*. Aplicación en acuicultura. Ph. D. Thesis. University of Barcelona; 1990. 326 pp.
- K. Kuwabara, A. Nakamura and T. Kashimoto, Effect of petroleum oil, pesticides, PCBs and other environmental contaminants on the hatchability of *Artemia salina* dry eggs, *Bull Environ Contam Toxicol* **25** (1980), pp. 69–74.
- P. Lavens and P. Sorgeloos, The cryptobiotic state of *Artemia* cysts, its diapause deactivation and hatching: a review. In: P. Sorgeloos, D.A. Bengtson, W. Declerck and E. Jaspers, Editors, *Artemia research and its applications. Ecology, culturing, use in aquaculture*, Universa Press, Wetteren (1987), pp. 27–63.
- Ph. Léger, D.A. Bengtson, K.L. Simpson and P. Sorgeloos, The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. In: E. Barnes, Editor, *Oceanogr Mar Biol Ann Rev* vol. **24**, Aberdeen University Press, Aberdeen (1986), pp. 521–623.
- A.S. Michael, C.G. Thompson and M. Abramovitz, *Artemia salina* as a test organism for bioassay, *Science* **123** (1956), p. 464.
- L. Migliore, G. Brambilla, A. Grassitellis and G. Dojmi di Delupis, Toxicity and bioaccumulation of sulphadimethoxine in *Artemia* (Crustacea, Anostraca), *Int J Salt Lake Res* **2** (1993), pp. 141–152.
- L. Migliore, C. Civitareale, G. Brambilla and G.D. Didelupis, Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*, *Water Res* **31** (1997), pp. 1801–1806.
- P. Rafiee, C.O. Matthews, J.C. Bagshaw and T.H. MacRae, Reversible arrest of *Artemia* development by cadmium, *Can J Zool* **64** (1986), pp. 1633–1641.
- R. Sarabia, A. Torreblanca, J.J. Del Ramo and J. Diaz-Mayans, Effects of low mercury concentration exposure on hatching, growth and survival in the *Artemia* strain La Mata parthenogenetic diploid, *Comp Biochem Physiol PA* **120** (1998), pp. 93–97.
- R. Sarabia, J. Del Ramo, J. Díaz-Mayans and A. Torreblanca, Developmental and reproductive effects of low cadmium concentration on *Artemia parthenogenetica*, *J Environ Sci Health* **38** (2003), pp. 1065–1071.

- C.W. Smith and S.M. Siegel, Differential permeability of *Artemia* cysts and cucumber seeds by alcohols, *J Histochem Cytochem* **23** (1975), pp. 80–83.
- P. Vanhaecke and P. Sorgeloos, International study on *Artemia*. IV. The biometrics of *Artemia* strains from different geographical origin. In: G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers, Editors, *The brine shrimp Artemia. Ecology, culturing, use in aquaculture*, Universa Press, Wetteren (1980), pp. 395–405.
- P. Vanhaecke and P. Sorgeloos, International study on *Artemia*. XIX. Hatching data for ten commercial sources of brine shrimp cysts and re-evaluation of the “hatching efficiency” concept, *Aquaculture* **30** (1983), pp. 43–52.
- P. Vanhaecke, P. Lavens and P. Sorgeloos, International study on *Artemia*. XVII. Energy consumption in cysts and early larval stages of various geographical strains of *Artemia*, *Ann Soc R Zool Belg* **113** (1983), pp. 155–164.
- I. Varó, R. Serrano, J.C. Navarro, F.J. López and F. Amat, Acute lethal toxicity of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos to different species and strains of *Artemia*, *Bull Environ Contam Toxicol* **61** (1998), pp. 778–785.
- I. Varó, R. Serrano, E. Pitarch, F. Amat, F.J. López and J.C. Navarro, Toxicity and bioconcentration of chlorpyrifos in aquatic organisms: *Artemia parthenogenetica* (Crustacea), *Gambusia affinis*, and *Aphanius iberus* (Pisces), *Bull Environ Contam Toxicol* **65** (2000), pp. 623–630.
- I. Varó, R. Serrano, E. Pitarch, F. Amat, F.J. López and J.C. Navarro, Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain: study of protein HSP70 as biomarker of sublethal stress in fish, *Arch Environ Contam Toxicol* **42** (2002), pp. 229–235.

2.2.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Con el objetivo de obtener información sobre el posible efecto protector del corion frente a la exposición de los quistes de *Artemia* a contaminantes presentes en su hábitat, se ha aplicado un diseño experimental basado en la exposición de quistes enteros y descapsulados al plaguicida organofosforado *clorpirifos*. Este insecticida se ha tomado como modelo debido a su amplio uso en la agricultura valenciana. A partir de estos experimentos se han determinado variables de relevancia en la supervivencia de la especie, como el porcentaje de eclosión y la supervivencia de las larvas expuestas. Asimismo, se ha determinado la concentración de *clorpirifos* en quistes expuestos al plaguicida, tanto enteros como descapsulados.

En la presente investigación, la concentración a la que se han expuesto los quistes ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ *clorpirifos*) es sensiblemente mayor a las concentraciones encontradas en las aguas del Delta del Ebro en diferentes campañas de muestreo, la cual es un indicador de la presencia de *clorpirifos* en el hábitat de las poblaciones de *Artemia*, aunque sólo en momentos puntuales. Sin embargo, es de esperar que la concentración presente después de aplicaciones agrícolas o vertidos ilegales pueda ser bastante más alta. Estos hechos avalan la presente investigación y justifican el estudio del efecto de contaminantes tóxicos sobre la supervivencia de las poblaciones de microcrústaceos, uno de los primeros eslabones de la cadena trófica en hábitats muy valiosos desde el punto de vista ecológico, como es el Delta del Ebro.

Los diferentes tipos de muestras (quistes de *Artemia* y aguas marinas) se procesaron y determinaron según la metodología descrita en el **Apartado 2.6 del Artículo científico 6**, desarrollada en una investigación realizada con anterioridad en nuestro laboratorio con diferentes tipos de organismos acuáticos (Hernández et al, 1998). La validación del método GC-MS aplicado dio unos resultados de recuperación a nivel de LOQ ($50 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) de 90% con una RSD no superior al 10%, para el tratamiento de los quistes de *Artemia*. El LOD se estimó en $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. En el caso de las aguas marinas se

obtuvo una recuperación de 90% con una RSD menor al 6%, el valor establecido para el LOQ fue de $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ y el LOD se estimó en $0.03 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

La comparación de los porcentajes de eclosión obtenidos en los diferentes tratamientos (control, tratamiento con $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de *clorpirifos* durante la hidratación de los quistes) muestra que no se observan diferencias significativas ($p < 0.01$) (**Figura 1, Artículo científico 6**). Sin embargo, sí que se observaron restricciones en el movimiento de los grupos expuestos, lo que puede ser crítico en la supervivencia de los individuos. Este efecto subletal ha sido descrito previamente como criterio para comprobar el efecto de tóxicos en adultos de *Artemia* (Michael et al, 1956) y ha sido utilizado por Go et al (1990) en nauplii expuestos a mercurio inorgánico. Es muy interesante el hecho de que en este mismo estudio, no se observó ningún efecto sobre el desarrollo de los embriones expuestos a mercurio hasta que el quiste se abrió, lo que sugirió que el corion actuaba como una barrera frente a los efectos tóxicos del metal (Go et al, 1990).

Respecto a la supervivencia de los nauplii, se observó que los eclosionados a partir de quistes descapsulados presentaron mayor supervivencia que los procedentes de quistes enteros en los grupos expuestos (**Figura 2, Artículo científico 6**).

A la vista de estos resultados se establece la hipótesis de que, a pesar de que los quistes descapsulados incorporan más pesticidas, los beneficios de la descapsulación son superiores respecto al efecto tóxico del plaguicida. El plaguicida *clorpirifos* afecta al sistema neurológico del nauplius nadador con mayor virulencia que al embrión. La transición desde el embrión enquistado a nauplius es un paso crítico en el desarrollo de *Artemia* (Clegg y Conte, 1980), lo que hace que sea muy importante el posible efecto de los contaminantes en estos estadios del desarrollo. Los Nauplii debilitados, eclosionados de quistes enteros, parecen ser más propensos al tóxico que nauplii sanos de quistes descapsulados, lo cual explicaría los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos al analizar quistes enteros, descapsulados, y descapsulados después de la fase de hidratación, demuestran claramente que el corion actúa como una barrera que retiene la mayor parte del tóxico, evitando su llegada al

embrión. En efecto, después de la hidratación, la concentración de *clorpirifos* fue mucho mayor en los quistes enteros que en los descapsulados después de la deshidratación (**Figura 3, Artículo científico 6**). Comparando las concentraciones encontradas en ambas muestras, se puede deducir que aproximadamente el 67% del plaguicida no atraviesa el corion, quedándose retenido en él.

Desde el punto de vista evolutivo, los resultados obtenidos sugieren que el corion actuaría como barrera, reteniendo compuestos que pudieran ser perjudiciales para el embrión durante su desarrollo, y no sólo como parte de un germen perdurable ante sequías o condiciones naturales adversas.

Los resultados obtenidos por otros investigadores con diferentes tipos de contaminantes no son homogéneos. Mientras Sarabia et al (1998, 2003) no encuentran efectos sobre la eclosión de quistes expuestos a mercurio y cadmio, Bagshaw et al (1986) informaron años antes de la ausencia de eclosión provocada por cadmio en concentraciones similares. Asimismo, Rafiee et al (1986) mostraron el efecto del cadmio y el zinc en las larvas después de la eclosión. Estas contradicciones fueron justificadas por Sarabia et al (2003) como consecuencia de diferencias en la estructura del corion entre especies y cepas.

Muchas de las investigaciones en el campo de la ecotoxicología llevadas a cabo con quistes y larvas de *Artemia* no han tenido en cuenta las diferentes cepas utilizadas y esta información puede ser muy importante para la interpretación de los resultados. De hecho, es conocido que diferentes razas de *Artemia* tienen diferentes grosores de corion (de 5 a 11 μm , Vanhaecke y Sorgeloos, 1980). Además, varios trabajos han demostrado las diferencias de respuesta de diferentes cepas de *Artemia* al efecto de tóxicos como el *clorpirifos* (Varó et al, 1997, 1998, 2000).

Estos hechos apoyan la idea de que puede haber diferencias en el porcentaje de eclosión y de supervivencia larvaria expuestos a la misma clase de tóxicos, ya que del grosor del corion depende tanto el nivel de protección ante los tóxicos como la cantidad

de energía necesaria para la eclosión, lo cual, a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, es crucial para la supervivencia de los nauplii nadadores.

Por otra parte, los mecanismos de toxicidad de los diferentes tipos de tóxicos también pueden hacer variar considerablemente los efectos sobre la eclosión, como demostraron con diferentes antibióticos Migliore et al (1993, 1997)

La presente investigación aporta información relevante sobre aspectos ecotóxicológicos de *Artemia*, necesarios en el estado actual del tema debido a la complejidad de la especie, lo que provoca contradicciones entre diferentes estudios. Los resultados obtenidos revelan que el corion de los quistes de *Artemia* actúa como una barrera, reteniendo la mayor parte de *clorpirifos* presente en el medio, impidiendo su llegada al embrión. Esto minimiza el efecto tóxico de este insecticida en la eclosión, pero afecta a la supervivencia de las larvas después de ésta.

2.2.4. REFERENCIAS

- Bagshaw J.C., Rafiee P., Matthews Ch.O., MacRae T.H. (1986). “*Cadmium and zinc reversibly arrest development of Artemia larvae*”. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 289–96.
- Clegg J.S., Conte F.P. (1980). “*A review of the cellular and developmental biology of Artemia*”. In: Persoone G., Sorgeloos P., Roels O., Jaspers E., editors. “*The brine shrimp Artemia. Physiology, biochemistry, molecular biology*”. Wetteren: Universa Press, p. 11–54.
- Go E.C., Pandey A.S., MacRae T.H. (1990). “*Effect of inorganic mercury on the emergence and hatching of the brine shrimp Artemia franciscana*”. *Marine Biology* 107, 93-102.
- Hernández F., Serrano R., Pitarch E., López F.J. (1998). “*Automated sample clean-up procedure for organophosphorus pesticides in several aquatic organisms using normal phase liquid chromatography*”. *Analytica Chimica Acta* 374, 215–229.
- Michael A.S., Thompson C.G., Abramovitz M. (1956). “*Artemia salina as a test organism for bioassay*”. *Science* 123, 464.
- Migliore L., Brambilla G., Grassitellis A., Dojmi di Delupis G. (1993). “*Toxicity and bioaccumulation of sulphadimethoxine in Artemia (Crustacea, Anostraca)*”. *International Journal of Salt Lake Research* 2, 141–52.
- Migliore L., Civitareale C., Brambilla G., Didelupis G.D. (1997). “*Toxicity of several important agricultural antibiotics to Artemia*”. *Water Research* 31, 1801–1806.
- Rafiee P., Matthews C.O., Bagshaw J.C., MacRae T.H. (1986). “*Reversible arrest of Artemia development by cadmium*”. *Canadian Journal of Zoology* 64, 1633–41.
- Sarabia R., Torreblanca A., del Ramo J.J., Díaz-Mayans J. (1998). “*Effects of low mercury concentration exposure on hatching, growth and survival in the Artemia*”.

strain La Mata parthenogenetic diploid". *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 120, 93–97.

Sarabia R., del Ramo J., Díaz-Mayans J., Torreblanca A. (2003). "*Developmental and reproductive effects of low cadmium concentration on Artemia parthenogenetica*". *Journal of Environmental Science and Health* 38, 1065–71.

Vanhaecke P., Sorgeloos P. (1980). "*International study on Artemia. IV. The biometrics of Artemia strains from different geographical origin*". In: Persoone G., Sorgeloos P., Roels O., Jaspers E., editors. "*The brine shrimp Artemia. Ecology, culturing, use in aquaculture*". Wetteren: Universa Press, p. 395–405.

Varo, I., Taylor, A.C., Ferrando, M.D. (1997). "*Effect of endosulfan pesticide on the oxygen consumption rates of nauplii of different Spanish strains of Artemia*". *Journal of Environmental Science and Health* 32, 363-375.

Varó, I. Serrano, R. Navarro, J.C. López, F.J., Amat F. (1998). "*Acute lethal toxicity of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos to different species and strains of Artemia*". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61,778-785.

Varó I., Serrano R., Pitarch E., Amat F., López F.J., Navarro J.C. (2000). "*Toxicity and bioconcentration of chlorpyrifos in aquatic organisms: Artemia parthenogenetica (Crustacea), Gambusia affinis and Aphanis iberus (Pisces)*". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 65, 623-630.



CONCLUSIONES

La **conclusión general** de la presente Tesis Doctoral es que las técnicas cromatográficas (tanto LC como GC) acopladas a espectrometría de masas, especialmente tándem MS (MS/MS) resultan ser muy eficaces y adecuadas para la determinación de residuos de plaguicidas y sus productos de transformación (TPs) en matrices de interés alimentario, debido a que aportan una sensibilidad y poder de confirmación muy elevados, que no es posible conseguir con los detectores tradicionales. También queda reflejada la complementariedad de las técnicas de análisis GC y LC debido al amplio abanico de problemas analíticos que se pueden abordar y a la naturaleza de los compuestos tratados.

De los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes **conclusiones específicas**:

1. La técnica LC-MS/MS resulta de especial interés en el campo de análisis de residuos de plaguicidas debido a su elevada sensibilidad y selectividad, particularmente en el caso de compuestos de polaridad media-alta. Es una técnica altamente versátil y eficiente para métodos multiresiduo, como puede observarse en la bibliografía reportada en la última década.
2. La técnica LC-MS/MS con analizador QqQ permite la determinación simultánea de múltiples compuestos pertenecientes a familias químicas muy diversas, y también de sus metabolitos (TPs), tal como se ha comprobado en esta Tesis con el método desarrollado para 52 compuestos en diversas matrices vegetales.
3. El empleo de LC-MS/MS con analizador QqQ permite la adquisición simultánea de varias transiciones SRM para cada compuesto, de modo que en una sola inyección es posible cuantificar y confirmar su presencia en las muestras analizadas a niveles muy bajos.
4. La técnica UHPLC supone una mejora sobre LC ya que consigue reducir considerablemente el tiempo empleado en la determinación con una adecuada

separación cromatográfica de los compuestos, debido a la elevada resolución que se consigue empleando esta innovadora técnica gracias al uso de partículas de 1.7 μm en la fase estacionaria.

5. La menor anchura de los picos conseguidos con UHPLC requiere del uso de un sistema de detección lo suficientemente rápido como para no comprometer la resolución conseguida. En el caso de análisis MS/MS implica el uso de instrumentos que permitan reducir el valor de tiempo de *dwell* (1-5 ms) sin perjudicar sus características analíticas (sensibilidad).
6. El método GC-MS desarrollado para el análisis de los analitos problemáticos *captan* y *folpet* permite su determinación simultánea en las tres matrices vegetales estudiadas (coliflor, pulpa y piel de caqui). Además, los iones medidos en el análisis son procedentes de los compuestos originales y no de sus correspondientes productos de degradación, como ocurre en otros métodos de análisis reportados en la bibliografía.
7. Se ha dado solución a los problemas de degradación típicamente observados en la determinación de los fungicidas *captan* y *folpet*. El empleo de sustancias químicas que actúan como protectores de los analitos (acetato de cinc, en este caso) permite minimizar e incluso evitar los problemas de degradación que surgen del contacto de la matriz con estos analitos durante la etapa de extracción. El control de la temperatura y modo de inyección, mediante empleo de un sistema PTV, hace, así mismo, que la degradación térmica sufrida por *captan* y *folpet* en el sistema de inyección de GC se vea minimizada.
8. En cuanto al análisis de organismos marinos, el método de purificación aplicado, basado en NPLC automatizada combinado con tratamiento ácido, es altamente eficaz en la eliminación del alto contenido graso presente en los extractos, previamente a la medida mediante GC-MS.

9. La técnica GC-MS/MS con analizador IT se ha mostrado muy adecuada para la identificación y cuantificación de plaguicidas organoclorados y PCBs en muestras de interés en acuicultura, como son piensos para peces y organismos marinos, con un alto contenido en grasa. Previa purificación mediante NPLC automatizada, se obtienen cromatogramas con una elevada relación S/N y se alcanzan LOD del orden de pocos $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, que resultan adecuados para este tipo de análisis.
10. La metodología desarrollada en esta Tesis se ha aplicado al estudio de contaminantes organoclorados y PCBs en peces salvajes y cultivados de la zona Mediterránea, en concreto dorada (*Sparus aurata*). Los análisis realizados han mostrado la presencia de estos contaminantes en concentraciones apreciables.
11. Los niveles de contaminantes presentes en tejidos de peces son mayores en los tejidos con más contenido graso, siguiendo, de modo general, la secuencia: hígado > músculo rojo > músculo blanco.
12. Los niveles de concentración de contaminantes en peces varían según la estación del año estudiada, siendo la carga de contaminante mayor en otoño y reduciéndose en verano, lo que podría ser consecuencia de una mayor ingesta de alimento para afrontar la etapa de desove.
13. Parece existir una mayor carga de contaminantes en los peces de origen salvaje en comparación con los cultivados debido, en parte, a que las materias primas de los piensos empleados en la alimentación de estas especies mediterráneas son de elevada calidad, con un bajo contenido en contaminantes.
14. La exposición de los nauplius (larvas) de *Artemia* al insecticida organofosforado *clorpirifos* afecta a su supervivencia. El corion de los quistes de *Artemia* actúa como barrera protectora impidiendo, en parte, la entrada de *clorpirifos* en el embrión. Los quistes de *Artemia* deberían ser descapsulados (eliminación del corion) para su uso en tests de toxicidad.

15. La metodología analítica desarrollada y empleada en esta Tesis Doctoral se ha validado de acuerdo con las recomendaciones recogidas en las guías europeas (principalmente, Guías SANCO) considerando como parámetros esenciales: linealidad, especificidad, exactitud y precisión, límite de cuantificación y límite de detección.



RELACIÓN DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PRESENTADOS

▪ ARTÍCULO 1

Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography–amenable pesticides and metabolites in different food commodities

F. Hernández , O.J. Pozo, J.V. Sancho, L. Bijlsma, M. Barreda, E. Pitarch

Journal of Chromatography A (2006) 1109, 242-252

▪ ARTÍCULO 2

Multiresidue pesticide analysis of fruits by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

O.J. Pozo, M. Barreda, J.V. Sancho, F. Hernández, J. Ll.Lliberia, M.A. Cortés, B. Bagó

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2007) 389,1765-1771

▪ ARTÍCULO 3

Residue determination of captan and folpet in vegetable samples by gas chromatography/negative chemical ionization-mass spectrometry

M.Barreda, F.J. López, M. Villarroya, J. Beltran, J.M. García-Baudín, F. Hernández

Journal of AOAC International (2006) Vol 89, No. 4, 1080-1087

▪ ARTÍCULO 4

Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry

R. Serrano, M. Barreda, E. Pitarch, F. Hernández

Journal of Separation Science (2003) 26, 75-86

- **ARTÍCULO 5**

Investigating the presence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean sea

R. Serrano, M. Barreda, M.A. Blanes

Marine Pollution Bulletin (2008) 56, 963-972

- **ARTÍCULO 6**

Assessment of the efficacy of *Artemia* sp (Crustacea) cysts chorion as barrier to chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) exposure. Effect on hatching and survival

I. Varó, F. Amat, J.C. Navarro, M. Barreda, E. Pitarch, R. Serrano,

Science of the Total Environment (2006) 366, 148-153

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS

- Captan and fenitrothion dissipation in field-treated cauliflowers and effect of household processing

María L. Fernández-Cruz, Mercedes Barreda, Mercedes Villarroya, Arantzazu Peruga, Susana Llanos and José M. García-Baudín

Pest Management Science (2006) 62:637-645.

