



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Estudios de determinación de compuestos orgánicos a niveles traza en matrices complejas

por **Andrés Pérez Parada**

**Montevideo, Uruguay
2012**





UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Tesis entregada como parte de los requerimientos para aspirar al título de

DOCTOR EN QUÍMICA

Facultad de Química,

Montevideo, 10 de octubre de 2012

Andrés Pérez Parada

Dr. Horacio Heinzen

Director de Tesis

Departamento de Química Orgánica

Universidad de la República

Dr. Amadeo. R. Fernández-Alba

Codirector de Tesis

Departamento de Hidrogeología
y Química Analítica

Universidad de Almería

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de muchas personas que a lo largo de este tiempo me han motivado a llegar hasta este punto. Entre ellas debo en primer lugar agradecer a Steffa por su paciencia y cariño. A mi familia por haberme brindado el entusiasmo y sostén suficientes.

Agradezco a mi director de tesis, Dr. Horacio Heinzen por brindarme los medios, el apoyo, el estímulo y la libertad suficientes para que desarrollara mi trabajo y para que casi sin darnos cuenta llegara este momento.

Agradezco al Dr. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba por su generosidad en brindarme la oportunidad de pertenecer durante un tiempo muy fructífero, a un grupo de investigación de primer nivel. Por permitirme hacer uso indiscriminado de los equipos, sus conocimientos y su agenda.

A los compañeros y amigos de la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales por los innumerables momentos transcurridos dentro y fuera de su espacio físico, durante los seis años de vinculación; en especial a Álvaro, Carlos, Daniel, Eduardo, Federico, Fernando, Gabriel, Joaquín, a las “Lucías” (Geis y Pareja) y “Natalias” (Besil, Gérez y Martínez), Marcos, Pilar, Silvina y Verónica por su apoyo cotidiano y porque parte de este trabajo, en muchas de sus formas, también es suyo.

A los compañeros y amigos de la Universidad de Almería, en especial a Paula y Octavio por su disposición y ayuda desinteresada para sobrevenir los tiempos difíciles y su compañía en los mejores momentos. También agradezco a las “Anas” (Agüera, Lozano y Jiménez), a Béla, Carmen, Chusa, Inma, Juanfra, Mariángeles, Mauricio, May, Milagros, Noelia y Samanta por las instancias de aprendizaje, su tiempo y colaboración.

A Mauricio por sus opiniones en estos últimos tiempos y a Jenny por darme un espacio que para pudiera realizar este documento. A Gustavo y Jorge por los análisis estadísticos, por su tiempo y buena voluntad.

A aquellos organismos que ayudaron a financiar en diferentes momentos e instancias la realización de este trabajo; a la ANII, al PEDECIBA, la AUIP. EURL y a la Facultad de Química.

Andrés Pérez

Montevideo, 10 de octubre de 2012

ÍNDICE DE CONTENIDOS

<i>AGRADECIMIENTOS</i>	4
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	5
ACRÓNIMOS Y TÉRMINOS	9
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	14
I.1 Relevancia de contaminantes orgánicos traza en el medio ambiente y los alimentos	14
I.2 Determinación de contaminantes orgánicos traza en el medio ambiente y los alimentos.....	18
I.3 Algunos métodos modernos de preparación de muestra para análisis de compuestos orgánicos traza	22
I.3.1 Extracción en fase solida	24
I.3.2 Dispersión de matriz en fase sólida.....	27
I.3.3 QuEChERS y métodos dispersivos	29
I.4 Instrumental contemporáneo: técnicas separativas y sistemas de detección	32
I.4.1 Cromatografía gaseosa.....	32
I.4.1.1 Detectores selectivos: GC-ECD / GC-FPD	33
I.4.1.2 Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.....	35
I.4.2 Cromatografía líquida.....	38
I.4.2.1 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	38
I.4.2.2 Modos de ionización e interfases a presión atmosférica.....	40
I.5 Espectrómetros de masa como detectores de los sistemas cromatográficos.....	44
I5.1.1 Cuadrupolo	44
I5.1.2 Tiempo de vuelo.....	46
I5.1.3 Espectrometría de masas tandem	49
I5.1.3.1 Triple cuadrupolo	51
I5.1.3.2 Sistemas híbridos: cuadrupolo – tiempo de vuelo (QTOF)	54
I5.1.3.3 Sistemas híbridos: cuadrupolo – trampa de iones lineal (QLIT).....	58
I.6 Aseguramiento de la calidad en la determinación de trazas en matrices complejas	60
I6.1 Cifras de mérito en la validación de metodologías	62
I6.2 El efecto matriz.....	64

16.3 Identificación y confirmación de analitos por espectrometría de masas	70
16.4 Exactitud, resolución y poder de resolución de masas	74
I.7 Referencias.....	79
OBJETIVOS.....	85
Objetivo general.....	85
Objetivos específicos.....	85
CAPITULO 1: Determinación de contaminantes orgánicos en materias primas farmacéuticas de origen natural.....	86
1.1 Antecedentes y consideraciones preliminares	87
1.2 Determinación multiresiduo de pesticidas en lanolina por Dispersión de Matriz en Fase Solida (MSPD) y GC-FPD / GC-MS.....	92
1.2.1. Introducción	92
1.2.2 Materiales y métodos: artículo científico N°1 (ANEXO 2).....	95
1.2.3 Resultados y Discusión	96
1.2.4 Conclusiones.....	106
1.3 Determinación de pesticidas en propóleos por Dispersión de Matriz en Fase Solida (MSPD) y GC-FPD / GC-MS	107
1.3.1. Introducción	107
1.3.2 Materiales y métodos: artículo científico N°2 (ANEXO 3).....	110
1.3.3 Resultados y Discusión	111
1.3.4 Conclusiones.....	123
1.4 Referencias.....	124
CAPITULO 2: Determinación de contaminantes orgánicos en alimentos	127
2.1 Antecedentes y consideraciones preliminares	128
2.2 Determinación de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal por tres métodos multiresiduo de preparación de muestra y LC-MS/MS.....	131
2.2.1. Introducción	131
2.2.2 Materiales y métodos: artículo científico N°3 (ANEXO 4).....	135
2.2.3 Resultados y Discusión	136
2.2.4 Conclusiones.....	149
2.3 Transferencia de residuos de pesticidas a la infusión de yerba mate: relación con las propiedades fisicoquímicas y estimación toxicológica	151

2.3.1. Introducción	151
2.3.2 Materiales y métodos: artículo científico N°4 (ANEXO 5)	154
2.3.3 Resultados y Discusión	155
2.3.4 Conclusiones.....	168
2.4 Referencias.....	169
CAPITULO 3: Determinación de contaminantes orgánicos en matrices ambientales	173
3.1 Antecedentes y consideraciones preliminares	174
3.2 Determinación de contaminantes emergentes en aguas residuales de Montevideo	181
3.2.1. Introducción	181
3.2.2 Materiales y métodos	182
3.2.3 Resultados y Discusión	186
3.2.4 Conclusiones.....	196
3.3 Desarrollo de estrategias de identificación y elucidación estructural de contaminantes emergentes en aguas por LC-MS/MS.....	199
3.3.1 Elucidación estructural de productos de transformación desconocidos de contaminantes orgánicos en el medio ambiente: el caso de la amoxicilina.....	199
3.3.1.1 Introducción	199
3.3.1.2 Materiales y métodos: artículo científico N° 5 (Véase ANEXO 7)	202
3.3.1.3 Resultados y Discusión	203
3.3.1.4 Conclusiones.....	214
3.3.2 Construcción y aplicaciones de bases de datos de masas exactas de contaminantes emergentes	216
3.3.2.1 Introducción	216
3.3.2.2 Materiales y métodos: artículo científico N° 6 (Véase ANEXO 8)	220
3.3.2.3 Resultados y Discusión	221
3.3.2.4 Conclusiones.....	250
3.3.3 Mejoras analíticas de instrumentos híbridos de LC-MS/MS tándem (LC-QTOF y LC-QLIT) en la evaluación de contaminación emergente en aguas superficiales.....	251
3.3.3.1 Introducción	251
3.3.3.2 Materiales y métodos: artículo científico N°7 (Véase ANEXO 11)	253
3.3.3.3 Resultados y Discusión	254

3.3.3.4 Conclusiones..... 271

3.4 Referencias..... 272

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS 278

ÍNDICE DE FIGURAS 282

ÍNDICE DE TABLAS..... 288

OTROS ARTICULOS RELACIONADOS A ESTA TESIS..... 290

PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y ENCUENTROS..... 290



ACRÓNIMOS Y TÉRMINOS

ACN	Acetonitrilo
AOAC	Association of Analytical Communities
AMX	Amoxicilina
ANA	ácido 1-naftilacético
ANAm	2-(1-naftil)acetamida
API	Ionización a Presión Atmosférica
BPAs	Buenas Prácticas de Agricultura
CE	Comisión Europea
CI	Ionización Química
CID	Disociación Inducida por Colisión
CMA _s	Concentración Máxima Admisible
DAD	Detector por Arreglo de Diodos
dSPE	Extracción Dispersiva en Fase Solida
DSR	Desviación Estándar Relativa
ECD	Detector de Captura Electrónica
EI	Ionización por Impacto Electrónico
EM	Efecto Matriz
EP	Farmacopea Europea
ESI	Ionización por Electrospray
EPI	Iones Producto Mejorados
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
FPD	Detector Fotométrico de Llama
FWHM	Ancho a Mitad de Altura
GC	Cromatografía de Gases
GC-MS	Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas
HRMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
IDA	Ingesta Diaria Admisible

IDA	Información Dependiente de la Adquisición
IT	Trampa de Iones
K _H	Constante de Henry
K _{ow}	Coefficiente de reparto octanol – agua
LC / HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
LC-MS	Cromatografía Líquida - Espectrometría de Masas
LMRs	Limites Máximos de Residuos
LOD	Límite de Detección
LOQ	Límite de Cuantificación
LPE	Extracción en Fase Líquida
LIT	Trampa Lineal de Iones
MeOH	Metanol
MFE	Extracción de Características Moleculares
MRM	Método Multirresiduo
MS/MS	Espectrometría de Masas Tándem
MSPD	Dispersión de Matriz en Fase Sólida
NRAs	Nivel de Residuos Admisibles
PTs	Productos de Transformación
OCs	Pesticidas organoclorados
OPs	Pesticidas organofosforados
Q	Cuadrupolo
QuEChERS	Rápido, Sencillo, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro
QqQ	Triple Cuadrupolo
QLIT	Cuadrupolo – Trampa Lineal de Iones
QTOF	Cuadrupolo – Tiempo de Vuelo
RI	Relación de Intensidad de Iones
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SIM	Monitoreo de Iones Seleccionados
SPE	Extracción en Fase Sólida
SRM	Adquisición de la Reacción Seleccionada (Selected Reaction Monitoring)

SRM	Método de Residuo Único (Single Residue Method)
Sw	Solubilidad en agua
TIC	Cromatograma de Iones Totales
TOF	Tiempo de Vuelo
T _R	Tiempo de Retención
OMS	Organización Mundial de la Salud
UE	Unión Europea
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
XIC	Cromatograma de Iones Extraídos

RESUMEN

El estudio de los contaminantes en los alimentos y el medioambiente es uno de los campos que mayor desarrollo ha experimentado en los últimos tiempos tanto en aspectos regulatorios como analíticos. La diversificación de las actividades económicas y humanas tendientes hacia una sociedad de consumo, ha generado una variación en las características y clases de contaminantes orgánicos que atentan contra la calidad y sustentabilidad de los recursos. El presente proyecto de tesis tuvo por objetivo el desarrollo y evaluación de métodos y estrategias analíticas cualitativas y cuantitativas para la determinación de compuestos orgánicos de relevancia sanitaria y/o ambiental presentes a bajas concentraciones en diferentes matrices como materias primas farmacéuticas, alimentos y muestras ambientales.

Se han realizado aportes al análisis de compuestos orgánicos trazas, en matrices de diverso origen y complejidad. La presente tesis ha sido dividida a efectos prácticos en tres capítulos dependiendo el tipo de matriz de trabajo: materias primas farmacéuticas, alimentos y medio ambiente.

En el primer capítulo, se destacan procedimientos analíticos originales para la determinación de residuos de pesticidas en materias primas farmacéuticas de origen natural, para los cuales los métodos oficiales o son obsoletos conceptualmente o simplemente no existen. Se desarrollaron dos metodologías basadas en la técnica MSPD para el análisis multiresiduo de pesticidas en lanolina y propóleos, matrices de compleja composición química donde la etapa de purificación es crítica para una buena determinación.

El segundo capítulo aborda el análisis de agroquímicos en alimentos. En primera instancia, se comprobó la posibilidad de determinación de reguladores de crecimiento en vegetales empleando tratamientos de muestra multiresiduo habituales (métodos Luke, QuEChERS y acetato de etilo) para el análisis de con determinación por sistemas LC-MS/MS. Por otro lado se realizó una evaluación preliminar a la contribución del consumo de yerba mate a la ingesta diaria de pesticidas por la población uruguaya, a partir de un dispositivo específico para evaluar la extracción de pesticidas en condiciones de ingesta típica del mate.

Se comprobó que la extractabilidad de residuos y por lo tanto la ingesta de pesticidas se puede relacionar con las propiedades fisicoquímicas de los pesticidas en estudio.

En el tercer capítulo, se describe la principal vía de transformación ambiental del antibiótico amoxicilina monitoreada en aguas residuales y aguas de río. Posteriormente se expone la posibilidad de evaluación de contaminantes emergente en aguas empleando diversos arreglos instrumentales. Son expuestas las fortalezas y debilidades de diversas estrategias analíticas especialmente enfocadas hacia instrumentos QTOF en experimentos dedicados a confirmación de identidad y estrategias de screening automatizado combinado con motores de búsqueda basados en bases de datos de masas exactas. Se ha observado que las estrategias basadas en detección asistida por software generalmente necesitan una etapa adicional de confirmación. Un instrumento QTOF en modo MS/MS permitió confirmar o rechazar la identidad de la mayoría de los hallazgos de screening de contaminantes emergentes en muestras reales a pesar de que existen limitaciones de sensibilidad analítica y efecto matriz. Se compararon además estrategias cuantitativas y cualitativas basada en el análisis por inyección directa de muestras acuosas por LC-MS/MS empleando instrumentos QLIT para un grupo representativo de contaminantes emergentes operando en modo SRM y en modo IDA.

La mayor sensibilidad de los instrumentos QLIT-MS/MS ofrece la posibilidad de realizar análisis cuantitativo de variedad de contaminantes por inyección directa de la muestra, reduciendo el efecto de la matriz y aumentando de la confiabilidad de los resultados. Durante esta tesis, se ha logrado cubrir los distintos aspectos del análisis de trazas contemplando desde estrategias de preparación de muestra, expansión del alcance de métodos preexistentes y caracterización de contaminantes antropogénicos, empleando distintas técnicas instrumentales y de tratamientos de datos que permiten la realización de experimentos útiles tanto en cuantificación, identificación preliminar, confirmación y elucidación estructural de contaminantes orgánicos.

INTRODUCCIÓN

I.1 Relevancia de contaminantes orgánicos traza en el medio ambiente y los alimentos

Lejos de ser un campo maduro de la química analítica, la determinación de contaminantes orgánicos traza en el medio ambiente y los alimentos, permanece desde sus orígenes, a mediados del siglo XX hasta la actualidad, como uno de los campos de mayor atención y desarrollo por los químicos analíticos tanto en centros de investigación, organismos gubernamentales como universidades. Esto es consecuencia de varios motivos entre los que se puede citar: (i) la constante diversificación de las actividades económicas debidas al desarrollo de la humanidad; (ii) el frecuente cambio de los aspectos reglamentarios con implicancias legales en los campos de seguridad alimentaria y ambiental, (iii) el creciente interés social en aspectos de la salud y el medio ambiente y (iv) las implicancias económicas y comerciales de la contaminación o de los contaminantes en particular. Se conocen muchos contaminantes orgánicos del medio ambiente y los alimentos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) actualmente estima que aproximadamente un cuarto de las enfermedades humanas ocurren por exposición prolongada a contaminantes (OMS 2012). En general, se asocia a los contaminantes orgánicos en alimentos con los residuos de pesticidas aunque también pueden ser incluidos otros aditivos alimentarios como conservantes, colorantes así como otras sustancias adquiridas por contaminación cruzada. En este sentido, la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura) define un pesticida como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo vectores de

enfermedades humanas o de animales, aquellas especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o interfieren con cualquier forma de producción, elaboración, mantenimiento, transporte o comercialización de alimentos o productos agrícolas (FAO 1989).

Dentro de los tópicos de mayor preocupación se encuentra el control de la seguridad de los alimentos, siendo los contaminantes orgánicos, uno de los puntos de mayor atención. Estos contaminantes surgen de los procesos productivos modernos de obtención de alimentos que emplean agroquímicos (desde fitosanitarios a productos veterinarios) en diversas etapas tales como cultivo o cría, transporte, almacenamiento y procesamiento de los mismos. El *Codex Alimentarius* es la estructura internacional perteneciente a la OMS/FAO, quien presenta una colección de normas alimentarias y otras disposiciones de carácter consultivo aceptadas internacionalmente, entre otros Uruguay (Decreto 527/94 1994), que buscan proteger la salud de los consumidores y asegurar la aplicación de prácticas equitativas en el comercio de alimentos y materias primas. En países agroexportadores como Uruguay, es frecuente que los sistemas productivos empleen diferentes sistemas de elaboración dependiendo del destino de los alimentos. En general, el empleo de buenas prácticas de agricultura (BPAs) tendientes a asegurar la inocuidad de los alimentos y un ambiente sustentable, son un prerrequisito para el comercio internacional. Esto es debido a que los residuos de agroquímicos también son empleados como reguladores del comercio de alimentos, considerándose un importante parámetro de calidad determinando incluso el acceso o suspensión a los mercados.

Una serie de conceptos han sido fijados desde el *Codex Alimentarius* para establecer criterios de control de los alimentos tales como la ingesta diaria

admisibles (IDA) y los límites máximos de residuos (LMRs). Los LMRs se definen como los niveles aceptables de residuos expresados en concentración, en mg/kg, con carácter legal en base al empleo de BPAs, de forma de asegurar la menor exposición al consumidor.

Otras reglamentaciones más restrictivas que el *Codex Alimentarius*, como las normas aprobadas por la Comisión Europea (CE) o por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), son vistas a escala mundial como referentes en los requisitos de los alimentos y las sustancias químicas aprobadas para elaboración de los mismos (CE/396/2005 2005; USDA 2012). Particularmente la Comisión Europea establece un gran avance ante al vacío de regulación, logrando armonizar los LMRs de pesticidas en alimentos al proponer un valor por defecto de 0,01 mg/kg en el caso de contaminantes no especificados en el par “pesticida – producto”.

La lista de contaminantes orgánicos ambientales es vastamente más amplia que en alimentos e incluye además de residuos de pesticidas provenientes de los procesos productivos agropecuarios, un gran número de sustancias de origen antropogénico u otras asociadas a ciertas industrias y actividades económicas. En este caso se pueden citar, grupos enteros de contaminantes relevantes como los compuestos orgánicos persistentes (POPs), los compuestos orgánicos volátiles (VOCs), hidrocarburos poliaromáticos (PAHs), dioxinas y furanos, bifenilos policlorados (PCBs) y difeniléteres polibromados (PBDEs), entre otros.

Desafortunadamente, algunas reglamentaciones vigentes de carácter nacional como el Código de Aguas del Uruguay (Decreto 253/79 1979), no incluyen esta clase de contaminantes dentro de su alcance por lo que, en estos casos, son adoptadas reglamentaciones reconocidas internacionalmente como la Agencia de

Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) tanto para concentraciones máximas admisibles (CMAs) de contaminantes en las matrices ambientales especificadas como en la utilización de métodos analíticos de referencia.

Sin embargo, en los últimos tiempos ha crecido el interés tanto en la academia como en entidades regulatorias, por otros contaminantes orgánicos, de origen antropogénico que son continuamente introducidos en el medio ambiente, denominados contaminantes emergentes. Se los ha caracterizado como emergentes porque es reciente la presencia de estos contaminantes en el medioambiente así como también son nuevas las metodologías analíticas que permiten detectar, elucidar y estudiarlos (Ramirez González 2011). Un contaminante emergente es definido como una material o una mezclas peligrosa (tanto de compuestos naturales o de síntesis, agentes microbianos y sustancias radioactivas) que se caracterizan por poseer: (i) una percepción de amenaza a la salud pública o al medio ambiente, (ii) donde no existen estándares establecidos de seguridad para la salud, (iii) la información toxicológica es insuficiente, limitada o en vías de evaluación y (iv) existen nuevas fuentes de generación con relevancia (MassDEP 2012). Estos contaminantes ambientales incluyen compuestos de conocida actividad biológica tales como productos farmacéuticos y veterinarios, productos de cuidado personal, hormonas, productos domésticos, aditivos de plastificantes, así como otros de desconocida o poco conocida actividad biológica tales como los denominados productos de degradación o transformación (PTs) ambiental tanto por procesos bióticos o abióticos (Richardson & Ternes 2011). Por este motivo, el número de contaminantes emergentes está continuamente creciendo. El principal desafío planteado supone un cambio en el esquema de sustentabilidad de los recursos hídricos (Heberer 2002, Richardson 2010).

Aún es escasa la información disponible sobre la ocurrencia, el destino ambiental y la evaluación del riesgo que representan los contaminantes emergentes para otros organismos vivos y/o la salud humana (Richardson & Ternes 2011). Por lo tanto, aunque los niveles de gran parte de los contaminantes emergentes en matrices ambientales aun no han sido regulados, es posible que en el futuro lo sean o se establezcan tecnologías con el fin de aplacarlos. Las reglamentaciones Europeas para aguas ambientales ya han incluido en su última actualización CMAs para algunos contaminantes hasta hace poco considerados de naturaleza emergente como los PBDEs, el bisfenol A, nonilfenoles y el bis(2-etilhexil)ftalato (CE/2008/105 2008). Por otra parte, la USEPA posee en este momento una lista de contaminantes emergentes candidatos a ser reglamentados en agua potable donde se incluye entre otros, productos farmacéuticos, hormonas esteroidales, productos de desinfección de agua, pesticidas y algunos productos de degradación de pesticidas (USEPA 2012). En la misma línea, la USEPA fue pionera en introducir métodos analíticos como el Método 1694 para el análisis a nivel de trazas de productos farmacéuticos y de cuidado personal en variedad de matrices ambientales (USEPA 2007).

I.2 Determinación de contaminantes orgánicos traza en el medio ambiente y los alimentos

Desde el punto de vista analítico, supone un reto determinar contaminantes orgánicos tanto por los niveles requeridos como por la complejidad de las matrices que los contienen. Es por tanto, que los métodos deben dotarse de características como selectividad y sensibilidad además de versatilidad para proporcionar

resultados confiables. Como consecuencia de las características específicas del número y gran variedad de los contaminantes orgánicos en los alimentos y el medio ambiente (diferentes actividades biológicas de las sustancias empleadas, diversidad química y fisicoquímica), las técnicas basadas en métodos separativos, entre estos los cromatográficos son habitualmente la principal elección. Las determinaciones analíticas a nivel de trazas en matrices de alta complejidad química tales como fluidos biológicos, alimentos y matrices ambientales suponen un doble desafío de lograr especificidad de señal incrementando las separaciones a la vez de llevar la sensibilidad de detección a los máximos niveles que ofrece el estado del arte del instrumental contemporáneo. Sumado a eso, se deben considerar las etapas de preparación de muestra tales como homogenización, extracción y purificación, como parte inherente e inseparable de la metodología analítica, que condiciona además el desempeño analítico y la calidad del análisis. Es por esto, que en la actualidad, referir a la determinación de contaminantes orgánicos en matrices complejas es prácticamente asociar este tópico con los métodos cromatográficos instrumentales tales como cromatografía de gases (GC) y cromatografía de líquidos (LC) acoplada a detectores espectrométricos de masas (MS) y masas tándem (MS/MS) así como con las metodologías de preparación de muestra que constituida por diversos acrónimos (ASE, DLLME, GPC, LPE, MAE, MISPE, MSPD, PLE, QuEChERS, SBSE, SFE, SPE, SPME, por citar unas pocas) que se han popularizado en los últimos años, establecen la nomenclatura metodológica de estos días.

A través de la creciente regulación e implicancias legales de los LMRs y MCAs de muchos contaminantes orgánicos traza, el nivel de exigencias tanto en capacidades y costos analíticos, ha experimentado un desarrollo vertiginoso en los últimos diez años, yendo hacia métodos de preparación de muestra y técnicas

instrumentales capaces de establecerse como métodos de rutina acreditables (Medina-Pastor *et al.* 2010). De esta forma, los métodos multirresiduo (MRMs) de preparación de muestra, que son aquellos capaces de ofrecer simultáneamente un amplio alcance de analitos por unidad de análisis, surgen como la primera elección de los laboratorios dedicados al monitoreo de contaminantes. Por otra parte, la utilización de métodos SRMs (métodos de un residuo o una clase química) ocurre en casos que el analito no permita ser incluido dentro del alcance de un MRM, por alguna característica específica o peculiaridad como ser sus propiedades fisicoquímicas. Los avances instrumentales en MS y MS/MS de los últimos años han permitido un rápido desarrollo de los métodos modernos de análisis, cambiando el rol preponderante que poseía la preparación de muestra e incluso la cromatografía, hacia un compromiso entre la técnica instrumental disponible y el método de preparación empleado. Es así, que los métodos modernos de preparación más populares suelen destacarse por ser más rápidos y por sobre todo miniaturizados, pensando en la reducción de los desechos generados durante el análisis, y no así en la limpieza exhaustiva de extractos. La llegada de nuevos analizadores de MS ha derivado en un cambio radical en las estrategias empleadas tanto en métodos de preparación de muestra como en las técnicas cromatográficas (Fernández-Alba 2005).

El desarrollo de GC-MS derivó en el casi abandono del uso de detectores selectivos, que son en la actualidad considerados útiles únicamente para determinadas aplicaciones (ej. detector de captura electrónica (ECD) para analizar organoclorados), determinados analitos volátiles, semivolátiles o para determinadas regulaciones aún vigentes tales como en las Farmacopeas Europea y de Estados Unidos (USP 2007; EP 2008). Por otra parte, los detectores selectivos no

cumplen con los requisitos formales de confiabilidad para la confirmación de residuos tal como puede observarse en guías conceptualmente actualizadas para validación de ensayos de residuos de pesticidas en alimentos (SANCO 2011). Paralelamente, los pesticidas modernos como los nuevos contaminantes ambientales, son mayormente de naturaleza polar siendo además muchos de ellos térmicamente inestables (Anastassiades & Scherbaum 2005; Gilbert-López *et al.* 2009). Conjuntamente con los desarrollos en nuevos analizadores de MS acoplables a LC y principalmente con la introducción de MS/MS mediante el analizador de triple cuadrupolo (QqQ), las técnicas instrumentales de análisis de compuestos orgánicos traza mediante LC-MS/MS, parcialmente desplazaron a las determinaciones por GC-MS tanto en muestras de alimentos (Fernández-Alba 2005; Alder *et al.* 2006) como matrices ambientales (Tadeo 2008; Richardson 2010). El estudio de metabolitos, productos de degradación y PTs ambientales, que son más polares y solubles en medios acuosos que sus compuestos originales, necesariamente involucra el uso de LC acoplado a detectores avanzados de MS. En este caso, los espectrómetros híbridos de MS tales como el QTOF (cuadrupolo – tiempo de vuelo) y QLIT (cuadrupolo – trampa lineal de iones) son de los preferidos, tanto para la identificación y confirmación como para el análisis cuantitativo (Pérez & Barceló 2007; Radjenović *et al.* 2007).

Este trabajo converge entre varios desarrollos empleando diferentes estrategias analíticas tanto en metodologías de preparación de muestra y utilización de técnicas cromatográficas con detección por diversas configuraciones de MS para el análisis cuali y cuantitativas de contaminantes orgánicos traza en diferentes matrices. Las aplicaciones serán expuestas en cada uno de los apartados de los capítulos venideros.

I.3 Algunos métodos modernos de preparación de muestra para análisis de compuestos orgánicos traza

Los procesos denominados tratamiento de muestra son aquellos comprendidos entre el muestreo y la determinación propiamente dicha. Se incluyen por tanto etapas realizadas en el laboratorio tales como submuestreo, homogenización, extracción, purificación de extractos (o clean-up) y preconcentración de los analitos de interés. Existen variedad de métodos de preparación de muestra para análisis de trazas orgánicas en alimentos (Fernández-Alba 2005; Fernández-Alba & García-Reyes 2008; Gilbert-López *et al.* 2009) y matrices ambientales (Petrovic *et al.* 2010, Moreno-Bondi *et al.* 2009). Estos pueden ser divididos en métodos basados en extracción con solventes orgánicos, extracción instrumental con solventes y mediante adsorción a superficies sólidas.

La extracción con solventes (LPE, del inglés liquid phase extraction) suele ser la principal estrategia como primer paso en el tratamiento de muestra, especialmente para muestras sólidas. Las LPEs fueron las primeras en aplicarse y establecerse como métodos de referencia por organismos oficiales y laboratorios de control de alimentos (Mills *et al.* 1963), siendo algunas de ellas, utilizadas hasta estos días (Luke *et al.* 1975). Con el paso del tiempo se ha tendido a desplazar el uso de solventes organoclorados por otros solventes orgánicos como el acetonitrilo (ACN), acetato de etilo, metanol (MeOH) y acetona. Dentro de las LPEs se incluyen tanto las extracciones líquido-líquido (LLE), como sólido-líquido (LSE). Las extracciones con solventes asistidas por instrumental generalmente buscan reducir el costo de procesamiento, tanto en tiempo analítico como en cantidad de solventes.

Dentro de este grupo se pueden considerar la extracción con fluidos supercríticos (SFE), la extracción con líquidos a alta presión (PLE), y la extracción asistida por microondas (MAE). Los tratamientos de muestra mediante adsorción en superficies sólidas suelen ser más selectivos tanto hacia las características del analito como hacia las características de la matriz. Se pueden emplear estos métodos con fines de preconcentración, extracción y purificación, distinguiéndose, la extracción en fase sólida (SPE) especialmente su versión dispersiva (dSPE), la microextracción en fase sólida (SPME), la extracción en barra con agitación (SBSE) y la extracción mediante dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) (Gilbert-López *et al.* 2009). Estos últimos métodos, son los más populares en la actualidad ya que han logrado bajar los límites de determinación y han permitido trabajar con matrices problemáticas.

El éxito del tratamiento de muestra está estrechamente vinculado con conocer las características de la matriz, el tipo de analito que se desea extraer y la técnica de determinación que se pretende aplicar. La tendencia actual es la búsqueda de métodos multiresiduo de preparación de muestra con el mayor alcance posible en analitos y tipos de matrices. A continuación se presentan, algunos métodos MRM utilizados durante este trabajo, cuyo origen fue el análisis de alimentos aunque en la actualidad son aplicados indistintamente en matrices ambientales aunque con algunas variantes.

I.3.1 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) es hoy en día el método de elección para la extracción y concentración de compuestos orgánicos en muestras acuosas (Petrovic et al. 2010; Buchberger 2011). Aunque el término SPE fue introducido en 1982, inicialmente se popularizó entre analistas de ramas biomédicas y farmacéuticas para analitos polares, siendo relativamente reciente su consolidación en el análisis de contaminantes semipolares y apolares (Anastassiades & Scherbaum 2005). La disponibilidad de sorbentes que permiten análisis más reproducibles ha contribuido a su aceptación por las agencias reguladoras. Otras razones de su popularidad son la posibilidad de elegir entre una amplia gama de fases comercialmente disponibles tanto empacadas en columnas, en cartuchos o en discos e incluso la compatibilidad con instrumentos que permiten automatismo (modalidad en línea, on-line) (Petrovic et al. 2010). La SPE está incluida en los métodos oficiales vigentes establecidos por la USEPA para la determinación de varios compuestos orgánicos (ftalatos, dioxinas, ácidos haloacéticos, PAHS, PCBS, pesticidas, contaminantes emergentes, entre otros.) en agua potable, aguas ambientales y aguas residuales (USEPA 2007; USEPA 2009; USEPA 2010). Sin embargo, esta técnica es menos directa que la LLE porque se necesita seleccionar un sorbente dentro de un gran abanico de posibilidades y porque las recuperaciones dependen de varias condiciones como el volumen de muestra, el solvente de elución, etc. De hecho, la SPE es un procedimiento simple si uno considera que está basada en el mismo principio separativo que la cromatografía líquida (Hennion 2000).

La modalidad off-line (fuera de línea), sigue siendo la principal elección en la literatura reciente de análisis ambiental de contaminantes orgánicos aunque en la

actualidad están emergiendo otras técnicas (Petrovic et al. 2010; Ballesteros-Gómez & Rubio 2011; Buchberger 2011).

Las principales características de la SPE son que la preparación de la muestra (extracción y purificación) y la preconcentración pueden ser logradas simultáneamente en una única etapa aunque los analitos posean diferentes propiedades fisicoquímicas. Debido a la capacidad de gobernar el factor de preconcentración, los LODs y LOQs son ajustables al rango analítico requerido o a la técnica instrumental disponible (Anastassiades & Scherbaum 2005). Las principales ventajas son la generación de pocos desechos de solventes orgánicos, su fácil aplicación a varias matrices (ej., aguas naturales, agua potable, y aguas residuales) y permite procesar varias muestras simultáneamente (véase Figura 1).

Los sorbentes apolares son adecuados para la preconcentración y purificación de extractos conteniendo compuestos orgánicos presentes en muestras líquidas acuosas. Los más utilizados son las alquil (octadecil (C18), octil (C8), etil (C2)), fenil y ciclohexil sílices donde los grupos alquilo están enlazados covalentemente a grupos silanol en la superficie de la sílice. Cuando la muestra pasa a través de este tipo de sorbentes, los analitos orgánicos interaccionan con la fase ligada mediante fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas quedando retenidos en ella. Posteriormente, los analitos son eluidos mediante el empleo de un pequeño volumen (2-10 mL) de solvente orgánico (MeOH, ACN, acetato de etilo, entre otros). Una de las fases más utilizadas son las de C18 debido a su capacidad de retener tanto analitos apolares como semipolares. Actualmente existe una amplia gama de sorbentes basados en el uso de óxidos inorgánicos, compuestos de baja especificidad (químicamente enlazados, polímeros porosos, etc.) y materiales selectivos para compuestos o grupos funcionales (intercambio iónico,

modos mixtos, macrociclos, materiales de acceso restringido, inmunosorbentes y polímeros impresos molecularmente) que han facilitados algunas aplicaciones desafiantes. En particular, los cartuchos Oasis® HLB (Waters Company) que contienen relleno polimérico con balance hidrofílico-lipofílico, de fase reversa, humectable en agua son adecuados para el análisis de aguas de una amplia variedad de compuestos por SPE (Baker & Kasprzyk-Hordern 2011; Cahill et al. 2004; Petrovic et al. 2006; Petrovic et al. 2010). Su composición consiste en una proporción equilibrada de dos polímeros: N-vinilpirrolidona (hidrofílica) y divinilbenceno (hidrofóbica). Esta fase proporciona una capacidad de retención superior que la fase reversa convencional, con una capacidad especial para optimizar la retención de los analitos polares (Petrovic et al. 2010).

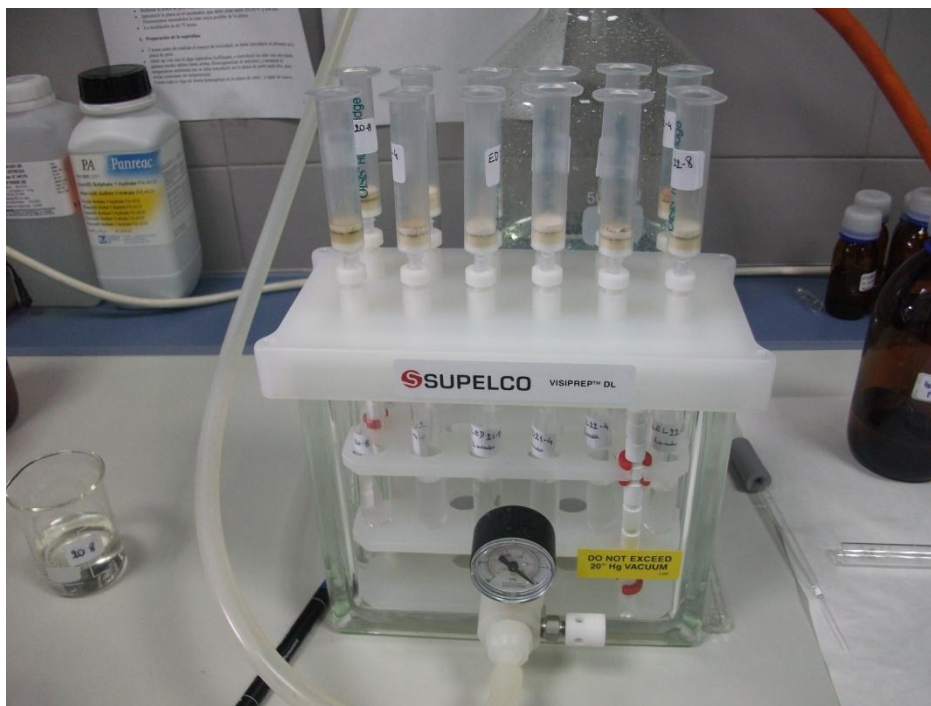


Figura 1: Manifold con cartuchos de SPE Oasis® HLB durante el tratamiento de efluentes para el análisis de contaminantes emergentes.

El principal campo de aplicación de la SPE de compuestos orgánicos son aplicaciones ambientales y dentro de estas las de aguas superficiales y residuales (Kasprzyk-Hordern et al. 2007; Moreno-Bondi et al. 2009; Petrovic et al. 2010; Baker & Kasprzyk-Hordern 2011; Ferreira da Silva et al. 2011), aunque hay diversidad de nuevas aplicaciones para matrices ambientales sólidas (Petrovic et al. 2010; Buchberger 2011).

I.3.2 Dispersión de matriz en fase sólida

Desde su invención en 1989 para la preparación de muestras de tejidos de peces (Barker et al. 1989), la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) ha sido ampliamente utilizada para simplificar la preparación de muestra de matrices sólidas con alto contenido de un interferente o clases de interferentes en particular. Esta técnica tiene como característica que puede hacerse a medida seleccionando una combinación adecuada de matriz – sorbente – solvente de elución en relación al analito, para dar extractos apropiados para determinaciones por GC o LC.

Inicialmente MSPD era utilizado para preparar muestras de origen animal tales como tejidos, leche, huevos, quesos, huevos y aceites vegetales, cuyo contenido lipídico resultaba inadecuado para ser determinado por otras técnicas (Barker 2000; Ferrer et al. 2005; Lehotay et al. 2005b), aunque rápidamente se extendió su uso en el análisis de frutas, hortalizas, miel, cereales, fluidos biológicos y suelos (Kristenson et al. 2006; Barker 2007; Gilbert-López et al. 2009).

Durante la MSPD la homogenización de la muestra, la extracción y la purificación se llevan a cabo simultáneamente, empleando un tamaño de muestra relativamente pequeño, un bajo consumo de solvente y una mínima cantidad de

fase sólida. Una MSPD típica involucra el mezclado directo de una pequeña porción de muestra (ej. 0,5 g) con una fase absorbente donde se produce la disrupción de la muestra. Posteriormente la mezcla es empacada dentro de una columna donde se eluye con un solvente apropiado. El eluato es posteriormente colectado, preconcentrado y analizado por técnicas instrumentales. La etapa de la mezcla se lleva a cabo en un mortero mientras que una jeringa conteniendo una fritada en la parte inferior, es empleada como cartucho. Esta técnica se diferencia sustancialmente con SPE porque a través de la dispersión, toda la superficie de la fase sólida se encuentra expuesta para interactuar con la muestra. Durante el proceso de disrupción en el mortero, el sorbente actúa como un abrasivo destruyendo las estructuras del tejido y por lo tanto mejorando la accesibilidad y extractabilidad de los contaminantes ocultos (Barker 2007).

La disrupción mecánica, dispersa la matriz sobre la superficie del sorbente aumentando la eficiencia de retención de interferentes. La Figura 2 muestra un ejemplo de dispersión de tinturas de propóleo sobre $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.



Figura 2: Dispersión de extractos de propóleo en sulfato de aluminio por la técnica MSPD.

Los procedimientos MSPD necesitan una buena optimización en relación a cantidades de matriz y tipos de sorbente y solvente de elución (Kistenson et al. 2006). Otros sorbentes adicionales suelen utilizados en serie a la columna MSPD denominándose co-columnas. El sorbente de la co-columna es utilizado de forma complementaria para la remoción de interferentes. El MSPD se destaca por ser una metodología directa y simple que involucra el uso de reactivos accesibles para cualquier laboratorio y no requiere de instrumental sofisticado.

La mayor desventaja radica en la pérdida de automatismo aunque el procedimiento de elución es potencialmente automatizable (Anastassiades & Scherbaum 2005).

I.3.3 QuEChERS y métodos dispersivos

La extracción de contaminantes con ACN tiene su origen en el inicio del análisis de residuos de pesticidas en alimentos mediante el método de Mills (Mills *et al.* 1963). Cuarenta años después, Anastassiades y colaboradores introducen una variante miniaturizada posteriormente denominada QuEChERS de rápido, sencillo, barato, efectivo, robusto y seguro (de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, por sus siglas en inglés) (Anastassiades *et al.* 2003a). Esta metodología fue asombrosamente exitosa pues termina siendo una variante metodológica adaptable a la matriz y/o al analito que incluye además de la extracción la etapa de purificación mediante dSPE. Otra característica destacable es se realiza con materiales e instrumentación comunes en cualquier laboratorio. Una de las claves en la extracción por esta metodología, es que se soporta en el uso de sales que aportan tanto a la separación de fases como a la eficiencia de extracción (Lehotay 2007) o confiriendo un pH adecuado para extraer determinados

analitos (Lehotay *et al.* 2005a). La purificación de QuEChERS se realiza adicionando, en un tubo conteniendo una alícuota de extracto, una fase sólida con capacidad de eliminar interferentes. Se introduce como fase sólida apropiada la amina primaria/secundaria (PSA), el carbón grafitizado (GCB) u octadecil sílice (C₁₈) a la mezcla de extracción en forma dispersiva en lugar de pasar el extracto a través de un cartucho o columna empaquetada con esta fase sólida (Lambropoulou & Albanis 2007; Wilkowska & Biziuk 2011).

La extracción con ACN presenta ventajas frente al uso de acetona, usada como solvente de extracción en el método de Luke (Luke *et al.* 1975), siendo una de las más importantes su buena separación de la fase acuosa con la adición de una sal (NaCl) sin necesidad de uso de solventes no polares. Este desarrollo es hoy un reconocido método oficial (AOAC 2007.01 2007; EN 15662 2008) y junto con extracciones por acetato de etilo (Ferrer *et al.* 2010; Pihlström *et al.* 2007) y la versión miniaturizada de Luke los más utilizados por los laboratorios de referencia de la Unión Europea (EURL 2012).

Durante su evolución desde su versión original (Figura 3), el método QuEChERS se ha extendido ampliamente tanto para su aplicación en GC-MS como LC-MS de cientos de analitos incluyendo pesticidas, drogas veterinarias, micotoxinas, toxinas y contaminantes ambientales, en diferentes matrices (Lehotay *et al.* 2005a; Lehotay *et al.* 2005b; Payá *et al.* 2007; Mol *et al.* 2008; Lehotay 2011; Wilkowska & Biziuk 2011).

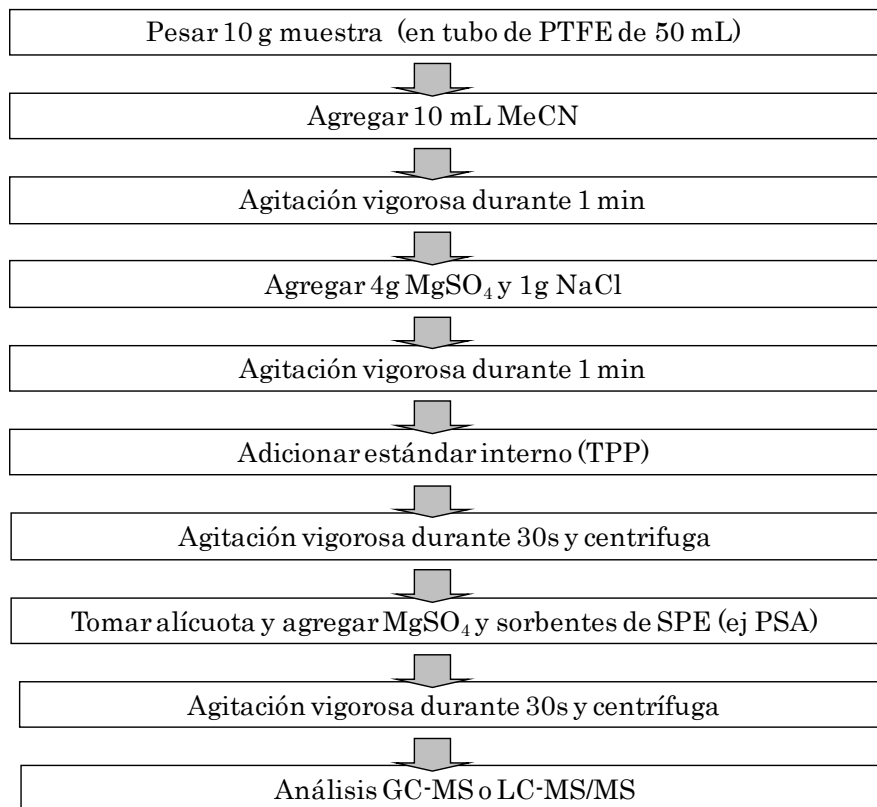


Figura 3: Diagrama de flujo del método QuEChERS en su versión original (Anastassiades *et al.* 2003a).

De acuerdo a los requerimientos, se han planteado diversas modificaciones a la propuesta original (sin control de pH) como el uso de buffers dando lugar a la versión buffer citrato (Payá *et al.* 2007) o acetato (Lehotay *et al.* 2005a) y la extracción con acetato de etilo en lugar de ACN (Mol *et al.* 2008).

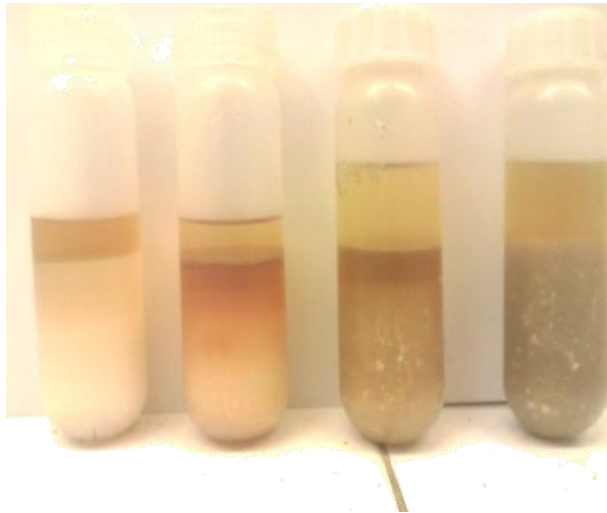


Figura 4: Extracción QuEChERS de muestras comerciales de caramelos de propóleos.

I.4 Instrumental contemporáneo: técnicas separativas y sistemas de detección

I.4.1 Cromatografía gaseosa

La cromatografía gaseosa (GC, generalmente referida a cromatografía gas-líquido) puede definirse como una técnica separativa basada en la afinidad que tienen los componentes de una muestra entre dos fases, una fase móvil gaseosa de gas inerte y una fase líquida inmovilizada sobre un sólido inerte. La fase móvil (gas portador) transporta a través de una columna con fase estacionaria líquida en dirección a un detector, una muestra previamente volatilizada en un puerto de inyección. Los analitos son entonces separados basados en la presión de vapor relativa y a las afinidades por la fase estacionaria (McNear & Miller 1998).

El origen de un sistema GC como hoy lo conocemos (puerto de inyección – horno que contiene la columna – detector) se remonta hacia el año 1951 destacándose desde el origen su potencial para la determinación de analitos volátiles (James & Martin 1951).

Hoy en día, los puertos de inyección más comunes son basados en división de flujo (split) o sin división de flujo (splitless) en el cual se restringe o no, el acceso de una porción de la muestra inyectada a la columna. Otros inyectoros como el PTV (vaporización por temperatura programable) son ampliamente utilizados con el objetivo de preconcentrar la muestra y aumentar la sensibilidad analítica.

Las determinaciones por GC con diversos detectores fueron las pioneras en el análisis de trazas tanto en alimentos como en medioambiente (Fernández-Alba 2005; Tadeo 2008). Con los avances tecnológicos, si bien se ha relegado el uso de GC y de los detectores selectivos, tanto la cromatografía de gases como algunas aplicaciones de estos detectores siguen siendo irremplazables, tal como se evidencia en el análisis de algunos pesticidas en alimentos (Alder *et al.* 2006, Lehotay 2007) y en diversas matrices ambientales por métodos oficiales (USEPA 2008).

I.4.1.1 Detectores selectivos: GC-ECD / GC-FPD

Si bien los detectores selectivos a la fecha no representan una novedad instrumental, estos constituyen una herramienta útil para el análisis de contaminantes determinables por GC. Se destacan por ser selectivos a una propiedad lo que les confiere una incrementada sensibilidad a los analitos por sobre otros compuestos que pueden ser interferentes. Durante esta tesis, dos detectores selectivos fueron utilizados ECD y fotométrico de llama (FPD).

Conceptualmente, el FPD es similar a un detector de ionización por llama (FID) en el que la muestra es quemada a la salida de la columna analítica por una llama de difusión de hidrógeno. Mientras que el FID mide los iones producidos por compuestos orgánicos durante la combustión, el FPD analiza la luminiscencia

emitida en la llama. Esta radiación es filtrada a longitudes de onda específicas, llega a un tubo fotomultiplicador y es analizada. Los FPD utilizan dos filtros de banda para detectar selectivamente compuestos que contienen azufre o fósforo. Los compuestos que contienen fósforo son detectables utilizando el filtro de 526 nm (filtro amarillo) mientras que los que contienen azufre son detectados con el filtro de 394 nm (filtro azul). Normalmente, un FPD posee una sensibilidad 100.000 veces mayor hacia el azufre y/o fósforo que hacia los hidrocarburos, por lo tanto es un detector sumamente útil para el análisis de trazas de compuestos organofosforados y organoazufrados (McNear & Miller 1998).

En tanto, el ECD es un detector selectivo a funciones electrofílicas tales como elementos electronegativos, siendo útil no solo para el análisis de pesticidas organohalogenados. Este detector posee una fuente de electrones basada en el elemento radiactivo ^{63}Ni en el interior del detector que emite partículas β (electrones) que colisionan e ionizan las moléculas de N_2 (gas make-up). Esta reacción forma una nube estable de electrones libres en la celda del detector ECD. Su electrónica, le permite trabajar para mantener una corriente constante a través de la nube de electrones mediante la aplicación de un pulso periódico entre ánodo y cátodo. Si tras su paso por la celda, un analito electronegativo captura electrones, el número de pulsos por segundo en el detector deberá aumentar para mantener la corriente constante. Posteriormente, esta restitución se traduce en una señal analítica por un ordenador (McNear & Miller 1998). El instrumento empleado para las aplicaciones desarrolladas en este trabajo fue un GC-FPD/ECD dual (Figura 5).



Figura 5: Cromatógrafo de gases dual (GC-FPD/ GC-ECD)

I.4.1.2 Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas

Holmes y Morrel demostraron exitosamente en 1957, el acoplamiento entre dos bloques de construcción hasta entonces considerados sistemas incompatibles; un sistema cromatográfico (en este caso un GC) y un MS (Holmes & Morrel 1957). Años después, con los avances en informática, los instrumentos GC-MS fueron comercializados con desarrollos de control por computadora del MS con analizador de cuadrupolo, ya que era limitante una rápida adquisición de los datos.

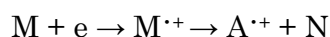
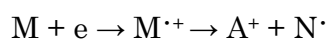
En un GC-MS, las sustancias separadas en el GC, son introducidas al MS a través de una interfase. Esto es seguido por un proceso de ionización, análisis de masas y detección de m/z . Los GC-MS utilizados en análisis de trazas utilizan dos modos fundamentales de ionización: por impacto electrónico (EI) y por ionización química (CI), dependiendo los requisitos. La CI se utiliza como estrategia de ionización débil mientras que EI de ionización fuerte.

Dependiendo de las condiciones de operación, la interfase de ionización de un GC-MS puede ionizar y fragmentar los analitos detectando todo en conjunto. Los iones de un analito forman una huella digital de su identidad que es su espectro de masas, que es único para ese analito.

El espectro de masas es una representación de la intensidad en función de la m/z donde m =masa y z =carga que es normalizada al pico base. Los GC-MS operando en modo de barrido (full scan) por EI adquieren espectros (en condiciones estándar a 70eV) que pueden ser utilizados para contrastar con bibliotecas de espectros disponibles comercialmente.

Cuando una molécula es ionizada en un filamento de EI, un ion molecular $M^{+\bullet}$ es producido, quien al contener tanta energía interna se fragmentará por expulsión de una partícula N con la formación de un ión fragmento $A^{+\bullet}$ o A^+ .

El vacío en el sistema, asegura que las reacciones que ocurren sean mono-moleculares que es la base de todos los estudios de fragmentación. Los electrones impactan en el analito, produciendo la fragmentación del mismo, de acuerdo a su estructura. El analito original da lugar a un catión-radical como ión molecular y los iones fragmentos pueden ser tanto cationes como iones radicales mientras que la partícula N puede ser radical o neutra:



Si la fragmentación tiene suficiente energía interna, las fragmentaciones posteriores pueden ocurrir dando lugar a la formación de una serie de iones fragmentos., Esta serie de descomposiciones cuando son elucidadas de un espectro de masas, son denominadas ruta de fragmentación, que son función de la energía suministrada y de la estructura química del analito. Por lo tanto, el espectro de masas no es simplemente un patrón de fragmentación ya que su apariencia

depende de la energía ionizante y de otros parámetros como la temperatura a la que la ionización es llevada a cabo (Dass 2007; Fernández-Alba 2005).

El análisis de trazas por GC-MS ha desarrollado sus principales aplicaciones en estrategias que utilizan analizadores tipo cuadrupolo (Q) operado en modo de iones seleccionados (SIM) o por analizador de trampa de iones (IT) que permite realizar experimentos de masas tándem (MS/MS) (de Kok & Agüera 2005; Gómez *et al.* 2009). La ventaja adicional de GC-MS sobre otros detectores de GC es sin duda la capacidad de ofrecer información estructural, que en el análisis de trazas permite la confirmación. La sensibilidad requerida obliga a trabajar en modo SIM en analizadores Q, siendo el modo de barrido de masas (full scan) un modo operacional para aéreas de estudio que manejan mayores niveles de concentración. En la presente tesis se utiliza instrumental EI-GC-MS con analizador Q (véase Figura 6).



Figura 6: Fotografía del GC-MS cuadrupolo (Hewlett Packard GC 6890- MS 5973) empleado en esta tesis.

Vale la pena mencionar, que aunque hay otros analizadores tándem como el triple cuadrupolo (GC-QqQ-MS/MS), dada la imposibilidad del GC-MS en trabajar en full scan en análisis de trazas, la tendencia en análisis ambiental como de alimentos busca en el acoplamiento de GC con espectrómetros de masas de alta resolución (HRMS) y a la cromatografía gaseosa vectorial (GC x GC) con detectores HRMS de adquisición rápida (Gómez *et al.* 2011; Richardson & Ternes 2011; Hernández *et al.* 2012; Kaufmann 2012).

I.4.2 Cromatografía líquida

La cromatografía líquida (LC) puede definirse como una técnica separativa basada en la afinidad que los componentes tienen entre dos fases inmiscibles: una fase móvil líquida que fluye sobre otra estacionaria sólida empaquetada en una columna. La fase móvil se compone generalmente de una mezcla de disolventes con distinta fuerza eluotrópica. La separación es una consecuencia de la diferencia de coeficientes de distribución entre los componentes de una muestra, que produce sucesivas etapas de adsorción y desorción de los mismos a través de la fase estacionaria (Andrey 2003; Grimalt 2009).

I.4.2.1 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

La espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida ha sido una de las técnicas analíticas que más se ha extendido en las últimas décadas en el campo de la química analítica aplicada al medio ambiente, alimentos y salud pública. El éxito de su aplicación es una consecuencia de la combinación de una técnica de separación (LC) que presenta una gran versatilidad para diversos analitos y las

capacidades que ofrecen diferentes analizadores de MS. Un instrumento LC-MS, se presenta como la posibilidad analítica de alcanzar una elevadísima sensibilidad con capacidad de ofrecer tanto información cuantitativa como cualitativa relacionada con información estructural, útil para confirmación a muy bajos niveles. Los diversos analizadores de MS disponibles proporcionan diferentes formatos de trabajo desde búsquedas objetivo (dirigidas a una serie de compuestos con iones y tiempos de retención conocidos) a no objetivo (dirigidas a una serie de compuestos con iones y/o tiempos de retención desconocidos) (Gómez *et al.* 2010).

Este último caso corresponde con las denominadas estrategias de screening de contaminantes, generalmente asociadas a la búsqueda de productos de transformación (PTs), metabolitos o productos de degradación e inclusive a compuestos conocidos de los que no se dispone de un estándar en el laboratorio (García-Reyes *et al.* 2007).

Desde una perspectiva elemental, se puede definir el funcionamiento del espectrómetro de masas en las siguientes etapas:

(a) la ionización, en la que las moléculas de los analitos pasan a estado gaseoso ionizándose, adicionándose o eliminándose un electrón o un protón. El exceso de energía proporcionado en este paso también puede transformarse en una fragmentación de la molécula, generando iones fragmento.

(b) la separación y el análisis de la masa de los iones moleculares y sus fragmentos cargados basándose en su relación m/z .

(c) la medida, amplificación y creación de los espectros de masas.

Para que el segundo paso se desarrolle correctamente es necesario trabajar con alto vacío, permitiendo el movimiento libre de los iones en el espacio, sin la interferencia de otras especies con las que puedan colisionar. La colisión puede generar la fragmentación de los iones moleculares y/o producir nuevas especies.

Esto produciría una reducción de la sensibilidad, generando desde señales falsas hasta una mala interpretación (Niessen 2006; Grimalt 2009; Snyder *et al.* 2010).

Revisiones bibliográficas recientes señalan que los instrumentos LC-MS/MS están absolutamente consolidados para las determinaciones de analitos orgánicos a niveles de trazas, tanto en campos de análisis ambiental (Tadeo 2008; Richardson 2010; Richardson & Ternes 2011; Hernández *et al.* 2012) como de alimentos (Lehotay *et al.* 2008; Soler *et al.* 2008; Malik *et al.* 2010; Kaufmann 2012).

I.4.2.2 Modos de ionización e interfases a presión atmosférica

La clave del éxito de LC-MS se debe en gran parte a la capacidad de conseguir que las moléculas neutras se conviertan en iones moleculares o fragmentos en estado gaseoso. La ionización de los analitos es de vital importancia porque es la condición necesaria de la espectrometría de masas para lograr controlar, separar y dirigir iones cargados de forma eficiente mediante la aplicación de campos eléctricos y magnéticos (Dass 2007). Este paso inicial en el acoplamiento de LC-MS fue quien limitó considerablemente su aplicación extendida de una forma robusta hasta avanzados los años 90. La principal incompatibilidad que presentaba el acoplamiento de MS con LC eran los altos flujos necesarios para una separación eficiente (alrededor de 1 mL/min) y la baja volatilidad de las fases móviles acuosas que debían evaporarse sin interferir con el alto vacío que hacía falta en el analizador de MS (Andrey 2003; Dass 2007). En ese contexto, las primeras interfases que se desarrollaron tenían como principal objetivo la eliminación del solvente, pretendiendo alcanzar una analogía con GC-MS, intentando conseguir moléculas del analito en fase gaseosa antes de llegar a la fuente de ionización. Una de las interfases más usadas fue el haz de partículas

(particle-beam, PB), el cual era capaz de separar rápidamente y con alta eficiencia el solvente de las moléculas eluidas en LC (Dass 2007). Posteriormente, durante el desarrollo de nuevas fuentes se comprobó que era posible favorecer la ionización de los analitos en presencia del solvente sin perturbar al analizador de MS. Se observó que no era necesaria la presencia de un filamento para lograr la ionización, si durante la nebulización se obtenían gotas cargadas, sobre todo para analitos de carácter básico, ácido o iónico (Boyd *et al.* 2008).

De esta manera, también se contempló la posibilidad de realizar la ionización de las especies a presión atmosférica. A partir de estos principios, se comenzó a desarrollar durante los años 70 las interfases a presión atmosféricas (API), que fueron presentadas a fines de los años 80 como una prometedora alternativa para el análisis de biomoléculas (Fenn *et al.* 1989). Más tarde, en 2002 se le concede el Premio Nobel de Química a John B. Fenn por su desarrollo de la fuente API más versátil conocida, y sobre quien se basa mayormente el análisis LC-MS de contaminantes orgánicos; la interfase y fuente de ionización por electrospray (Dass 2007; Grimalt 2009). El electrospray es generado por la aplicación de un alto voltaje (3-6 kV) sobre un capilar conductor por el que circula un pequeño flujo de fase móvil de la LC a presión atmosférica. La elevada diferencia de potencial crea un campo eléctrico que induce a la acumulación de cargas sobre la superficie del líquido al final del capilar, que progresivamente se rompe en microgotas de solvente cargado. Estas gotas de solvente se dispersan como consecuencia de la introducción de un flujo de gas inerte a alta temperatura en dirección coaxial al flujo de la fase móvil, que induce a la evaporación o pérdida del exceso de solvente en las gotas (véase el diseño de una fuente ESI en la Figura 7).

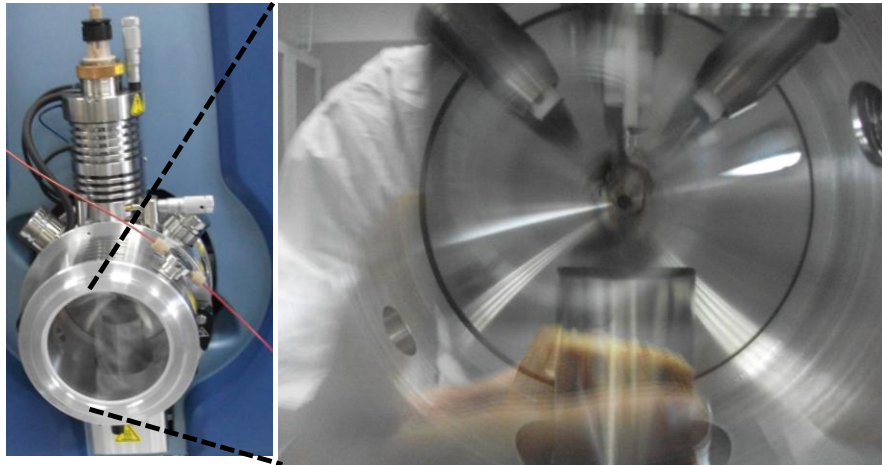


Figura 7: Fuente electrospray de iones Turbo V TM (AB Sciex) en un equipo 5500 LC-QLIT-MS/MS (AB Sciex)

Los iones que se forman en la ESI pueden ser de carga positiva o negativa, generalmente se presentan como: (a) en modo positivo, iones de moléculas protonadas ($[M+H]^+$), y aductos de sodio; (b) en modo negativo, iones moleculares desprotonados ($[M-H]^-$) o aductos de formiato o acetato, en el caso de emplear fases móviles modificadas (Andrey 2003). En los últimos tiempos, se ha hecho uso de diferentes técnicas para lograr ionizar en fase líquida debido a la falta de universalidad de ionización para todos los analitos por una misma fuente. Es necesario comentar varias de ellas: ionización por termospray (TSP), ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI), ionización por laser a presión atmosférica (APLI) y por ultimo ESI. En una escala de polaridades y pesos moleculares se puede situar la aplicación de cada fuente según la Figura 8.

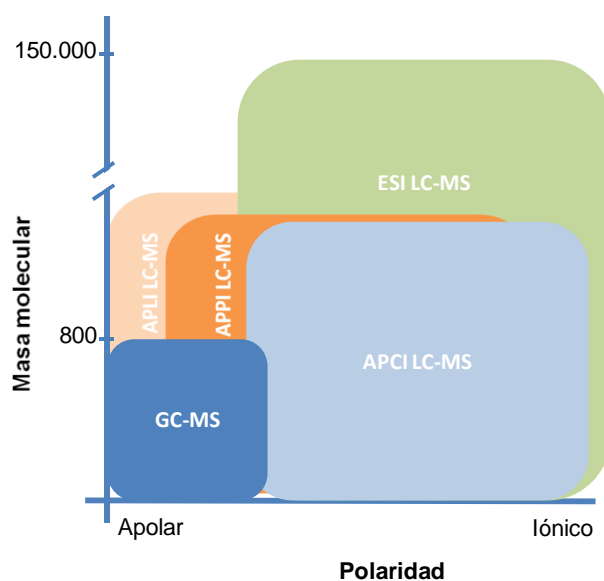


Figura 8: Rango de aplicación del acoplamiento GC-MS y las diferentes interfases en el acoplamiento de LC-MS en función de la polaridad de los analitos y su masa molecular.

Se puede deducir de las técnicas de LC-MS a través de sus diversas fuentes, son capaces de cubrir analitos de alto y bajo peso molecular, de polaridad variable. En comparación, los analitos determinables por GC-MS corresponden a un pequeño grupo de compuestos que van desde apolares a semipolares, de relativamente bajo peso molecular, limitando mucho su aplicación en métodos de amplio alcance.

En la práctica, los dos esquemas más comunes de trabajo en análisis cuantitativo de contaminantes orgánicos involucran una estrategia complementaria de EI-GC-MS y ESI-LC-MS/MS, ya que se han demostrado irremplazables una a la otra (Alder *et al.* 2006; Pitarch *et al.* 2010). Se deduce además, que hay un rango de analitos que pueden ser determinados indistintamente por ambas técnicas con similares desempeños.

I.5 Espectrómetros de masa como detectores de los sistemas cromatográficos

El analizador de masas es la parte esencial de un espectrómetro de masas, donde se utiliza un campo eléctrico o magnético de forma de afectar la trayectoria o la velocidad de los iones y focalizándolos en función de m/z . En el diseño de los analizadores de MS se distinguen como los más populares: cuadrupolo (Q), trampas de iones (IT), trampa lineales de iones (LIT), Orbitrap, resonancia de ión ciclotrón (ICR), sector magnético y tiempo de vuelo (TOF). La capacidad de un analizador es determinada por las siguientes cifras de mérito: rango de m/z , resolución de masas, exactitud de masas y precisión, eficiencia de transmisión de iones, rango dinámico lineal, velocidad de barrido, capacidad de MS/MS y sensibilidad. Por otro lado, otros factores que también determinan la elección de un instrumento u otro son su adaptabilidad y coste económico, tanto en operación como en mantenimiento (Boyd *et al.* 2008). De todos los analizadores citados nos centraremos en el funcionamiento de aquellos que luego se han utilizado en el desarrollo experimental de la presente tesis, estos son el analizador cuadrupolo (Q), triple cuadrupolo (QqQ), TOF y los híbridos cuadrupolo – tiempo de vuelo (QTOF) y cuadrupolo – trampa lineal de iones (QLIT).

I5.1.1 Cuadrupolo

El cuadrupolo es el analizador de masas nominal más extendido ya que es compatible con las fuentes de EI, CI y API haciéndose popular tanto entre instrumentos GC-MS como en LC-MS (Andrey 2003; Boyd *et al.* 2008). Este hecho radica en que los Q ofrecen un buen compromiso con el rango de masas (de 40-2000

amu), reproducibilidad, además de una alta sensibilidad al menor precio entre la tecnología disponible (Grimalt 2009).

Sin embargo, un Q ofrece un poder de resolución limitado, por lo que en la actualidad se busca un aumento en la selectividad acoplando varios Q para realizar masas tándem (MS/MS), utilizando uno de ellos como filtro de masas. Un cuadrupolo consiste en barras (si bien hay cuadrupolos de 4, 6 y 8 barras con diferentes usos, el campo entre ellas es cuadrupolar) dispuestas en paralelo con polos espaciados alrededor del eje central (Boyd *et al.* 2008).

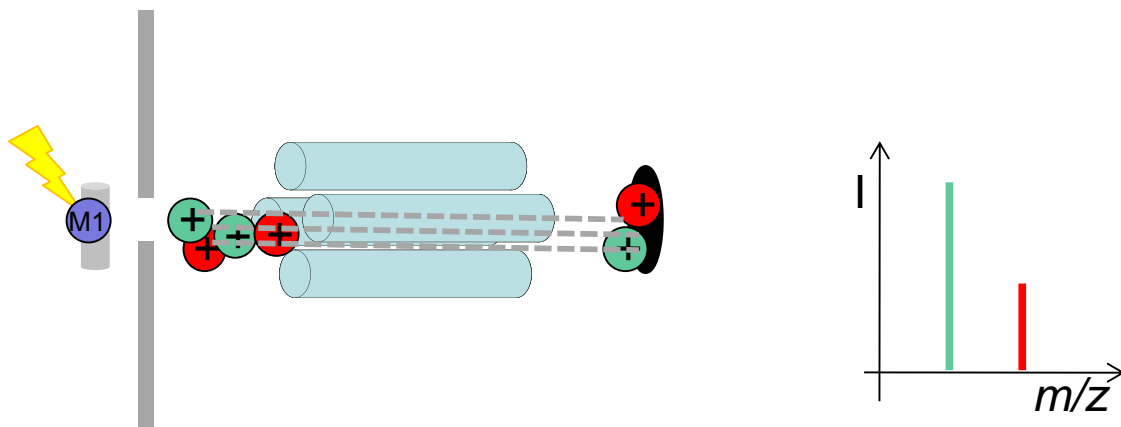


Figura 9: Esquema de operación de un cuadrupolo.

A las barras situadas en posición opuesta, se les aplica una corriente continua (DC) y un voltaje de radiofrecuencia (RF). Los iones son introducidos en el campo cuadrupolar mediante la aplicación de un potencial, con lo que empiezan a oscilar en un plano perpendicular al eje de las barras. De esta manera los iones describen una trayectoria que depende directamente de su relación m/z . En definitiva, la separación de los iones de diferente relación m/z se produce por la vibración estable de los iones en un campo eléctrico de alta frecuencia generado entre los polos (véase Figura 9). De forma específica, un Q es capaz de ajustar una radiofrecuencia para estabilizar una relación m/z concreta dirigida hacia el

detector, descartando aquellas relaciones m/z diferentes a las seleccionadas. Este modo operativo del Q le vale su utilización como filtro de masas, de forma que de todos los iones provenientes de la fuente, sólo se van transfiriendo al detector aquellos seleccionados. En ese sentido, para obtener un barrido total de masas debe ir acoplando una a una las m/z mediante la creación de campos eléctricos selectivos de cada una de ellas. En general la velocidad de escaneo suele ser de 4000-5000 amu/s (Dass 2007).

15.1.2 Tiempo de vuelo

El TOF se destaca por ser un analizador de MS altamente sensible en modo de barrido de iones (full scan) considerado el instrumento con capacidad de masas exactas más fácilmente accesible por los laboratorios (García-Reyes *et al.* 2007). La separación de los iones, se realiza en función del tiempo que tardan en atravesar un tubo de vuelo, el cual depende de la relación m/z (un tiempo de vuelo típico se encuentra entre 5-100 μ s). Una de las dificultades más importantes de este tipo de instrumentos al acoplarlos con cromatógrafos, es que los iones que llegan continuamente de la interfase tienen que ser enviados al TOF mediante un pulso. Para obtener una buena medida del tiempo de vuelo de los iones, el tiempo inicial al que comienza el vuelo debe estar muy bien controlado. Para obtener una eficiencia de la transmisión de los iones adecuada, se ha diseñado la aceleración ortogonal de los iones procedentes de la fuente, que permite muestrear una fracción de este haz de iones continuos. De forma que el analizador TOF trabaja de forma discontinua al contrario que el analizador de cuadrupolo, ya que los iones que llegan al analizador son pulsados ortogonalmente al tubo de vuelo a través de un “pusher”, teniendo que esperar el tiempo necesario para que todos alcancen al

detector antes de volver a lanzar otro pulso. Habitualmente la fracción de iones muestreados en el pulso es aproximadamente el 25% de los iones generados en la fuente de iones. A pesar de esto, este porcentaje de iones sigue siendo mayor al obtenido en un cuadrupolo operando en modo barrido de iones, lo que los convierte en uno de los instrumentos más sensibles operando en modo full scan. Un TOF simple lineal con una longitud aproximada de un metro de tiempo de vuelo puede alcanzar un potencial de resolución de alrededor de 10.000 medidos a ancho a mitad de altura (FWHM) (Boyd *et al.* 2008; García-Reyes *et al.* 2007).

Para incrementar la resolución sería necesaria una mayor longitud del tubo de vuelo o un mayor recorrido antes de llegar al detector. El reflectrón es un sistema óptico compuesto por un conjunto de espejos de iones con capacidad de reflejar el vuelo del ión al contrario de su trayectoria. Este dispositivo permitió el diseño de instrumentos de mayor resolución en el mismo espacio físico, corrigiendo además algunos errores de diseño que generan dispersión en las energías cinéticas de los iones provenientes de la interfase (Boyd *et al.* 2008; Dass 2007).

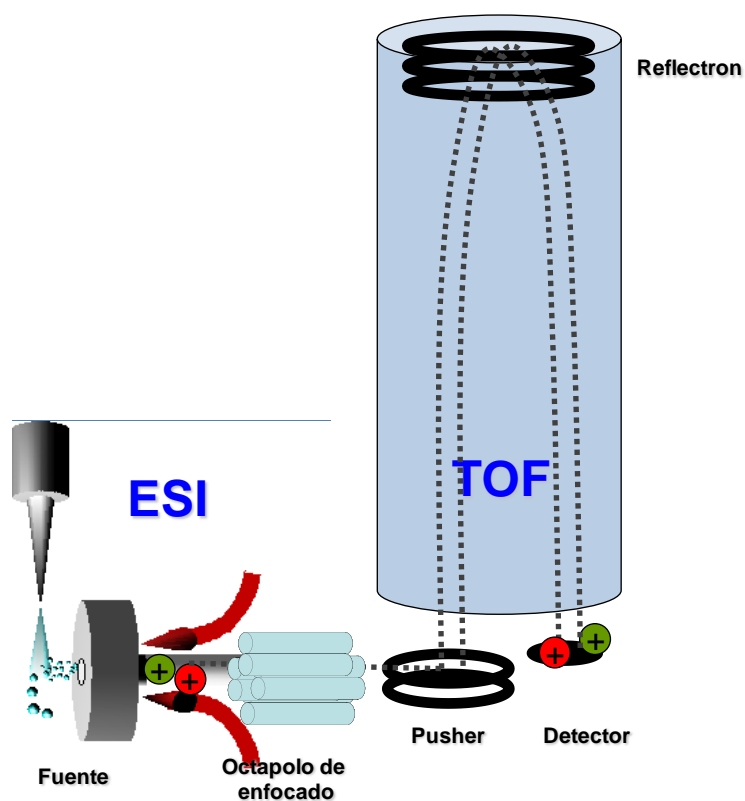


Figura 10: Esquema de operación de un TOF con diseño MSD/TOF (Agilent Technologies).

Un ion disperso por poseer mayor energía cinética penetrará a mayor profundidad en el reflector que otro ion teniendo la misma m/z pero menor energía cinética. De esta forma se van generando paquetes de iones más discretos, que llegan al mismo tiempo al detector, favoreciendo considerablemente la resolución instrumental del TOF. La Figura 10 muestra un esquema de disposición de las partes de un TOF. Actualmente, la resolución de analizadores TOF se ha incrementado notablemente, llegando a valores típicos de 10.000-20.000 FWHM dependiendo el rango de masas de estudio. Una característica del TOF por su diseño operativo, es que no presenta limitaciones teóricas de pesos moleculares analizables. Aunque conforme aumenta la relación m/z resulta más complicado determinar el tiempo de vuelo de los iones, se habla de un límite práctico de 500.000 amu (Grimalt 2009). Este hecho explica

que sea preferible el uso de una interfase ESI en combinación con instrumentos TOF para análisis por LC-MS, siendo apto para el estudio de macromoléculas (Cotter 1997).



Figura 11: Fotografía de un equipo LC-TOF-MS. LC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies) acoplado a un TOF (MSD TOF, Agilent Technologies) con fuente ESI.

La fotografía de un TOF utilizado en esta tesis se muestra en la Figura 11. Por último, otra característica que diferencia claramente el analizador TOF del Q es que el modo de adquisición siempre se realiza en full scan, por lo que siempre se obtiene un barrido de todos los iones en un rango de masas seleccionado.

I5.1.3 Espectrometría de masas tándem

La posibilidad de acoplamiento entre dos o más analizadores de masas, aumenta considerablemente el potencial y las capacidades que ofrece un instrumento MS. En la práctica, un sistema de masas tándem (MS/MS) aplicado al análisis de matrices complejas es empleado para aumentar la selectividad de señal

y sensibilidad hacia el analito. Desde la invención de Q simples, tradicionalmente acoplados a GC, se han desarrollado notablemente aquellas aplicaciones que han buscado información estructural de los analitos, bajo una ionización fuerte por EI. Sin embargo, dado que la interfase ESI produce una disociación inducida por colisión (CID) débil de las moléculas ionizadas y por tanto débil fragmentación permitieron los sistemas MS/MS con CID posterior a la fuente (Dass 2007, Hoffman & Stroobant 2007). Aunque es posible inducir a una mayor fragmentación de los iones en una fuente API, bajo esta situación se suele originar una mayor cantidad de ruido químico. Además, la presencia de interferentes de masas cercanas al fragmento, impiden una visualización espectral clara del analito de interés. En este caso, se debería disponer de muy buenos procesos cromatográficos, para asegurar completa especificidad de señal analítica, por lo menos a un tiempo dado (Grimalt 2009).

La adquisición en MS/MS ofrece una gran selectividad, ya que permite la posibilidad de aislar un ión hacia una celda de colisión, eliminando previamente otros iones o fragmentos que puedan interferir. Esta selectividad aportada por el espectrómetro MS, se complementa con la selectividad cromatográfica, aumentando la capacidad de detección (Boyd *et al.* 2008). La fragmentación en este caso se produce por la colisión del ión seleccionado con moléculas de un gas inerte (CID en la celda de colisión). La CID se suele dividir en dos etapas: en la primera, la energía translacional del ión se convierte en energía interna tras colisionar con la molécula de gas inerte; en la segunda, esta energía interna se transforma en energía de fragmentación, dividiéndose el ión en distintos fragmentos. Estas reacciones están ligadas directamente a la composición y estructura de la molécula (Hoffman & Stroobant 2007).

I5.1.3.1 Triple cuadrupolo

Los instrumentos LC-MS/MS fueron inicialmente desarrollados empleando tres Q acoplados secuencialmente, usando el intermedio como celda de colisión (generalmente representado como q). Bajo operación en MS/MS, en el primer cuadrupolo (filtro de masas Q_1) se selecciona la m/z de interés, que se suele denominar como ión precursor. Este pasa a través de la celda de colisión (Q_2) dónde se fragmenta, los iones producto son separados (filtro de masas) por el tercer cuadrupolo (Q_3) (Dass 2007; Hoffman & Stroobant 2007). Un esquema de operación de un analizador triple cuadrupolo es mostrado en Figura 12.

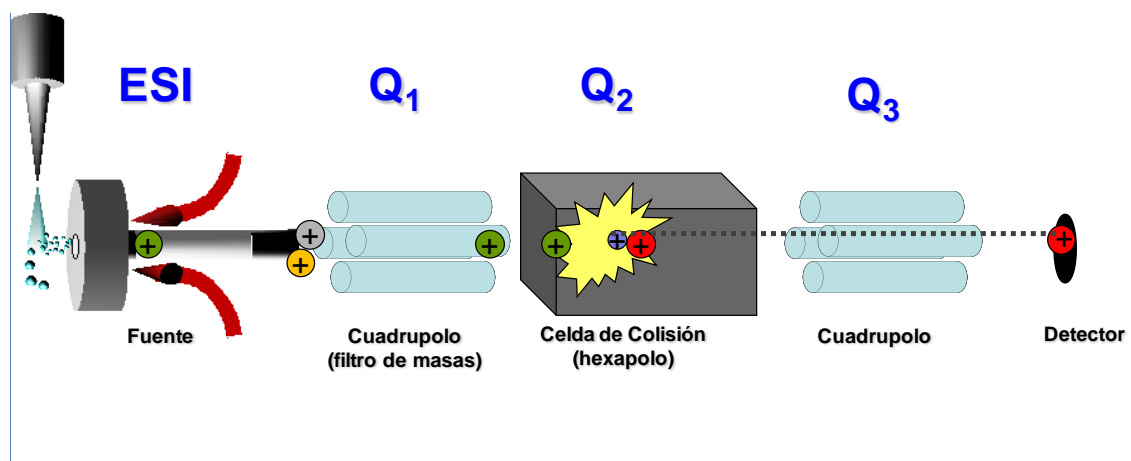


Figura 12: Esquema de operación de un QqQ.

Este tipo de instrumentos han sido denominados triple cuadrupolo (QqQ) aunque la celda de colisión suele ser un hexapolo u octapolo, ya que su diseño va dirigido a potenciar la eficiencia de la transmisión de los iones desde la celda de colisión hasta el Q_3 , además de presentarse como un espacio adecuado para la fragmentación (Dass 2007; Grimalt 2009).



Figura 13: Fotografía de un equipo LC-QqQ-MS/MS. LC Agilent 1200 Series (Agilent Technologies) acoplado a un QqQ (Agilent Technologies) con fuente ESI.

El instrumento empleado en el Capítulo 2 de la presente tesis se muestra en la Figura 13. La adquisición mediante un QqQ ofrece una gran versatilidad, dependiendo del modo en que opera Q1 y Q3. Cada uno de estos modos de adquisición presenta unas características que lo hacen idóneo para un objetivo concreto.

Los principales modos de adquisición que se suelen aplicar son (véase Figura 14):

- Barrido de iones (o full scan): donde todas las moléculas que se ionizan en la interfase llegan al detector. En el QqQ, tanto la celda de colisión Q2 como Q3 no intervienen en el proceso de selección, realizándose un barrido de iones con Q1, obteniendo un espectro en full scan.
 - Adquisición de un ión seleccionado (SIM): la adquisición SIM está dirigida a la medida de un ion seleccionado previamente en Q1, donde la celda de colisión y Q3 no actúan en la medida. Este tipo de adquisición deriva del uso
-

de Q simple, y su aplicación en instrumentos QqQ no suele ser muy frecuente.

- Barrido de iones producto: el barrido de iones producto se lleva a cabo seleccionando en Q1 una m/z concreta denominado ión precursor, que se fragmenta con una energía de colisión adecuada en la celda de colisión, mientras que Q3 adquiere en modo full scan de forma que se obtiene la medida de todos los fragmentos del ión precursor. A estos fragmentos se les denomina iones producto. Este modo de adquisición es ideal para la obtención de la máxima información estructural posible del ión precursor.

- Adquisición de la reacción seleccionada (selected reaction monitoring, SRM); donde se selecciona un ión en Q1 denominado ión precursor; el ión precursor se fragmenta en la celda de colisión (Q2) en presencia de gas inerte aplicando una energía de colisión óptima (para propósitos cuantitativos) y finalmente uno de los iones fragmento obtenido se selecciona en Q3 denominado ión producto. La adquisición en SRM es sin lugar a dudas la más utilizada en aplicaciones cuantitativas para matrices complejas, ya que se proporciona un entorno que maximiza sensibilidad y selectividad a la vez que minimiza la presencia de señales de los interferentes (Andrey 2003; Grimalt 2009, Hoffman & Stroobant 2007).

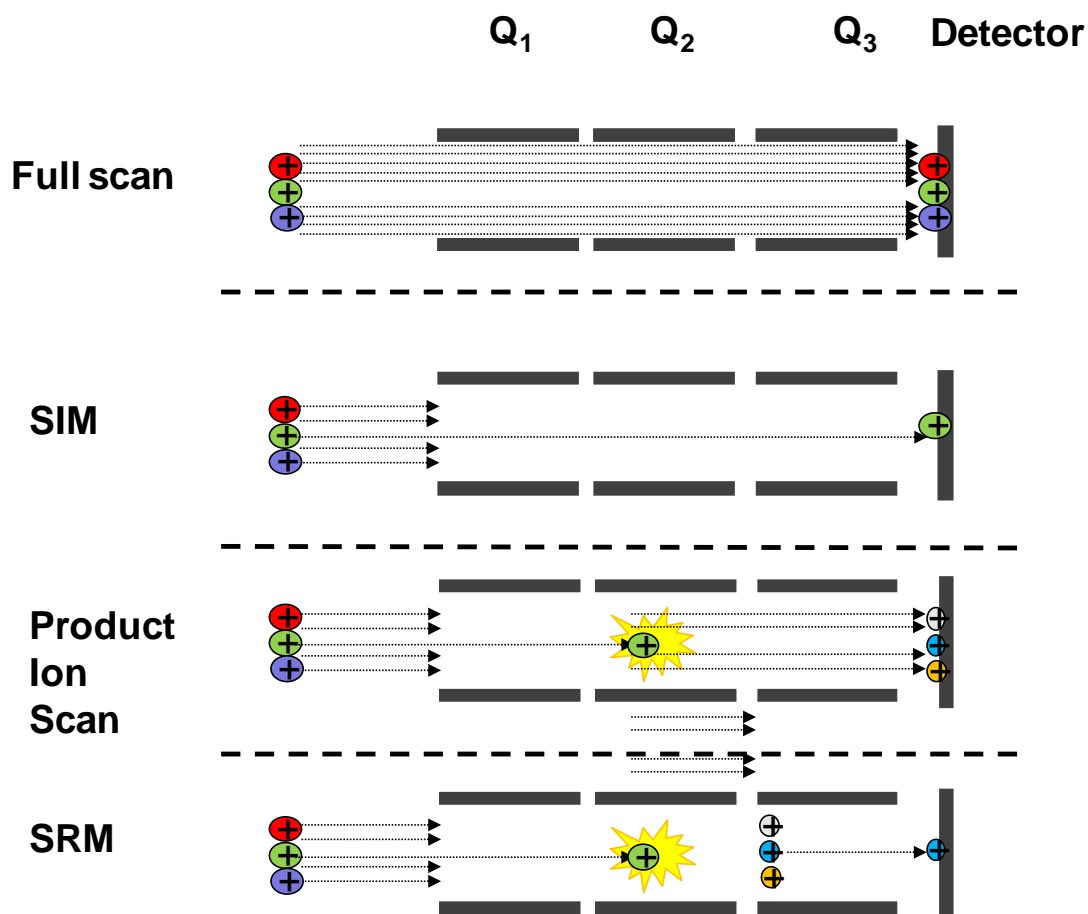


Figura 14: Principales modos operativos de un analizador QqQ

15.1.3.2 Sistemas híbridos: cuadrupolo – tiempo de vuelo (QTOF)

La combinación de analizadores con características diferentes es una clara estrategia de potenciación de capacidades. El sistema híbrido QTOF, posee un diseño muy similar al QqQ donde se sustituye Q₃ por un analizador TOF. De esta manera, una vez ha sido fragmentado el ión precursor en la celda de colisión los iones fragmento entran en el tubo de vuelo determinándose la masa exacta de los iones producto. La HRMS ofrecida por este instrumento presenta ventajas prácticas frente a HRMS simple, ya que la calidad y la cantidad de información proporcionada por MS/MS, aumenta la selectividad y la capacidad de la técnica para experimentos con fines de elucidación estructural. Adicionalmente, el QTOF

es capaz de ofrecer medidas de masa de los iones producto con una buena exactitud de masa, permitiendo la asignación de una fórmula molecular empírica a cada ión, facilitando la proposición de estructuras químicas para cada ión producto, así como la ruta de fragmentación del ión precursor aislado (Dass 2007; Boyd *et al.* 2008).

Aunque poseen modos operativos similares, el QTOF posee capacidades bien diferentes a un QqQ. Debido a que en un QTOF posee la habilidad de adquirir espectros en full scan de todas las moléculas ionizadas que llegan al TOF, dependiendo de cómo actúe el Q1 (filtro de masas) se producirán experimentos diferentes. Si Q2 no opera, el instrumento adquirirá como un TOF en modo full scan, con capacidad de obtener m/z con exactitud (véase Figura 15a). Alternativamente ocurrirá CID en la celda de colisión con generación de iones producto (Figura 15b).

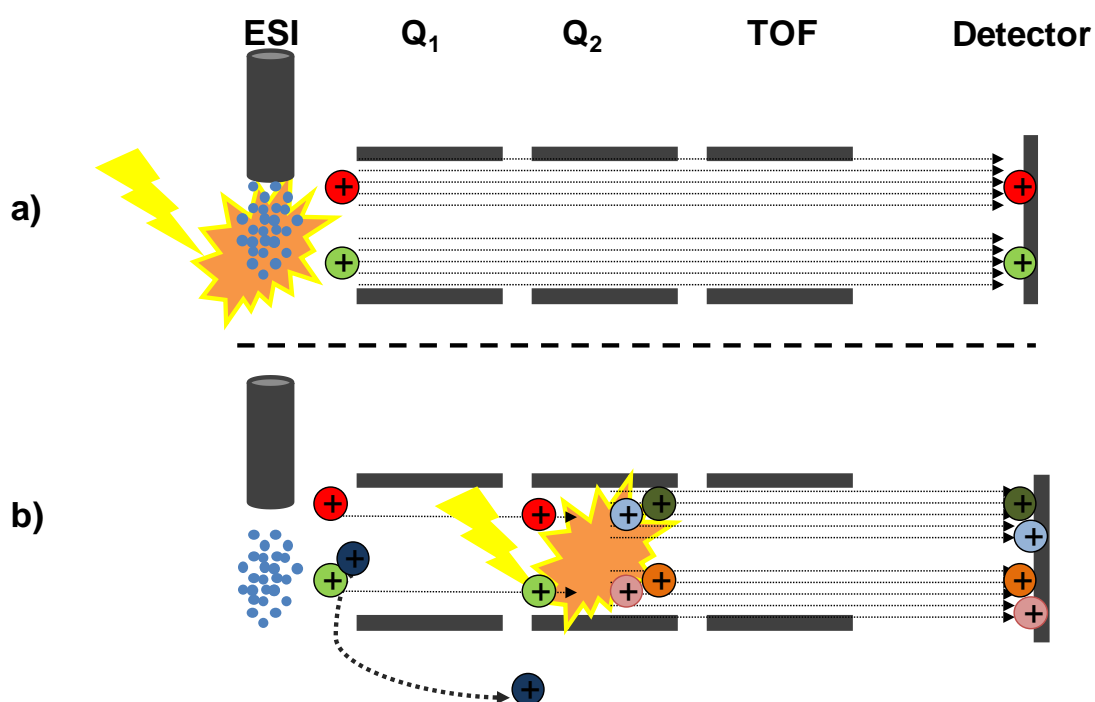


Figura 15: a) CID en la fuente de QTOF b) CID en la celda de colisión de QTOF.

De esta forma, si el cuadrupolo selecciona un ión precursor y este se fragmenta en la celda de colisión (Q2), el TOF lleva a cabo un barrido de iones producto del ion precursor. Este modo de adquisición permite obtener las m/z de todos los iones productos con masa exacta únicamente del ión seleccionado y con elevada pureza espectral. La forma de funcionamiento de un QTOF se esquematiza en la Figura 16.

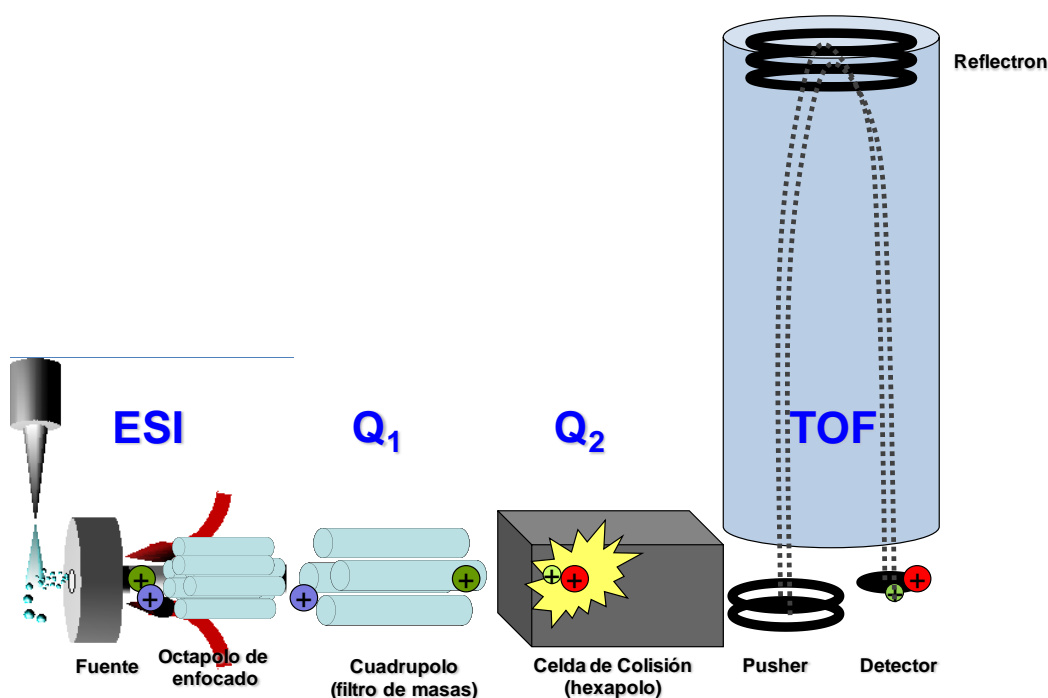


Figura 16: Esquema de operación de un QTOF de diseño 6530 Series (Agilent Technologies).

Una ventaja que presenta conocer la masa exacta es permitir conocer la fórmula elemental de cada uno de los iones producto, que mediante una interpretación espectral justificada por ruta la fragmentación, permite elucidar la estructura del compuesto (García-Reyes *et al.* 2007). Sin embargo, el instrumento QTOF operativamente no dispone la posibilidad de obviar el barrido de iones ya que el TOF trabaja siempre en full scan.

Por este motivo, difiere a las adquisiciones típicas del QqQ en modo SRM, donde el último analizador actúa como filtro de masas (Grimalt 2009, Hoffman & Stroobant 2007). Sin embargo, es posible tratar los datos generados por QTOF con herramientas de software asociado para obtener el cromatograma correspondiente a un único ión, mediante la extracción de un ión (eXtracted Ion Chromatogram, XIC) del cromatograma total de datos (Total Ion Current, TIC) obtenidos en su modo full scan (Farré *et al.* 2008). Esta estrategia de tratamiento de datos, presenta una analogía con el modo SIM de adquisición de datos del QqQ. Por el contrario, la aplicación de un XIC de una m/z específica de un ion producto en un cromatograma cuando el instrumento operó en MS/MS en un tiempo determinado guarda la misma analogía que el modo SRM presentado en QqQ. La potencialidad de un QTOF (véase Figura 17) operando en modos MS y MS/MS quedara profundamente expuesta en los en los Capítulo 2 y 3 de la presente tesis, para resolver problemas de confirmación de analitos conocidos y desconocidos.



Figura 17: Fotografía de un equipo LC-QTOF-MS/MS. LC Agilent 1200 Series (Agilent Technologies) acoplado a un QTOF (6530 Series Agilent Technologies) con fuente ESI JetStream®.

15.1.3.3 Sistemas híbridos: cuadrupolo – trampa de iones lineal (QLIT)

Una trampa lineal de iones (LIT) es un analizador basado en un cuadrupolo de cuatro barras que finaliza en lentes que repelen los iones para que se conserven dentro del espacio entre las barras mediante un potencial positivo para iones positivos y viceversa. El LIT es una reciente incorporación a la familia de espectrómetros de masas. Consiste en dos pares de barras hiperbólicas, cada una de ellas segmentadas en tres secciones axiales. La sección central es tres veces más grande que las otras dos y posee una abertura o rendija a su largo para permitir liberar y detectar los iones externamente.

En esencia tiene una construcción idéntica a la de un analizador cuadrupolo ya que posee cuatro barras paralelas y usa voltajes RF y DC para la separación de masas y su análisis (Dass 2007). Sus modos operacionales son, sin embargo, similares a las trampas de iones tridimensionales (IT). En cada sección las barras opuestas están conectadas eléctricamente. Los iones son atrapados en dirección axial (plano yz) por aplicación de tres voltajes separados DC en cada una de las secciones de la trampa. Para el atrapado radial de los iones (plano xy), se genera un campo de atrapado por RF. Por aplicación de potenciales RF (conocido como voltajes RF) entre el par de electrodo x y el electrodo y . Además una serie de voltajes AC suplementarios son aplicados a los electrodos en plano x (barras de salida) para la activación, aislamiento y liberación de los iones. Los principios de LIT están ampliamente expuestos en la literatura (Dass 2007; Hoffman & Stroobant 2007). Una ventaja del LIT es que posee mayor capacidad de atrapado que un IT tanto por el volumen que disponen como en diseño de operación: por otra parte son buenos analizadores en mantener una eficiencia de atrapado que en otras trampas se ve disminuida por efectos de repulsión por espacio-carga. Esto lleva a que la

sensibilidad de un instrumento LIT sea muy elevada porque dispone de un tiempo de acumulación de iones antes de ser detectados (Dass 2007). Sin embargo, debido a este diseño lineal, el tiempo de atrapado es necesariamente menor que otros diseños de trampas con lo que las mediciones de masa se llevan a cabo rápidamente con buenos detectores y sistemas de adquisición.

Un instrumento híbrido QLIT se destaca por ser particularmente sensible. Los modos operacionales de un QLIT son básicamente los mismos que presenta un QQQ más su uso como trampa para generar espectros MS^n aunque con algunas salvedades que serán explicadas mediante aplicaciones concretas en el Capítulo 3. Un esquema del diseño QLIT y una fotografía de este instrumento son mostrados en la Figura 18 y Figura 19, respectivamente. Un sistema QLIT ofrece capacidad de MS/MS nominal donde Q2 es generalmente referida a la celda de colisión.

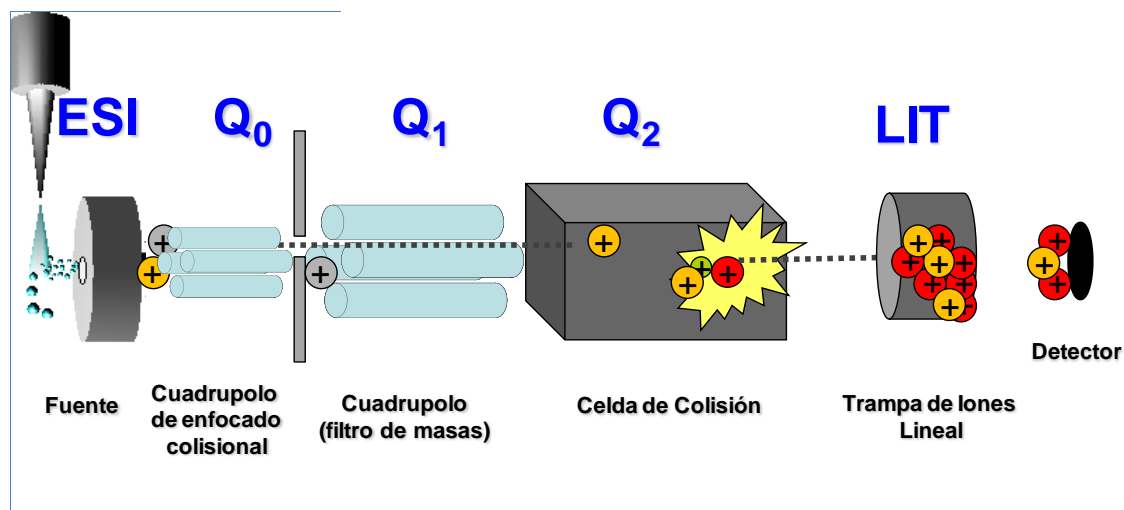


Figura 18: Esquema de funcionamiento de un QLIT (5500, AB Sciex).

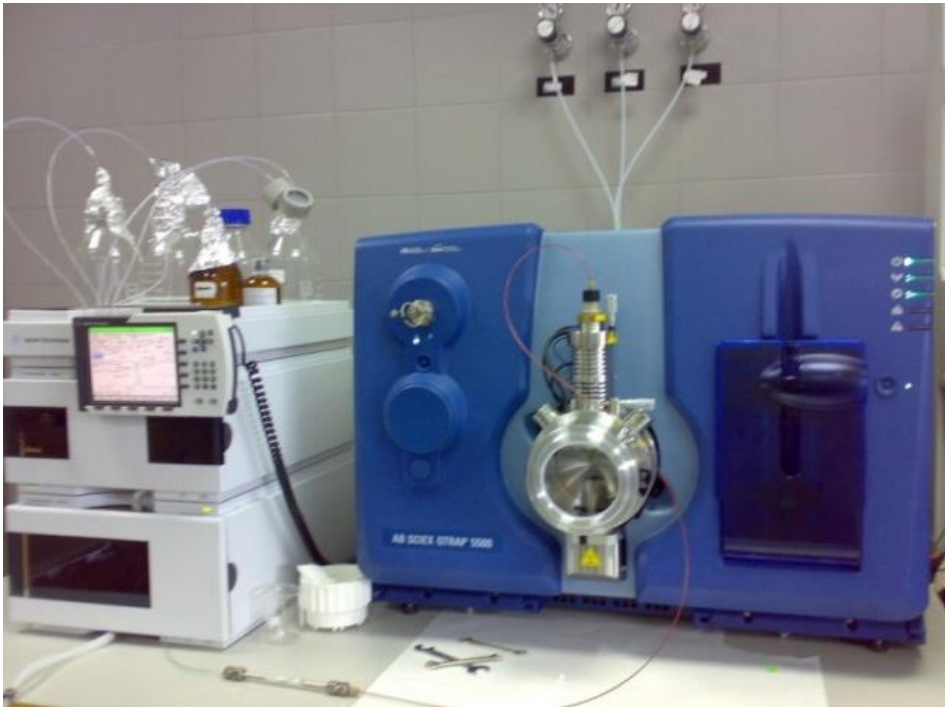


Figura 19: Fotografía de un instrumento QLIT con diseño 5500 (AB Sciex) con fuente ESI Tubo V®.

I.6 Aseguramiento de la calidad en la determinación de trazas en matrices complejas

Si bien existe amplia bibliografía que refiere a las prácticas en química analítica, por métodos cromatográficos, y entre estos los que utilizan MS para determinación de analitos a nivel de trazas, estos poseen requerimientos específicos de control de calidad propios de estas técnicas de determinación. El objetivo del aseguramiento y control de la calidad (QA/QC) es soportar la validez de los resultados obtenidos siendo en la actualidad uno de los requisitos básicos de acreditaciones ISO/IEC 17.025. Deben incluirse en esta etapa las características propias de la validación de un método, la determinación analítica de muestras y el tratamiento de los datos (Funk *et al.* 2007).

Debido a la diversidad de principios de diferentes técnicas analíticas de determinación, el aseguramiento de la calidad es un campo que hasta el momento no tiene una clara armonización a nivel internacional. Es frecuente encontrar según los autores de bibliografía reciente, el empleo de diversos criterios para estudiar el mismo campo de análisis de contaminantes en medioambiente y alimentos sin una clara justificación. Sin embargo, resultan interesantes en este campo los aportes de la CE para evaluación del desempeño de los métodos analíticos (CE/657 2002) y la reciente séptima edición del documento SANCO/12495/2011 de validación de métodos y procedimientos de control de calidad para análisis de residuos de pesticidas en alimentos (SANCO 2011).

El documento SANCO establece definiciones y pautas útiles para la determinación de contaminantes traza y la aceptabilidad del desempeño de los métodos analíticos que trascienden su campo de aplicación que son los alimentos.

Las definiciones SANCO suelen ajustarse más a la realidad del problema planteado: determinaciones trazas de contaminantes orgánicos con métodos cromatográficos espectrométricos de masas contemporáneos en matrices complejas. El objetivo al suministrar esta información es soportar la confiabilidad de los resultados para una calidad definida. Según Funk *et al.* 2007, las características de calidad de un proceso analítico son:

- Especificidad: la habilidad de un proceso analítico de registrar los analitos deseados en todas las formas relevantes (Funk *et al.* 2007). Es también la habilidad del detector (ayudada por la selectividad de la extracción, purificación, derivatización y/o separación) de proveer señales que efectivamente pertenecen al analito. Por ejemplo, GC-MS con EI es un sistema de determinación no selectivo capaz de una gran especificidad.
-

- **Selectividad:** la habilidad de un proceso analítico de registrar solo al analito deseado mientras que otros componentes en o características en la muestra no influyen el resultado (Funk *et al.* 2007). Es también la habilidad de la extracción, purificación, derivatización, separación y especialmente del detector de discriminar entre un analito y otro compuesto (SANCO 2011). Por ejemplo, GC-ECD es un sistema de detección selectivo que no provee especificidad. HRMS y MS tándem pueden ser ambas altamente selectivas y altamente específicas (SANCO 2011).
- **Sensibilidad:** es el cambio del valor medido por cambio en la concentración de analito (Funk *et al.* 2007) aunque también puede definirse como la pendiente de una curva de ajuste o calibración (OUA 2010).
- **Exactitud:** tanto en el sentido de veracidad (carencia de errores sistemáticos) como de precisión (medidas de diferencias entre resultados obtenidos por repeticiones de un proceso analítico establecido sobre una muestra; e imprecisión causada por errores aleatorios) (Funk *et al.* 2007). También es definida como la cercanía de concordancia entre el resultado analítico y el valor verdadero o de referencia aceptado. Aplicado a una población de resultados, involucra una combinación de errores aleatorios (estimados como precisión) y errores sistemáticos (veracidad) (Funk *et al.* 2007; SANCO 2011).

16.1 Cifras de mérito en la validación de metodologías

Las cifras de mérito comúnmente evaluadas al desarrollar y/o validar una metodología analítica son límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), veracidad (exactitud) y precisión.

➤ **Limite de detección:** El OUA (Organismo Uruguayo de Acreditación) define LOD como la menor magnitud que puede examinarse de un analito en la muestra y que es detectada con un nivel de confianza determinado. Básicamente es la mínima concentración de analito que proporciona una señal significativamente distinta a la señal del blanco (OUA 2010). En métodos cromatográficos instrumentales se suele determinar asistido a herramientas de software de los mismos equipos como la relación señal/ruido (S/R) mayor o igual a 3 ($S/R \geq 3$) (Wells *et al.* 2011).

➤ **Limite de cuantificación:** Es la menor concentración o masa del analito que ha sido validada con exactitud y precisión aceptables aplicando un método analítico (SANCO 2011). Se puede estimar mediante la relación $LOQ=10 S/R$ (Wells *et al.* 2011).

En caso de pesticidas, se establece como criterio que el LOQ debe ser menor o igual al LMR del pesticida en la matriz en estudio (SANCO 2011).

➤ **Veracidad:** cercanía de concordancia entre el promedio del valor obtenido entre el valor promedio de una serie de resultados analíticos. (ej. recuperación promedio) y el valor verdadero o de referencia aceptado. Se suele expresar como el promedio de las recuperaciones para cada uno de los niveles ensayados. El criterio de aceptación es un porcentaje de recuperación en el rango de 70-120 % (SANCO 2011).

➤ **Precisión:** cercanía de concordancia entre resultados analíticos independientes obtenidos aplicando el procedimiento experimental bajo condiciones estipuladas. Una medida de precisión (o imprecisión) es generalmente expresada como desviación estándar o desviación estándar relativa (DSR). La repetitividad para un analito es obtenida usualmente como la precisión usando un mismo método para una muestra por un laboratorio en

un corto periodo de tiempo. En tanto, la reproducibilidad para un analito es obtenida usualmente del promedio de recuperaciones o análisis de materiales de referencia por diferentes laboratorios, diferentes analistas por un periodo de tiempo. SANCO considera precisiones aceptables (reproducibilidades y repetitividad) cuyos valores de DSR sean menores o iguales a 20% (SANCO 2011).

Cabe remarcar, que estas definiciones no son absolutas ya que están en constante evolución además de que persiguen diferentes objetivos, como por ejemplo cumplimiento con LMRs o límites legales.

Vale la pena mencionar que otras cifras de mérito de relevancia también suelen ser obtenidas en validación de métodos como rango dinámico, efecto matriz, reproducibilidad, robustez, por citar algunas (véase SANCO 2011).

I6.2 El efecto matriz

La respuesta de los analitos en sistemas GC y cromatografía – MS (GC-MS, LC-MS/MS) puede ser afectada por la presencia de coextractivos de la muestra (matriz). El efecto matriz (EM) puede ser definido como la influencia de uno o más compuestos de la muestra en la medida de concentración o masa del analito pudiendo ser variable e impredecible, incluso variando entre las muestras o concentraciones de un mismo analito. Puede ser observado como un aumento o supresión en la respuesta obtenida por el detector para un mismo analito comparando entre la respuesta obtenida en un solvente puro que contiene el estándar contra el obtenido en presencia de coextractivos de la matriz (Mastovska *et al.* 2005).

Por este motivo, en análisis de residuos se emplea la calibración en matriz como una alternativa más confiable de cuantificación a fin de compensar el EM (SANCO 2011). Estudiar el EM es un proceso sencillo, siempre y cuando se disponga de matriz blanco de las mismas características que las muestras que se desean analizar. Para esto, el blanco de matriz es preparado al igual que las muestras. En la práctica, los analitos son finalmente agregados al blanco de extracto para construir una curva de calibración en matriz. El EM puede ser calculado empleando la siguiente expresión (Kmellar *et al.* 2008):

$$EM(\%) = \left(\frac{\text{Pendiente curva matriz}}{\text{Pendiente curva solvente}} - 1 \right) \times 100$$

donde el signo establece el efecto de aumento (+) o supresión (-) de respuesta para ese analito en esa matriz

Las causas del EM en GC como en LC-MS son bien diferentes. En GC, una de las principales causas de este fenómeno, es la existencia de sitios activos que se pueden encontrar a lo largo del sistema cromatográfico, especialmente en el inyector (Poole 2007). Este hecho establece parte del EM en GC es un efecto netamente cromatográfico y a priori independiente del sistema de detección empleado. Estos sitios activos son responsables de la adsorción y/o descomposición térmica de ciertos analitos (Anastassiades *et al.* 2003b).

La naturaleza de estos sitios activos, se atribuye a impurezas de metales o grupos silanol que se pueden encontrar en las superficies de la columna y en el liner del inyector. El EM en GC suele estar relacionado a formas irregulares de picos, picos

con cola y altos límites de detección. La explicación aceptada es que los compuestos de la matriz ocupan los sitios activos disminuyendo la disponibilidad de estos para interactuar con los analitos y por tanto mejorando el rendimiento de analitos que ingresan al proceso cromatográfico y a la detección (Poole 2007). Cabe destacar que los extractos de matrices complejas generalmente poseen una fracción de coextractivos no volátiles que no ingresan al sistema cromatográfico que también guardan relación con este efecto (véase Figura 20). En 1993 se da el primer reporte de EM en análisis de residuos de pesticidas organofosforados utilizando GC-FPD con columna open-tubular (Erney *et al.* 1993). Este comportamiento sería denominado por el mismo grupo de investigación como “aumento de la respuesta cromatográfica inducida por la matriz” (Poole 2007). Entre los factores que producen EM en GC se pueden citar (i) número y tipo de sitios activos en el inyector y columna (mantenimiento y estado del liner, véase Figura 20), (ii) estructura química (puentes de hidrógeno y termolabilidad) de los analitos, (iii) concentración del analito, (iv) temperatura de inyección, (v) tiempo de interacción (que es función del flujo presión, volumen de inyección, volumen de expansión del solvente, diámetro de columna y tiempo de retención del analito y por supuesto (vi) el tipo de matriz y la concentración de coextractivos (Hajšlová & Zrostlíková 2003; Mastovska *et al.* 2005; Poole 2007).

El EM en GC suele ser compensado realizando calibraciones en matriz como una forma de simular las condiciones reales de inyección, algo que no siempre se consigue ya que es muy difícil encontrar matrices blanco o que la matrices blanco no son representativas de todas las muestras en cuestión. Otra estrategia interesante para compensar el EM es la utilización de protectores de analitos; un concepto desarrollado por Anastassiades y colaboradores (Anastassiades *et al.*

2003b; Mastovska *et al.* 2005). Estos compuestos son agregados a los estándares en solvente y al ser determinados simulan el comportamiento de la matriz mejorando en la adquisición de respuesta.



Figura 20: Liner de un GC-MS luego del análisis de muestras de alimentos.

Por otra parte, el principal mecanismo que justifica el EM en LC-MS fue inicialmente sugerido por Kebarle como el resultado de una competición entre los componentes no volátiles de la matriz y los iones de los analitos que buscan acceder a la superficie de las microgotas y la forma en que pasan al estado gaseoso (Kebarle 2000; King *et al.* 2000; Annesley 2003; Alder 2011). Se conoce que el EM depende fuertemente de la habilidad de los componentes de la matriz en ocupar la superficie de las microgotas más que de la habilidad del analito en hacer lo mismo (Alder 2011). Esta hipótesis justifica porque el EM en LC-MS es un problema bastante frecuente en la interfase ESI más que en otras interfases API (King *et al.* 2000). Dependiendo del ambiente en el cual tiene lugar la ionización (en equipos LC-MS es función del proceso cromatográfico y por tanto de la coelución de matriz) y del proceso de evaporación del ion del analito, la competencia de los iones en la matriz

puede terminar en supresión o aumento de señal. En ESI/LC-MS el comportamiento observado es generalmente de supresión de la señal y repercute en detrimento de la precisión del método analítico (King *et al.* 2000; Fernández-Alba 2005). Sumado a eso, los requerimientos de las muestras para determinación por LC-MS/MS suelen ser inferiores en términos de remoción de coextractivos en la preparación de muestra que los exigidos a métodos por GC-MS. Sin embargo, los extractos de matrices complejas poseen muchos coextractivos con la capacidad de convertirse en interferentes manifestándose en el EM (véase Figura 21).

Una aproximación para visualizar el EM en LC-MS es mediante la realización de un cromatograma en full scan de la matriz blanco, donde se asume que todos los compuestos causantes del EM compiten con el analito por la ionización. De forma intuitiva, cabe esperar que al tiempo de retención cromatográfico en el que eluyen más compuestos de la matriz, producirá un EM mayor. Sin embargo, el principal inconveniente de esta aproximación es que no tiene presente que otros compuestos que no se ionizan también están asociados al EM (Alder 2011; Grimalt 2009).

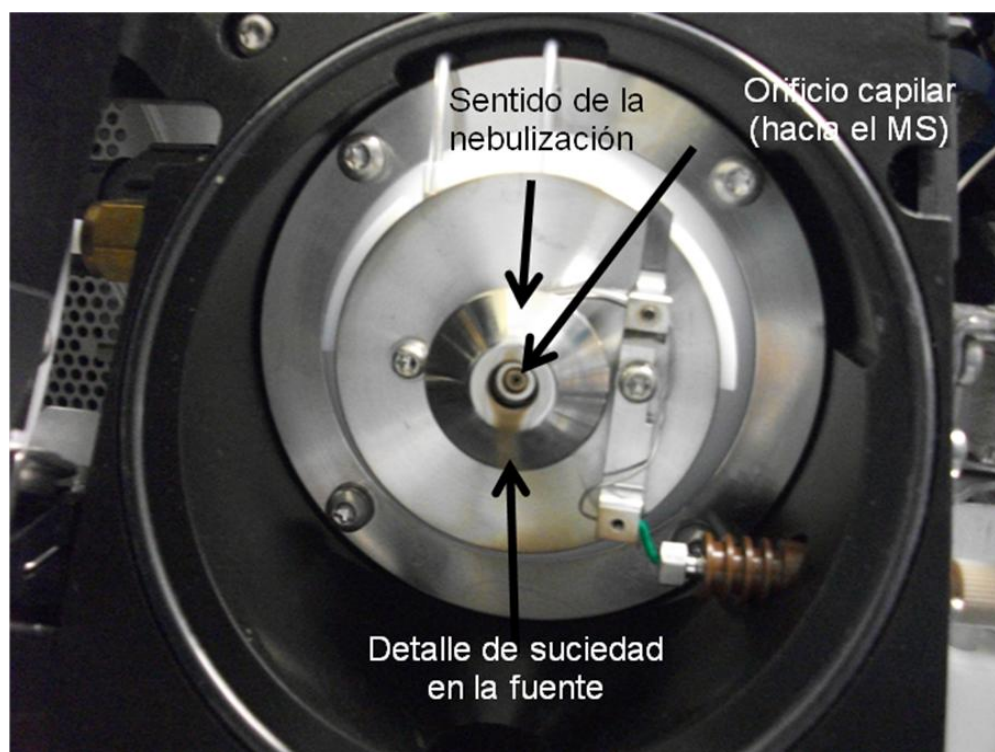


Figura 21: Fuente ESI de iones (JetStream™, Agilent Technologies) luego del análisis de una serie de muestras de efluentes.

En ESI-LC-MS, al igual que en GC, el EM no depende únicamente del analito sino de la matriz y las condiciones instrumentales al momento en el cual se adquiere la señal. Al igual que en GC, la calibración en matriz es ampliamente utilizada en determinaciones cuantitativas por LC-MS aunque pueden ser empleadas otras estrategias menos frecuentes como uso de estándares internos, o estándares marcados isotópicamente (SANCO 2011).

Sin embargo, una tendencia reciente derivada del notable incremento en sensibilidad de los nuevos instrumentos, busca reducir el EM por dilución del extracto o de la propia muestra (en caso de muestras acuosas) en lugar de su preconcentración. Esta estrategia ha sido previamente reportada para equipos LC-MS/MS con analizador cuadrupolo – trampa lineal de iones (QLIT) tanto en matrices ambientales (Martínez Bueno *et al.* 2011; Pareja *et al.* 2011) como en alimentos (Ferrer *et al.* 2011). La reducción de la presencia de otros componentes

de la matriz mediante su dilución en el extracto busca conseguir que el comportamiento durante la ionización sea comparable a los estándares en solvente. No obstante, el principal inconveniente de esta aproximación es la pérdida gradual de sensibilidad inherente a una dilución.

En otro contexto, el EM también tiene incidencia en la exactitud de masa de iones provista por instrumentos HRMS. Este hecho es de vital importancia en estrategias de screening de contaminantes y en los criterios de identificación de analitos mediante estas técnicas (Kaufmann *et al.* 2011; Malato *et al.* 2011; Kaufmann 2012; Mol *et al.* 2012).

I6.3 Identificación y confirmación de analitos por espectrometría de masas

La SANCO actualmente define la identificación como el resultado de un proceso capaz de proveer información estructural (ej. usando espectrometría de masas) que satisface los criterios aceptables para el propósito de un análisis. El proceso es generar evidencia suficiente que asegure que el resultado sobre una muestra específica es válido. Los analitos deben ser identificados correctamente para ser cuantificados (SANCO 2011).

Bajo esta definición, al demandar información estructural como requisito de identificación, las técnicas cromatográficas con detectores diferentes a MS, indirectamente no califican a este propósito lo que ha motivado a un acelerado desuso de estas técnicas. La identificación sin ambigüedades es un requisito antes de dar cualquier resultado. Si bien esta definición es válida en el campo de análisis de residuos de pesticidas en alimentos es la utilizada durante este trabajo.

La identificación por MS acoplada a cromatografía se soporta cuando se provee simultáneamente (SANCO 2011):

- tiempo de retención
- m/z adecuadas
- datos de abundancia (relación de intensidad de iones, IR)

Para obtener los IR se selecciona un ión de referencia, que suele ser el más abundante. El cálculo se puede expresar como %, o bien como la división entre las alturas de un ion de referencia y la correspondiente al ión o transición de confirmación.

De forma que si los valores de los IR teóricos (obtenidos a partir de patrones) y los de las muestras, no se desvían por encima de la tolerancia indicada (CE/657 2002; SANCO 2011) se asegura la identificación del analito (véase

Tabla 1).

RI (% del pico base)	EI-GC-MS (relativo)	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ LC-MS, LC-MS ⁿ (relativo)
> 50%	±10%	±20%
> 20% hasta 50%	±15%	±25%
> 10% hasta 20%	±20%	±30%
≤10%	±50%	±50%

Tabla 1: Máximas tolerancias recomendadas para intensidades relativas usando técnicas MS (SANCO 2011).

La confirmación de los resultados es otra parte esencial y ampliamente discutida, ya que supone un punto muy importante a la hora de presentar resultados.

La confirmación es la combinación de dos o más análisis concordantes uno al otro (idealmente usando técnicas de selectividad ortogonal) en las cuales, al menos una de ellas es capaz de satisfacer la identificación (Lehotay *et al.* 2008; SANCO 2011). Bajo este concepto, la identificación por sí misma no provee identidad en forma conclusiva, mientras que la confirmación si lo hace. La necesidad de confirmación de la identidad se encuentra asociada a la insuficiencia del análisis de identificación en asegurar la presencia o ausencia del analito en una muestra.

Se deduce que el objetivo es entonces evitar el reporte de falsos positivos o falsos negativos en la muestra. Lo más adecuado sería llevar a cabo un análisis de la muestra por varias técnicas analíticas. En este caso es recomendada la aplicación de técnicas de análisis con selectividad ortogonal, ya que se asume que si un mismo analito se extrae y determina por métodos analíticos con características de selectividad muy diferentes, se asegura con una altísima probabilidad la identidad del compuesto estudiado. Alternativamente se recomienda reanalizar la muestra, para comprobar la ausencia de errores introducidos por el analista, contaminaciones o problemas instrumentales no controlados. Con este objetivo normalmente se suele combinar el análisis primario con un segundo análisis que incremente la especificidad, como puede ser la adición de nuevas transiciones SRM por LC-QqQ, o bien el máximo número de iones de fragmentación en LC-QTOF (Grimalt 2009, Lehotay *et al.* 2008).

En lo que se refiere a los falsos positivos, lo ideal sería desarrollar métodos de análisis lo más específicos posibles, de forma que se descarte la posible presencia de un interferente al tiempo de retención del analito. En ese sentido, LC-MS/MS o GC-MS/MS son herramientas analíticas de gran capacidad, permitiendo la adquisición en modo SRM de un gran número de transiciones adicionales a la de cuantificación.

Para ejemplificar el concepto la Figura 22 muestra la confirmación por GC-MS de RI para tres m/z (314, 286, 258) correspondientes al clorpirifos en una muestra de propóleo previamente analizada por GC-FPD.

Sin embargo, de acuerdo a los criterios establecidos por estas guías de referencia es suficiente la adquisición de tres iones SIM en técnicas MS o dos transiciones SRM en técnicas MS/MS que además cumplan con tiempo de retención y RI para confirmar un positivo (CE/657 2002; SANCO 2011) aunque hay excepciones reportadas (Schürmann *et al.* 2009).

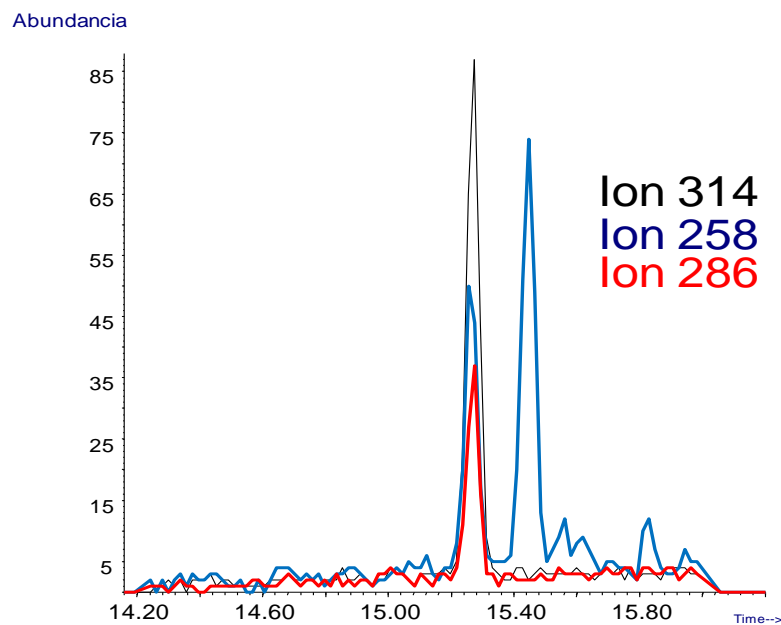


Figura 22: Confirmación de clorpirifos en muestra de propóleo por GC-MS.

Por último, los instrumentos TOF y QTOF merecen especial mención para la confirmación de identidad de pesticidas problemáticos (Lacorte & Fernández-Alba 2006; Sancho *et al.* 2006; García-Reyes *et al.* 2007), metabolitos (Picó *et al.* 2007; Soler *et al.* 2007; Picó & Barceló 2008; Picó *et al.* 2008) así como contaminantes emergentes (Farré *et al.* 2008; Pitarch *et al.* 2010) y productos de transformación

(Gómez *et al.* 2010; Picó *et al.* 2010) en diversas matrices, gracias a la capacidad de proveer masas exactas para iones moleculares y fragmentos con alta sensibilidad en modo de barrido de masas. La confirmación por estas técnicas es posible cuando se cumple simultáneamente el ajuste de tiempo de retención ($\pm 2\%$) y dos iones de masas exactas con sus respectivas RI (CE/657 2002). Como se expondrá en el Capítulo 3, estos equipos están dotados de herramientas de software que ayudan a resolver mediante interpretación de las masas exactas y las distribuciones isotópicas encontradas, las formulas moleculares de los iones.

Esta información, conjuntamente con la interpretación de una ruta de fragmentación es utilizada para identificar y/o confirmar analitos, inclusive nuevos compuestos.

I6.4 Exactitud, resolución y poder de resolución de masas

Los instrumentos de masas exactas proveen de medidas y espectros de masas exactas dependientes de las condiciones en lo que se adquieren (véase el espectro MS/MS de masas exacta de heroína obtenido por QTOF en Figura 23). La exactitud de masas es la desviación entre la masa exacta medida y la masa exacta calculada de un ión. Esta puede ser expresada como un valor absoluto en miliDaltons (mDa) o como un valor relativo en partes por millón (ppm).

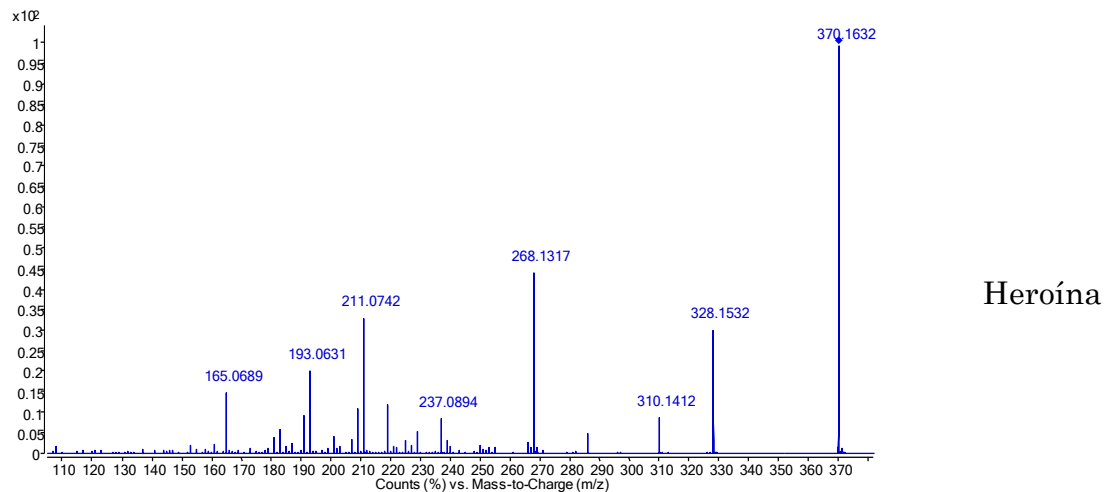


Figura 23: Espectro QTOF de heroína (90V fragmentor, energía de colisión 20 eV)

En la práctica, el valor de exactitud de masa expresado en ppm es el más utilizado el cual se puede calcular de la siguiente forma:

$$\text{Exactitud (ppm)} = \frac{\text{Masa exacta medida} - \text{Masa exacta teórica}}{\text{Masa exacta teórica}} * 10^6$$

Como norma general para pesos moleculares inferiores a 1.000 Da, se considera un valor adecuado de masa exacta apto para la identificación de un ión cuando su exactitud es inferior a 5 ppm (Boyd *et al.* 2008; CE/657 2002; Farré *et al.* 2008).

Cuando se trabaja con analizadores de MS es muy importante mantener un adecuado ajuste del eje de masas que asegure la correcta asignación de las masas espectrales, para lo que se suelen realizar una calibración del eje de masas. La calibración del eje de masas en instrumentos de masa nominal se suele realizar con menor frecuencia que en analizadores de masas exactas, debido a que su resolución es menor y las exigencias para su resolución de masas son menores. Sin embargo,

otros analizadores como el TOF o QTOF deben ser calibrados frecuentemente, con el objetivo de obtener buenos ajustes de masas y con ello valores de masa exacta correctos. Además, para estos analizadores se utiliza una sustancia de referencia que se adquiere a lo largo del cromatograma, ya que es posible cierta desviación de la medida de la masa por pequeñas variaciones de las condiciones de trabajo principalmente la temperatura, que afecta al recorrido de masas por dilatación o contracción del tubo de tiempo de vuelo (Boyd *et al.* 2008; Grimalt 2009).

La resolución de un espectrómetro de masas es su habilidad de distinguir entre dos iones con similares valores de m/z . La IUPAC define la resolución de masas como la menor diferencia de masas entre dos picos de igual magnitud de tal forma que el valle entre ellos es una fracción específica de la altura de pico (IUPAC 2012).

En tanto el poder de resolución definido a FWHM se define como $m/\Delta m$ donde m es la m/z medida y Δm es el ancho de pico a mitad altura. Esto condiciona a que el poder de resolución de instrumentos TOF y QTOF sea variable a lo largo de eje de masas y dependiente de la masa medida, siendo mayor a m/z mayores. El termino poder de resolución es generalmente confundido e intercambiado con el de resolución de masas (SANCO 2011). Hechas estas aclaraciones podemos ver que en la Figura 24, el poder de resolución del instrumento para la m/z 922 (masa calibrante HP-921 (Agilent Technologies) de un TOF en ese rango de masas) es $922,0092/0,087 = 10,598$.

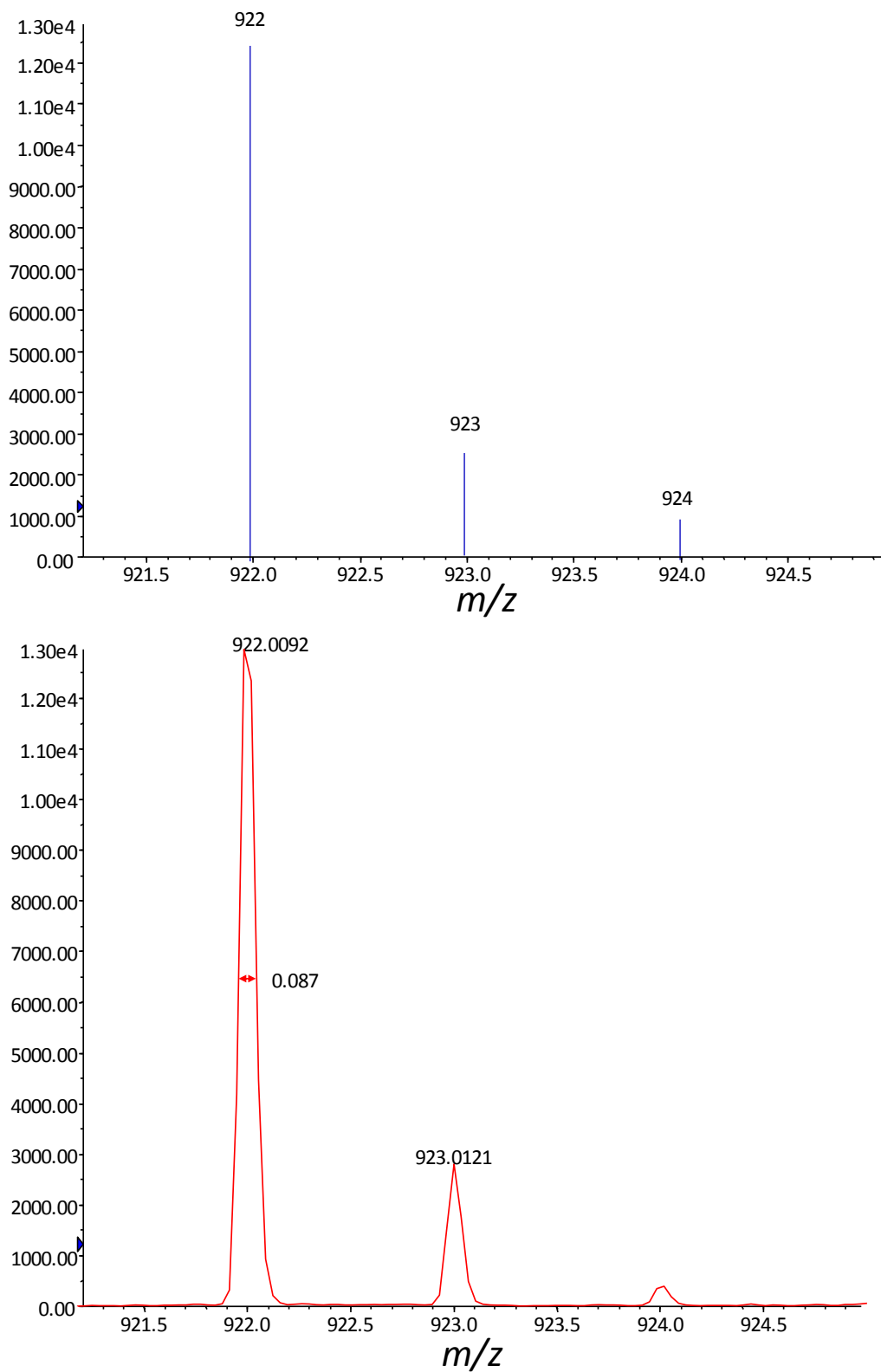


Figura 24: Espectro de baja resolución y de alta resolución (TOF) de la masa del calibrante.

Esta somera introducción a la temática de la tesis y su marco conceptual, nos muestra el inmenso campo y capacidades que existen en la actualidad para la determinación de compuestos orgánicos a niveles traza. La combinación entre las distintas posibilidades de análisis instrumental y de preparación de muestra, hacen posible determinar en forma relativamente directa y simple, un gran número de analitos a bajas concentraciones, algo que era impensable años atrás, Podemos además elucidar la estructura de compuestos de degradación de esos mismos analitos lo que descubre un universo de compuestos no descritos aún en la literatura con el fin de aportar elementos para comprender mejor su acción sobre la salud de la población y los ecosistemas.

I.7 Referencias

- ALDER, L. (2011). Basics of electrospray ionization. LAPRW. Montevideo, 3rd Latin American Pesticide Residue Workshop (Comunicación personal) Mayo 2011, Montevideo, Uruguay.
- 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.
- ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., ŠTAJNBAHER, D. & SCHENCK, F.J. (2003a). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* **86**, 412-431.
- ANASTASSIADES, M., MASTOVSKA, K. & LEHOTAY, S.J. (2003b). Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A* **1015**, 163-184.
- ANASTASSIADES, M. & SCHERBAUM, E. (2005). Sample handling and cleanup procedures II - new developments. *Comprehensive Analytical Chemistry*. A. R. Fernández-Alba Ed., Amsterdam, Países Bajos, Elsevier B.V.
- ANDREY, R.E. (2003). Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction. *Analytical Techniques in the Sciences (AnTS)*. Chichester, Inglaterra, John Wiley & Sons, Ltd.
- ANNESLEY, T.M. (2003). Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry* **49**, 1041-1044.
- AOAC 2007.01 (2007) Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate, *AOAC Official Method*.
- BAKER, D.R. & KASPRZYK-HORDERN, B. (2011). Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1218**, 8036-8059.
- BALLESTEROS-GÓMEZ, A. & RUBIO, S. (2011). Recent advances in environmental analysis. *Analytical Chemistry* **83**, 4579-4613.
- BARKER, S.A. (2000). Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal*.
- BARKER, S.A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 151-162.
- BARKER, S.A., LONG, A.R. & SHORT, C.R. (1989). Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography*. **475**: 353-361.
- BOYD, K., BASIC, C. & BERTHEM, R.A. (2008). Mass analyzers for quantitation: separation of ions by m/z values. *Trace quantitative analysis by mass spectrometry*. K. Boyd, Basic, C., Berthem, R.A. Ed., Chichester, Inglaterra, John Wiley and Sons Ltd.
- BUCHBERGER, W. (2011). Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *Journal of Chromatography A* **1218**, 603-618.
- CAHILL, J.D., FURLONG, E.T., BURKHARDT, M.R., KOLPIN, D. & ANDERSON, L.G. (2004). Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1041**, 171-180.
- CE/396/2005 (2005). European Commission (EC) Regulation No 396/2005. *Official Journal of the European Union* **L 70**, 1-34.
- CE/657/2002 (2002). Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Union* **L221**.
- CE/2008/105 (2008). Relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. *Official Journal of the European Union* **L**, 84-95.
- COTTER, R.J. (1997). Time of flight mass spectrometry. *Instrumentation and application in biological research*. Washington DC, EE.UU, American Chemical Society.
- DASS, C. (2007). Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. *Wiley Interscience Series on Mass Spectrometry*. New Jersey, EE.UU, John Wiley & Sons. Inc.
- DE KOK, A. & AGÜERA, A. (2005). GC-MS II: Applications for pesticide analysis in food. *Comprehensive Analytical Chemistry*. A. R. Fernández-Alba Ed., Amsterdam, Países Bajos, Elsevier B.V.
- DECRETO 253/79 (1979). Decreto 253/79 del Poder Ejecutivo de la Republica Oriental del Uruguay: Código de aguas.

- EN 15662:2008 (E) (2008) Foods of plant origin — Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE — QuEChERS-method. European Standard. European committee for standardization. Bruselas, Bélgica.
- EP (2008). Lanolin Monograph. *European Pharmacopeia 6th Ed.* C. o. Europe. Estrasburgo, Francia.
- ERNEY, D.R., GILLESPIE, A.M., GILVYDIS, D.M.& POOLE, C.F. (1993). Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with spitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *Journal of Chromatography* **638**, 57-63.
- EURL (2012). "European Union Reference Laboratories." consulta el 6 junio de 2012 disponible en: <http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/home.asp?LabID=500&Lang=EN>.
- FAO, ED. (1989). *International code of conduct on the distribution and use of pesticides*. Codex Alimentarius. Roma, Italia.
- FARRÉ, M., GROS, M., HERNÁNDEZ, B., PETROVIC, M., HANCOCK, P.& BARCELÓ, D. (2008). Analysis of biologically active compounds in water by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**, 41-51.
- FENN, J., MANN, M., MENG, C., WONG, S.& WHITEHOUSE, C. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71.
- FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., ED. (2005). *Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues*. Comprehensive Analytical Chemistry. Amsterdam, Países Bajos, Elsevier B.V.
- FERNÁNDEZ-ALBA, A.R.& GARCÍA-REYES, J.F. (2008). Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **27**, 973-990.
- FERREIRA DA SILVA, B., JELIC, A., LÓPEZ-SERNA, R., MOZETO, A.A., PETROVIC, M.& BARCELÓ, D. (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere* **85**, 1331-1339.
- FERRER, C., AGÜERA, A., MEZCUA, M., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., MACK, D., ANASTASSIADES, M.& GAMÓN, M. (2010). Efficiency evaluation of the main multiresidue methods used in europe for the analysis of amitraz and its major metabolites. *Journal of AOAC International* **93**, 380-388.
- FERRER, C., GÓMEZ, M.J., GARCÍA-REYES, J.F., FERRER, I., THURMAN, E.M.& FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2005). Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1069**, 183-194.
- FERRER, C., LOZANO, A., AGÜERA, A., GIRÓN, A.J.& FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2011). Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A* **1218**, 7634-7639.
- GARCÍA-REYES, J.F., HERNANDO, M.D., MOLINA-DÍAZ, A.& FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2007). Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **26**, 828-841.
- GILBERT-LÓPEZ, B., GARCIA-REYES, J.F.& MOLINA-DIAZ, A. (2009). Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta* **79**, 109-128.
- GÓMEZ, M.A.J., HERRERA, S., SOLÉ, D., GARCÍA-CALVO, E.& FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2011). Automatic searching and evaluation of priority and emerging contaminants in wastewater and river water by stir bar sorptive extraction followed by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **83**, 2638-2647.
- GÓMEZ, M.J., GÓMEZ-RAMOS, M.M., AGÜERA, A., MEZCUA, M., HERRERA, S.& FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2009). A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in waters. *Journal of Chromatography A* **1216**, 4071-4082.
- GÓMEZ, M.J., GOMEZ-RAMOS, M.M., MALATO, O., MEZCUA, M.& FERNANDEZ-ALBA, A.R. (2010). Rapid automated screening, identification and quantification of organic micro-contaminants and their main transformation products in wastewater and river waters using liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry with an accurate-mass database. *Journal of Chromatography A* **1217**, 7038-7054.
-

- GRIMALT, S. (2009). Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal. *Analytical Chemistry*. Castellón de la Plana, Universitat Jaume I de Castellón.
- GROS, M., PETROVIĆ, M. & BARCELÓ, D. (2006). Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* **70**, 678-690.
- HAIŠLOVÁ, 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.
- HEBERER, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters* **131**, 5-17.
- HENNION, M.C. (2000). Sample handling and trace analysis of pollutants: techniques, applications and quality assurance *Environmental analysis - techniques, applications and quality assurance*. D. Barceló Ed., Amsterdam, Países Bajos, Elsevier B.V.
- HERNÁNDEZ, F., SANCHO, J., IBÁÑEZ, M., ABAD, E., PORTOLÉS, T. & MATTIOLI, L. (2012). Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 1251-1264.
- HOFFMAN, E. & STROOBANT, V. (2007). Mass spectrometry: principles and application. Chichester, Inglaterra, John Wiley & Sons. Inc.
- HOLMES, J. & MORREL, F. (1957). Oscillographic mass spectrometric monitoring of gas chromatography. *Applied Spectroscopy* **11**, 86-87.
- IUPAC (2012). Mass resolution.
- JAMES, A.T. & MARTIN, A.J.P. (1951). Gas liquid partition chromatography: a technique for the analysis of volatile material. *The Analyst* **77**, 915-932.
- KASPRZYK-HORDERN, B., DINSDALE, R.M. & GUWY, A.J. (2007). Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1161**, 132-145.
- KAUFMANN, A. (2012). The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 1233-1249.
- KAUFMANN, A., BUTCHER, P., MADEN, K., WALKER, S. & WIDMER, M. (2011). Semi-targeted residue screening in complex matrices with liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: current possibilities and limitations. *The Analyst* **136**, 1898-1909.
- KEBARLE, P. (2000). A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 804-817.
- KING, R., BONFIGLIO, R., FERNÁNDEZ-METZLER, C., MILLER-STEIN, C. & OLAH, T. (2000). Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **11**, 942-950.
- KMELLAR, B., FODOR, P., PAREJA, L., FERRER, C., MARTINEZ-UROZ, M.A., VALVERDE, A. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2008). Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1215**, 37-50.
- KRISTENSON, E.M., RAMOS, L. & BRINKMAN, U.A.T. (2006). Recent advances in matrix solid phase dispersion. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **96**, 96-111.
- LACORTE, S. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2006). Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrometry Reviews* **25**, 866-880.
- LAMBROPOULOU, D.A. & ALBANIS, T.A. (2007). Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 1663–1683.
- LEHOTAY, S.J. (2007). Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. *Journal of AOAC International* **90**, 485-520.
- LEHOTAY, S.J. (2011). QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods. **747**: 65-91.
-

- LEHOTAY, S.J., MASTOVSKA, K., AMIRAV, A., FIALKOV, A.B., ALON, T., MARTOS, P.A., DE KOK, A. & FERNANDEZ-ALBA, A.R. (2008). Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatography-mass spectrometry and other techniques. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **27**, 1070-1090.
- LEHOTAY, S.J., MASTOVSKA, K. & LIGHTFIELD, A.R. (2005a). Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International* **88**, 615-629.
- LEHOTAY, S.J., MASTOVSKA, K. & YUN, S.J. (2005b). Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *Journal of AOAC International* **88**, 630-638.
- LUKE, M.A., FROBERG, J.E. & MASUMOTO, H.T. (1975). Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **58**, 1020-1026.
- MALATO, O., LOZANO, A., MEZCUA, M., AGÜERA, A. & FERNANDEZ-ALBA, A.R. (2011). Benefits and pitfalls of the application of screening methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A* **1218**, 7615-7626.
- MALIK, A.K., BLASCO, C. & PICÓ, Y. (2010). Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *Journal of Chromatography A* **1217**, 4018-4040.
- MARTÍNEZ BUENO, M.J., UCLÉS, S., HERNANDO, M.D. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2011). Development of a solvent-free method for the simultaneous identification/quantification of drugs of abuse and their metabolites in environmental water by LC-MS/MS. *Talanta* **85**, 157-166.
- MASSDEP. (2012) Massachusetts Department of Environmental Protection, Emerging contaminants fact sheet & overview, consulta 13 de setiembre de 2012, disponible en <http://www.mass.gov/dep/toxics/stypes/emercfs.htm>
- MASTOVSKA, 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.
- MCNEAR, H.N. & MILLER, J.N. (1998). Basic gas chromatography. *Techniques in Analytical Chemistry*. Canadá, Jhon Wiley and Sons, Inc.
- MEDINA-PASTOR, P., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., RODRIGUEZ-TORREBLANCA, C. & ANDERSSON, A. (2010). European Commission proficiency tests for pesticide residues in fruits and vegetables. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* **29**, 70-83.
- MILLS, P.A., ONLEY, J.H. & GAITHER, R.A. (1963). Rapid method for chlorinated pesticide residues in non fatty foods *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **46**, 181-191.
- MOL, H., PLAZA-BOLAÑOS, P., ZOMER, P., DE RIJK, T.C., STOLKER, A.A.M. & MULDER, P.P.J. (2008). Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Analytical Chemistry* **80**, 9450-9459.
- MOL, H.G.J., ZOMER, P. & DE KONING, M. (2012). Qualitative aspects and validation of a screening method for pesticides in vegetables and fruits based on liquid chromatography coupled to full scan high resolution (Orbitrap) mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 2891-2908.
- MORENO-BONDI, M.C., MARAZUELA, M.D., HERRANZ, S. & RODRIGUEZ, E. (2009). An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **395**, 921-946.
- NIESSEN, W.M.A., ED. (2006). *Liquid chromatography - mass spectrometry*. Chromatographic sciences. Florida, EE.UU, CRC Press.
- OMS (2012). "Public health and environment (PHE)." consulta el 22 de agosto 2012, Organización Mundial de la Salud, disponible en: <http://www.who.int/phe/en/>.
- PAREJA, L., MARTÍNEZ-BUENO, M.J., CESIO, V., HEINZEN, H. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2011). Trace analysis of pesticides in paddy field water by direct injection using liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1218**, 4790-4798.
- PAYÁ, P., ANASTASSIADES, M., MACK, D., SIGALOVA, I., TASDELEN, B., OLIVA, J. & BARBA, A. (2007). Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 1697-1714
-

- PÉREZ, S.& BARCELÓ, D. (2007). Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **26**, 494-514.
- PETROVIC, M., FARRÉ, M., DE ALDA, M.L., PEREZ, S., POSTIGO, C., KÖCK, M., RADJENOVIC, J., GROS, M.& BARCELO, D. (2010). Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. *Journal of Chromatography A* **1217**, 4004-4017.
- PETROVIC, M., GROS, M.& BARCELO, D. (2006). Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1124**, 68-81.
- PICÓ, Y.& BARCELÓ, D. (2008). The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **27**, 821-835.
- PICÓ, Y., FARRÉ, M., SOLER, C.& BARCELÓ, D. (2007). Confirmation of fenthion metabolites in oranges by IT-MS and QqTOF-MS. *Analytical Chemistry* **79**, 9350-9363.
- PICÓ, Y., FARRÉ, M.L., SEGARRA, R.& BARCELÓ, D. (2010). Profiling of compounds and degradation products from the postharvest treatment of pears and apples by ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Talanta* **81**, 281-293.
- PICÓ, Y., FARRÉ, M.L., TOKMAN, N.& BARCELÓ, D. (2008). Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the quantification of amitraz and identification of its degradation products in fruits. *Journal of Chromatography A* **1203**, 36-46.
- 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.
- PITARCH, E., PORTOLÉS, T., MARÍN, J.M., IBÁÑEZ, M., ALBARRÁN, F.& HERNÁNDEZ, F. (2010). Analytical strategy based on the use of liquid chromatography and gas chromatography with triple-quadrupole and time-of-flight MS analyzers for investigating organic contaminants in wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397**, 2763-2776.
- POOLE, C.F. (2007). Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1158**, 241-250.
- RADJENOVIC, J., PETROVIC, M.& BARCELÓ, D. (2007). Advanced mass spectrometric methods applied to the study of fate and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **26**, 1132-1144.
- RAMIREZ GONZÁLEZ, N. (2011). Organic contaminants in environmental atmospheres and waters., Departament de Química Analítica i Química Orgànica Tarragona, España, Universidad Rovira I Virgili. Tesis doctoral.
- RICHARDSON, S.D. (2010). Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current Issues. *Analytical Chemistry* **82**, 4742-4774.
- RICHARDSON, S.D.& TERNES, T.A. (2011). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry* **83**, 4614-4648.
- SANCO (2011). Method validation & quality control procedures for pesticide residues analysis in food & feed. *Document N° SANCO/12495/2011*.
- SANCHO, J.V., POZO, Ó.J., IBÁÑEZ, M.& HERNÁNDEZ, F. (2006). Potential of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the determination of pesticides and transformation products in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**, 987-997.
- SCHÜRSMANN, A., DVORAK, V., CRÜZER, C., BUTCHER, P.& KAUFMANN, A. (2009). False-positive liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmation of sebutylazine residues using the identification points system according to EU directive 2002/657/EC due to a biogenic insecticide in tarragon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **23**, 1196-1200.
- SNYDER, L.R., KIRCKLAND, J.J.& DOLAN, J.W., Eds. (2010). *Introduction to modern liquid chromatography*. New Jersey, EE.UU, John Wiley and Sons, Inc.
- SOLER, C., HAMILTON, B., FUREY, A., JAMES, K.J., MAÑES, J.& PICÓ, Y. (2007). Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry analysis of carbosulfan, carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, and other metabolites in food. *Analytical Chemistry* **79**, 1492-1501.
- 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.
-

- TADEO, J.L., ED. (2008). *Analysis of pesticides in food and environmental samples*. Florida, EE.UU, CRC Press.
- USDA (2012). "MRLs Database." US Department of Agriculture, consulta el 22 de agosto de 2012 disponible en: <http://www.mrlatabase.com/>.
- USEPA (2007). Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS
- USEPA (2008). National guidelines for superfund organic methods data review. Document USEPA 540-R-08-01.
- USEPA (2009). Method 524-3: Measurement of purgeable organic compounds in water by capillary column gas chromatography/mass spectrometry
- USEPA (2010). Method 539: Determination of hormones in drinking water by solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)
- USEPA (2012). "CCL and Regulatory Determinations Home." Environmental Protection Agency, consulta el 20 de agosto de 2012 disponible en: <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/index.cfm>.
- USP (2007). Lanolin Monograph. *USP 30-NF25* Rockville, MD, The United States Pharmacopoeia Convention Inc.
- WELLS, G., PREST, H. & RUSS C.W. Signal, noise and detection limits in mass spectrometry Agilent Technologies technical note, consulta 13 de setiembre de 2012, disponible en <http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews>
- WILKOWSKA, A. & BIZIUK, M. (2011). Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry* **125**, 803-812.
-

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollo de procesos analíticos para la determinación de compuestos orgánicos, presentes en matrices de relevancia sanitaria y ambiental a niveles de trazas.

Objetivos específicos

- Desarrollo y aplicación de métodos multirresiduales de preparación de muestra para la determinación de pesticidas por GC-FPD/ECD y GC-MS en materias primas farmacéuticas de relevancia para la industria uruguaya (lanolina y extractos de propóleos).
 - Determinación multirresiduo de pesticidas en infusiones de yerba mate por GC-FPD/ECD. Estudio de la transferencia de los pesticidas a la infusión en relación a sus propiedades fisicoquímicas y vinculación con parámetros toxicológicos recomendados por la OMS.
 - Determinación de hormonas vegetales (ácido 1-naftilacético y 2-(1-naftilacetamida) por tres métodos multirresiduo típicos en alimentos por LC-QqQ-MS/MS y LC-QTOF-MS.
 - Determinación de contaminantes emergentes por GC-MS en efluentes de planta de pretratamiento de Montevideo, Uruguay y evaluación preliminar de datos.
 - Elucidación de los productos de transformación de amoxicilina en aguas residuales por LC-QTOF-MS/MS y propuesta de una ruta de transformación ambiental.
 - Elaboración de una base de datos de masa exacta por LC-QTOF-MS/MS para 92 contaminantes emergentes.
 - Exploración de capacidades analíticas de instrumentos LC-MS/MS (LC-QTOF y LC-QLIT) y puesta a punto de estrategias de identificación y confirmación de contaminantes emergentes en aguas residuales y superficiales.
-

CAPITULO 1: Determinación de contaminantes orgánicos en
materias primas farmacéuticas de origen natural

1.1 Antecedentes y consideraciones preliminares

Una materia prima farmacéutica es una sustancia activa o inactiva utilizada en el proceso de fabricación de una forma farmacéutica. De acuerdo con su función en el medicamento, pueden clasificarse en dos grupos: a) ingredientes activos con actividad farmacológica, y b) excipientes que permiten la dosificación del ingrediente activo y su idoneidad para la vía de administración (de la Rosa *et al.* 1995).

A pesar de la gran cantidad de productos farmacéuticos producidos sintéticamente y los progresos en biotecnología e ingeniería genética, existe aún un número importante de materias primas de origen natural, que se utilizan para la fabricación de productos farmacéuticos. El uso de materias primas de buena calidad es un requisito obligatorio para llevar a cabo las "buenas prácticas de elaboración" de la industria farmacéutica. Hoy en día, la presencia de pesticidas en diferentes matrices de origen animal y vegetal es de interés público debido a los peligros potenciales para la salud de los consumidores (OMS 1998). La presencia de residuos de pesticidas en materias primas se puede deber a las prácticas agrícolas, la contaminación ambiental o también contaminación cruzada. Los requisitos sobre el número de contaminantes traza a ser controlados crece continuamente a la vez que los niveles en los que estos compuestos deben ser determinados son cada vez más exigentes. Los métodos MRM suelen ser la estrategia preferida para determinación de trazas orgánicas.

Muchos procedimientos MRM empleados en el control de materias primas farmacéuticas, utilizan diferentes técnicas de extracción y purificación, así como una variedad de sistemas de detección.

Los métodos analíticos más importantes para controlar los contaminantes en materias primas destinados a ser utilizados en preparados farmacéuticos son descritos en las Farmacopeas de los Estados Unidos y Europa (USP 2007a; EP 2008a). Muchas hierbas y especias de interés están incluidas en estos documentos, aunque no representan el estado del arte actual de las técnicas analíticas ni los requerimientos de los mercados, principalmente porque están direccionadas hacia contaminantes obsoletos utilizando técnicas desactualizadas e inadecuadas para algunos propósitos. La amplia gama de pesticidas utilizados en la actualidad y la gran variedad de bienes de consumo, han obligado al desarrollo de nuevos métodos, debido a la dificultad de cubrir todos los analitos y todas las matrices por los métodos oficiales. La tendencia actual es la utilización de pesticidas más polares, no halogenados, menos persistentes e inestables en el medio ambiente, lo que ha conducido a un cambio en el concepto de las características analíticas y de los sistemas de detección requeridos para su análisis.

Los ensayos de residuos de pesticidas en materias primas farmacéuticas tal como se encuentran descritos en las monografías oficiales de farmacopeas (USP 2007b, EP 2008b), se basan en una extracción preliminar con solventes orgánicos, seguido por una cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía de permeación en gel (GPC). La EP describe además un paso posterior que incluye una SPE sobre alúmina previamente a su determinación cuantitativa por GC con detectores selectivos (ECD, FPD, nitrógeno y fósforo (NPD) y conductividad térmica (TCD)).

Estos procedimientos se destacan por ser robustos y se diferencian levemente en algunas condiciones experimentales.

A pesar de los avances en sistemas de detección, la etapa de preparación de la muestra sigue siendo una etapa crucial en el análisis de residuos de pesticidas en productos naturales. Un valioso indicador de los avances en este escenario, puede ser visto en la determinación de pesticidas en plantas de uso medicinal expuesta en una revisión bibliográfica de hace poco más de diez años (Zuin y Vilegas 2000) en comparación con una exposición reciente de los últimos avances relativos a preparación de muestras por protocolos miniaturizados utilizando sofisticados sistemas de detección de MS y MS/MS (Wong *et al.* 2010a; Wong *et al.* 2010b).

Los métodos de análisis “adecuados para el fin”, basan su diseño en el conocimiento de la composición de la matriz, las propiedades fisicoquímicas de los analitos de interés, así como la naturaleza química de los interferentes procedentes de las propias matrices a analizar y/o la instrumentación disponible.

El tratamiento de muestra aplicado depende en gran medida en la complejidad de la matriz, algo que va en contraposición con los métodos oficiales que son sumamente genéricos. Las metodologías modernas de tratamiento de muestras para alimentos, básicamente clasifican las matrices en función del contenido en agua, azúcar, acidez o contenido graso (SANCO 2011). Del mismo modo, diferentes matrices de productos naturales se pueden agrupar en función de su contenido de agua (bajo o alto, tal como hierbas secas y frescas), contenido en cera (lanolina, cera de abejas y propóleos bruto) y el contenido de polifenoles (propóleos). Esta categorización es útil porque las estrategias de extracción y remoción de interferentes aplicadas a alimentos son de naturaleza similar y pueden ser extrapoladas a estas matrices. Así mismo, la selección de la metodología de

preparación de muestra está directamente relacionada con el método de detección disponible en el laboratorio.

En general, la capacidad selectiva del detector condiciona la metodología de tratamiento de muestra. El detector ECD requiere exhaustivas etapas de purificación de los extractos, siendo a menudo necesario más de una etapa de para eliminar interferentes indeseados de la matriz, tales como pigmentos (clorofilas, polifenoles y carotenoides) y ceras, de forma de incrementar la sensibilidad analítica, la especificidad de señal y la confiabilidad de los resultados junto con un aumento de vida útil de la instrumentación. Por esta razón, las metodologías de tratamiento de muestra de amplio alcance utilizan estrategias genéricas o poco específicas de extracción a expensas de un detrimento en sensibilidad y selectividad que busca ser compensada con el mejor detector disponible.

El enfoque clásico en el que se describen las metodologías oficiales es inviable a esta aproximación y falla principalmente en los fines confirmativos de los residuos. Esto es debido a que las farmacopeas aun no han introducido en sus monografías los sistemas MS como detectores de referencia para análisis de residuos de pesticidas al contrario de las reglamentaciones para el control de alimentos (SANCO 2011) y muestras ambientales (CE/657 2002).

La realidad actual y la tendencia de gran parte de los laboratorios ambientales y de alimentos en el mundo es el empleo de equipos GC-MS y LC-MS, que poseen mayor versatilidad analítica. Muchos agroquímicos modernos suelen ser analitos problemáticos para la etapa de preparación de muestra o la determinación, además de que no siempre están incluidos en la lista de sustancias a ser controladas, aunque resulta de interés establecer su ocurrencia desde un punto de vista sanitario y comercial.

Las nuevas tendencias en el análisis de residuos de pesticidas se han enfocado en la miniaturización de las metodologías de preparación de muestra, hacia procedimientos más sencillos, rápidos, rentables y/o respetuosos con el medio ambiente. Incluso con la llegada de instrumentos MS y MS/MS; el conocimiento total de la contribución de los pesticidas en productos de uso farmacéutico, aun no se ha desarrollado tanto, en comparación con lo ocurrido para el control de alimentos y muestras ambientales. Esto hace que el desarrollo de nuevos métodos en el análisis de residuos de contaminantes orgánicos en materias primas farmacéuticas, sea en la actualidad un tema abierto y desafiante para los años venideros (véase ANEXO 1).¹

Este capítulo aborda el desarrollo de dos nuevos métodos o para la determinación de residuos de pesticidas en lanolina y extractos de propóleos empleando la técnica MSPD como estrategia de preparación de muestra con determinación por GC-FPD/ECD y GC-MS.

¹ Pesticide residues in natural products with pharmaceutical use: occurrence, analytical advances and perspectives

Pérez-Parada A Colazzo M., Besil N., Dellacassa E., Cesio M.V., Heinzen H. and Fernández-Alba A.R. (2011). *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*, Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-437-5.

1.2 Determinación multirresiduo de pesticidas en lanolina por Dispersión de Matriz en Fase Solida (MSPD) y GC-FPD / GC-MS

1.2.1. Introducción

La lanolina es una mezcla compleja de ésteres de alto peso molecular de ácidos grasos con alcoholes grasos, esteroides, alcoholes triterpénicos; diésteres, pequeñas cantidades de alcoholes y dioles de cadena larga, ácidos grasos de cadena larga e hidroxiácidos, secretados por las glándulas sebáceas de las ovejas. La lanolina se obtiene a través del procesamiento de la grasa de lana por medio de una purificación (Jover *et al.* 2002; Margenat *et al.* 2008).

La lanolina es ampliamente utilizada en productos de cuidado personal, en formulaciones cosméticas y farmacéuticas, debido a su alta compatibilidad con la grasa de la piel humana, debido a de sus propiedades surfactantes, emulsionantes y absorbente de agua. Para evitar los daños producidos por ectoparásitos, las ovejas y las lanas almacenadas, son tratadas con pesticidas organoclorados (OCs), organofosforados (OPs) y piretroides sintéticos. Debido a su naturaleza lipofílica, los pesticidas se acumulan y persisten en la grasa de lana (Heikes y Craun 1992; Jones 1996).

Los residuos de pesticidas en la lanolina son estrictamente controlados para establecer el precio, calidad y seguridad de la materia prima y por lo tanto, la EP y la USP han establecido límites máximos de residuos (LMRs) individuales y totales (USP 2007a; EP 2008b). La lanolina calidad USP adopta un máximo total de residuos sumados de 10 mg/kg (USP 2007b) mientras que la lanolina calidad EP es

de por sí más estricta, adoptando un máximo total de residuos sumados de 1 mg/kg con ausencia (<0,01 mg/kg) de OCs (EP 2008b).

En la literatura, están publicadas varias estrategias de análisis de lanolina y grasa de lana. Ha sido reportada la partición liquido-liquido de lanolina entre *n*-hexano y acetonitrilo (MeCN) con posterior purificación por SPE empleando Florisil (Miyahara *et al.* 1992), co-destilación por barrido (USP 1990) y extracción por fluido supercrítico (Margenat *et al.* 2008). Merece una mención especial la dispersión de lanolina en tierra de diatomeas, con posterior elución con MeCN, seguido por dos sucesivas etapas de purificación en columnas de C₁₈ y Florisil (Diserens 1989), así como la dispersión sobre Celite y posterior SPE en sílica gel en condiciones optimizadas para determinar los OCs en lanolina etoxilada (Polese *et al.* 2000). Sin embargo, el método de tratamiento de muestra comúnmente utilizado para la determinación de residuos de pesticidas en lanolina es por GPC (Jones 1996; López-Mesas *et al.* 2000; Jover y Bayona 2002; USP 2007b; EP 2008b), con la variante de un posterior tratamiento con SPE de alúmina (Jones 1996; EP 2008b) y posterior análisis por GC. Aunque esta metodología es robusta, los procedimientos de GPC implican varias etapas de preparación de muestra, tienen menor rendimiento de muestras en unidad de tiempo y requieren grandes cantidades de disolventes organoclorados. En el sentido de las características requeridas para los métodos analíticos modernos y en las demandas apremiantes de los laboratorios de rutina (Kristenson *et al.* 2006), el presente trabajo se enmarca en la miniaturización de una metodología analítica basada en la estrategia MSPD. La MSPD lleva a cabo simultáneamente la homogenización de la muestra, la extracción y purificación utilizando un pequeño tamaño de muestra, bajo consumo de disolventes con una mínima cantidad de fase sólida (Kristenson *et al.* 2006;

Barker 2007; García-López *et al.* 2008). Se ha demostrado que esta estrategia es aplicable al análisis de residuos de pesticidas en matrices de alto contenido graso tal como el aceite de oliva virgen (Ferrer *et al.* 2005; García-Reyes *et al.* 2007).

El presente trabajo se centra en el desarrollo y evaluación de una metodología MRM, sencilla, rápida y barata para el análisis de residuos de pesticidas en lanolina, utilizando MSPD como tratamiento de muestra seguido por GC-ECD/FPD con una posterior confirmación de los residuos por GC-MS. Se demuestran un alcance y desempeño analítico similares a los obtenidos por los métodos oficiales que figuran en el EP y la USP.

1.2.2 Materiales y métodos: artículo científico N°1 (ANEXO 2)²

² Multiresidue determination of pesticides in lanolin using matrix solid-phase dispersion

Pérez A., González G., González J., Heinzen H.

Journal of AOAC International (2010) 93, 712-719.

1.2.3 Resultados y Discusión

1.2.3.1 Evaluación del método de extracción y purificación

En esta metodología, la selección de las condiciones experimentales es crítica con el fin de realizar una extracción selectiva y purificación de los extractos. La lanolina se destaca por ser una matriz oleosa con bajo contenido en agua (0,25% (USP 2007a)) y alta afinidad para OPs, OCs y piretroides. Además posee una baja solubilidad en solventes polares como MeOH y MeCN (Jones 1997). Las fases dispersantes polares tales como Florisil, sílica gel o alúmina neutra no fueron adecuadas además de que la partición entre los pesticidas y la lanolina no se puede realizar adecuadamente. Para la etapa de elución, la utilización de disolventes apolares como *n*-hexano, CH₂Cl₂ o acetato de etilo, ya sean solos o en diferentes mezclas, es inviable por la alta solubilidad de lanolina en estos, produciendo una alta coextracción de la matriz. Por este motivo se ensayo una estrategia de remoción en fase reversa, mediante el uso de una fase solida dispersante con alta afinidad por la matriz y un eluyente polar, con baja solubilidad en esta.

La fase solida C₁₈ ha sido ampliamente utilizada en el análisis de residuos de pesticidas para la purificación de muestras grasas, debido a su alta afinidad por lípidos neutros (Lehotay *et al.* 2005; Garrido Frenich *et al.* 2007). Los pesticidas pueden ser extraídos mediante la elución con un solvente adecuado. La C₁₈ mostro ser una fase dispersante adecuada para una solución de lanolina en hexano. El material cosorbente seleccionado fue alúmina neutra debido a que remueve eficazmente lípidos polares coextraídos y peróxidos de esteres de esteroides producidos durante el autooxidación de la muestra, proporcionando una reducción adicional del interferencias de fondo en los cromatogramas (Jones 1996; EP 2008b).

En la Figura 25 se esquematiza la metodología realizada. El ajuste de las condiciones de MSPD se basó en la mejor relación de fase dispersante/muestra encontrada, siendo esta de 0,1 g de equivalentes de muestra / g C₁₈. Proporciones mayores de lanolina/C₁₈ dieron mezclas difíciles de manejar y probablemente saturadas en lanolina.

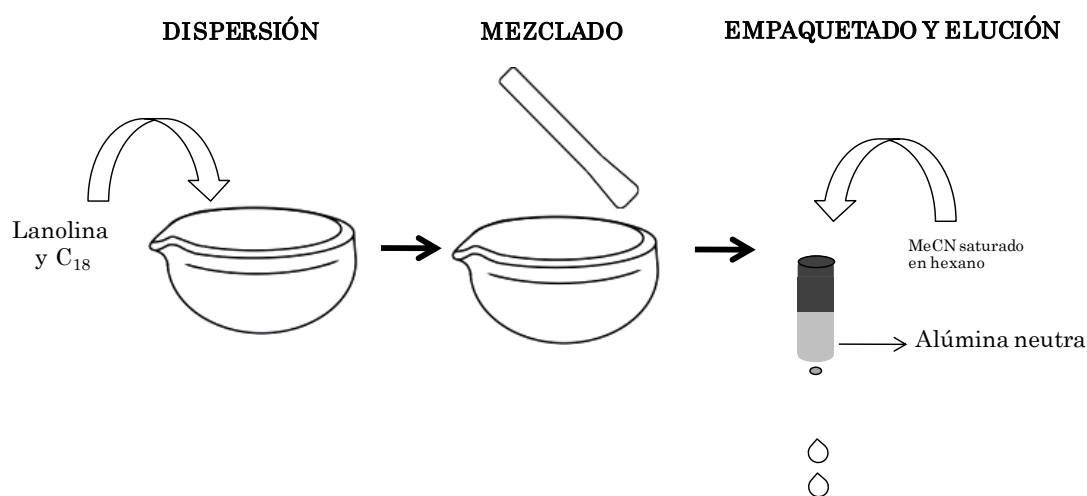


Figura 25: Procedimiento esquemático de MSPD para residuos de pesticidas en lanolina.

Durante la dispersión y el mezclado en mortero, ocurre la evaporación total del solvente. Posteriormente el material se empaqueta en forma seca en el cartucho ya conteniendo cosorbente, se realiza un prensado con un embolo y se pasa directamente a la elución. La selección del tipo y volumen de solvente de elución se llevó a cabo realizando estudios de recuperación preliminares con algunos pesticidas comúnmente utilizados en tratamientos sanitarios de ovejas (diazinon, pirimifos-metil, clorpirifos, etion y cipermetrina) a una concentración de 1 µg/g (Jones 1996).

Estos pesticidas cubren una amplia gama de rangos de polaridad y presiones de vapor, lo que permite estimar una evaluación efectiva del desempeño del método. La elución fue realizada inicialmente con porciones de 5 mL a 8 mL de MeCN, produciendo recuperaciones en el último caso, del entorno de 80% a excepción de cipermetrina. Empleando MeCN como solvente de elución, se observó que muy poco material lipídico fue coeluido, aunque las recuperaciones aun fueron bajas. Se busco incrementar el poder de elución del solvente con el fin de optimizar las recuperaciones. La mezcla MeCN -*n*-hexano (95:5) dio buenas a excelentes recuperaciones para estos pesticidas en el rango de 83 a 101% con DSRs por debajo del 10,7% (véase Figura 26) sin comprometer la coelución de matriz.

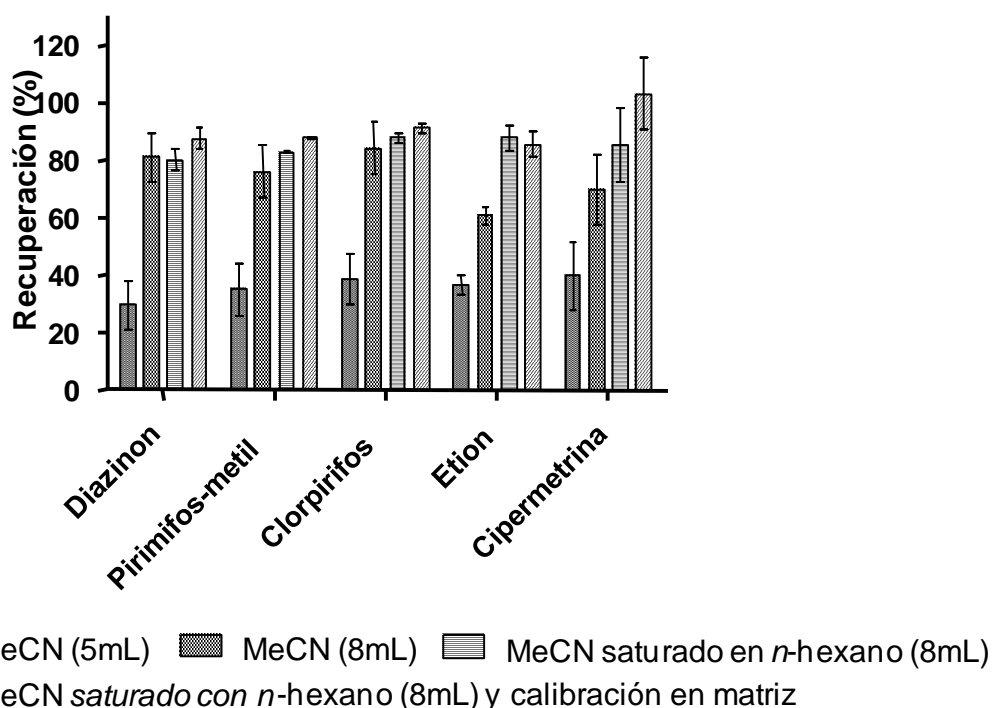


Figura 26: Ensayos preliminares de recuperaciones en función del solvente de elución.

1.2.3.2 Validación del método

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de ensayo se procedió a la validación del método. Los extractos obtenidos fueron sometidos a análisis cuantitativo por un GC-ECD/FPD dual (véanse Tabla 2 y Tabla 3). El análisis por GC-MS fue utilizado únicamente para propósitos de confirmación de residuos en muestras problema. Todos los pesticidas incluidos en este estudio mostraron una relación lineal ($r^2 > 0,99$) respecto al estándar interno bromofos-metil en el rango de concentraciones ensayado en los estudios de recuperación (0,05 a 1 mg/kg) y superiores (rango dinámico ensayado: LOQ - 5 mg/kg).

Nº	Pesticida	T _R (min)	T _{R,R}	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
1	Diazinon	8,02	0,759	0,005	0,015
2	Propetamfos	8,21	0,777	0,009	0,030
3	Diclofention	8,94	0,846	0,010	0,033
4	Fenclorfos	9,49	0,898	0,012	0,039
5	Pirimifos-metil	9,69	0,917	0,005	0,015
6	Clorpirifos	10,11	0,956	0,007	0,025
7	Bromofos-metil (IS)	10,57	1,000	-	-
8	Clorfenvinfos	11,19	1,059	0,020	0,07
9	Etion	13,15	1,244	0,004	0,015

Tabla 2. Tiempos de retención (T_R) tiempos de retención relativos (T_{RR}), límites de detección y cuantificación (LODs y LOQs) de los pesticidas analizados por GC-FPD.

Los factores de respuesta se calcularon utilizando calibraciones en matriz y en solvente (SANCO 2011). Los LODs se determinaron utilizando el método gráfico para una relación señal-ruido (S/N) de 3 para cada pesticida, mientras que los LOQs se obtuvieron a una S/N de 10 en las condiciones descritas anteriormente.

Los LODs obtenidos con el método propuesto, fueron levemente inferiores a los obtenidos previamente por otros autores (Jones 1996; Jover y Bayona 2002) y cumplen con los LMRs establecidos en las monografías oficiales (USP 2007b; EP 2008b). Los cromatogramas FPD y ECD no mostraron interferencias de señal. La Tabla 4 muestra los resultados del estudio de recuperación de los pesticidas seleccionados a dos niveles de fortificación estudiados. Los resultados, en general están dentro del rango aceptado para métodos cuantitativos de residuos de pesticidas en alimentos de 70-120% de recuperación y DSR (%) menores a 20% (SANCO 2011). El método MSPD muestra exactitud y precisión aceptable, con recuperaciones individuales de los pesticidas desde 82,8 a 117,7% para todos los pesticidas a excepción de *p,p'*-DDD, cuya recuperación fue de 135,4 a 139,1% en las concentraciones ensayadas. En cuanto a la precisión, los valores de DSR variaron entre 1,7 y 20,1% en el caso más desfavorable. El análisis por GC-FPD muestra mayor especificidad del detector que el obtenido por GC-ECD evidenciado además por los valores de DSR menores. En tanto, la Tabla 5 muestra los iones buscados y sus ventanas de tiempos por SIM-GC-MS para confirmación de los residuos.

N°	Pesticida	T _R (min)	T _{R,R}	LOD (mg/kgmg/k)	LOQ (mg/kgmg/k)
10	α -HCH	12,43	0,659	0,003	0,010
11	γ -HCH (lindano)	13,66	0,725	0,003	0,010
12	δ -HCH	14,73	0,781	0,003	0,012
13	Aldrin	17,82	0,945	0,002	0,007
14	Bromofos-metil (<i>IS</i>)	18,85	1,000	-	-
15	α -Endosulfan	21,86	1,160	0,010	0,033
16	Dieldrin	23,97	1,272	0,003	0,010
17	<i>p,p'</i> -DDE	24,8	1,316	0,005	0,017
18	β -Endosulfan	26,89	1,427	0,020	0,067
19	<i>p,p'</i> -DDD	29,27	1,553	0,005	0,017
20	<i>p,p'</i> -DDT	33,53	1,779	0,011	0,037
21	λ -Cihalotrina I	38,74	2,055	0,015	0,050
22	λ -Cihalotrina II	39,06	2,072	-	-
23	Cipermetrina I	41,21	2,186	0,025	0,083
24	Cipermetrina II	41,24	2,188	-	-
25	Cipermetrina III (<i>a</i>)	41,39	2,196	-	-
26	Cipermetrina IV	41,47	2,200	-	-
27	Fenvalerato I	42,35	2,247	0,022	0,074
28	Fenvalerato II	42,61	2,260	-	-
29	Deltametrina I	42,99	2,281	0,020	0,067
30	Deltametrina II	43,24	2,294	-	-

Tabla 3: Tiempos de retención (T_R) tiempos de retención relativos (T_{RR}), limites de detección y cuantificación (LODs y LOQs) de los pesticidas analizados por GC-ECD.

1.2.3.3 Desempeño obtenido en comparación con los métodos oficiales

Como ya se comentó, existen algunos inconvenientes relacionados con las metodologías oficiales de análisis de lanolina, debido principalmente al consumo de grandes cantidades de solventes orgánicos, el tiempo requerido en la etapa de evaporación y la gestión apropiada de los residuos de solventes organoclorados. Por otro lado, es conocida la dificultad del tiempo de colección de fracciones en un sistema GPC, debido al compromiso establecido entre las recuperaciones de los pesticidas y la cantidad residual de matriz (Jover y Bayona 2002; Ferrer *et al.* 2005).

Es de destacar que los piretroides sintéticos y esteroides libres de la lanolina (sobre todo el colesterol y alcoholes triterpénicos como lanosterol) tienen similares pesos moleculares ($350 < PM < 500$) resultando entonces en un efecto de superposición de fracciones por GPC, lo que supone una separación ineficiente de este grupo de analitos con la fracción alcohólica de la matriz (Jones 1996).

Sumado a eso, los métodos de farmacopea no consideran uno de los mayores desafíos de control de exactitud en las determinaciones por GC como lo es el efecto matriz (EM) (Anastassiades *et al.* 2003; Mastovska *et al.* 2005). En este trabajo se empleó calibración en matriz como estrategia cuantitativa lo que es de suponer tendería a mejorar la exactitud presentada.

El método MSPD ofrece otras mejoras para superar algunos inconvenientes con en el flujo de muestras, ya que es una metodología rápida (10-15 minutos por muestra) con bajo consumo de reactivos, mínima generación de residuos, proporcionando mayor flexibilidad para trabajar. Sin embargo, la falta de automatización en la etapa de dispersión es su principal desventaja.

Pesticida	Recuperaciones (%DSR ^a)		
	0,05 (mg/kg)	0,1 (mg/kg)	1,0 (mg/kg)
Diazinon	-	87,9 (3,7)	82,8 (4,2)
Propetamfos	-	85,0 (7,3)	84,7 (12,0)
Diclofention	-	91,0 (3,1)	88,8 (5,5)
Fenclorfos	-	91,8 (6,4)	94,5 (2,5)
Pirimifos-metil	-	88,2 (0,5)	87,3 (1,8)
Clorpirifos	-	91,7 (1,7)	86,9 (3,6)
Clorfenvinfos	-	94,3 (4,2)	87,7 (8,2)
Etion	-	85,8 (4,5)	88,4 (1,5)
α -HCH	102,1 (20,1)	95,7 (11,3)	-
γ -HCH (lindano)	102,7 (15,4)	111,1 (10,6)	-
δ -HCH	107,5 (10,4)	91,5 (11,4)	-
Aldrin	105,7 (19,1)	105,0 (13,1)	-
(α + β) Endosulfan	86,9 (11,0)	92,4 (11,6)	-
Dieldrin	105,0 (7,3)	112,4 (10,9)	-
<i>p,p'</i> -DDE	107,1 (14,7)	91,9 (12,2)	-
<i>p,p'</i> -DDD	139,1 (19,0)	135,4 (10,8)	-
<i>p,p'</i> -DDT	109,7 (15,3)	117,7 (12,3)	-
λ -Cihalotrina	-	92,4 (15,4)	88,1(12,5)
Cipermetrina	-	103,6 (12,7)	101,7 (10,1)
Fenvalerato	-	91,9 (16,4)	112,9 (8,2)
Deltametrina	-	102,5 (9,6)	108,8 (11,3)

Tabla 4. Promedio de recuperaciones y DSRs (%) del método propuesto en lanolina.

La cantidad de coextractivos de lanolina obtenidos por GPC y MSPD, son comparables gravimétricamente (7 y 10 mg, respectivamente). El colesterol es el principal componente del residuo alcohólico libre de lanolina en ambos casos. El método por MSPD desarrollado muestra menores cantidades de alcoholes de cadena larga, esteroides, derivados de esteroides y alcoholes triterpénicos como se ve por el cromatograma de iones totales (TIC) obtenido por GC-MS (véase Figura 27).

Sin embargo se ve comparativamente aumentada la cantidad de ésteres de esteroides a tiempos de retención superiores en los cromatogramas GC-ECD.

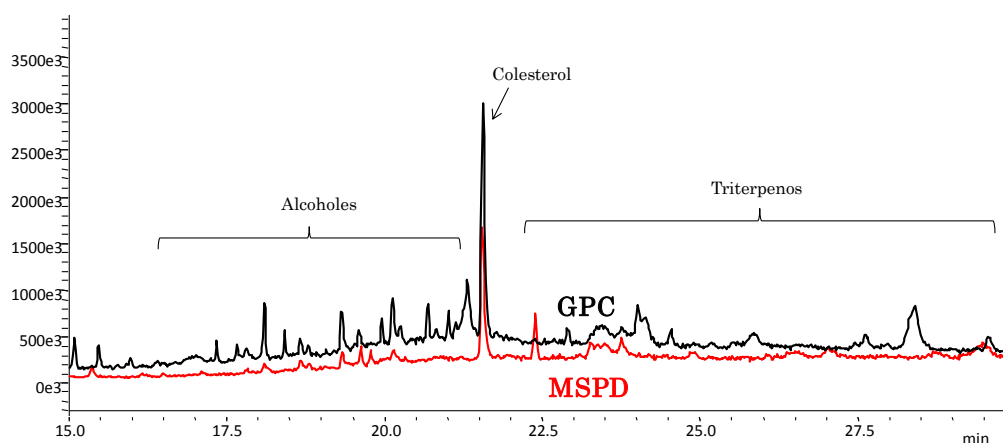


Figura 27. Cromatograma GC-MS (TIC) comparando el residuo de matriz alcohólica de lanolina.

Tres muestras reales fueron analizadas por ambos métodos obteniéndose resultados significativamente diferentes para residuos de cipermetrina en dos de ellas (test *t* de Student, $p < 0,05$). Se sugiere la existencia de subestimación de residuos por el método GPC ya que no evalúa la incidencia del EM en la cuantificación (USP 2007) al contrario del método MSPD propuesto. Este efecto, demostró tener incidencia directa en el valor observado del factor de respuesta para cuantificación por estándar interno, motivo por el cual se cree que afecta la exactitud de los resultados.

	Pesticida	PM	<i>m/z</i>	Ventana de tiempos
1	α -HCH	288	121,181,219	
2	γ -HCH (lindano)	288	146,181,219,253	12,2-13,8
3	Propetamfos	281	138,194,222,236	
4	Diazinon	304	179,276,304	
5	δ -HCH	288	181,219,207,254	14,0-15,0
6	Diclofention	314	223,251,279	
7	Fenclorfos	320	125,285,289	15,3-16,6
8	Pirimifos-metil	305	276,290,305	
9	Aldrin	362	66,91,101,263,293	
10	Clorpirifos	349	125,197,286,314	
11	Bromofos-metil (<i>IS</i>)	364	125,329,331	16,8-19,2
12	Clorfenvinfos	358	267,295,323	
13	α -Endosulfan	404	195,207,241,267	19,9-22,0
14	Dieldrin	378	79,263,279,345	
15	<i>p,p'</i> -DDE	316	246,318,176	23,5-25,0
16	β -Endosulfan	404	195, 207,241,269	
17	<i>p,p'</i> -DDD	313	165,200,235,237	
18	Etion	384	125,153,231,384	
19	<i>p,p'</i> -DDT	352	75,165,199,235	26,0-34,0
20	λ -Cihalotrina	449	161,181,197,208	
21	Cipermetrina	415	127,163,181,209	37,5-41,5
22	Fenvalerato	419	125,167,181,225	
23	Deltametrina	503	172,181,208,253	42,0-43,5

Tabla 5. Programa de confirmación de residuos por GC-MS (modo SIM).

1.2.4 Conclusiones

Se muestra la viabilidad de la técnica MSPD como estrategia de tratamiento de muestra para la determinación de residuos de pesticidas en una matriz de alto contenido graso como la lanolina. La estrategia de análisis posee un desempeño analítico similar a los métodos oficiales. En esta metodología, las etapas de extracción de los residuos y purificación del extracto, son realizadas simultáneamente. No se requiere instrumentación sofisticada de laboratorio, ni solventes organoclorados (diclorometano) como en las metodologías oficiales, reduciéndose 20 veces el consumo total de solventes con un tiempo total de manipulación que puede llevarse a cabo en 10-15 minutos. De esta forma se postula que este método podría ser útil en el análisis de rutina.

1.3 Determinación de pesticidas en propóleos por Dispersión de Matriz en Fase Solida (MSPD) y GC-FPD / GC-MS

1.3.1. Introducción

El propóleo es un subproducto natural de la apicultura, valorado debido a sus reportadas propiedades antibacteriana, antiviral, fungicida, anti-inflamatoria y anticancerosa, por lo que se lo utiliza ampliamente en las industrias farmacéutica y de alimentos. Son ampliamente conocidas las preparaciones farmacéuticas conteniendo propóleos para aplicaciones dérmicas, aunque hoy en día es cada vez más utilizado como alimento o suplemento dietético (Burdock 1998). Los residuos de pesticidas en el propóleo surgen de dos fuentes principales, ya sea proveniente de la contaminación por las prácticas agrícolas o debido a la aplicación directa de pesticidas en las colmenas, principalmente para evitar ácaros como la *Varroa destructor* (Wallner 1999; Bogdanov 2006; Rissato *et al.* 2007). A pesar del creciente consumo y producción a nivel internacional, existen pocos reportes sobre la ocurrencia de contaminantes y su influencia en la calidad de los propóleos.

Los residuos de acaricidas son contaminantes comunes en propóleo, aunque no hay reportado un método MRM oficial para la determinación de residuos de acaricidas, ni existe una regulación específica del contenido de residuos de pesticidas en este producto, sus derivados o en las prácticas apícolas de elaboración. El cumafos (O-(3-cloro-4-metil-2-oxo-4a,8a-dihidro-2H-cromen-7-il)O,O-dietil fosfotionato) es una de las sustancias preferidas en todo el mundo para el control de varroasis (Wallner 1999; Tremolada *et al.* 2004; Portóles *et al.* 2009; Serra-Bonvehí y Orantes-Bermejo 2010).

El interés en la contaminación de los propóleos se describe en recientes publicaciones sobre el análisis de residuos de pesticidas en propóleos brutos (Santana dos Santos *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009) y elaborados (Acosta-Tejada *et al.* 2011). Las tinturas o extractos de propóleo son la materia prima utilizada en la producción de productos elaborados en base a propóleo, obtenidas luego del procesamiento del propóleo bruto que consta de etapas de lavado, eliminación de ceras a través de la disolución de la resina en etanol y una posterior filtración para separar material insoluble (Burdock 1998). El propóleo procesado tiene aspecto y consistencia de goma pegajosa muy pigmentada con diferentes propiedades fisicoquímicas y composición que el propóleo bruto, principalmente debido a la remoción de ceras. La determinación de residuos de pesticidas en propóleo es un desafío analítico debido a la excepcional composición polifenólica de esta matriz y la variabilidad química existente entre diferentes muestras en función de sus orígenes geográficos o botánicos (Kumazawa *et al.* 2002; Chen *et al.* 2009).

En este sentido, las etapas de purificación de muestra deben ser exhaustivas y lo suficientemente versátiles como para producir extractos adecuados para determinaciones rutinarias por GC. Desde el punto de vista de transacciones comerciales, se realizan determinaciones de residuos de pesticidas en propóleos utilizando métodos generales en productos de origen animal o botánico (Specht y Tillkes 1985) que también típicamente involucran el uso de GPC como se describe también en las Farmacopeas (USP 2007b; EP 2008b). Los únicos reportes específicamente desarrollados para la determinación de trazas de pesticidas en propóleo bruto han aplicado MSPD para analizar residuos de bifentrina, buprofezin, tetradifon y vinclozolin por GC-MS (Santana dos Santos *et al.* 2008), así como SPE para determinar residuos de 17 OCs en propóleos utilizando una combinación en tándem de cartuchos de carbono grafitado y cartuchos de Florisil,

analizando los extractos mediante GC-ECD. Recientemente, Acosta-Tejada *et al.* 2011 reporta la aplicación de MSPD en fase dispersiva C₁₈ y AcOEt como solvente de elución, como método de análisis de pesticidas OPs en 5 tinturas de propóleos por GC-MS. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología para análisis rutinario de cumafos en tinturas de propóleos, que se amplió posteriormente a etion y clorpirifos. La estrategia utilizada se centra en la búsqueda de una remoción casi absoluta de los componentes de la matriz para producir extractos lo suficientemente limpios de polifenoles que puedan ser analizados por GC. En este artículo se presenta la validación del método y las características analíticas de un nuevo método basado en MSPD utilizando sulfato de aluminio anhidro (Al₂(SO₄)₃) como sorbente con posterior purificación por cromatografía en columna seguido por determinación de los residuos por GC-FPD y confirmación por GC-MS. Se muestra el desempeño de un método con remoción exhaustiva de polifenoles en análisis de rutina con muestras reales de tinturas de propóleos.

1.3.2 Materiales y métodos: artículo científico N°2 (ANEXO 3)³

³ Determination of coumaphos, chlorpyrifos and ethion residues in propolis tinctures by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to flame photometric and mass spectrometric detection

Pérez-Parada A., Colazzo M., Besil N., Geis-Asteggiane L., Rey F., Heinzen H.

Journal of Chromatography A (2011) 1218, 5852–5857.

1.3.3 Resultados y Discusión

Varios autores destacan la importancia de la purificación de extractos como el paso más importante en la determinación de residuos de pesticidas en propóleos (Chen *et al.* 2009). Contrariamente con los reportes de estudios de propóleos brutos (Santana dos Santos *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009), las tinturas de propóleo son de una constitución homogénea y no contienen ceras, lo que representa un cambio en el diseño de preparación de la muestra. Se planteo una estrategia MSPD ya que esta muestra gran utilidad cuando se trabaja con muestras altamente complejas, gracias al aprovechamiento las interacciones entre la muestra y la fase dispersante, favorecidas por la mezcla mecánica. Debido a la elevada complejidad de las tinturas de propóleos, fueron realizados algunos estudios preliminares utilizando la estrategia MSPD para eliminar intensivamente compuestos polifenólicos.

Diferentes materiales absorbentes fueron evaluados con este propósito, tales como alúmina neutra, sílica gel y Florisil para MSPD en fase normal eluyendo con mezclas de CH_2Cl_2 : AcOEt como han descrito previamente otros autores (Santana dos Santos *et al.* 2008). Los ensayos en fase reversa fueron realizados empleando MSPD en fase C_{18} eluyendo con AcOEt y MeCN de acuerdo al procedimiento descrito recientemente por Acosta-Tejada *et al.* 2011, el cual resultó inadecuado para los propóleos uruguayos posiblemente debido a las diferencias en composición con los propóleos mexicanos. Como se ha indicado anteriormente, la técnica MSPD permite la confección a medida de condiciones matriz/dispersante para asegurar mínima coelución de interferentes. Se experimentaron problemas de dispersión de

las tinturas con sorbentes típicos, debido al contenido de agua del extracto alcohólico y la baja afinidad del propóleo a la superficie dispersante.

En cambio, la fase dispersante seleccionada, $(Al_2(SO_4)_3$ anhidro.), no sólo contiene una alta afinidad por polifenoles, sino también que debido a sus propiedades altamente higroscópicas elimina el agua residual presente en la tintura, permitiendo una mejor interacción entre la muestra y la fase sólida mediante una rápida etapa de dispersión. La complejación con Al (III) es una propiedad bien conocida de los flavonoides (García *et al.* 1993), que se utiliza para eliminar selectivamente los polifenoles y compuestos aromáticos, incluso en aguas residuales (Domínguez *et al.* 2007). El Al (III) posee una gran afinidad por grupos hidroxilos, especialmente los fenólicos donde además se forman las sales de aluminio de los ácidos carboxílicos aromáticos o alifáticos. La complejación de fenoles y ácidos con Al (III) no permite su solubilización en solventes orgánicos apolares tales como CH_2Cl_2 y AcOEt. Durante la etapa de elución, los polifenoles complejados no pueden ser eluidos por la polaridad relativamente baja de los solventes orgánicos empleados. Por otro lado, la acetona fue seleccionada como diluyente de la tintura de propóleos por su alto poder disolvente para esta matriz y su alta volatilidad, útil en la etapa de dispersión ya que se logra evaporar rápidamente produciendo un polvo seco. De acuerdo a Santana dos Santos *et al.* (2008) el Florisil fue utilizado como cosorbente, mediante una elución con mezclas de CH_2Cl_2 :AcOEt lo que proporciona alta extracción de pesticidas y la reducción de coextractivos de propóleo. Diferentes mezclas de estos solventes fueron ensayados aunque la mezcla CH_2Cl_2 :AcOEt (9:1) fue finalmente seleccionada como un compromiso entre la elución de pesticidas y coextractivos de la matriz. Si bien la remoción de la matriz es muy alta con esta metodología aun es inadecuada para el análisis de rutina. Una etapa posterior de purificación por cromatografía en

columna de sílica gel, es realizada para obtener un mantenimiento adecuado de los puertos de inyección de GC y aumento de la vida útil de la columna cromatográfica. Este procedimiento es una adaptación a una técnica para remoción de polifenoles en aceites cítricos (Saitta *et al.* 2000). En la Figura 28 se muestra una investigación preliminar llevada a cabo en una muestra de propóleos conteniendo 0,5 mg/kg de los pesticidas estudiados, para establecer el volumen óptimo de CH_2Cl_2 en la extracción cuantitativa de los pesticidas en la etapa de purificación por columna.

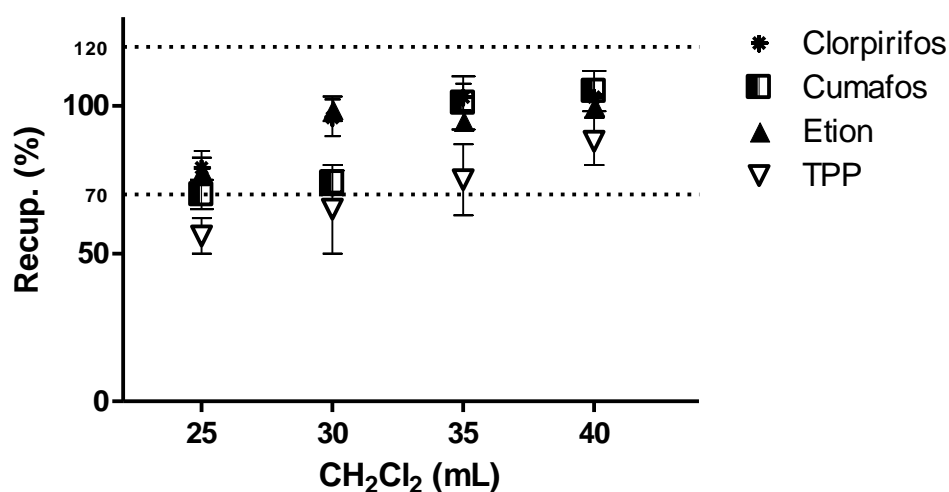


Figura 28. Optimización del volumen de CH_2Cl_2 en la etapa de cromatografía en columna para los pesticidas seleccionados a 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$).

De acuerdo a los requisitos aceptados en metodologías de análisis de residuos de pesticidas que deben proveer recuperaciones en el rango 70-120% (SANCO 2011), fue seleccionado un volumen de 40 mL de CH_2Cl_2 como volumen de elución en esta etapa (véase Figura 28).

La optimización de los parámetros del GC (temperaturas y gradiente de temperaturas del horno, programa del puerto de inyección etc.) fue realizada para lograr un alto flujo de muestras a través de tiempos instrumentales de análisis de

18 minutos. Se trabajó utilizando el FPD en el modo de fósforo para análisis cuantitativo de rutina, debido a la capacidad de este detector, en ofrecer un mayor rango dinámico, alta selectividad de señal y un menor mantenimiento.

Durante este trabajo el TPP fue utilizado como estándar sustituto (SANCO 2011) para control de desempeño de cada muestra procesada, mientras que el bromofos metil fue utilizado como estándar interno con fines cuantitativos.

Cabe remarcar, que los hallazgos de picos cromatográficos obtenidos a tiempos de retención específicos por esta técnica (análisis de identificación) no son suficientes para confirmar la presencia de residuos en la muestra. Aunque los extractos obtenidos pueden ser analizados de forma rutinaria por GC-MS operando en modo SIM, esta técnica se utilizó únicamente para determinar la presencia o ausencia de pesticidas (análisis de confirmación) en las muestras debido a la mayor sensibilidad y especificidad que proveen las m/z de cada analito. La Tabla 6 muestra los LODs y LOQs de los pesticidas analizados junto con su rango dinámico y coeficientes de determinación, bajo las condiciones seleccionadas. Fueron examinadas tres m/z en el modo SIM en cada analito, para la confirmación de los resultados positivos tal como recomienda el documento SANCO en su versión actual (SANCO 2011). La confirmación de positivos es asistida por los tiempos de retención correspondiente al análisis por GC-FPD (análisis de identificación) y GC-MS (análisis de confirmación) donde además debe cumplirse la presencia de tres m/z SIM con conservación de la abundancia relativa de estas (SANCO 2011).

	GC-FPD				GC-MS	
	LOD μg/kg	LOQ μg/kg	Rango mg/kg	Curva de calibración	Coef. r^2	LOD μg/kg
Clorpirifos	9,1	30,0	0,03- 5,00	$y = 1,0606x + 0,0672$	0,994	0,56
Cumafos	26,0	88,0	0,05- 20,00	$y = 0,7862x - 0,1452$	0,999	0,43
Etion	4,7	15,0	0,05- 5,00	$y = 1,6073x - 0,1152$	0,999	1,43

Tabla 6: Límites de detección y cuantificación (LODs and LOQs) y parámetros de regresión lineal en calibración en matriz.

El criterio de selección de iones está dado por aquellos más abundantes en el espectro MS o aquellos que no presenten interferencias isobárica de la matriz y por tanto mayor poder de confirmación. De forma ilustrativa la Figura 29 muestra la utilización de iones en el análisis por GC-MS para la confirmación de residuos de cumafos en una muestra problema (m/z 362, 364, 334). Los iones seleccionados para estos pesticidas, junto con sus abundancias relativas se resumen en la Tabla 7, donde también se informan los tiempos de retención por GC-FPD y el EM (%).

Los factores de respuesta para la cuantificación por estándar interno, fueron calculados en base a la calibración en matriz y en solvente mediante el análisis por GC-FPD. Los LODs fueron determinados utilizando el método gráfico en base a

una relación S/N de 3 para cada pesticida en muestras enriquecidas, mientras que los LOQs se obtuvieron con S/N de 10.

El LOD para cumafos por GC-FPD fue de 26 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que para MS como sistema de detección este fue sensiblemente inferior con 0,43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ referido a la m/z 334.

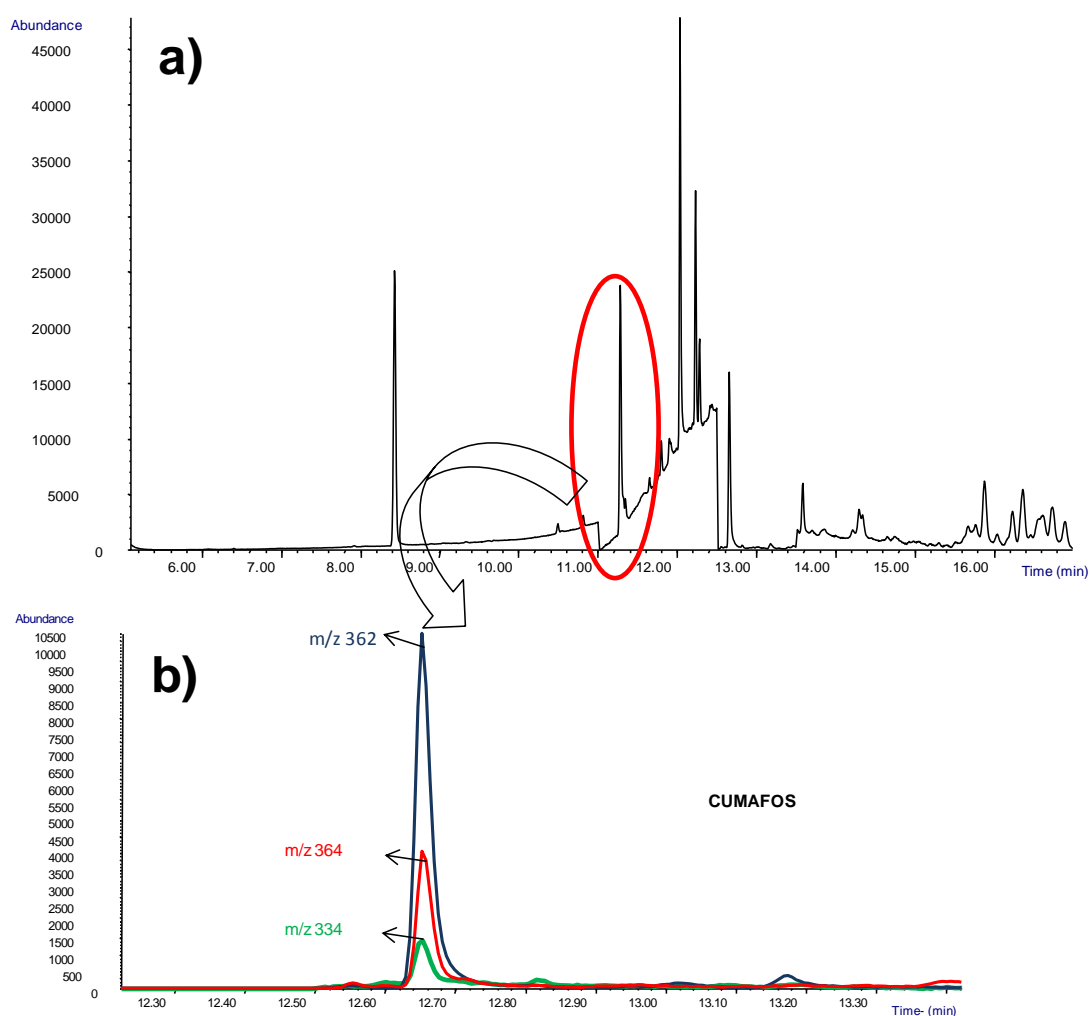


Figura 29: (a) Cromatograma TIC de GC-MS de una muestra problema; (b) confirmación de coumafos en la muestra (m/z 362, 364, 334).

	GC-FPD								GC-MS				
	T _R (min)	Recup. ±DSR (%)				Recup. ±DSR (%)	EM (%)	Precisión Inter-día (DSR, %)	T _R (min)	Ventana de adquisición	Ion <i>Quant</i> ,	Iones <i>Quals</i>	Relación de iones (%)
		Nivel de fortificación (µg/g)											
	0,1	0,5	1,0	5,0									
Clorpirifos	8,6	88±10	87±1	123±4	112±3	102±17	- 41	6,8	9,2	5,0 – 9,4	197	314	86
Cumafos	13,5	102±13	85±3	106±12	111±4	101±11	+ 14	7,2	14,2	14,0 – 22,0	362	316	64
												364	42
Etion	11,2	98±6	92±1	115±6	110±3	104±11	- 49	3,8	11,8	11,5 – 12,4	231	334	12
												384	16
Bromofos metal (EI)	9,0	-	-	-	-	-	-	2,3	9,5	9,4 – 11,5	326	233	15
												325	81
TPP	11,8	92±12	88±9	92±8	89±10	90±2	-	5,2	12,6	12,4 – 14,0	331	327	18
												329	68
												333	31

Tabla 7: Tiempos de retención T_R (min) para análisis GC-FPD/ MS, Recuperaciones, Promedio de recuperaciones y DSRs (%), Efecto matriz (EM %) calculado, y reproducibilidad inter-día (%) para cada analito bajo estudio (n=5) por GC-FPD. Iones *Quals* y *Quant* de confirmación.

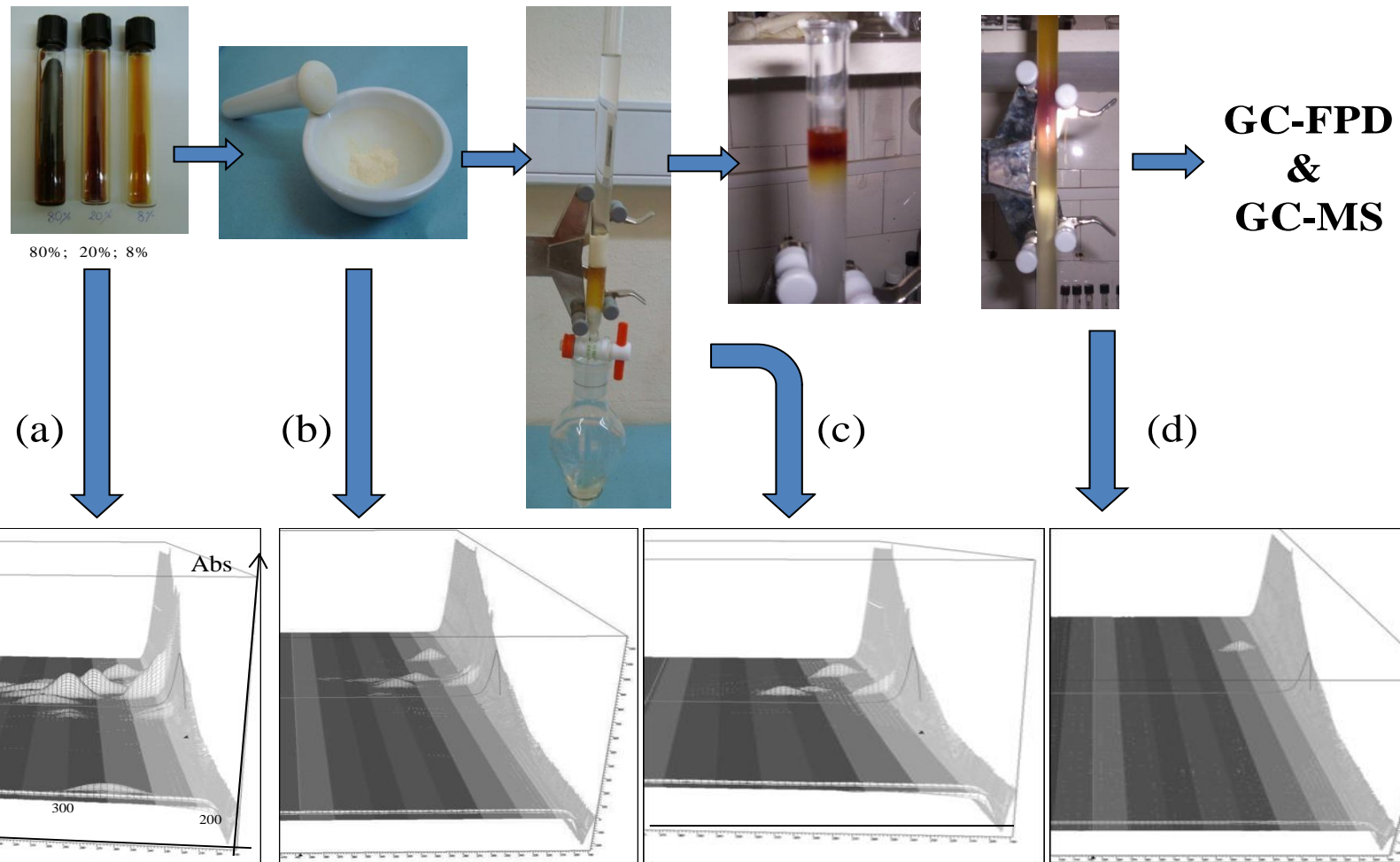


Figura 30: Esquema de preparación de muestra y cromatogramas en 3D mostrando el desempeño de cada etapa de preparación de muestra en la remoción de polifenoles. (a) dilución de muestra a 8 %; (a) MSPD en sulfato de aluminio anh.; (c) MSPD y Florisil como cosorbente; (d) extracto final usando cromatografía por SiO₂.

Como se comentó anteriormente, el mayor esfuerzo de esta metodología está abocado a remoción exhaustiva de polifenoles que es llevada a cabo en la preparación de muestra. Para demostrar la remoción de la matriz en cada paso, se realizó un seguimiento de los polifenoles durante la purificación mediante análisis por LC con detección por arreglo de diodos (LC-DAD) como se muestra en Figura 30. Se demuestra que todas las etapas de preparación de muestra son necesarias para obtener extractos acordes a análisis de rutina.

El EM (%) calculado evidencia que etion es el pesticida más influenciado por EM con fuerte supresión de respuesta (- 49%), seguido por clorpirifos (- 41%) y cumafos (+ 14%) que experimenta un débil efecto de aumento de señal.

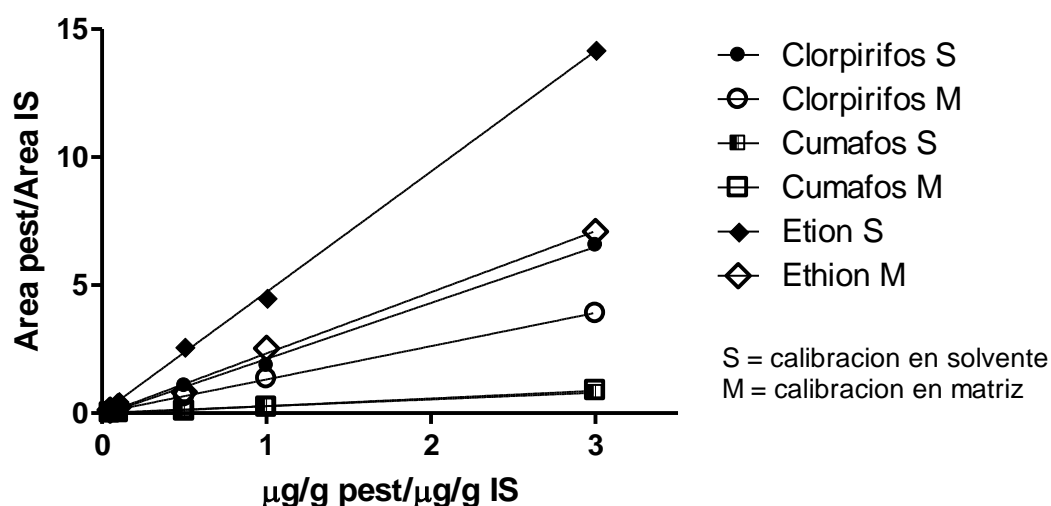


Figura 31: Curvas de calibración en solvente y matriz para cada pesticida evidenciando el fuerte efecto matriz de los extractos de propóleo ($n=7$).

Por este motivo, fue seleccionada la calibración en matriz para propósitos cuantitativos. Una comparación de las curvas de calibración para los estándares de pesticidas obtenidas en solvente y matriz es indicada en la Figura 31.

Como se informa en la Tabla 7, el método muestra recuperaciones acordes (70-120%) y DSRs inferiores a 13%.

La DSR inter-día ($n = 5$) arrojó valores entre 3,8 y 7,2% lo que puede interpretarse como una fortaleza de esta metodología, algo que había sido buscado sin mucho éxito en otros reportes para esta matriz (Acosta-Tejada *et al.* 2011). La etapa por cromatografía en columna, resulta ser limitante para un análisis MRM de pesticidas, ya que esta excluye a los compuestos más polares en función del volumen de CH_2Cl_2 empleado en la elución. El volumen seleccionado fue elegido como un compromiso entre las recuperaciones y una sobrecarga de EM, lo que garantiza buenas recuperaciones y reproducibilidad únicamente para los pesticidas en estudio. La eliminación de este paso o el uso de mayores volúmenes de solvente de elución se relacionan directamente con un aumento de los coextractivos, lo que provoca problemas en el mantenimiento del GC, genera EM y disminuye la sensibilidad. Dado que los extractos de propóleos se comercializan en una variedad de concentraciones alcohólicas, el método puede ser fácilmente extendido al contenido total de sólidos que refiere la muestra mediante la realización de diluciones apropiadas de los extractos sólidos.

Un cromatograma típico de GC-FPD muestra el hallazgo de residuos de clorpirifos (pico 1) y cumafos (pico 5) en una muestra real en comparación a una mezcla de estándares es mostrado en las Figura 32 a y b, respectivamente. El método propuesto se aplicó al análisis de más de 2.500 muestras reales con destino a consumo local y exportaciones del sector apícola uruguayo en los últimos dos años.

Fueron identificados residuos de cumafos y clorpirifos en la gran mayoría de las muestras analizadas (>98%), mientras que en muy pocos casos (<3%), fueron

identificados residuos de etion. Las frecuencias de detección y los niveles de pesticidas encontrados en tinturas de propóleos uruguayos están en el entorno a los recientemente publicados en la cera de abejas en los EE.UU (Mullin *et al.* 2010) lo que devela problemas de incumplimiento de buenas practicas de elaboracion de la apicultura.

Estos resultados están en consonancia con los recientes reportes de alta contaminación por pesticidas que presentan los productos apícolas (Mullin *et al.* 2010; Serra-Bonvehí y Orantes-Bermejo 2010). Se observó que el rango dinámico de esta metodología se ajusta adecuadamente a los contenidos de pesticidas en las muestras reales. Además, surge de este estudio una gran preocupación a nivel nacional entorno al clorpirifos quien presenta alta frecuencia de detección y no es usado en apicultura debido a su alta toxicidad para las abejas (0,36 mg / abeja) (Tomlin 2009). Esta presencia se especula que podría estar asociada a la contaminación de cultivos donde es aplicado clorpirifos como la soja. Bajo la estrategia de análisis propuesto, la necesidad de mantenimiento del GC se pone de manifiesto después de ~300 muestras inyectadas a través de ensanchamiento de los picos y la pérdida de sensibilidad de cumafos donde se recomienda para solventar este problema, el acortamiento de una fracción de columna (50 cm desde el puerto de inyección). Para realizar un seguimiento del funcionamiento del método, se presenta un gráfico de control para el TPP en 83 muestras reales analizadas durante un período de diez días se muestra en la Figura 33. Sólo un valor “outlier” se encontró con la técnica propuesta por dos analistas diferentes considerando un nivel de confianza de 95%.

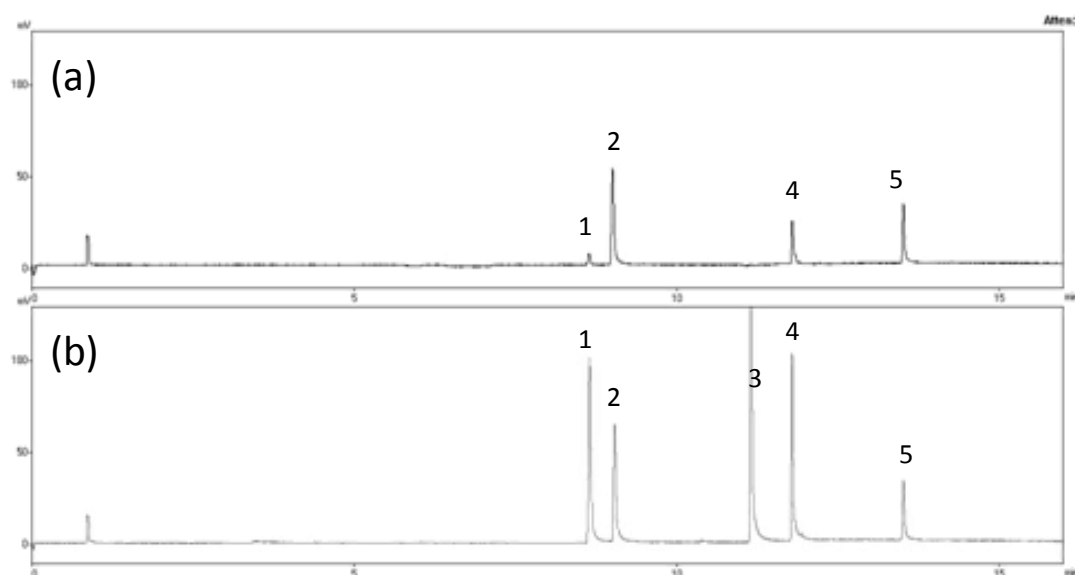


Figura 32: Cromatogramas por GC-FPD: (a) muestra problema conteniendo clorpirifos y cumafós; (b) mezcla de estándares 1 $\mu\text{g/mL}$ de (1) clorpirifos (2) bromofós metil (3) etion; (4) TPP; (5) cumafós.

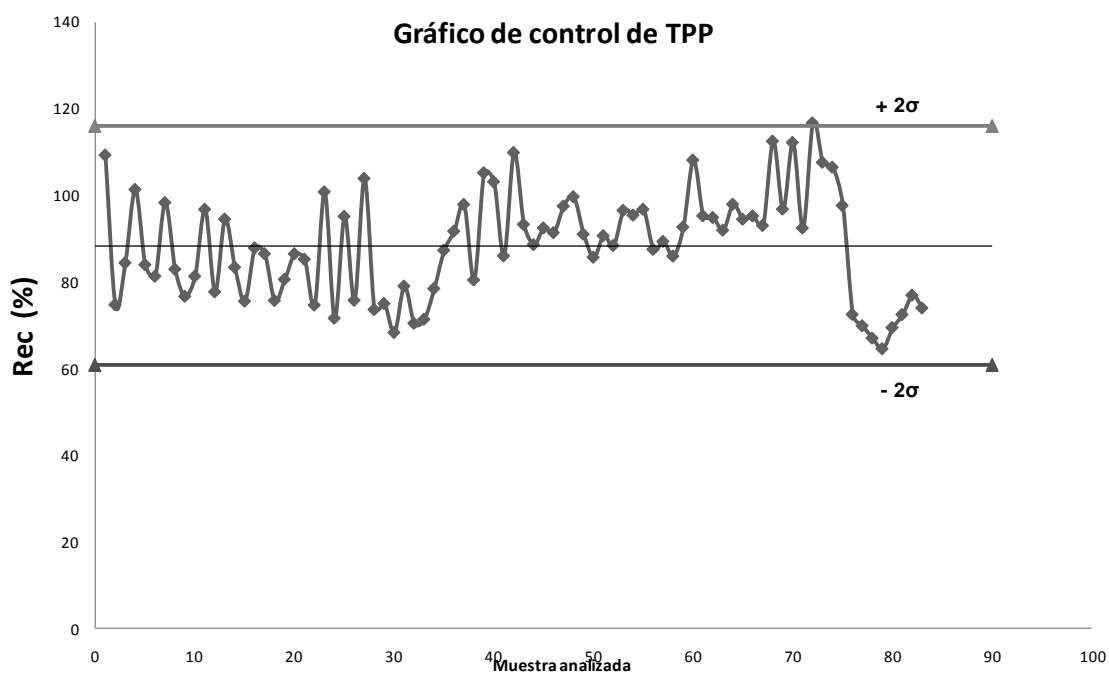


Figura 33: Grafico de control de TPP (recuperación % vs numero de muestra) para dos analistas durante un mes de análisis ($n=83$).

1.3.4 Conclusiones

En este trabajo se presentó el desarrollo de un método analítico para la determinación de residuos de cumafos, clorpirifos y etion en extractos de propóleos. La estrategia de análisis avocada a la remoción exhaustiva de polifenoles en la etapa de purificación, ha podido ser aplicada de forma rutinaria mediante determinación por GC-FPD/MS de los extractos.

El $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ anhidro empleado como fase dispersante en la etapa MSPD, demostró ser muy eficiente en la remoción de polifenoles en una matriz problemática. El método propuesto es confiable y se aplicó con éxito para el análisis de cerca de 2.500 muestras reales en control de producción y exportación, durante el periodo de dos años.. No solo se encontraron residuos de cumafos en la gran mayoría de las muestras, sino también de clorpirifos (con alta frecuencia, aunque bajos niveles) en las muestras reales analizadas, lo que indica la necesidad de conocimiento sobre la contaminación de propóleos por residuos de pesticidas y de establecimiento de LMRs internacionales para esta materia prima y sus derivados.

1.4 Referencias

- ACOSTA-TEJADA, G.M., MEDINA-PERALTA, S., MOGUEL-ORDÓÑEZ, Y.B. & MUÑOZ-RODRÍGUEZ, D. (2011). Matrix solid-phase dispersion extraction of organophosphorus pesticides from propolis extracts and recovery evaluation by GC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **400**, 885-891.
- ANASTASSIADES, M., MASTOVSKA, K. & LEHOTAY, S.J. (2003). Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A* **1015**, 163-184.
- BARKER, S.A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **70**, 151-162.
- BOGDANOV, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie* **37**, 1-18.
- BURDOCK, G.A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* **36**, 347-363.
- CE/657/2002 (2002). Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Union* **L221**, 8-36.
- CHEN, F., CHEN, L., WANG, Q., ZHOU, J., XUE, X. & JING, Z. (2009). Determination of organochlorine pesticides in propolis by gas chromatography–electron capture detection using double column series solid-phase extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 1073–1079.
- DE LA ROSA, M.D.C., ROSARIO MEDINA, M.D. & VIVAR, C. (1995). Microbiological quality of pharmaceutical raw materials. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* **70**, 227-232.
- DISERENS, H. (1989). Simplified extraction and cleanup for multiresidue determination of pesticides in lanolin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **991**, 72-76.
- DOMÍNGUEZ, J.R., GONZÁLEZ, T., GARCÍA, H.M., SÁNCHEZ-LAVADO, F. & BELTRÁN DE HEREDIA, J. (2007). Aluminium sulfate as coagulant for highly polluted cork processing wastewaters: Removal of organic matter. *Journal of Hazardous Materials* **148**, 15-21.
- EP (2008a). *European Pharmacopeia 6th Ed.* Consejo de Europa, Estrasburgo, Francia.
- EP (2008b). *Lanolin Monograph.* Consejo de Europa, Estrasburgo, Francia.
- FERRER, C., GÓMEZ-REYES, J.F., FERRER, I., THURMAN, E.M. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2005). Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1069**, 183-194.
- GARCÍA-LÓPEZ, M., CANOSA, P. & RODRÍGUEZ, I. (2008). Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**, 963-974.
- GARCÍA-REYES, J.F., FERRER, C., GÓMEZ-RAMOS, M.J., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. & MOLINA-DÍAZ, A. (2007). Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **26**, 239-251.
- GARCÍA, S., HEINZEN, H., MARTINEZ, R. & MOYNA, P. (1993). Identification of flavonoids by TLC scanning analysis. *Chromatographia* **35**, 430-434.
- GARRIDO FRENICH, A., PLAZA BOLAÑOS, P. & MARTÍNEZ VIDAL, J.L. (2007). Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1153**, 194-202.
- HEIKES, D.L. & CRAUN, J.C. (1992). Rapid multiresidue procedure for the determination of pesticides in anhydrous lanolin and lanolin-containing pharmaceutical preparations utilizing gel permeation chromatography cleanup with gas chromatographic and mass spectrometric techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1586-1590.
- JONES, F.W. (1996). Multiresidue analysis of pesticides in wool wax and lanolin using gel permeation and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 3197-3201.
- JONES, F.W. (1997). The removal of pesticide residues from wool wax by solvent extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **74**, 1241-1245.
- JOVER, E. & BAYONA, J.M. (2002). Trace level determination of organochlorine, organophosphorus and pyrethroid pesticides in lanolin using gel permeation chromatography followed by dual gas
-

- chromatography and gas chromatography–negative chemical ionization mass spectrometric confirmation. *Journal of Chromatography A* **950**, 213-220.
- JOVER, E., MOLDOVAN, Z.& BAYONA, J.M. (2002). Complete characterisation of lanolin steryl esters by sub-ambient pressure gas chromatography–mass spectrometry in the electron impact and chemical ionisation modes. *Journal of Chromatography A* **970**, 249-258.
- KRISTENSON, E.M., BRINKMAN, U.A.T.& RAMOS, L. (2006). Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **25**, 96-111.
- KUMAZAWA, S., HAYASHI, K., KAJIYA, K., ISHII, T., HAMASAKA, T.& NAKAYAMA, T. (2002). Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 4777-4782.
- LEHOTAY, S.J., MASTOVSKA, K.& YUN, S.J. (2005). Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *Journal of Aoac International* **88**, 630-638.
- LÓPEZ-MESAS, M., CRESPI, M., BRACH, J.& MULLENDER, J.P. (2000). Clean-up of a pesticide–lanolin mixture by gel permeation chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **38**, 551-555.
- MARGENAT, L., TORRES, A.I., MOYNA, P., HEINZEN, H., GONZÁLEZ, G.& JACHMANIÁN, I. (2008). Lanoline purification by selective extraction of pesticides using supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids* **45**, 177-180.
- MASTOVSKA, 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.
- MIYAHARA, M., SUZUKI, T.& SAITO, Y. (1992). Multiresidue method for some pesticides in lanolin by capillary gas chromatography with detection by electron capture, flame photometric, mass spectrometric, and atomic emission techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 64-69.
- MULLIN, C.A., FRAZIER, M., FRAZIER, J.L., ASHCRAFT, S., SIMONDS, R., VANENGELSDORP, D.& PETTIS, J.S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS one* **5**.
- OMS (1998). Organización Mundial de la Salud, *Quality control methods for medicinal plant materials*, Génova, Italia.
- POLESE, L., SANNOMIYA, M., DE OLIVEIRA SADER, A.P.& LÚCIA RIBEIRO, M. (2000). Extraction and clean-up procedure for analysis of organochlorine pesticide residues in ethoxylated lanolin. *Il Farmaco* **55**, 637-640.
- PORTÓLES, T., IBÁÑEZ, M., SANCHO, J.V., LÓPEZ, F.J.& HERNÁNDEZ, F. (2009). Combined use of GC-TOF MS and UHPLC-(Q)TOF MS to investigate the presence of nontarget pollutants and their metabolites in a case of honeybee poisoning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 4079-4090.
- RISSATO, S.R., GALHIANE, M.S., DE ALMEIDA, M.V., GERENUTTI, M.& APON, B.M. (2007). Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry* **101**, 1719-1726.
- SAITTA, M., DI BELLA, G., SALVO, F., LO CURTO, S.& DUGO, G. (2000). Organochlorine pesticide residues in Italian citrus essential oils, 1991-1996. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 797-801.
- SANCO (2011). Method validation & quality control procedures for pesticide residues analysis in food & feed. *Document N° SANCO/12495/2011*.
- SANTANA DOS SANTOS, T.F., AQUINO, A., SILVEIRA DÓREA, H.& NAVICKIENE, S. (2008). MSPD procedure for determining buprofezin, tetradifon, vinclozolin, and bifenthrin residues in propolis by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**, 1425–1430.
- SERRA-BONVEHÍ, J.& ORANTES-BERMEJO, J. (2010). Acaricides and their residues in Spanish commercial beeswax. *Pest Management Science* **66**, 1230-1235.
- SPECHT, W.& TILLKES, M. (1985). Gas-chromatographic determination of pesticide residues after clean-up by gel-permeation chromatography and mini-silicagel-column chromatography. Part 5. Clean-up of foods and feeds from vegetable and animal origin for multiresidue analysis of fat-soluble and water-soluble pesticides. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **322**, 443-455.
- TOMLIN, C.D.S. (2009). *The Pesticide Manual*. Hampshire, BCPC Publications.
- TREMOLADA, P., BERNARDINELLI, I., COLOMBO, M., SPREAFICO, M.& VIGHI, M. (2004). Coumaphos distribution in the hive ecosystem: Case study for modeling applications. *Ecotoxicology* **13**, 589-601.
- USP (1990). *USP-NF*. Rockville, Rockville, MD. United States Pharmacopoeia Convention Inc.

- USP (2007a). *USP30-NF 25*. Rockville, MD, , The United States Pharmacopoeia Convention Inc.
- USP (2007b). *Lanolin Monograph.*, The United States Pharmacopoeia Convention Inc
- WALLNER, K. (1999). Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* **30**, 235-248.
- WONG, J., HAO, C., ZHANG, K., YANG, P., BANERJEE, K., HAYWARD, D., IFTAKHAR, I., SCHREIBER, A., TECH, K., SACK, C., SMOKER, M., CHEN, X., UTTURE, S.C.& OULKAR, D.P. (2010a). Development and interlaboratory validation of a QuEChERS-based liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for multiresidue pesticide analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 5897-5903.
- WONG, J.W., ZHANG, K., TECH, K., HAYWARD, D.G., KRYNITSKY, A.J., CASSIAS, I., SCHENCK, F.J., BANERJEE, K., DASGUPTA, S.& BROWN, D. (2010b). Multiresidue pesticide analysis of ginseng powders using acetonitrile or acetone-based extraction, solid-phase extraction cleanup, and gas chromatography–mass spectrometry/selective ion monitoring (GC-MS/SIM) or –tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 5884-5896.
- ZUIN, V.G.& VILEGAS, J.H.Y. (2000). Pesticide residues in medicinal plants and phytomedicines. *Phytotherapy Research* **14**, 73-88.
-

CAPITULO 2: Determinación de contaminantes orgánicos en alimentos



2.1 Antecedentes y consideraciones preliminares

El análisis de contaminantes en alimentos presenta diversos desafíos. Por un lado, la determinación con alto grado de exactitud de la concentración de los contaminantes presentes en los diversos alimentos, el aseguramiento de ausencia de un número importante de contaminantes y por último la comprensión del riesgo toxicológico que esas sustancias representan para la salud cuando se encuentran en alimentos específicos en el marco de una dieta considerada desde una perspectiva global, la que es característica de cada nación. Bajo este punto de vista, para el caso de Uruguay que no posee una dieta occidental estándar para las cuales se han calculado los distintos LMRs, es importante conocer la contribución a la ingesta diaria de pesticidas contenidos en bebidas relevantes como por ejemplo el mate, la infusión de *Ilex paraguariensis*. Dadas las peculiaridades tecnológicas de las actividades agrícolas, la posibilidad de contaminación por agroquímicos relativamente alta. Los avances reglamentarios en la materia han acompañado el desarrollo de los procedimientos analíticos y hoy día un gran número de agroquímicos podría controlado aunque aún hay compuestos que no han sido incluidos en los protocolos analíticos y existen matrices sin reglamentar. En los últimos quince años, han surgido gran variedad de metodologías y principios de análisis con utilidad en la determinación de contaminantes en alimentos (Fernández-Alba 2005). En este sentido, dos campos han tenido excepcional desarrollo: (i) las técnicas de detección basadas en MS/MS a través de nuevas configuraciones de analizadores; y (ii) las estrategias de preparación de muestra, a través de varias técnicas simplificadas de pretratamiento, extracción y clean-up (purificación) previo a la determinación instrumental (Picó *et al.* 2006; Lehotay *et al.* 2008; Banerjee *et al.* 2010; Malik *et al.* 2010; Lehotay 2011). En la Unión

Europea, se ha promulgado una guía modelo, tendiente a la armonización de criterios en validación de métodos y aseguramiento de la calidad de los resultados analíticos para soportar la validez de los datos utilizados en dar cumplimiento a los LMRs, a la promoción de acciones de mejora y a la evaluación de la exposición por pesticidas de los consumidores (SANCO 2011). A pesar de la gran variedad de opciones disponibles, la tendencia observada en los laboratorios oficiales de control y monitoreo de alimentos es la utilización rutinaria de ciertos protocolos MRM basados en tres grandes métodos de preparación de muestra como son el QuEChERS (Anastassiades *et al.* 2003; Lehotay *et al.* 2007), la extracción con acetato de etilo (Pihlström *et al.* 2007; Ferrer *et al.* 2010) o la variante miniaturizada (Sawyer 1985; Hiemstra *et al.* 1999) del método original de Luke *et al.* (1975); con determinaciones por MS/MS (LC y GC) utilizando analizadores del tipo triple cuadrupolo (QqQ) (EURL 2012). La búsqueda del aseguramiento de la calidad de resultados ha promovido la utilización de estas técnicas y la aceptación de criterios que permiten la intercomparación de los resultados analíticos. En este sentido, se ha logrado la oficialización de estas metodologías emergentes con amplia aceptación a nivel mundial (Lehotay *et al.* 2007; Lehotay 2011). Los métodos de preparación de muestra anteriormente citados proveen de extractos adecuados al estado del arte de la instrumentación contemporánea, cumpliendo con varios requisitos tales como facilidad de implementación, rentabilidad económica, tendencia a reducción de los residuos generados y demostrada aptitud técnica a través de las cifras de mérito, una elevada versatilidad y rapidez siendo implementadas por laboratorios oficiales en acreditaciones ISO/IEC 17.025. Por el lado de los sistemas de detección, el uso de las técnicas de MS/MS en su configuración más simple como lo es el analizador QqQ, surge la opción más accesible por los laboratorios en términos económicos como por capacidades

analíticas adquiridas (Lehotay 2011). Debido a la estandarización de estas técnicas, se han podido realizar exhaustivos programas de monitoreo sobre la presencia de residuos de contaminantes en alimentos, la evaluación del riesgo de exposición e ingesta de contaminantes por parte de los consumidores. Esto se ve revelado por el incipiente interés de estimaciones de contaminantes en alimentos procesados, cocidos, freídos, enlatados o ingeridos teniendo en cuenta los hábitos culturales de consumo (Boobis *et al.* 2008; Kaushik *et al.* 2009; Keikotlhaile *et al.* 2010; Lee *et al.* 2010; González-Rodríguez *et al.* 2011).

El presente capítulo, muestra en primera instancia, los estudios realizados con el fin de incluir dos hormonas reguladoras del crecimiento vegetal dentro del alcance de los tres métodos más populares de preparación de muestra entre los laboratorios de control con determinación por LC-QqQ-MS/MS. Estos desarrollos tienen como objetivo promover incrementar el alcance de los MRM de rutina por los laboratorios de control.

Posteriormente, se demuestra la transferencia de residuos de pesticidas a la infusión de la yerba mate tomando en consideración un diseño experimental que contempla determinados hábitos culturales de consumo por la población uruguaya. Mediante la determinación de residuos en la infusión, se han estimado los coeficientes de transferencia para un grupo de pesticidas y su relación con propiedades fisicoquímicas como la solubilidad en agua de los pesticidas. Finalmente se realiza una evaluación toxicológica preliminar mediante la utilización de parámetros descritos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para estimar su seguridad y niveles máximos de residuos en hierbas de infusión.

2.2 Determinación de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal por tres métodos multiresiduo de preparación de muestra y LC-MS/MS

2.2.1. Introducción

Las hormonas reguladores del crecimiento vegetal controlan procesos fisiológicos específicos en las plantas, tales como la división, la elongación y la diferenciación de las células. Estas sustancias se utilizan para promover la floración y el desarrollo de una gran variedad de frutas y hortalizas. La aplicación en los cultivos, de auxinas sintéticas como el ácido 1-naftilacético (ANA) y la 2-(1-naftil)acetamida (ANAm) con posterioridad a la floración se realiza para prevenir la caída o la baja producción de frutos. Sin embargo, cantidades superiores a las necesarias actúan como inhibidores del crecimiento siendo perjudiciales en el correcto desarrollo de los cultivos (Sigrist *et al.* 1974; Tomlin 2009). Al contrario de la mayoría de los agroquímicos, estos compuestos no son especialmente considerados de alto riesgo para la salud humana aunque deberían ser controlados. Recientemente fue definida por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria una dosis de aguda de referencia (ARfD) de 0,1 mg/kg de peso corporal por día, tanto para la ANA y ANAm, lo que las clasifica en sustancias de riesgo moderado (EFSA 2011).

A pesar de que estas sustancias no son rutinariamente monitoreadas, en la Unión Europea se ha establecido una reciente reglamentación con LMRs de 0,05 mg/kg de

ANA y ANAm en la mayoría de los alimentos vegetales, a excepción de ciertas frutas de pomo (como manzanas y peras) con LMRs superiores comprendidos entre 0,1 a 1 mg/kg (EC 2005).

Por otra parte, estos compuestos fueron incluidos en el Anexo III A del Reglamento Europeo N° 149/2008 por tanto, se clasifican como LMRs temporales en proceso de revisión (EC 2008). Hay pocos reportes sobre la determinación de hormonas reguladoras de crecimiento exógenas en frutas y verduras, que serían útiles para controlar la "buenas prácticas de manufactura" y seguridad de los consumidores mediante su evaluación de LMRs. La mayoría de los reportes se han centrado en la determinación de auxinas endógenas en diversas matrices vegetales (Chiwocha *et al.* 2003; Gennaro 2003; Hou *et al.* 2008; Lu *et al.* 2008; Izumi *et al.* 2009; Chen *et al.* 2010; Lu *et al.* 2010a) mientras que pocos esfuerzos han sido realizados para determinar hormonas de origen exógeno como ANA (Nagayama *et al.* 2003; Segura Carretero *et al.* 2004; Ma *et al.* 2008; Lu *et al.* 2010b), ANAm u otras auxinas sintéticas relacionados, tales como el ácido 2-naptiloxiacético (auxina BNOA) (Gennaro 2003; Segura Carretero *et al.* 2004; Lucini & Molinari 2010).

Diferentes técnicas de determinación han sido empleadas para determinar ANA en alimentos como espectrofluorimetría (Navalón *et al.* 1997), electroforesis capilar con detección por arreglo de diodos (CE-DAD) (Segura Carretero *et al.* 2004), cromatografía capilar electrocinética micelar (MECC-DAD) (Liu *et al.* 2002), electrocromatografía capilar presurizada (PCEC-DAD) (Lu *et al.* 2010b), cromatografía líquida con detección por fluorescencia (LC-FLD) (Nagayama *et al.* 2003; Lu *et al.* 2010a), LC-DAD (Gambino *et al.* 2008) y técnicas por espectrometría de masas tándem (LC-MS/MS) (Lu *et al.* 2008; Ma *et al.* 2008). Por otro lado, pocos autores han investigado la determinación y ocurrencia de ANAm, ya que sólo existen reportes de análisis fluorimétrico en manzanas (Sigrist *et al.* 1974) y

recientemente en fertilizantes por LC-DAD (Gambino *et al.* 2008). Los métodos de preparación de muestra reportados para estos análisis son variados e involucran marcadas etapas de ajuste de pH. En la literatura, el esquema general de extracción de ANA se basa en una primera etapa de maceración de varias horas en diversos solventes orgánicos (Liu *et al.* 2002; Chen *et al.* 2010; Lu *et al.* 2010b), aunque generalmente se utiliza MeOH (Lu *et al.* 2008; Oulkar *et al.* 2011a; Oulkar *et al.* 2011b), acetona (Nagayama *et al.* 2003; Segura Carretero *et al.* 2004) o acetato de etilo (Gennaro 2003; Lucini & Molinari 2010) siempre empleando un riguroso control de pH, y final purificación por SPE o extracción líquido-líquido. También otros métodos más modernos como la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) han sido recientemente ensayados en la determinación de ANA (Lu *et al.* 2010a).

A pesar de esto, la inclusión de estos analitos en el alcance de métodos MRMs, los convierte en una alternativa más atractiva en el ámbito de los laboratorios oficiales y de investigación, dedicados al monitoreo de sustancias en alimentos. La utilización de estos MRMs mejora el conocimiento sobre la ocurrencia de contaminantes, ayuda a la detección temprana de alertas sanitarias, así como aporta mayor confiabilidad de resultados, tal como demuestra la experiencia de varios ejercicios interlaboratorio de pesticidas en frutas y hortalizas (Ferrer *et al.* 2010; Medina-Pastor *et al.* 2010a; Medina-Pastor *et al.* 2010b).

El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia y la adecuación para el fin en la determinación de ANA y ANAm por los métodos MRM más populares que actualmente se aplican en la gran mayoría de los laboratorios de residuos de agroquímicos en frutas y hortalizas. Estos implican extracción y partición con acetona (mini-Luke, Luke *et al.* 1975), la extracción de acetato de etilo (AcOEt,

Ferrer *et al.* 2010) o MeCN con buffer acetato (QuEChERS acetato, Lehotay *et al.* 2007).

Se expone además una comparación entre desempeños cualitativos y cuantitativos mediante la determinación por LC-MS/MS con analizador QqQ en términos de recuperación, precisión, sensibilidad y capacidad de confirmación de estos analitos en muestras reales de tomates y zucchini.

2.2.2 Materiales y métodos: artículo científico N°3 (ANEXO 4)⁴

⁴ Inclusion of 1-naphthylacetic acid and 2-(1-naphthyl)acetamide in three typical multiresidue methods for LC-MS/MS analysis of tomatoes and zucchini

Lozano A., Pérez-Parada A., Heinzen H., Fernández-Alba A.R.

Journal of AOAC International (2012) 95 (en prensa).

2.2.3 Resultados y Discusión

Debido a su sensibilidad y selectividad para el análisis de trazas en muestras complejas, los instrumentos LC-(QqQ)MS/MS operando con fuentes de ionización ESI tanto en modos positivo como negativo, son en la actualidad los más utilizados en las determinaciones de amplio alcance de agroquímicos (Fernandez-Alba & Garcia-Reyes 2008). Es de destacar que la variación entre el grupo ácido de ANA y el amida de ANAm condiciona la polaridad de una fuente de ionización ESI ya que el grupo ácido tiene facilidad por perder un protón y formar un anión $[M-H]^-$ mientras que la amida tiende a formar un catión $[M+H]^+$.

Para clarificar este concepto, la Figura 34 muestra las estructuras químicas de ANA y ANAm.

Figura 34: Estructuras químicas del ácido 1-naftilacético (ANA) y 2-(1-naftil)acetamida (ANAm)

Un esquema de los métodos de preparación de muestra evaluados se muestra en la Figura 35. En estos, el TPP es utilizado como estándar sustituto únicamente para evaluación del proceso de extracción. Puede observarse que de las tres metodologías

empleadas, únicamente el método de QuEChERS tiene control del pH a través de la formación de un buffer acetato de pH 4,5–5 además de que es el único que incluye etapa de purificación dispersiva (Lehotay *et al.* 2010). Se utilizó un agitador axial para asistir en la validación de las metodologías desarrolladas en tubo de centrífuga (QuEChERS y AcOEt) mientras que para el mini-Luke fue utilizado un Polytron en las etapas de extracción con acetona y éter de petróleo-CH₂Cl₂.

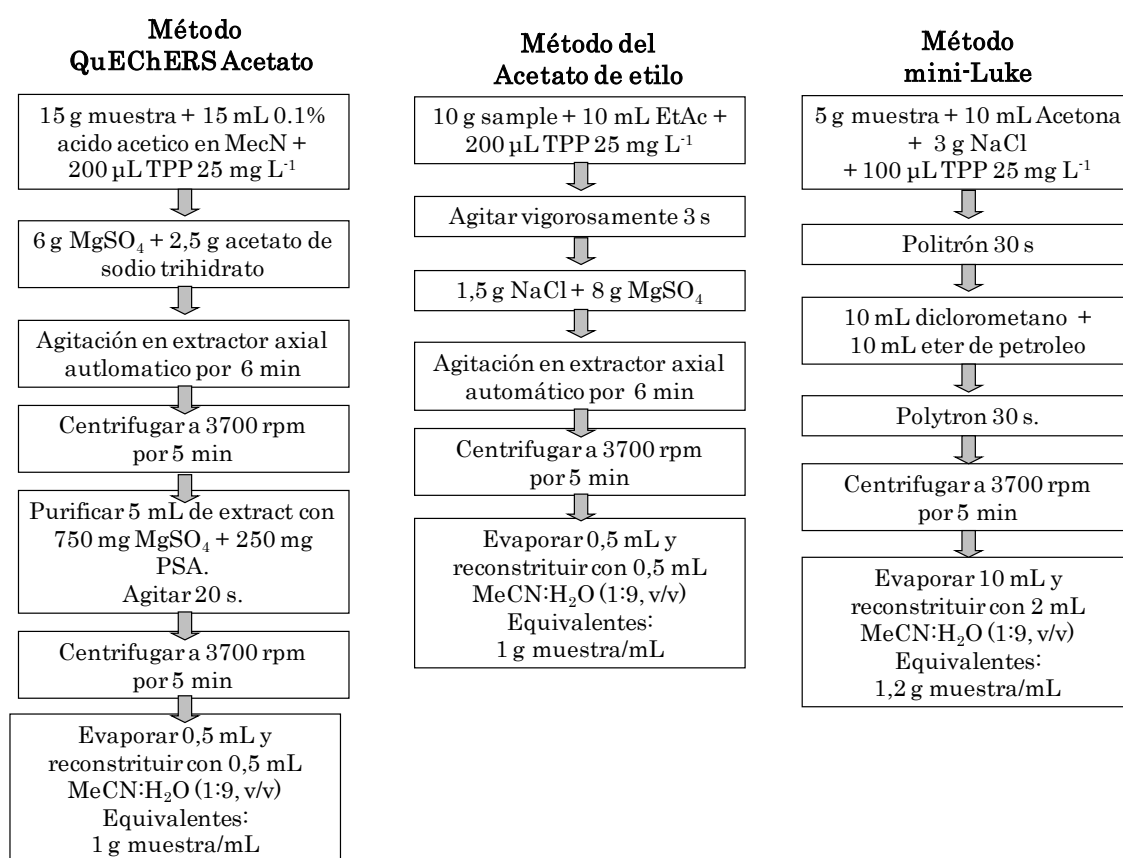


Figura 35: Esquema de métodos de preparación de muestra empleado para el análisis de ANA y ANAm en tomate y zucchini.

2.2.3.1 Optimización de parámetros instrumentales

La optimización de estos analitos se realizó individualmente mediante análisis por inyección en flujo (sin etapa cromatográfica) directamente por MS/MS a una concentración de 1 mg/L en MeCN:H₂O (1:1), a un flujo constante de MeCN:H₂O (50:50) de 0,2 mL/min y utilizando un volumen de inyección de 5µL. De cada barrido de MS, se seleccionaron dos transiciones (formación de iones producto) de masa adecuadas, una con fines de cuantificación (*Quant*) y otra para confirmación (*Qual*). El ion producto más abundante fue utilizado como transición de cuantificación (SRM₁) mientras que la segunda fue empleada como calificadora (SRM₂). El voltaje de fragmentación (V_{frag}) fue investigado en el rango de 60-150 V, mientras que las energías de colisión (EC) fueron optimizadas para obtener máxima sensibilidad de las transiciones entre 5-20 V. Ambos modos de ionización, positivo y negativo fueron utilizados para ambos compuestos (ESI + y ESI -). Las condiciones optimizadas se muestran en la Tabla 8. Como era de esperar, se encontró máxima sensibilidad para ANA cuando la ionización fue realizada en ESI(-), mientras que ANAm demuestra la mayor sensibilidad en el ESI (+).

Con la finalidad de llevar a cabo la determinación simultánea de tales analitos debido a que es necesario realizar un cambio en la polaridad de la fuente, se busco maximizar la separación cromatográfica entre ANA y ANAm. Se observo que una separación del orden de un minuto entre los analitos, no es suficiente para estabilizar adecuadamente la fuente de ionización, produciéndose una respuesta ruidosa en la región de cambio de polaridad y forma irregular de pico de ANA.

Tanto MeOH como MeCN fueron investigados como fases móviles orgánicas para LC. Se utilizó ácido fórmico como modificador de fase móvil (fase orgánica al 0,1%

en ácido fórmico) debido al ensanchamiento y frecuente desdoblamiento de pico observado para ambos analitos cuando se emplean fases móviles sin modificador.

Bajo estas condiciones se obtuvo una máxima sensibilidad para ANA en MeOH, por lo que este solvente fue seleccionado por sobre MeCN cuya sensibilidad es mucho menor.

Analito	T _R (min)	Ion padre	V _{frag} (V)	m/z		Relación de iones (A _{IP1} /A _{IP2})		
				producto 1 (IP1)	producto 2 (IP2)			
ANAm	14,07	186,2	120	141,1	15	115,1	20	3,7
ANA	16,35	185,1	60	140,9	5	116,7	-	-
TPP	21,07	322,0	120	77,2	35	152,2	30	77,7

Tabla 8: Parámetros de análisis LC-(QqQ)MS/MS para el análisis de ANA, ANAm y el control interno de extracción TPP.

Las columnas analíticas convencionales de fase reversa tales como C₈ (150 mm largo x 4,6 mm; 5 µm tamaño de partícula, no proporcionaron una separación eficiente de dichos compuestos en 30 minutos de análisis, independientemente del gradiente de solventes empleado. Por este motivo se utilizó una columna de grandes dimensiones (fase C₁₈, 250 mm largo x 3 mm; 5 µm tamaño de partícula) como se describe en la sección experimental. Esta mostró un cambio en el orden de elución de los analitos pero aumentó la separación (ΔT_R ANA-ANAm = 2,3 min.) haciendo posible la estabilización de la fuente de ionización, mejorando la respuesta analítica obtenida luego del cambio de polaridad. La identificación de ANA y ANAm se basa en la coincidencia de tiempos de retención (estándar vs.

muestra problema) y la identificación de las transiciones SRM seleccionadas dentro de la tolerancia aceptada (SANCO 2011) tal como se reporta en la Tabla 8.

Desafortunadamente, ANA solo posee una transición notable (m/z 185,1→140,9) cuando es analizada por QqQ-MS/MS en condiciones optimizadas de fragmentación, independientemente de su concentración en el rango estudiado. La sensibilidad de la segunda transición (m/z 185,1→115,1) es demasiado baja y esta señal desaparece en condiciones de cromatografía. La Figura 36 muestra las transiciones SRM obtenidas para un estándar de ANA bajo análisis cromatográfico.

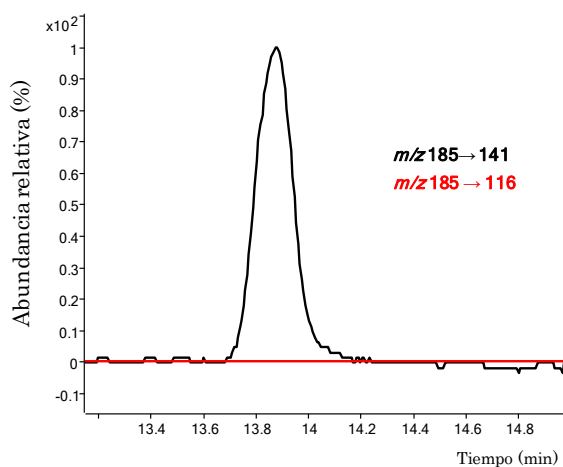


Figura 36: Cromatogramas SRM de LC-QqQ-MS/MS en el análisis de un estándar de ANA a 1mg/L. Se observa que la transición m/z 186 →115 (trazo rojo) no se realiza.

Bajo condiciones óptimas de análisis instrumental, el cromatograma MRM transcurre en tres zonas SRM que varían entre las transiciones buscadas y la ionización de la fuente ESI, tal como se muestra en la Figura 37.

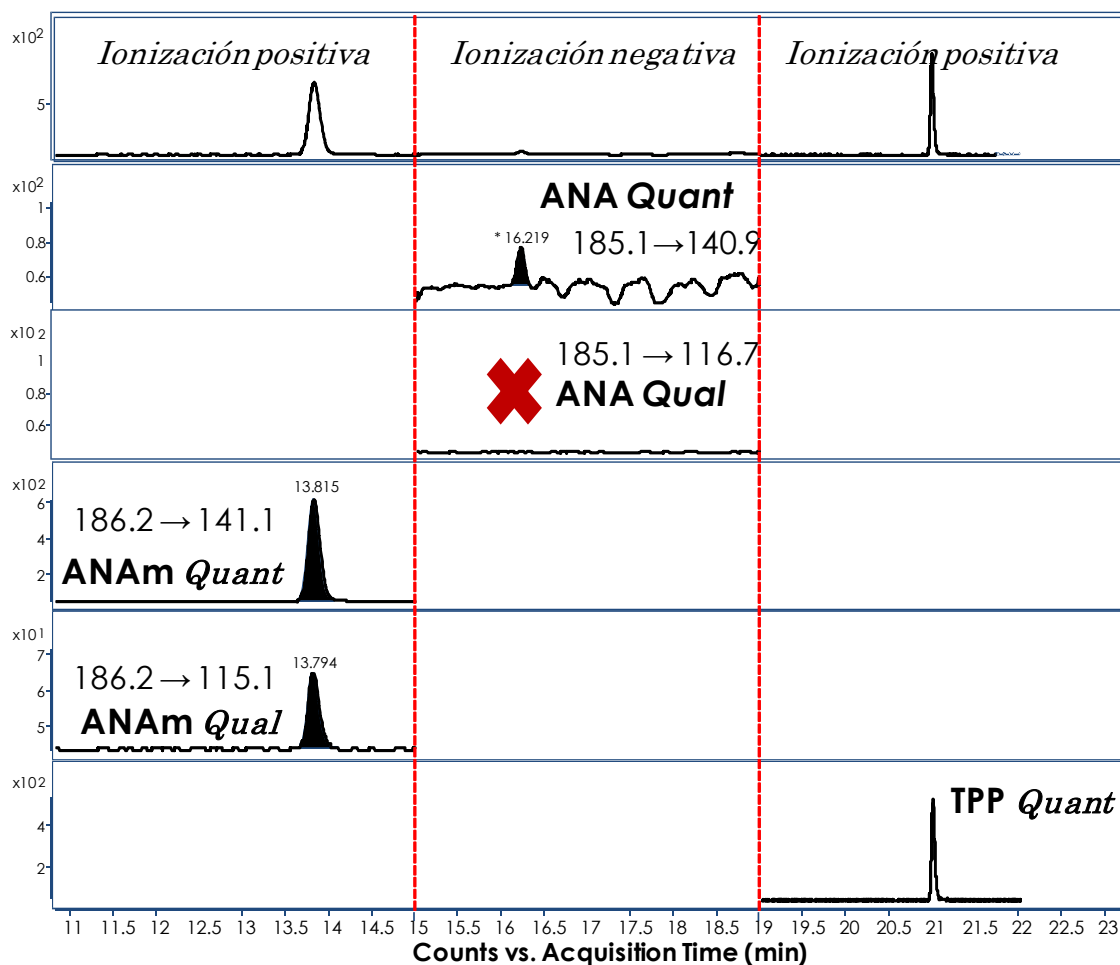


Figura 37: Cromatograma SRM de ANA, ANAm y TPP por LC-(QqQ)MS/MS.

Debido a que no es factible la confirmación de ANA por LC-(QqQ)MS/MS, es necesaria una técnica instrumental auxiliar a tal propósito. La estrategia analítica ensayada mediante un segundo análisis, incluye una confirmación inequívoca de residuos de ANA, con medición de las masas exactas por LC-ESI(-)-QTOF operando en modo de barrido de MS, del ion molecular de ANA ($[M-H]^-$) y el ion producto de su descarboxilación ($[M-H-CO_2]^-$). Las rutas de fragmentación propuestas para ANA y ANAm por ESI (-) y (+), respectivamente, son mostradas en la Figura 38.

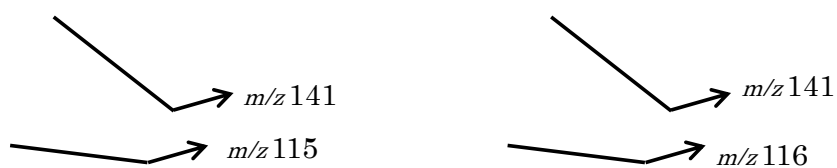


Figura 38: Fragmentaciones ESI (+) de ANAm y ESI (-) de ANA.

En LC-QTOF-MS fueron estudiadas las condiciones de ionización para lograr la mayor sensibilidad y selectividad para ANA. Se encontró que varios parámetros como la temperatura del capilar, la temperatura del gas de secado y el voltaje de fragmentación para una disociación inducida por colisión de iones (CID) en la fuente ESI, tienen fuerte influencia sobre la sensibilidad y la abundancia relativa de los iones producto de este analito. Las condiciones finalmente seleccionadas para ANA incluyen un voltaje de fragmentación muy débil (90V), una temperatura del capilar de 350°C y una temperatura de secado de gas de 150 °C. Los análisis fueron llevados a cabo bajo las condiciones de barrido de MS (full scan) y analizados mediante búsqueda en el cromatograma de iones extraídos (XIC) de la molécula desprotonada ($[M-H]^-$) de ANA (m/z 185,0608; fórmula $[C_{12}H_9O_2]^-$) a partir del cromatograma total de iones (TIC) utilizando una ventana de exactitud de 20 ppm en la extracción de iones. El tiempo de retención obtenido para ANA fue de 12,9 min. Bajo estas condiciones, ANA produce sólo un ion fragmento que corresponde a su decarboxilación ($[M-H-CO_2]^-$) con m/z 141,0710, fórmula $[C_{11}H_9]^-$, con abundancia similar al ion padre. La masa exacta de la molécula desprotonada de ANA pudo ser confirmada bajo estas condiciones a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tanto en extractos de tomate como de

zucchini, superando los requisitos de toma de decisión por LMRs. De los datos obtenidos, esta técnica ofrece un alto grado de capacidad de confirmación debido a su capacidad de medir exactitudes de masas con errores inferiores a 5 ppm ($< 2\text{mDa}$ en el rango $50\text{-}400\text{ m/z}$). Un ejemplo de confirmación de ANA por LC-QTOF es mostrado en la Figura 39. La distribución de las masas exactas a un tiempo de retención adecuado junto con la presencia de los dos iones (que evidencian una pérdida de CO_2) con buena exactitud de masa, confirman el hallazgo. En resumen, la confirmación de ANA se basa en (i) tiempo de retención y transición (m/z $185 \rightarrow 141$) por LC-QqQ y (ii) tiempo de retención y masas exactas de las m/z $185,0608$ y $141,0710$ por LC-QTOF.

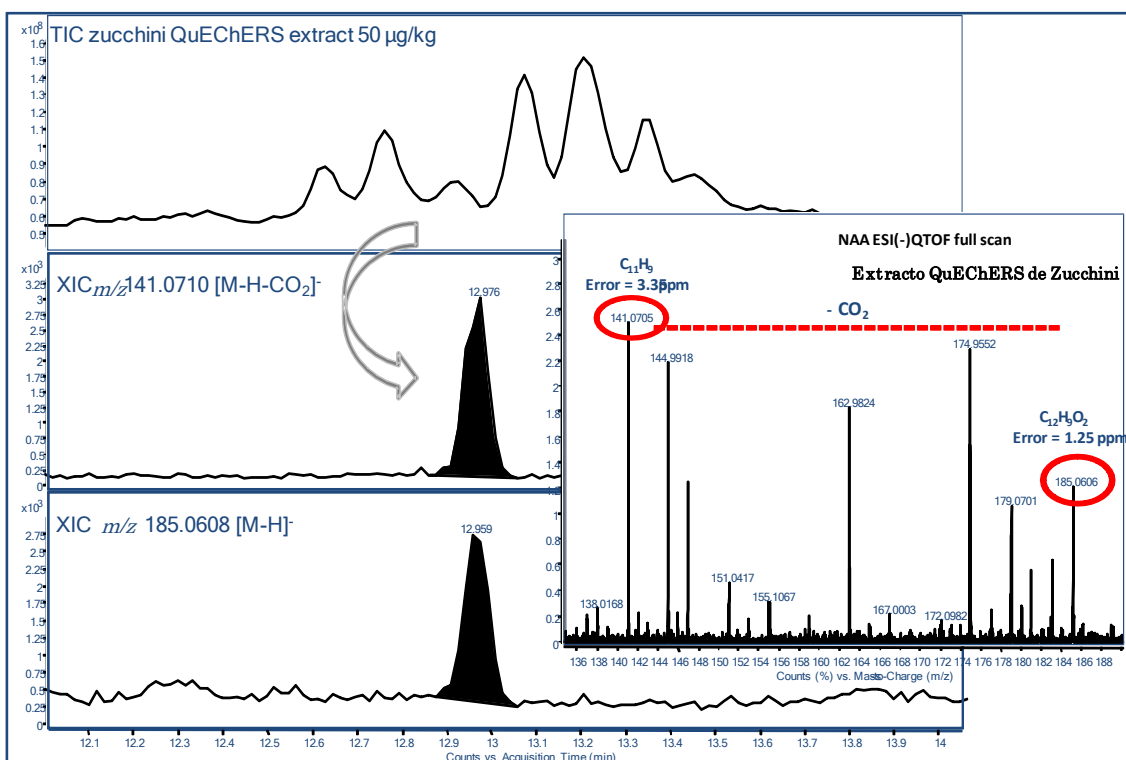


Figura 39: Confirmación de residuos de ANA en zucchini fortificado a $50\text{ }\mu\text{g/kg}$ por LC-QTOF-MS. Detalle de XICs de m/z $185,0608$ y $141,0710$ y espectro de masas en el barrido de MS identificando los iones con los respectivos errores de masas.

2.2.3.2 Evaluación de métodos de preparación de muestra

Las cifras de mérito estudiadas fueron recuperación, linealidad, efecto matriz, repetibilidad y reproducibilidad en dos matrices de alto contenido en agua, como el zucchini y el tomate en los que se sospecha se utilizan hormonas. Para los tres métodos de extracción estudiados, la validación fue realizada de la misma manera. La linealidad de estos en el sistema (QqQ)MS/MS se evaluó mediante la obtención de respuestas, de extractos blanco de cada metodología evaluada, fortificados progresivamente con siete niveles de concentración de ANA y ANAm, entre 1 y 500 $\mu\text{g/L}$. Las recuperaciones y su precisión (evaluada como desviaciones estándar relativas, DSR en %) se reportaron como el promedio de cinco análisis de matrices blanco fortificados con analitos en concentraciones de 20 y 100 $\mu\text{g/kg}$ para ANAm y de 50 y 100 $\mu\text{g/kg}$ para ANA. La repetibilidad y reproducibilidad fueron expresadas como DSR (%) ($n = 5$) de los análisis intra e inter-días, evaluada entre 1 y 5 días por dos analistas independientes, respectivamente. Los efectos matriz fueron obtenidos como el cociente de las pendientes de calibración en cada matriz con cada método, sobre la obtenida en disolvente puro (Kmellar *et al.* 2008), para el rango 1-500 $\mu\text{g/L}$. Las rectas de calibración mostradas en la Figura 40 evidencian un marcado efecto matriz de supresión de señal para ANA y ANAm en tomate para las tres metodologías evaluadas. Por otra parte, el efecto de supresión en zucchini es generalmente inferior al obtenido en tomate, siendo despreciable en otros casos e incluso se muestra como aumento de señal tal como se ve para ANA por el método de mini-Luke.

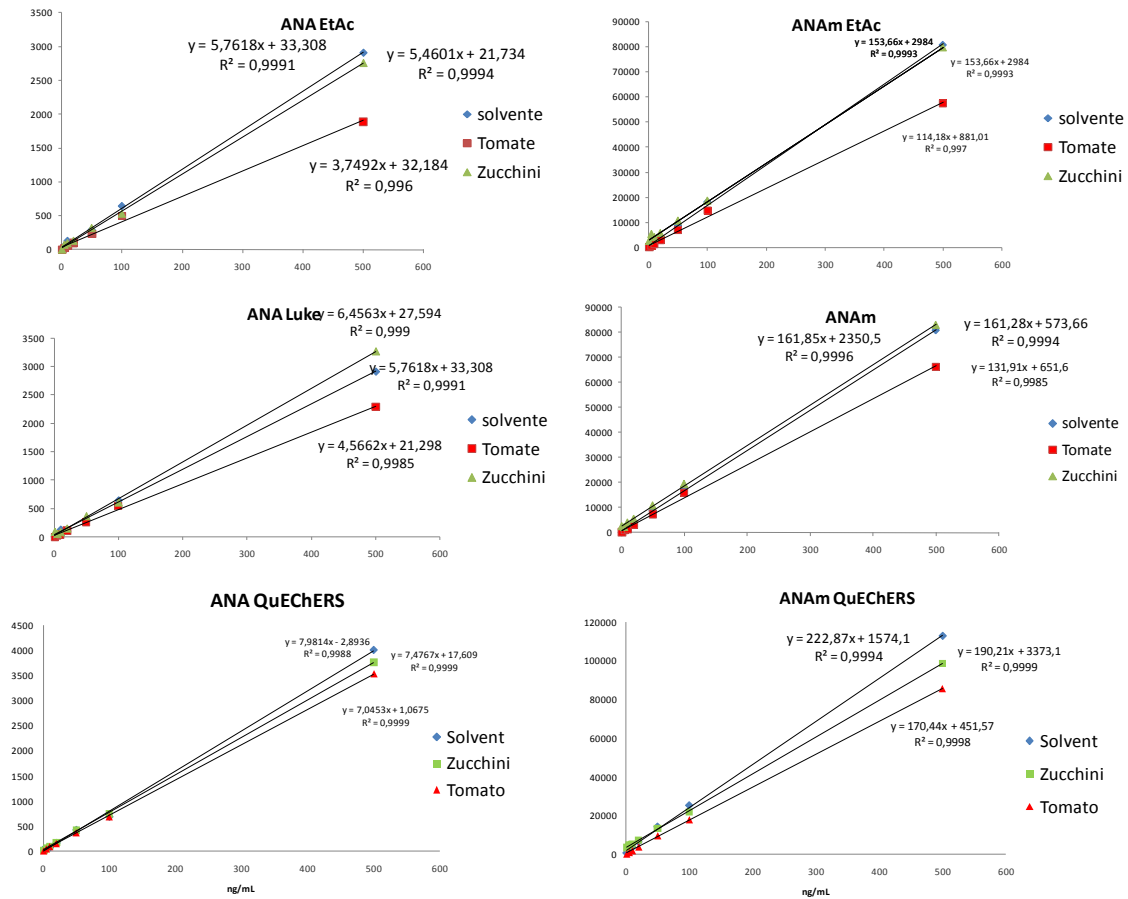


Figura 40: Curvas de calibración de ANA y ANAm en tomate y zucchini para los tres métodos de preparación de muestra evaluados con determinación LC-QqQ-MS/MS. Señal representada: Área SRM1.

La Tabla 9 muestra los resultados del estudio de recuperaciones en matrices de tomate y zucchini. Se utilizaron calibraciones en matriz de los analitos con fines cuantitativos. Los LODs fueron inferiores a 10,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para la ANA y 6,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para el ANAm. Las recuperaciones obtenidas para ANA variaron entre 73,8-107,0% con DSR <10,1% para el mini-Luke; 76,2-106,9% con DSR <10,7% para AcOEt y 76,2-84,9% con DSR <7,3% para QuEChERS.

		TOMATE		ZUCCHINI		
Nivel / método	Analito	Recuperación (%)	DSR (%)	Recuperación (%)	DSR(%)	
Nivel bajo	50 ppb Mini-Luke	ANA	107,0	10,1	86,7	1,8
	20 ppb Mini-Luke	ANAm	73,8	15,1	93,1	2,4
	50 ppb AcOEt	ANA	98,2	10,7	95,9	4,4
	20 ppb AcOEt	ANAm	99,4	1,5	76,2	1,6
	50 ppb QuEChERS	ANA	81,9	7,2	84,9	7,1
	20 ppb QuEChERS	ANAm	88,4	4,6	76,8	3,7
Nivel alto	100 ppb Mini-Luke	ANA	92,7	9,7	98,3	6,3
	100 ppb Mini-Luke	ANAm	95,4	5,5	102,1	3,5
	100 ppb AcOEt	ANA	106,9	4,5	82,6	4,5
	100 ppb AcOEt	ANAm	97,8	4,0	91,6	2,9
	100 ppb QuEChERS	ANA	81,5	5,8	76,2	7,3
	100 ppb QuEChERS	ANAm	92,5	5,0	89,5	1,4

Tabla 9: Recuperaciones (%) y DSR(%) para niveles bajo y alto de ANA y ANAm en tomate y zucchini.

Por otro lado, para ANAm, las recuperaciones variaron desde 73,8-102,1% con DSR <15,1% para el mini-Luke; 76,2-97,4% con DSR <4,0% para AcOEt y 92,5-98,2% con DSR <7,2% para el método QuEChERS. El resto de cifras de mérito evaluadas se presentan en la Tabla 10. Las curvas de calibración presentaron valores de r^2 superiores a 0,996 en todos los casos. La valoración de precisión intradía se determinó a partir de la inyección repetida de extractos fortificados al valor inferior de LMR de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en varias matrices vegetales. La precisión interdía fue adquirida a través del análisis de estos extractos durante cinco días consecutivos.

Las DSR obtenidas en los estudios intradía fueron inferiores a 12,4% para ANAm y 10,7% para ANA, mientras que las interdía fueron inferiores a 17,8% para ANAm y 11,3% para ANA. El EM para tomate usando el método de AcOEt fue estimado en (-34,9%) para ANA y (-29,2%) para ANAm. En tanto, el EM obtenido al realizar QuEChERS y mini-Luke fue bajo en ambos casos. Por otro lado, los LODs y LOQs fueron calculados para los extractos fortificados con ANAm utilizando el método gráfico en la concentración más baja en la que SRM₂ produce relaciones S/N de 3 y 10, respectivamente. Sin embargo, para ANA el LOD y LOQ fue determinado para a la única transición disponible (SRM₁). Bajo estas condiciones, los LOQs fueron inferiores a 20 µg/kg para ANAm y 33,6 µg/kg para ANA.

		Pendiente	r^2	EM (%)	Precision (DSR, %)		LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)	
					Intra-día	Inter-día			
ANAm	Tomate	Solvente	161,24	0,999	–	–	–	3,1 ^a	10,2 ^a
		Mini-Luke	131,91	0,999	-18,2	12,4	17,1	6,0 ^a	20,0 ^a
		EtAc	114,18	0,997	-29,2	1,5	4,4	3,0 ^a	10,0 ^a
		QuEChERS	128,37	0,999	-20,4	3,1	3,4	5,0 ^a	16,6 ^a
	Zucchini	Mini-Luke	161,85	0,999	0,4	3,5	17,8	5,0 ^a	16,6 ^a
		EtAc	153,66	0,999	-4,7	2,9	7,2	1,5 ^a	5,0 ^a
		QuEChERS	137,61	1,000	-14,7	1,2	10,6	4,8 ^a	16,0 ^a
ANA	Tomate	Solvente	5,76	0,999	–	–	–	5,2 ^b	17,2 ^b
		Mini-Luke	4,56	0,999	-20,8	10,1	7,7	3,2 ^b	10,6 ^b
		EtAc	3,75	0,996	-34,9	10,7	1,3	8,3 ^b	27,6 ^b
		QuEChERS	5,08	1,000	-11,7	5,5	5,2	6,5 ^b	21,6 ^b
	Zucchini	Mini-Luke	6,45	0,999	12,0	6,3	1,4	6,7 ^b	22,3 ^b
		EtAc	5,46	0,999	-5,2	4,5	11,3	10,1 ^b	33,6 ^b
		QuEChERS	5,39	1,000	-6,4	8,3	6,7	6,0 ^b	20,0 ^b

$$\text{EM (\%)} = ((\text{pendiente en matriz} / \text{pendiente en solvente}) - 1) \times 100$$

0 ^a Datos referidos al ion SRM₂ ^b Datos referidos al ion SRM₁

1

2 Tabla 10: Datos de validación obtenidos en ambas matrices por tres métodos MRM ensayados. Repetitividad y reproducibilidad
 3 expresadas como DSR (%) inter e intra-día calculada a un nivel de concentración de 50 $\mu\text{g/kg}$ (EU LMRs típico para frutas y vegetales).

4

En relación de estos parámetros, los tres métodos MRM pueden ser considerados comparables para las matrices estudiadas de acuerdo a las directrices de la UE sobre validación de métodos de análisis de residuos de pesticidas (SANCO 2011), cumpliendo además con los requisitos regulatorios de residuos en alimentos (EC 2005).

Bajo estos procedimientos fueron analizadas 4 muestras de tomate y 4 de zucchini obtenidas de supermercados locales (Almería, España). En todas las muestras de zucchini fueron identificados residuos del ANAm. Tres de estas muestras presentaron residuos por debajo del LOQ, mientras que una muestra contenía 7,0 µg/kg del ANAm. No fueron detectados residuos de ANA en las muestras analizadas. En vista de estos resultados, se confirma la utilización de ANAm en el paquete tecnológico utilizado para el cultivo de zucchini, aunque cumplen con los LMRs vigentes en la UE.

2.2.4 Conclusiones

Se demuestra que es posible la inclusión de las hormonas ácido 1-naftilacético y 2-(1-naftil)acetamida en el alcance de métodos multiresiduo utilizados en el ámbito de los laboratorios de control de residuos. Tanto el método mini-Luke, AcOEt y QuEChERS acetato con determinación por LC-(QqQ)MS/MS demostraron capacidades satisfactorias de análisis. Sin embargo, la limitación de esta técnica instrumental requiere una técnica complementaria de confirmación de ANA de forma de evitar falsos positivos o negativos. La confirmación de ANA fue llevada a cabo mediante el uso de medidas de masa exacta proporcionadas por un sistema LC-QTOF operando en modo de barrido de MS. Fueron detectados residuos de

ANAm en muestras analizadas de zucchini de mercados locales de Almería, que cumplan con la reglamentación Europea. Sin embargo, aun es necesario un mayor conocimiento sobre la ocurrencia de reguladores de crecimiento en alimentos por lo que este estudio alienta la inclusión de estos analitos en futuros programas de control de agroquímicos en los alimentos de origen vegetal.

2.3 Transferencia de residuos de pesticidas a la infusión de yerba mate: relación con las propiedades fisicoquímicas y estimación toxicológica

2.3.1. Introducción

El mate es la infusión preparada con hojas secas y molidas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*), una planta altamente consumida en Uruguay, Brasil, Argentina y Paraguay. Las hojas de yerba mate, son ricas en cafeína, motivo por el cual su consumo es un hábito que se está extendiendo a otras regiones del mundo. En la cuenca del Río de la Plata, la infusión es preparada y consumida de una manera muy peculiar; una porción de hojas secas, tostadas y desmenuzadas (entre 50-70g) de yerba mate son colocadas dentro de una recipiente (también llamado mate), mientras que pequeñas porciones de agua caliente son vertidas sobre la yerba mate, se dejan reposar durante unos segundos para posteriormente beber la infusión resultante a través de una succión por un tubo de acero llamado bombilla. El procedimiento se repite hasta que el material herbario es insípido o pierde atracción por el consumidor (Vázquez & Moyna 1986; MSP 1994).

En promedio, unas 300.000 toneladas de yerba mate son producidas anualmente para consumo en América del Sur. Uruguay es el mayor consumidor per cápita de esta hierba, con un promedio anual de 9,4 kg por habitante al año. La población Argentina presenta un consumo promedio anual de 6,7 kg por habitante (CAMBADU 2009). La yerba mate también es consumida en forma de infusión fría en Paraguay, en bolsitas sumergibles en Europa, especialmente en Alemania y recientemente, bajo forma de refrescos energizantes comercializados en EE.UU. y Canadá (Goldenberg *et al.* 2003). La yerba mate es conocida sobre todo por su capacidad estimulante y diurética debido al contenido en metil-xantinas: cafeína

(0,5-0,8%), teofilina (0,01 a 0,08%), y la teobromina (0,03%). Existen además reportes de propiedades antioxidantes de la yerba mate sobre la captación de los radicales libres (Assis *et al.* 2006) y sobre el adelgazamiento (Dickel *et al.* 2007).

El *Ilex paraguariensis* es un pequeño arbusto cultivado en Argentina, sur de Brasil y Paraguay cuyas estrategias tradicionales de control de plagas incluyen, entre otros, el uso de insecticidas seguido de fungicidas y en menor medida herbicidas con el fin de mejorar los rendimientos y la productividad (Schmalko *et al.* 2002; Prat 2003). Este uso generalizado de pesticidas puede dar lugar a la presencia de residuos en el producto comercial. Cabe destacar que aunque la población susceptible al consumo de yerba mate asciende a 50 millones de personas únicamente en la región del Mercosur, aun no se han establecido LMRs en ningún país miembro.

Recientemente, ha sido estudiada la transferencia de pesticidas durante el proceso de infusión del té (*Camelia sinensis*) (Jaggi *et al.* 2001; Kumar Tewary *et al.* 2005; Gupta & Shanker 2008; Gupta *et al.* 2008; Sharma *et al.* 2008; Manikandan *et al.* 2009), infusión de menta (*Menta piperita*) (Ozbey & Uygun 2007) y té de tilo (*Tilia cordata*) (Lino & Silveira 1997). Se ha visto que el pasaje a la infusión de los pesticidas desde el material herbario depende entre varios factores, de las propiedades fisicoquímicas que los contaminantes poseen, tales como su solubilidad en agua (S_w), coeficiente de reparto octanol – agua (Kow) y la constante de Henry (KH) (Nagayama 1996).

Con el fin de conocer la contribución de la yerba mate a la ingesta diaria de residuos de pesticidas en una población como la uruguaya, se planteó investigar la transferencia de pesticidas de yerba mate comercial fortificada, a su infusión, mediante una simulación a las condiciones de ingesta.

En este trabajo se determina la transferencia de residuos de pesticidas durante el proceso de extracción en relación con las propiedades fisicoquímicas de los pesticidas y sus niveles de residuos. Estos resultados pretenden comprender la contribución de la ingesta de pesticidas por los consumidores de mate y sus potenciales efectos adversos desde una perspectiva realista.

Por esta razón, se estiman los niveles admisibles de residuos (NRAs o ARLs en sus siglas en inglés) calculados de acuerdo a documentos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el control de calidad de plantas medicinales de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$NRA = \frac{IDA \times T \times P}{100 \times IDM}$$

Donde:

- ❖ NRA = nivel individual de residuos admisible (en mg/kg de material vegetal).
 - ❖ IDA = máxima ingesta diaria admisible de un pesticida (mg/kg de peso corporal).
 - ❖ T = factor de extracción o transferencia que determina la tasa de transición del pesticida de la hierba a la infusión.
 - ❖ IDM = La ingesta media diaria de producto herbario (en kg), ~0,03 kg para la población uruguaya.
 - ❖ P = peso corporal (kg), 60 kg de referencia para un adulto.
-

2.3.2 Materiales y métodos: artículo científico N°4 (ANEXO 5)⁵

⁵ Transfer of pesticides to the brew during mate drinking process and their relationship with physicochemical properties

Pérez-Parada, A.; González, J.; Pareja, L.; Geis-Asteggiante, L.; Colazzo, M.; Niell, S.; Besil, N.; González, G.; Cesio, V.; Heinzen, H.

Journal of Environmental Science and Health Part B (2010) 45, 830–837

2.3.3 Resultados y Discusión

El estudio de la transferencia de pesticidas a las infusiones durante la preparación de bebidas como el té es relativamente reciente (Ozbey & Uygun 2007; Gupta & Shanker 2008; Gupta *et al.* 2008; Sharma *et al.* 2008; Kaushik *et al.* 2009; Manikandan *et al.* 2009; Banerjee *et al.* 2010). El agua caliente posee la capacidad de extraer parcialmente residuos de determinados pesticidas hacia la infusión junto con los compuestos responsables del sabor y el aroma de las plantas (Manikandan *et al.* 2009). Sin embargo, hasta el momento, no hay reportes sobre la presencia de residuos de pesticidas en hojas de *Ilex paraguariensis*, así como la porción de residuos transferida a la infusión. La tasa de transferencia de pesticidas evaluada como porcentaje de transferencia (T (%)) , se encuentra influenciada principalmente por el método de extracción además de las propiedades fisicoquímicas de los analitos a extraer (Lino & Silveira 1997; Jaggi *et al.* 2001).

De esta forma se propone que una simulación de extracción conjuntamente con la determinación de residuos que han sido transferidos a la infusión permite comprender y/o predecir el comportamiento de los pesticidas en un escenario realista. El modelo de simulación empleado fue desarrollado tomando en cuenta las características experimentales de tomar mate, tanto en masa de yerba utilizada, tamaño del recipiente contenedor, temperatura y cantidad de agua entre cebadura y otras características que constituyen al ritual de bebida tal como el tiempo de macerado (por cebadura) en la preparación de la infusión. Basta considerar las diferencias entre el proceso de infusión del mate y el té, donde la maceración es en única etapa durante 2-6 minutos en una relación 100:1 a 100:2,5 entre agua y hierba (Jaggi *et al.* 2001; Gupta *et al.* 2008). El mate tiene menor tiempo de

preparación de infusión (30 s), la temperatura del agua suele ser menor (80 ± 5 °C), la cantidad de la hierba es mayor (alrededor de 60 g) y es una bebida que luego de preparada se sirve repetidas veces mediante el agregado de pequeñas porciones de agua caliente sobre el mismo material vegetal (alrededor de 30 mL) generalmente en recipientes térmicos de 1L de volumen.

En este trabajo fue estudiado el comportamiento de 18 insecticidas dentro de los que se incluyen 12 pesticidas organofosforados, 5 piretroides sintéticos y un pesticida organoclorado que fueron considerados relevantes dentro del paquete sanitario empleado en el cultivo de yerba mate (Schmalko *et al.* 2002; González *et al.* 2006; Niell *et al.* 2008).

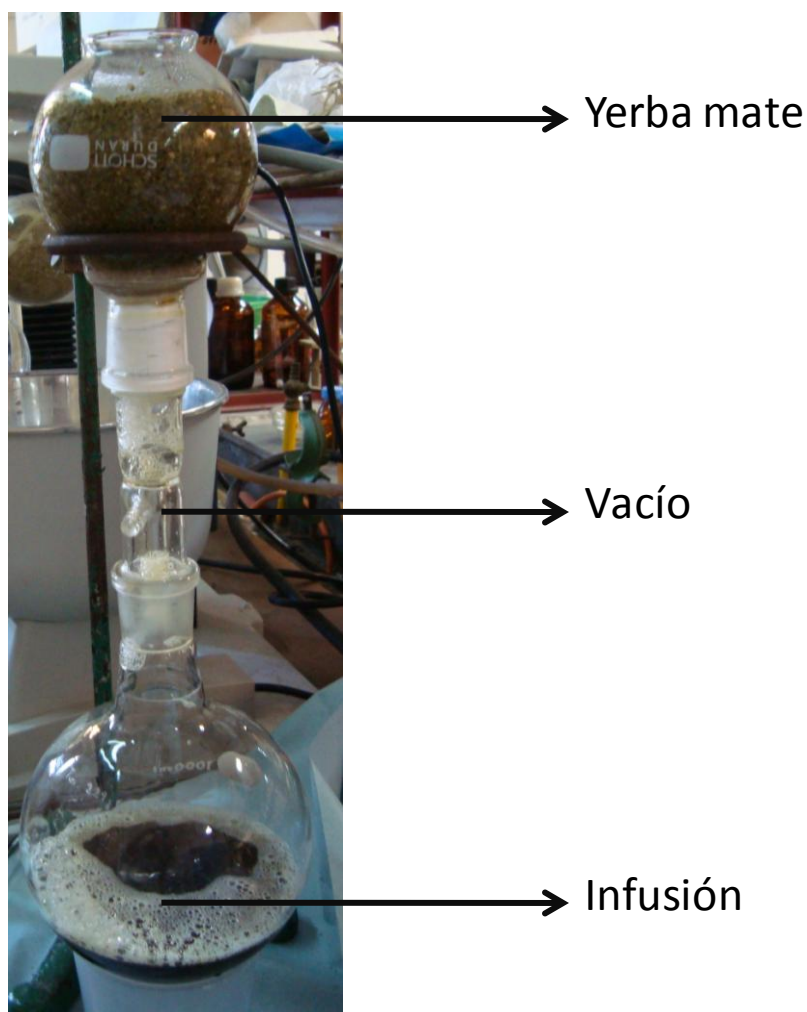


Figura 41: Simulador de mate de vidrio utilizado para extraer los pesticidas de la yerba mate.

El comportamiento de los pesticidas fue estudiado mediante la determinación de T (%) de los pesticidas seleccionados. La Figura 41 muestra el artefacto de simulación empleado. El mismo consta de una pieza de vidrio que simula la forma del mate y otras piezas de vidrio encastradas que pueden conectarse a una línea de vacío que permiten succionar la infusión en un recipiente inferior. El análisis de los residuos de pesticidas en la propia infusión se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por (Ozbey & Uygun 2007). Este consta en una partición inicial con solvente orgánico. Para esto, 100 mL de infusión son

particionados con porciones de CH_2Cl_2 donde posteriormente la fase orgánica colectada es secada con Na_2SO_4 , concentrada a presión reducida hasta sequedad y reconstituida en 3 mL de CH_2Cl_2 . Luego se procede a una etapa de purificación del extracto por SPE en columna de Florisil con elución de CH_2Cl_2 de forma de eliminar pigmentos. El eluato es reconstituido en una solución de bromofos metil (estándar interno) a 1 mg/L y este extracto fue analizado por GC-ECD y GC-FPD.

El cometido de la etapa de purificación del extracto es debido a que se encuentra un perfil muy similar al encontrado en las infusiones de té debido a las grandes cantidades co-extraídas durante la infusión de de metil-xantinas (principalmente cafeína) y polifenoles.. La exactitud del método fue evaluado mediante un estudio de recuperaciones a 1 mg/L de infusión para los pesticidas estudiados. Tal como han considerado otros autores, el estudio recuperación fue realizado a esta única concentración suponiendo que T (%) varía con el tipo de plaguicida, siendo independiente de la concentración de residuos (Nagayama 1996; Jaggi *et al.* 2001). La mayoría de los pesticidas fueron extraídos con recuperaciones entre 70-120% y DSRs < 20% tal como muestra la

Tabla 11.

Estos resultados podrían considerarse aceptables dentro de los parámetros de la guía europea de validación de métodos multirresiduo de pesticidas en alimentos (SANCO 2011). Sin embargo, las recuperaciones de piretroides analizados por GC-ECD (λ -cihalotrina, cipermetrina, deltametrina) así como de metidation analizado por GC-FPD, fueron superiores a este rango sugerido, además de que λ -cihalotrina y cipermetrina poseen alta dispersión de DSRs (>20%). Esto puede ser debido a que estos compuestos se eluyen en una zona del cromatograma que está sujeta a alto

nivel de interferencias que coeluyen y aumentan el nivel de ruido y contribuyen a pérdida de especificidad de señal.

2.3.3.1 Transferencia de pesticidas a la infusión de yerba mate y relación con propiedades fisicoquímicas

Los porcentajes de transferencia de los pesticidas desde la yerba mate a la infusión se resumen en la Tabla 12. Los T (%) obtenidos varían desde 6,40 hasta 0,08% con precisiones evaluadas como DSRs generalmente inferiores a 20%, aunque cipermetrina, dimetoato y $\alpha+\beta$ endosulfán mostraron DSRs <25% ($n=5$). Estos altos valores de dispersión están en general asociados a los pesticidas menos solubles en agua. El T (%) para dimetoato fue el más alto (6,40%), seguido por el de malatión y metidatión (2,79 y 2,73% respectivamente). Por otro lado, los residuos de deltametrina fueron los menos extraídos (0,08%) bajo este proceso. La tendencia y valores de T (%) obtenidos es comparable a los reportados en otros procesos de infusión como en el té (Nagayama 1996; Jaggi *et al.* 2001; Manikandan *et al.* 2009), y a otras infusiones (Lino & Silveira 1997; Ozbey & Uygun 2007) aunque los T (%) hallados en yerba mate fueron más bajos a estas otras infusiones realizadas en una única etapa. El T (%) de los pesticidas en este estudio fue relacionado con su solubilidad en agua (Sw.). La Figura 42 muestra un gráfico donde se representa la T (%) encontrada en función del log Sw de los pesticidas.

	Recuperación (%)	DSR (%)	GC-FPD	GC-ECD	T _{R,R}
(Z+E)	89,4	9,2	†		1,07
Clorpirifos	101,1	4,7	†		0,98
Clorpirifos-metil	83,4	7,1	†		0,88
Coumafos	78,2	7,3	†		1,41
λ-Cihalotrina	124,5	22,8		†	1,48/1,52
Cipermetrina	140,2	25,7		†	1,77/1,78
Deltametrina	178,3	18,4		†	1,86/1,88
Diazinon	84,2	14,3	†		0,78
Diclofention	94,3	2,2	†		0,91
Dimetoato	64,2	15,6	†		0,80
α+β Endosulfan	112,5	14,2		†	1,04/1,43
Etion	84,5	2,4	†		1,24
Fenvalerato	116,3	14,7		†	1,83/1,84
Malation	83,4	7,1	†		0,97
Metidation	128,2	14,7	†		1,11
Paration-metil	118,2	17,6	†		0,93
Pirimifos-metil	87,6	13,2	†		0,94
Propetamfos	74,3	8,1	†		0,85
τ-Fluvalinato	105,7	13,2		†	1,85/1,85

Tabla 11: Recuperaciones obtenidas a 1mg/L en infusión de yerba mate. Pesticidas analizados por GC-ECD o GC-FPD y tiempos de retención relativos (TRR). Los compuestos con más de un diastereoisómero poseen diferentes tiempos de retención.

Pesticida	T (%)	DSR (%)	log Kow*	log Sw (mg /L) 20-25°C*	H (Pa m ³ mol ⁻¹) *
(Z+E) Clorfenvinfos	0,76	18,6	3,85; 4,22	2,08; 0,86	—
Clorpirifos	0,43	6,9	4,70	0,15	6,76 x 10 ⁻¹
Clorpirifos-metil	0,44	5,8	4,24	0,41	3,72 x 10 ⁻¹
Coumafos	0,65	17,7	4,13	0,18	3,14 x 10 ⁻³
λ-Cihalotrina	0,12	18,2	4,79	-2,30	2,00 x 10 ⁻²
Cipermetrina	0,21	24,3	7,00	-2,40	2,00 x 10 ⁻²
Deltametrina	0,08	15,4	5,10	-5,70	3,13 x 10 ⁻²
Diazinon	0,63	18,3	3,30	1,78	6,09 x 10 ⁻²
Diclofention	0,67	4,0	5,27	1,07	—
Dimetoato	6,40	21,7	0,70	4,37	1,46 x 10 ⁻⁶
α+β Endosulfan	0,20	24,2	4,74	-0,48	1,48; 7,00 x 10 ⁻²
Etion	0,27	5,4	4,20	0,30	3,85 x 10 ⁻²
Fenvalerato	0,18	11,3	6,60	-5,00	—
Malation	2,79	2,3	2,75	2,16	2,21 x 10 ⁻²
Metidation	2,73	4,0	2,20	2,30	3,30 x 10 ⁻⁴
Paration-metil	0,89	8,7	3,00	1,74	8,57 x 10 ⁻³
Pirimifos-metil	0,59	6,1	4,20	1,00	6,00 x 10 ⁻²
Propetamfos	2,11	6,8	3,82	2,04	—
τ-Fluvalinato	0,16	18,3	4,60	-8,99	4.04 10 ⁻⁵

Tabla 12: Transferencia porcentual de pesticidas a la infusión y datos fisicoquímicos reportados en Tomlin, 2009.

Como era de esperar, los pesticidas con menor Sw presentaron menor T (%), como se observa para los piretroides sintéticos (λ-cihalotrina, cipermetrina,

deltametrina, fenvalerato y τ -fluvalinato) y $\alpha+\beta$ endosulfán. Los pesticidas organofosforados mostraron transferencias intermedias a altas tal como para dimetoato. Aunque Sw juega un papel importante, es conocido que el T (%) se relaciona al Kow y K_H (Nagayama 1996). Una tendencia inversa fue encontrada al representar T (%) en función del log Kow (véase la Figura 43). Se puede observar que cuanto mayor T (%) cada pesticida estudiado posee un menor Kow. De acuerdo con los datos presentados en la Tabla 12, la tendencia relativa de transferencia de cada pesticida podría ser prevista conociendo su Sw y Kow.

De acuerdo con el T (%) obtenido, estos pesticidas pueden ser divididos en tres grupos: los de T (%) <0,2%; aquellos que 0,4% <T (%) <0,9% y T (%) > 1%. Los pesticidas con log Kow > 4,7 y valores negativos de log Sw (Sw <1 mg/L) pertenecen al primer grupo, categorizados como los menos extraíbles. Los pesticidas con T (%) intermedio, poseen un Kow y Sw intermedias comprendidos entre 2,0 <log Kow <4,7 y 0 <log Sw <2,0. Por último, los pesticidas que tienen un log Kow < 2,0 y log Sw > 2,0 mostraron la mayor tasa de transferencia. Por otra parte, no fue obtenida una clara tendencia de proporcionalidad de la extracción de los pesticidas entre T (%) y pK_H (-log de la constante de Henry) (véase Figura 44) aunque un comportamiento general puede ser inferido: T (%) superiores se relacionan con menores valores de pK_H .

Sin embargo, los valores de T (%) descritos en el presente trabajo son inferiores a los reportados en la literatura para otras infusiones. Jaggi *et al.* (2001) reporta valores de T (%) de 3,14 y el 25,8% de clorpirifos y dimetoato en infusión de té, respectivamente, mientras que en este trabajo se encontraron para estos analitos T (%) de 0,43 y 6,40%, respectivamente en yerba mate.

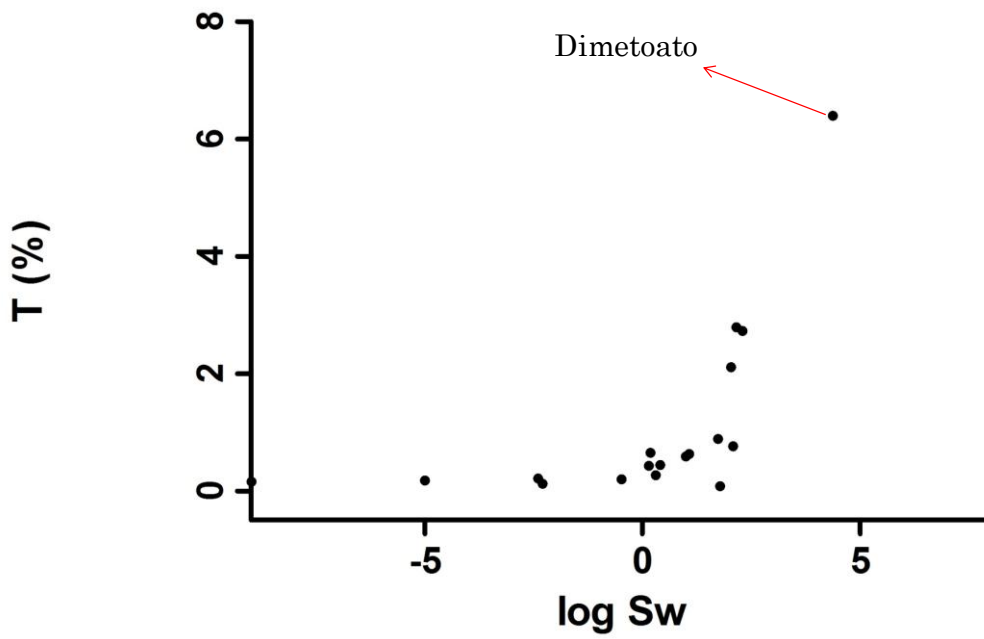


Figura 42: Relación entre log Sw (solubilidad en agua) y T (%) hallado para los pesticidas en yerba mate.

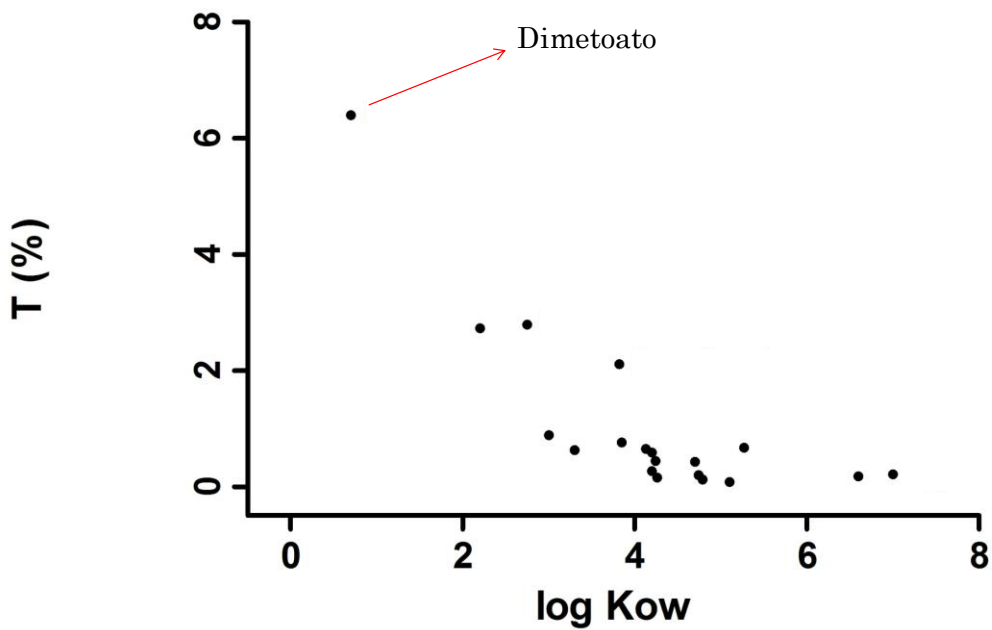


Figura 43: Relación entre log Kow y T (%) hallado para los pesticidas en yerba mate.

Este comportamiento podría explicarse en parte porque la utilización de temperaturas más bajas para preparación de la infusión de yerba mate ($80 \pm 5^\circ\text{C}$) en comparación a las infusiones de té preparadas con agua a 100°C , además de emplear menores tiempos de elaboración de la infusión (30 s) cuando la infusión de té es preparada con maceración entre 2 y 6 min.

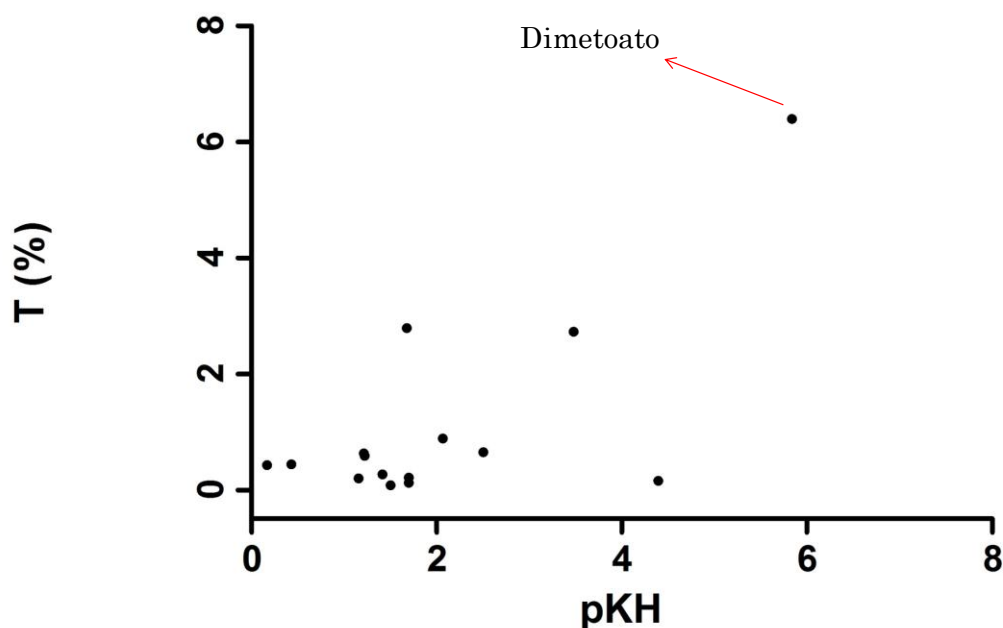


Figura 44: Relación entre pK_H (constante de Henry) y T (%) hallado para los pesticidas en yerba mate.

Debido a que S_w es un parámetro dependiente de la temperatura, la extractabilidad debería ser inferior a menores temperaturas, por lo que es esperable una disminución de T (%). Por otra parte, la transferencia aumenta con el tiempo de infusión (Jaggi *et al.* 2001). Es importante señalar que durante la infusión de mate, no todo el material vegetal está expuesto a extracción simultáneamente. Este hecho podría conducir a la obtención de menores valores de T (%). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que para un nivel de residuos similar,

la cantidad de yerba mate expuesta a extracción es muy superior y por tanto la cantidad de residuos extraídos podría ser mayor. Considerando, por ejemplo, un nivel de residuos de 1,0 mg/kg de dimetoato en té y yerba mate, para 2 g de té, la cantidad de pesticida que se ingerirá será de 0,5 µg, de acuerdo con la transferencia de valores reportados (Jaggi *et al.* 2001); mientras que en una porción de 60 g de yerba mate la fracción potencial de extracción de este pesticida tomando en cuenta el T (%) estimado sería 3,9 µg.

2.3.3.2 Estimación toxicológica

Los LMRs de pesticidas en alimentos tomados en Uruguay y la región son generalmente los establecidos por el Codex Alimentarius. Sin embargo, también son seguidas algunas recomendaciones y requisitos internacionales en el caso de productos cuyo destino es la exportación (Codex Alimentarius 1997; EC 2005; USDA 2010).

Como se comentó anteriormente, los LMRs van asociados a un alimento en particular por lo que es bastante frecuente que haya un vacío de regulación específica para determinados productos de consumo local o regional desde una perspectiva internacional. Sin embargo, la evaluación del riesgo de pesticidas puede ser estimada mediante otros conceptos internacionalmente aceptados como el IDA de un pesticida definidos por la OMS. Los NRAs de los pesticidas en un material vegetal específico pueden ser calculados sobre la base del IDA y los IDM en kg de la planta consumida según lo recomendado por la FAO/OMS en las directrices para el control de calidad de las plantas medicinales (OMS 1997; OMS 1998). Por lo tanto, las NRAs surgen como una buena aproximación de los residuos

aceptables en las muestras comerciales de yerba mate, conociendo los promedios de consumo a nivel local.

La determinación de la T (%) es muy útil para establecer la contribución de la ingesta de infusión de yerba mate a la ingesta diaria de pesticidas para la población susceptible. Los valores IDA de los pesticidas en estudio van desde 0,0002 hasta 0,30 mg/kg de peso corporal, como muestra la

Tabla 13. Tomando en cuenta los valores de T (%) fueron estimados los NRAs de yerba mate en las condiciones ensayadas considerando el MDI de yerba mate MDI uruguayo. Se encontraron NRAs que van desde 0,003 mg/kg para el diazinon hasta casi 18 mg/kg para el malation. Esta estimación podría ayudar a proponer en base a criterios técnicos los LMRs de pesticidas para la yerba mate en la región del Mercosur. Sin embargo, se advierte que los pesticidas diazinon, clorfenvinfos y λ -cyhalotrina, tienen NRAs inferiores a los límites de detección de la mayoría de los métodos analíticos disponibles basados en métodos cromatográficos y al nivel armonizado de 10 μ g/kg de residuos de pesticidas en alimentos según las reglamentaciones contemporáneas más estrictas (CE 2005).

	IDA (mg/kg pc)*	NRA's Estimados (mg pesticida/kg hierba)
(Z+E) Clorfenvinfos	0,0005	0,0081
Clorpirifos	0,0100	0,0921
Clorpirifos-metil	0,0100	0,0943
Coumafos	0,0350	0,4875
λ -Cihalotrina	0,0020	0,0051
Cipermetrina	0,0500	0,2250
Deltametrina	0,0100	0,0171
Diazinon	0,0002	0,0027
Diclofention	—	—
Dimetoato	0,0020	0,2743
α + β Endosulfan	0,0060	0,0257
Etion	0,0020	0,0116
Fenvalerato	0,0200	0,0771
Malation	0,3000	17,936
Metidation	0,0010	0,0585
Paration-metil	0,0030	0,0572
Pirimifos-metil	0,0300	0,3793
Propetamfos	—	—
τ -Fluvalinato	0,0100	0,0343

Tabla 13: Ingesta diaria admisible (IDA) (Codex Alimentarius 1997) y nivel de residuos aceptable (NRAs) calculados para cada pesticida. Los pesticidas que no fueron calculados no presentan IDA reportada por el Codex Alimentarius.

2.3.4 Conclusiones

Se demuestra que los residuos de pesticidas son extraídos parcialmente de la yerba mate durante el proceso infusión y esta extracción guarda relación con las propiedades fisicoquímicas. Los pesticidas con mayor S_w , menor K_{ow} e inferior K_H , presentan superiores tasas de transferencia a la infusión.

Este comportamiento podría extenderse a otros pesticidas aplicados en cultivos de yerba mate, como herbicidas y fungicidas que no fueron incluidos en este estudio. Se deduce que la cantidad de residuos realmente consumidos es varias veces inferior a las que podrían encontrarse en el material vegetal original. Sin embargo, las grandes cantidades de yerba mate que son consumidas diariamente en Uruguay podrían conducir a la ingesta de cantidades no despreciables de pesticidas por esta población, lo que podría sugerir una contribución relevante a la ingesta de pesticidas. El futuro establecimiento de LMRs de pesticidas en yerba mate es necesario para garantizar tanto la realización de buenas prácticas agrícolas como de la protección de la salud de la población susceptible.

2.4 Referencias

- ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., ŠTAJNBAHER, D. & SCHENCK, F.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* **86**, 412-431.
- ASSIS, J.R., DOS SANTOS FREITAS, L., FLORES PETES, V., DARIVA, C., DE OLIVEIRA, J.V. & BASTOS CARAMÃO, E. (2006). Chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): A study of extraction methods. *Journal of Separation Science* **29**, 2780-2784.
- BANERJEE, H., GANGULY, P., ROY, S., BANERJEE, D., PARAMASIVAM, M., BANERJEE, T. & SHARMA, K.K. (2010). Persistence and safety risk assessment of propineb in Indian tea. *Environmental Monitoring and Assessment* **170**, 311-314.
- BOOBIS, A.R., OSSENDORP, B.C., BANASIAK, U., HAMEY, P.Y., SEBESTYEN, I. & MORETTO, A. (2008). Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. *Toxicology Letters* **180**, 137-150.
- CAMBADU (2009) Centro de almaceneros, minoristas y baristas del Uruguay, <http://www.cambadu.com.uy/Informacion/Noticias/Sociedad/mate.html>, consulta 19 de agosto de 2012.
- CE (2005). European Commission, Regulation No 396/2005. *Official Journal of the European Union* **L 70**, 1-34.
- CE (2008). European Commission, Regulation No 149/2008. *Official Journal of the European Union* **L 58**, 1-398.
- CODEx ALIMENTARIUS (1997). "Codex Alimentarius: Pesticide MRLs in food." Joint FAO/WHO Food Standards Programme, consulta el disponible.
- CHEN, H., ZHANG, Z.-X., ZHANG, G.-M., GUO, X.-F., ZHANG, H.-S. & WANG, H. (2010). Liquid Chromatographic Determination of Endogenous Phytohormones in Vegetable Samples Based on Chemical Derivatization with 6-Oxy(acetylpiperazine) Fluorescein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 4560-4564.
- CHIWOCHA, S.D.S., ABRAMS, S.R., AMBROSE, S.J., CUTLER, A.J., LOEWEN, M., ROSS, A.R.S. & KERMODE, A.R. (2003). A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *The Plant Journal* **35**, 405-417.
- DICKEL, M.L., RATES, S.M.K. & RITTER, M.R. (2007). Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* **109**, 60-71.
- EFSA (2011). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance 1-naphthylacetic acid. *European Food Safety Authority Journal* **9**, 2019.
- EURL (2012). "European Union Reference Laboratories." consulta el 6 junio de 2012 disponible en: <http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/home.asp?LabID=500&Lang=EN>.
- FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2005). Pesticide Residue Analysis. *Comprehensive Analytical Chemistry*. A. R. Fernández-Alba. Amsterdam, Países Bajos, Elsevier B.V.
- FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. & GARCÍA-REYES, J.F. (2008). Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **27**, 973-990.
- FERRER, C., AGÜERA, A., MEZCUA, M., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., MACK, D., ANASTASSIADES, M. & GAMÓN, M. (2010). Efficiency evaluation of the main multiresidue methods used in Europe for the analysis of amitraz and its major metabolites. *Journal of AOAC International* **93**, 380-388.
- GAMBINO, G.L., PAGANO, P., SCORDINO, M., SABATINO, L., SCOLLO, E., TRAULO, P. & GAGLIANO, G. (2008). Determination of plant hormones in fertilizers by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection: Method development and single-laboratory validation. *Journal of AOAC International* **91**, 1245-1256.
- GENNARO, M. (2003). Intercalibration of chromatographic methods for auxino phytodrugs in Solanaceae. *Journal of Chromatography A* **993**, 111-119.
-

- GOLDENBERG, D., GOLZ, A. & JOACHIMS, H.Z. (2003). The beverage maté: A risk factor for cancer of the head and neck. *Head and Neck* **25**, 595-601.
- GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R.M., RIAL-OTERO, R., CANCHO-GRANDE, B., GONZALEZ-BARREIRO, C. & SIMAL-GÁNDARA, J. (2011). A review on the fate of pesticides during the processes within the food-production Chain. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **51**, 99-114.
- GONZÁLEZ, J., VILLAGRÁN, V., GONZÁLEZ, G. & HEINZEN, H. (2006). Evaluation of pesticide residues in yerba mate. *European Pesticide Residue Workshop, Corfu, Greece*, 84.
- GUPTA, M. & SHANKER, A. (2008). Persistence of acetamiprid in tea and its transfer from made tea to infusion. *Food Chemistry* **111**, 805-810.
- GUPTA, M., SHARMA, A. & SHANKER, A. (2008). Dissipation of imidacloprid in Orthodox tea and its transfer from made tea to infusion. *Food Chemistry* **106**, 158-164.
- HIEMSTRA, M., TOONEN, A. & DE KOK, A. (1999). Determination of benzoylphenylurea insecticides in pome fruit and fruiting vegetables by liquid chromatography with diode array detection and residue data obtained in the dutch national monitoring program. *Journal of AOAC International* **82**, 1198-1205.
- HOU, S., ZHU, J., DING, M. & LV, G. (2008). Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta* **76**, 798-802.
- IZUMI, Y., OKAZAWA, A., BAMBA, T., KOBAYASHI, A. & FUKUSAKI, E. (2009). Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **648**, 215-225.
- JAGGI, S., SOOD, C., KUMAR, V., RAVINDRANATH, S.D. & SHANKER, A. (2001). Leaching of pesticides in tea brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5479-5483.
- KAUSHIK, G., SATYA, S. & NAIK, S.N. (2009). Food processing a tool to pesticide residue dissipation - A review. *Food Research International* **42**, 26-40.
- KEIKOTLHAILE, B.M., SPANOGHE, P. & STEURBAUT, W. (2010). Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A meta-analysis approach. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 1-6.
- KMELLAR, B., FODOR, P., PAREJA, L., FERRER, C., MARTINEZ-UROZ, M.A., VALVERDE, A. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2008). Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1215**, 37-50.
- KUMAR TEWARY, D., KUMAR, V., RAVINDRANATH, S.D. & SHANKER, A. (2005). Dissipation behavior of bifenthrin residues in tea and its brew. *Food Control* **16**, 231-237.
- LEE, S.J., PARK, A. & IM, M.H. (2010). Feasibility study on mathematically estimating food commodity intake using the limited sources of food recipes in Korea. *Journal of Food Composition and Analysis* **23**, 821-827.
- LEHOTAY, S.J. (2011). QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods. **747**: 65-91.
- LEHOTAY, S.J., MASTOVSKA, K., AMIRAV, A., FIALKOV, A.B., ALON, T., MARTOS, P.A., DE KOK, A. & FERNANDEZ-ALBA, A.R. (2008). Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatography-mass spectrometry and other techniques. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **27**, 1070-1090.
- LEHOTAY, S.J., O'NEIL, M., TULLY, J., VALVERDE GARCÍA, A., CONTRERAS, M., MOL, H., HEINKE, V., ANSPACH, T., LACH, G., FUSSELL, R., MASTOVSKA, K., POULSEN, M.E., BROWN, A., HAMMACK, W., COOK, J.M., ALDER, L., LINDTNER, K., VILA, M.G., HOPPER, M., DE KOK, A., HIEMSTRA, M., SCHENCK, F., WILLIAMS, A. & PARKER, A. (2007). Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. *Journal of AOAC International* **90**, 485-520.
- LEHOTAY, S.J., SON, K.A., KWON, H., KOESUKWIWAT, U., FU, W.S., MASTOVSKA, K., HOH, E. & LEEPIPATPIBOON, N. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A* **1217**, 2548-2560.
- LINO, C.M. & SILVEIRA, M.I.N. (1997). Loss of organochlorine pesticide residues during the infusion processes of Linden (*Tilia cordata* Mill.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 2718-2722.
-

- LIU, B.F., ZHONG, X.H. & LU, Y.T. (2002). Analysis of plant hormones in tobacco flowers by micellar electrokinetic capillary chromatography coupled with on-line large volume sample stacking. *Journal of Chromatography A* **945**, 257-265.
- LU, Q., CHEN, L., LU, M., CHEN, G. & ZHANG, L. (2010a). Extraction and analysis of auxins in plants using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 2763-2770.
- LU, Q., ZHANG, L., CHEN, L., LU, M., TONG, P. & CHEN, G. (2010b). Simultaneous analysis of endogenous and exogenous plant hormones by pressurized capillary electrochromatography. *Journal of Separation Science* **33**, 651-657.
- LU, Q., ZHANG, L., CHEN, T., LU, M., PING, T. & CHEN, G. (2008). Identification and quantitation of auxins in plants by liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**, 2565-2572.
- LUCINI, L. & MOLINARI, G.P. (2010). Fate of the plant growth regulator BNOA (2-naphthylacetic acid) followed by spray application to tomato. *Agrochimica* **54**, 34-40.
- LUKE, M.A., FROBERG, J.E. & MASUMOTO, H.T. (1975). Extraction and Cleanup of Organochlorine, Organophosphate, Organonitrogen, and Hydrocarbon Pesticides in Produce for Determination by Gas-Liquid-Chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **58**, 1020-1026.
- MA, Z., GE, L., LEE, A.S.Y., YONG, J.W.H., TAN, S.N. & ONG, E.S. (2008). Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta* **610**, 274-281.
- MALIK, A.K., BLASCO, C. & PICÓ, Y. (2010). Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *Journal of Chromatography A* **1217**, 4018-4040.
- MANIKANDAN, N., SEENIVASAN, S., GANAPATHY, M.N.K., MURALEEDHARAN, N.N. & SELVASUNDARAM, R. (2009). Leaching of residues of certain pesticides from black tea to brew. *Food Chemistry* **113**, 522-525.
- MEDINA-PASTOR, P., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., MEZCUA, M. & RODRIGUEZ-TORREBLANCA, C. (2010a). Laboratory assessment by combined z score values in proficiency tests: experience gained through the European Union proficiency tests for pesticide residues in fruits and vegetables. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397**, 3061-3070.
- MEDINA-PASTOR, P., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., RODRIGUEZ-TORREBLANCA, C. & ANDERSSON, A. (2010b). European Commission proficiency tests for pesticide residues in fruits and vegetables. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **29**, 70-83.
- MSP (1994). Decreto 315/994 del Poder Ejecutivo de la Republica Oriental del Uruguay. *Reglamento Bromatológico Nacional*, 198-199.
- NAGAYAMA, T. (1996). Behavior of residual organophosphorus pesticides in foodstuffs during leaching or cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 2388-2393.
- NAGAYAMA, T., TAKANO, I., KOBAYASHI, M., TAMURA, Y., TOMIZAWA, S., TATEISHI, Y., KIMURA, N., KITAYAMA, K. & SAITO, K. (2003). Determination of captafol, cyhexatin, 1-naphthylacetic acid and quintozene in apple, Japanese pear and melon by simultaneous extraction. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* **44**, 126-131.
- NAVALÓN, A., BLANC, R. & VILCHEZ, J.L. (1997). Determination of 1-naphthylacetic acid in commercial formulations and natural waters by solid-phase spectrofluorimetry. *Microchimica Acta* **126**, 33-38.
- NIELL, S., PAREJA, L., GONZÁLEZ, J., CESIO, V., VRYZAS, Z., MOURKIDOU, E. & HEINZEN, H. (2008). Comparación de métodos analíticos para la determinación de residuos de plaguicidas en yerba mate. *II Congreso de Fitoterapicos del Mercosur, MG-Brasil*, 128.
- OMS (1997). Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues. *WHO/FSF/FOS/97.7*.
- OMS (1998). Maximum limit of pesticide residues for medicinal plant materials. *Quality control methods for medicinal plant materials*.
- OULKAR, D.P., BANERJEE, K., GHASTE, M.J., RAMTEKE, S.D., NAIK, D.G., PATIL, S.B., JADHAV, M.R. & ADSULE, P.G. (2011a). Multiresidue analysis of multiclass plant growth regulators in grapes by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International* **94**, 968-977.
-

- OULKAR, D.P., KULKARNI, S.& BANERJEE, K. (2011b). Multiresidue analysis of plant growth regulators in grapes by triple quadrupole and quadrupole-time of flight-based liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International* **94**, 1715-1721.
- OZBEY, A.& UYGUN, U. (2007). Behaviour of some organophosphorus pesticide residues in peppermint tea during the infusion process. *Food Chemistry* **104**, 237-241.
- PICÓ, Y., FONT, G., RUIZ, M.J.& FERNÁNDEZ, M. (2006). Control of pesticide residues by liquid chromatography-mass spectrometry to ensure food safety. *Mass Spectrometry Reviews* **25**, 917-960.
- 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.
- PRAT, K.S. (2003). Yerba Mate: Guía de buenas prácticas de producción y manufactura en yerba mate. *Ilex Paraguariensis*, 5-32.
- SANCO (2011). Method validation & quality control procedures for pesticide residues analysis in food & feed. *Document N° SANCO/12495/2011*.
- SAWYER, L.D. (1985). The Luke et al. method for determining multipesticide residues in fruits and vegetables: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **68**, 64-71.
- SCHMALKO, M.E., RAMALLO, L.A., FERREYRA, D.J.& BERLINGHERI, R.D. (2002). Dimethoate degradation in plants and during processing of yerba maté Leaves. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **45**, 419-422.
- SEGURA CARRETERO, A., CRUCES-BLANCO, C., SORIANO PEÑA, M., CORTACERO RAMÍREZ, S.& FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, A. (2004). Determination of phytohormones of environmental impact by capillary zone electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 1419-1422.
- SHARMA, A., GUPTA, M.& SHANKER, A. (2008). Fenvalerate residue level and dissipation in tea and in its infusion. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **25**, 97-104.
- SIGRIST, R., TEMPERLI, A.& HURTER, J. (1974). Fluorometric method for the determination of residues of 1-naphthaleneacetamide and 1-naphthaleneacetic acid on apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **22**, 568-570.
- TOMLIN, C.D.S., ED. (2009). *The Pesticide Manual: a world compendium*. BCPC.Hampshire, Inglaterra.
- USDA (2010). "US Department of Agriculture. International maximum residue level database." consulta el disponible en: www.mrlatabase.com.
- VÁZQUEZ, A.& MOYNA, P. (1986). Studies on mate drinking. *Journal of Ethnopharmacology* **18**, 267-272.
- WILKOWSKA, A.& BIZIUK, M. (2011). Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry* **125**, 803-812.
-

CAPITULO 3: Determinación de contaminantes orgánicos en matrices ambientales



3.1 Antecedentes y consideraciones preliminares

El estudio de contaminantes ambientales es un campo que ha experimentado un gran desarrollo en los últimos tiempos tanto en aspectos regulatorios como analíticos.

La diversificación de las actividades económicas y humanas así como el uso masivo de nuevos productos de consumo, ha generado una variación en las características y clases de contaminantes antropogénicos en diferentes matrices ambientales. Estas nuevas prácticas han llevado a un incremento de los contaminantes orgánicos que atentan contra la calidad y sustentabilidad de los recursos (Barceló & Petrovic 2007). Una de las matrices de mayor estudio son los efluentes urbanos siendo estos, a través de los vertidos, los principales responsables del deterioro de las aguas superficiales. En la actualidad esta instaurado un debate sobre el efecto real de muchas sustancias químicas en el medioambiente. Por tanto, las definiciones han ido evolucionando y hoy los contaminantes químicos son definidos como sustancias que alteran o potencialmente pueden alterar el ecosistema receptor, incluso cuando sus efectos son desconocidos (Terzić *et al.* 2008). En este contexto, han sido recientemente incluidos una gran variedad de xenobióticos que pueden tener diversos efectos sobre la vida ya sea por acción directa o indirecta a concentraciones traza en la propia matriz ambiental. Por lo tanto, el conocimiento de la calidad de los efluentes y su interacción con los sistema acuáticos naturales es fundamental para implementar políticas y acciones para mitigar los impactos ambientales (Hernando *et al.* 2006).El acceso al agua potable por parte de la población se ha incrementado en las últimas décadas, pero su sustentabilidad en una sociedad

moderna de consumo se ve comprometida. La mayor fuente de contaminación de los sistemas acuáticos deriva de las emisiones de aguas residuales, que contienen un amplio rango de contaminantes antropogénicos. La atención en la contaminación del agua se ha expandido recientemente de los contaminantes prioritarios o convencionales a los llamados contaminantes emergentes o nuevos contaminantes, cuya presencia en el medioambiente no es nueva, pero las posibles consecuencias sobre la salud pública y el medio ambiente, aun no son bien conocidas. La lista de nuevos contaminantes incluye productos de higiene personal, fármacos, drogas de abuso, algunos productos industriales y productos de uso doméstico (Barceló & Petrovic 2007; Kolpin *et al.* 2008). Muchos de estos compuestos son persistentes y actualmente omnipresentes en aguas residuales, superficiales y potables. En este sentido, los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) representan el grupo de productos químicos más usados por la población y de mayor interés en la literatura (Richardson 2003; Richardson & Ternes 2005; Richardson 2007; Richardson 2009; Richardson & Ternes 2011).

La presencia de contaminantes emergentes en agua es considerada un indicador de la actividad humana. Los PPCPs no son fáciles de remover en las plantas de tratamientos de efluentes incluso estando muchos de ellos presentes en aguas potables (Richardson & Ternes 2011; Vulliet *et al.* 2011). La evidencia científica reciente posiciona el área de ocurrencia de contaminantes emergentes en los principales planos de evaluación de sustentabilidad de los recursos hídricos. Se han detectado estos compuestos en concentraciones del orden de los ng/L a µg/L (Richardson & Ternes 2011) tanto en aguas residuales, superficiales, subterráneas y potables provenientes de plantas potabilizadoras (Vulliet *et al.* 2011).

Esto ha motivado un cambio desde el punto de vista reglamentario en importantes normativas como las de Estados Unidos y la Unión Europea, donde se ve expresado el interés en el ámbito de contaminación emergente. Actualmente la reglamentación Europea para aguas superficiales continentales tales como de lagos y ríos establece concentraciones máximas admisibles (CMAs) de ciertos contaminantes de naturaleza emergente. Algunos ya han sido considerados de índole prioritario como los difenileteres bromados (PBDEs), nonilfenol y octilfenol aunque otros identificados como potenciales candidatos a contaminantes prioritarios como el bisfenol A, se encuentran bajo proceso de revisión en la lista de prioritarios (EC 2008, Anexo III).

Por otra lado, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) aun no ha establecido límites de concentración ni ocurrencia para contaminantes emergentes pero ha puesto énfasis e interés en el establecimiento de métodos de análisis para el monitoreo de tales compuestos en diferentes matrices ambientales de forma de incrementar el conocimiento y establecer una futura reglamentación, si es apropiado. En el año 2007, se introduce en las normativas USEPA el interés por la contaminación emergente, con la aparición de los métodos USEPA 1694, para determinación de 74 PPCPs y USEPA 1698 para 27 hormonas esteroidales en diversas matrices ambientales, como agua, suelos, sedimentos y biosólidos (USEPA 2008; USEPA 2010).

Desde el punto de vista analítico, el desarrollo de métodos para determinar variedad de compuestos orgánicos en aguas está basado fundamentalmente en estrategias del tipo multiresiduo. Gran parte de la literatura emplea protocolos de preparación de muestra que utilizan preconcentración, siendo SPE en cartuchos, generalmente del tipo HLB (balance hidrofílico-lipofílico), una de las opciones más

utilizadas (Gómez *et al.* 2007a; Martínez Bueno *et al.* 2007b; Gómez *et al.* 2009; Martínez Bueno *et al.* 2010a). Esta metodología fue extendida recientemente por la USEPA en la determinación de hormonas en agua potable, proveniente de plantas potabilizadoras (USEPA 2010). Los equipos de LC y GC acoplados a MS son ampliamente utilizados con este propósito ya que logran separar los compuestos dentro de una matriz de naturaleza compleja para posteriormente detectarlos con gran sensibilidad en base a los iones específicos generados en la fragmentación de cada analito. Desde una perspectiva histórica, los primeros reportes y revisiones en contaminación emergente comienzan con el uso de GC utilizando variedad de detectores incluyendo espectrómetros de masas (Richardson 2001b; Richardson 2001a). El alcance de estos estudios estaba restringido a ciertos contaminantes volátiles o semivolátiles, además de estar condicionados al tipo de detector empleado, tales como los subproductos de desinfección organoclorados provenientes de los procesos de potabilización (Richardson 2001a). La introducción posterior de GC-MS en contaminación emergente fue vislumbrada como una mejor alternativa para el monitoreo ambiental de amplio espectro (Richardson 2001a; Richardson 2002). Valiosos aportes empleando GC-MS y GC-MS/MS fueron introducidos principalmente en experiencias piloto del monitoreo de PPCPs tales como analgésicos y fragancias (Gómez *et al.* 2007b; Gómez *et al.* 2009).

Sin embargo, debido a la naturaleza semipolar de la mayoría de los contaminantes emergentes, los grandes aportes en contaminación emergente fueron realizados por LC-MS/MS (Cahill *et al.* 2004; Gros *et al.* 2006a; Petrovic *et al.* 2006; Martínez Bueno *et al.* 2007b). La amplia gama de configuraciones de espectrómetros de masas empleados en LC-MS, permitió un incremento del alcance de los métodos analíticos con aplicación ambiental. Tanto el método USEPA 1694 como la mayoría

de la literatura especializada basa el análisis de estos contaminantes en función de fragmentaciones específicas de masas o transiciones obtenidas, implícitamente para LC-MS o LC-MS/MS (Petrovic *et al.* 2010; Ballesteros-Gómez & Rubio 2011; Buchberger 2011; Richardson & Ternes 2011; Hernández *et al.* 2012).

Las configuraciones de analizadores de masas tándem aplicada a contaminantes emergentes basan su esquema de diseño QqQ tal como el encontrado en el USEPA 1694 y USEPA 538. Si bien se trata de los instrumentos más robustos, surgen algunas debilidades principalmente en la confirmación de los analitos en relación a la influencia ejercida por la matriz de la muestras. Las transiciones de masas pueden ser afectadas o enmascaradas por la matriz con incremento de probabilidad de falsos negativos, e incluso falsos positivos cuando desde la propia matriz surgen las señales analíticas.

En busca de solventar tales problemas y en consecuencia de los avances tecnológicos, la disponibilidad de otros analizadores motivó cambios en el esquema de trabajo instaurado. Los equipos de TOF son uno de los preferidos para las aplicaciones ambientales, debido a que tienen una gran resolución de masas lo que hace posible identificar los compuestos por su masa exacta además de una gran sensibilidad en el modo de adquisición de barrido de MS. Los equipos del tipo QTOF, permiten la realización de experimentos MS/MS con el agregado de masa exacta de los iones producto (Lacorte & Fernández-Alba 2006; Bijlsma *et al.* 2011). Se provee entonces una incrementada selectividad debido a la exclusión de iones generados (muchos de los cuales provienen de la matriz) ya que la segunda fragmentación se lleva a cabo únicamente para un ion específico, lo que la hace extraordinariamente útil en confirmación inequívoca de compuestos (Hernández *et al.* 2012).

Otras estrategias recientemente introducidas han sido la inyección directa de muestras de agua en equipos altamente sensibles. Los primeros intentos en el uso de estas estrategias comenzaron con el empleo de analizadores QqQ pero en matrices no muy complejas tales como en agua de calidad potable o de recreación. En base a estos principios, recientemente, se ha establecido el método USEPA 538 para determinación de contaminantes orgánicos emergentes y algunos persistentes en agua potable por inyección directa de agua en LC-(QqQ)MS/MS (USEPA 2009).

En esta tendencia de evitar la preparación y preconcentración de muestras, las nuevas configuraciones de analizadores híbridos como el QLIT, capaces de obtener alta selectividad comparable al QqQ, con mayor sensibilidad avizoran una aproximación a uno de los máximos exponentes del estado del arte actual en espectrometría de masas (Ballesteros-Gómez & Rubio 2011; Martínez Bueno *et al.* 2011).

Actualmente, el modelado espacio-temporal; el análisis avanzado y la elucidación del destino ambiental de los contaminantes emergentes son algunas líneas de investigación de gran interés (Ballesteros-Gómez & Rubio 2011; Gómez *et al.* 2012).

El presente capítulo consta de dos partes bien diferenciadas que tocan colateralmente estos puntos. La primera trata de la determinación de algunos contaminantes emergentes relevantes en aguas residuales y superficiales de Montevideo, Uruguay por metodologías convencionales basadas en SPE con determinación por GC-MS. Este trabajo representa el primer exponente en Uruguay de evaluación de contaminación emergente y sobre el que se realizan ensayos estadísticos surgido de un monitoreo intensivo de la única planta de tratamiento de la ciudad de Montevideo. La segunda parte, es novedosa desde el punto de vista instrumental y analítico. Se demuestra la elucidación del destino

ambiental de un antibiótico ampliamente consumido como es la amoxicilina empleando LC-QTOF mediante experimentos de MS/MS utilizados para interpretación espectral. Posteriormente, se relatan algunas estrategias para la detección asistida por software de contaminantes emergentes empleando una base de datos de masas exactas desarrollada con este propósito. Se muestra la proposición de flujos de trabajo mejorados para elucidar el destino ambiental y la ocurrencia de productos de transformación de tales contaminantes en muestras de aguas residuales y superficiales. Finalmente se exponen las ventajas de los analizadores de masas híbridos en la exploración de contaminantes emergentes en cursos de agua.

3.2 Determinación de contaminantes emergentes en aguas residuales de Montevideo

3.2.1. Introducción

El 60% de la población uruguaya (~1.800.000 habitantes) vive en Montevideo y su zona metropolitana. Las aguas residuales domésticas e industriales de Montevideo, son colectadas y tratadas físicamente en una planta de pretratamiento (colector de Punta Carretas) que no dispone de tratamiento biológico. La disposición final de estas aguas residuales transcurre a través de un emisario subacuático a dos kilómetros de la costa en el Río de la Plata. Esto transforma a las playas y costas de Montevideo en las zonas más susceptibles por la contaminación emergente. El presente trabajo, es una evaluación preliminar de la ocurrencia de algunos contaminantes emergentes de interés en aguas residuales recibidas (influyente) y dispuestas en el Río de la Plata (efluente) por la planta de pretratamiento de Punta Carretas.

Los compuestos analizados fueron fármacos (por ej. ibuprofeno, acetaminofeno (paracetamol), dipirona, diclofenac, carbamazepina), estimulantes (cafeína, nicotina y sus principales productos de degradación), pesticidas (atrazina y sus principales productos de degradación, clorpirifos, DEET), un antimicrobiano (triclosan), y plastificantes (bisphenol A, bis(2-etilhexil) ftalato).

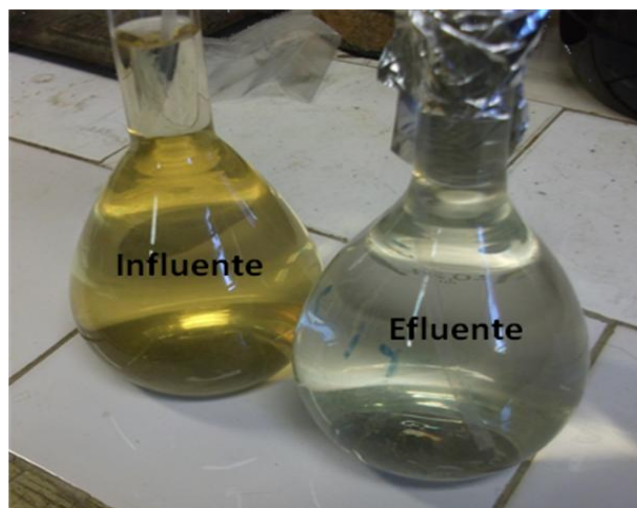


Figura 45: Fotografía de muestras de influente y efluente de la planta de pretratamiento de Punta Carretas, Montevideo.

3.2.2 Materiales y métodos

3.2.2.1 Reactivos y estándares

Los estándares de los pesticidas fueron suministrados por Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania). El resto de estándares analíticos fueron provistos por Sigma Aldrich y Fluka (St. Louis, EE.UU). Los solventes y reactivos fueron: AcOEt calidad para análisis de trazas (Pharmco Products Inc., Brookfield, CT. EE.UU.). Las soluciones stock de los compuestos en estudio se prepararon en AcOEt a 2,0 g/L (excepto teobromina que fue preparada en MeOH) fueron guardadas a -18°C hasta su uso. A partir de las soluciones de estándares se prepararon soluciones mix intermedias a 100,0 mg/L de cada compuesto en AcOEt.; posteriormente de este mix se prepararon las siguientes soluciones de niveles de calibración: 0,05; 0,1; 0,5; 0,7, y 1,0 mg/L en AcOEt. Fue empleada una solución de TPP a una concentración de 0,5 mg/L en AcOEt como estándar interno.

3.2.2.2 Colección de muestras

i. Aguas residuales

Las muestras fueron colectadas según procedimientos internos del Laboratorio de Calidad Ambiental (LCA) de la Intendencia de Montevideo, de acuerdo al programa de monitoreo de la planta de pretratamiento de Punta Carretas. Esta planta aplica un tratamiento físico al agua residual que no incluye tratamiento secundario del tipo biológico. La Figura 45 muestra el aspecto de las muestras de agua residual.

Las muestras fueron tomadas en envases de polipropileno de 1L, e inmediatamente conservadas a -18°C hasta el análisis. La campaña fue realizada entre el 18/09/2011 y el 24/09/11 donde fueron colectadas muestras cada cuatro horas (06hs; 12hs; 18hs y 24hs) del mismo día en puntos de entrada (influyente) y salida (efluente) de la planta de pretratamiento. En total fueron colectadas y analizadas 56 muestras discretas.

3.2.2.3 Preparación de muestra

Se utilizó un método multiresiduo para determinación de contaminantes emergentes tal como describe Gómez *et al.* (2007). Las muestras son ajustadas a pH 8 con NH_4OH (0,1 M) y filtradas por membrana de PTFE con filtro de poro de $0,45\mu\text{m}$ (Millipore, Brasil). Los analitos fueron extraídos mediante SPE utilizando un Manifold (Supelco, EE.UU) en cartuchos comerciales de OASIS HLB[®] (balance hidrofílico – lipofílico) (Waters Co, EE.UU) previamente acondicionados con agua destilada ajustada a pH 8. Posteriormente, se hacen pasar por el cartucho 200 mL de muestra de agua residual. Se realiza la etapa de elución en dos etapas mediante 4 mL de AcOEt. Los extractos obtenidos se juntan y evaporan en corriente de N_2 ,

llevándolos hasta casi sequedad, donde se reconstituyen con 1,0 mL de solución de TPP estándar interno a 0,5 mg L⁻¹.

3.2.2.4 Preparación de agua residual sintética y fortificación de muestras

Se disuelve en 1L de agua destilada, 160 g de peptona, 110 g de urea, 30 mg de K₂HPO₄, 7 mg de NaCl, 4mg de CaCl₂ · 2H₂O de NaCl, 2 mg de Mg₂SO₄ · 7H₂O. Esta agua residual tiene un COD de aproximadamente 100 mg/L (OECD 2001) . Sobre esta agua residual sintética se procedió a fortificar la muestra de agua residual para realizar ensayos de recuperación y determinación de LODs con soluciones mix apropiadas de los compuestos de estudio. Se realizaron recuperaciones en agua residual sintética a dos niveles de fortificación: 1 µg/L y 10 µg/L. La cuantificación fue realizada mediante calibración en matriz empleando extractos de agua residual sintética.

3.2.2.4 Instrumentos

Los análisis fueron realizados utilizando un GC HP 6890 acoplado a un MS (analizador cuadrupolo) HP 5973 en modo de ionización por EI (70eV). Las condiciones experimentales fueron las siguientes: columna capilar HP-5 (5 % fenil, 95 %-dimetil-polisiloxano) (30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 µm espesor de fase); gas carrier He (flujo 1,0 mL min⁻¹); volumen de inyección 1 µL; modo de inyección, split; radio de split 1:12. La temperatura del cuadrupolo y de la fuente de ionización fueron 150 y 230°C, respectivamente.

El programa de temperatura utilizado fue: 80°C inicial (durante 3 min), luego a 10°C/min hasta 295 °C donde se mantiene isoterma por 10 min. El software utilizado fue MSD ChemStation D.03.00.611 (Agilent Technologies, EE.UU).

3.2.2.4 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) de la matriz de correlación de Pearson para representar el comportamiento de las variables (compuestos químicos) y las observaciones (muestras por sitio y hora) en un número reducido de dimensiones (Legendre & Legendre 1998; Cuadras 2012). Además, para representar sobre un mismo par de ejes se aplicó la técnica de “Biplot” con una ponderación de variables y observaciones igual, correspondiente a $\alpha = 0,5$ (Legendre & Legendre, 1998; StataCorp. 2009).

Para determinar si existía significación estadística en el comportamiento de las variables respecto de la entrada o salida de la planta de tratamiento y/o la hora se realizó un análisis multivariado de la varianza (MANOVA) (Cuadras, 2012). Dado que los datos no cumplen algunos de los supuestos del MANOVA se consideró un umbral más exigente para la significación estadística con un valor-p igual o menor a 0,01. Luego del MANOVA se estudió la significación estadística univariada mediante el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras independientes (Conover 1999). Los análisis estadísticos se realizaron en el programa STATA 12 (StataCorp 2011).

3.2.3 Resultados y Discusión

3.2.3.1 Desempeño del método

Debido a la imposibilidad de conseguir muestras blanco representativas de agua residual se procedió a realizar ensayos de desempeño del método sobre agua residual sintética preparada según procedimientos internacionales (OECD 2001) tal como han ensayado previamente otros autores (Gómez *et al.* 2007b; Martínez Bueno *et al.* 2007a). El método analítico propuesto es una adaptación a un método ampliamente reportado donde previamente fueron evaluados estos mismos contaminantes emergentes (Gómez *et al.* 2007b). En el presente trabajo fueron evaluados además otros analitos de interés tales como BHT, metil parabeno, DEET, atrazina y sus productos de degradación. Se realizaron ensayos de recuperación de forma de evaluar la exactitud del método analítico. La precisión fue evaluada a partir de la DSR (%) de los ensayos de recuperación mientras que los LODs y LOQs fueron calculados utilizando el método gráfico que definiendo al LOD de cada compuesto como 3 veces la relación S/R obtenido mediante el software Chemstation. El LOQ fue estimado como 10 S/R.

Por otra parte, también fue evaluada la linealidad en el rango LOQ – 1 mg/L cubriendo el rango de concentraciones encontradas en este estudio. En todos los casos fueron encontrados coeficientes de determinación $r^2 > 0.99$.

Mediante el esquema propuesto, se obtuvieron recuperaciones en el rango 74-114 % en la mayoría de los casos con DSRs menores a 20%. Sin embargo, se obtuvieron bajas recuperaciones para el antipirético/antiinflamatorio dipirona (33.1%) posiblemente debido a que este sufre hidrólisis durante su análisis tal como sugiere Martínez Bueno *et al.* 2007a.

Compuesto	T _R (min)	<i>m/z</i>	<i>m/z</i> Quant	Rec % (DSR %)	LOD (ng/L)
Atrazina	14,6	215, 217, 200, 202, 173	200	88,1 (9,4)	25
BHT	11,8	220, 205, 145	205	92,2 (7,1)	12
Bis(2etil- hexil)ftalato	21,75	279,167, 149	149	102.1(3.2)	15
Bisfenol A	18,8	213, 214, 228, 119	213	104.3 (6.4)	33
Cafeína	15,65	194, 195, 109, 82, 67	194	92.7 (8.9)	8
Carbamazepina	20,4	193, 192, 236, 165	193	79.8 (4.3)	102
Clorpirifos	17,1	258, 286, 314	314	84.7 (8.4)	29
Cotinina	14,2	176, 119, 118, 98	98	73.7 (12.7)	60
DEET	12,65	190, 119, 91	119	106.4 (16.3)	32
Desetil-Atrazina	13,65	172, 187, 174	172	88.5 (8.9)	35
Desisopropil- Atrazine	13,5	173, 158, 145	173	82.7 (9.2)	42
Diclofenac	18,7	214, 242, 277, 216	216	80.4 (5.3)	103
Dipirona	17,4	83, 216, 217	217	33.1 (21.0)	102
Ibuprofeno	13,15	161, 163, 206	161	102.4(6.4)	84
Iminostilbeno	15,6	192, 193, 165	193	nd	nd
Metil Parabeno	11,15	152, 121, 63, 65	121	93.8 (5.2)	12
Nicotina	9,6	84, 133, 161, 162	84	80.6 (7.8)	20
Nonilfenol	14,3	107, 121,149, 163	107	79.1 (22.9)	200
Paracetamol	13,98	109, 151, 80	109	73.8 (10.5)	120
Paraxantina	16	180, 123, 68	180	nd	nd
Pentaclorofenol	14,75	266, 268, 165, 200	266	66.2 (15.2)	64
Simazina	14,5	201, 186, 173	201	104.1 (6.1)	79
Teobromina	15,8	180, 109, 82	180	113.7 (12.4)	65
Teofilina	16,5	180, 123, 95, 68	180	101.8 (9.2)	69
TPP	20,7	325, 326, 327	326	-	-
Triclosan	18,2	288, 290, 218, 146	218	99.1 (14.1)	50

Tabla 14: Iones seleccionados, tiempos de retención (T_R, min), recuperaciones a 10 µg/L y LODs (en ng L⁻¹) para los compuestos estudiados. nd: no determinado.

Utilizando un factor de preconcentración de 200 veces los LODs encontrados fueron inferiores a 0.2 $\mu\text{g/L}$. La Tabla 14 muestra los iones seleccionados, tiempos de retención, porcentajes de recuperaciones obtenidos al nivel de 10 $\mu\text{g/L}$ y los correspondientes LODs. Cabe la pena destacar la formación de iminoestilbeno como producto de degradación térmica de carbamazepina durante el análisis. Esto repercute en que no puede ser conocida exactamente la cantidad presente de carbamazepina en las muestras.

La Figura 46 ejemplifica el análisis simultáneo por GC-MS de analitos destacables como nicotina, metil parabeno, paracetamol, ibuprofeno, cafeína y sus principales metabolitos (paraxantina, teobromina y teofilina) en una muestra real de agua residual.

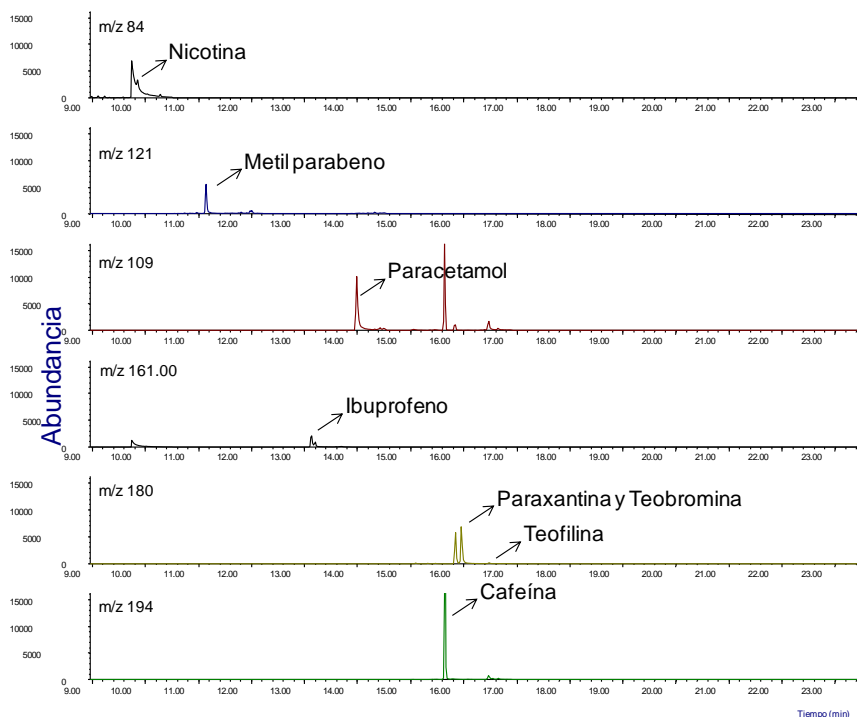


Figura 46: Cromatograma de GC-MS mostrando los iones SIM de detección de algunos contaminantes emergentes relevantes en una muestra de efluente de agua residual.

3.2.3.2 Análisis de datos

La estrategia desarrollada se aplicó para caracterizar diferencias sustanciales entre los influentes y efluentes de agua residual durante este monitoreo semanal. Se detectaron la mayoría de los compuestos seleccionados a niveles de $\mu\text{g/L}$ exceptuando desetil-atrazina y simazina que no fueron detectados en ninguna muestra. En general, un grupo reducido de compuestos representa más de un 50% de la carga total de contaminación emergente entre los compuestos estudiados. Estos compuestos fueron cafeína, paraxantina, teobromina, nicotina, paracetamol e ibuprofeno. La Figura 47, muestra las contribuciones individuales a la carga total promedio de las muestras de influente. Se puede notar una carga promedio de $37 \mu\text{g/L}$ de los contaminantes emergentes monitoreados para 28 muestras diferentes tomadas cada 4hs en el periodo de una semana.

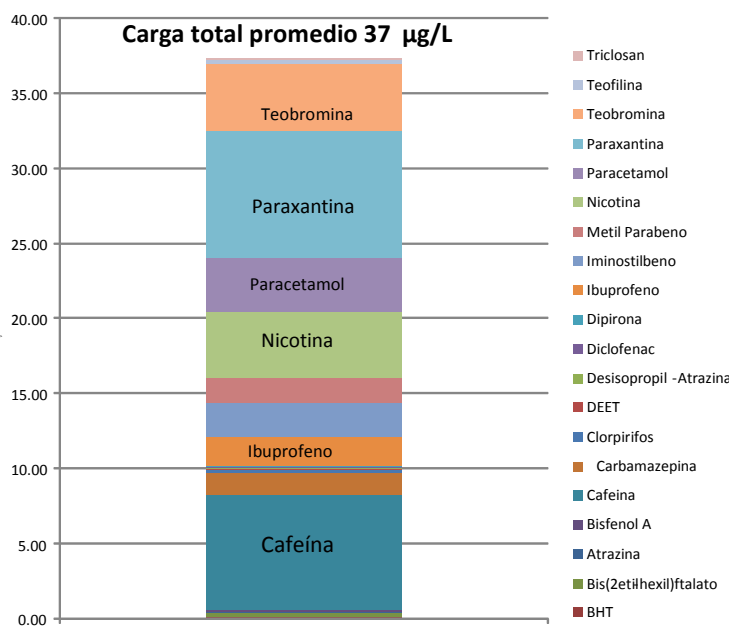


Figura 47: Carga total promedio y contribuciones individuales en el periodo de una semana para influentes (muestras de entrada, influentes) de la planta de tratamiento.

Por otra parte, las muestras de efluentes de la planta de tratamiento muestran perfiles similares aunque la carga total promedio se ve sensiblemente incrementada, siendo esta 232 $\mu\text{g/L}$. Se puede notar que cafeína, paraxantina y teobromina son los compuestos que mas experimentan un aumento en su concentración promedio (véase Figura 48). Este comportamiento podría ser explicado debido al proceso de adsorción/desorción de los contaminantes en partículas sólidas durante el pretratamiento. Gómez *et al.* 2007b postula una liberación de los compuestos más polares tales como cafeína y sus compuestos relacionados a la fase acuosa durante procesos de decantación de sólidos suspendidos, al mismo tiempo que los compuestos más lipofílicos son removidos durante el tratamiento mediante adsorción a los lodos.

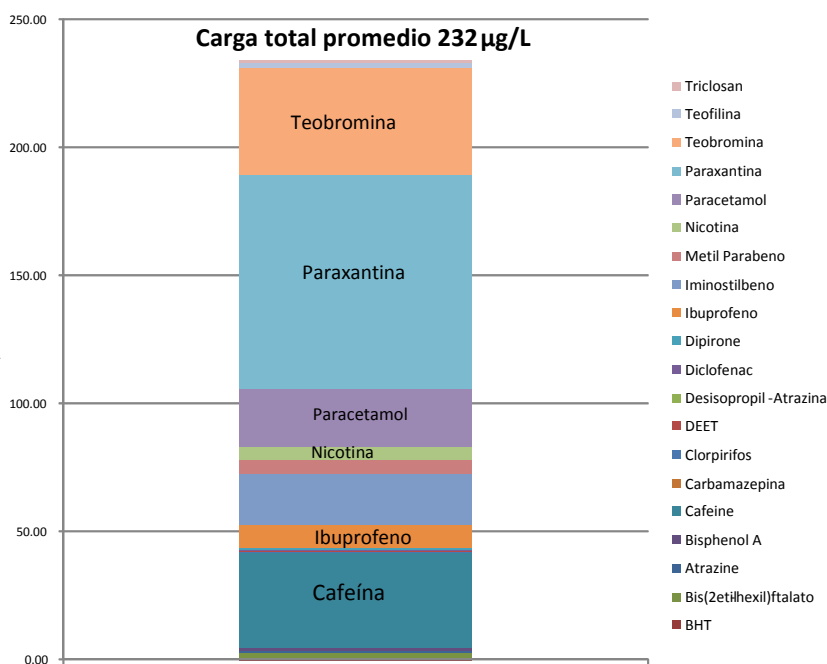


Figura 48: Carga total promedio y contribuciones individuales en el periodo de una semana para efluentes (muestras de salida, efluentes) de la planta de tratamiento.

Como se puede observar, en este caso hay que destacar la importancia de los productos de degradación y metabolitos ya que de los 6 compuestos más destacados, 2 de ellos son pertenecen a esta categoría (paraxantina y teobromina). Desde el punto de vista de la frecuencia de detección, la totalidad de las muestras presentaron cafeína, nicotina y bis(2etil-hexil)ftalato.

Otros compuestos como paracetamol, metil parabeno, paraxantina, teobromina, iminoestilbeno y carbamazepina también presentaron muy alta ocurrencia en las muestras analizadas. Los compuestos mayormente presentes fueron estimulantes (cafeína y nicotina) seguidos por fármacos y otros compuestos derivados de productos de cuidado personal como por ejemplo el metil parabeno, BHT, DEET y triclosan.

La Figura 49 se ilustran los anteriores enunciados, donde además se nota que los pesticidas fueron quienes presentaron menores ocurrencias aunque fueron detectados residuos de clorpirifos y atrazina. De esta forma, se puede afirmar que las aguas residuales estudiadas presentan las mayores incidencias de contaminación emergente debido a contaminantes de origen domestico.

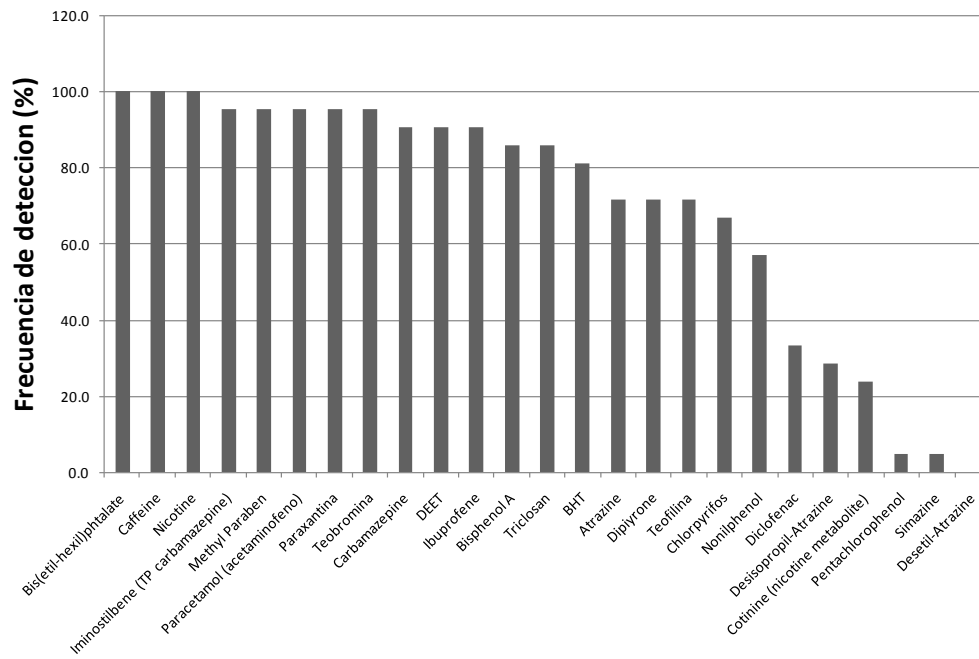


Figura 49: Frecuencias de detección de los compuestos analizados en aguas residuales.

Se estudió la evolución temporal de estos compuestos. Las Figura 50 y Figura 51 muestran los promedios de ocurrencia, máximos y mínimos encontrados para estos analitos en influentes y efluentes, respectivamente. Se nota un máximo de concentración de nicotina de 73 $\mu\text{g/L}$ en las muestras de influente con máximos de cafeína, paraxantina y teobromina en el entorno de los 20 $\mu\text{g/L}$.

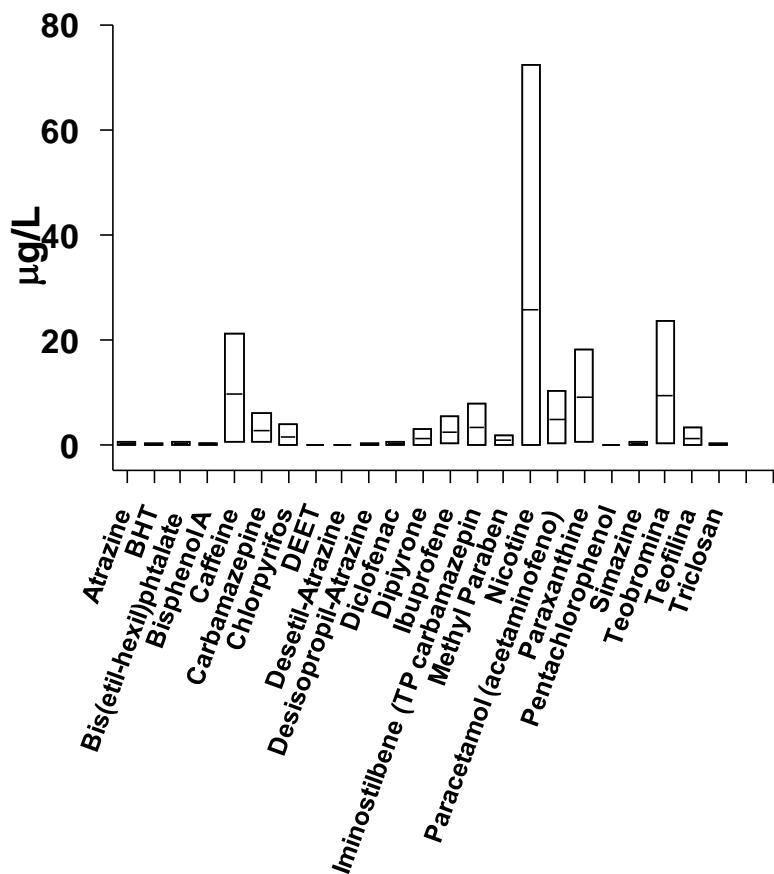


Figura 50: Promedios (línea media), máximos y mínimos de concentración de los contaminantes estudiados durante el monitoreo de influentes (muestras de entrada) de agua residual.

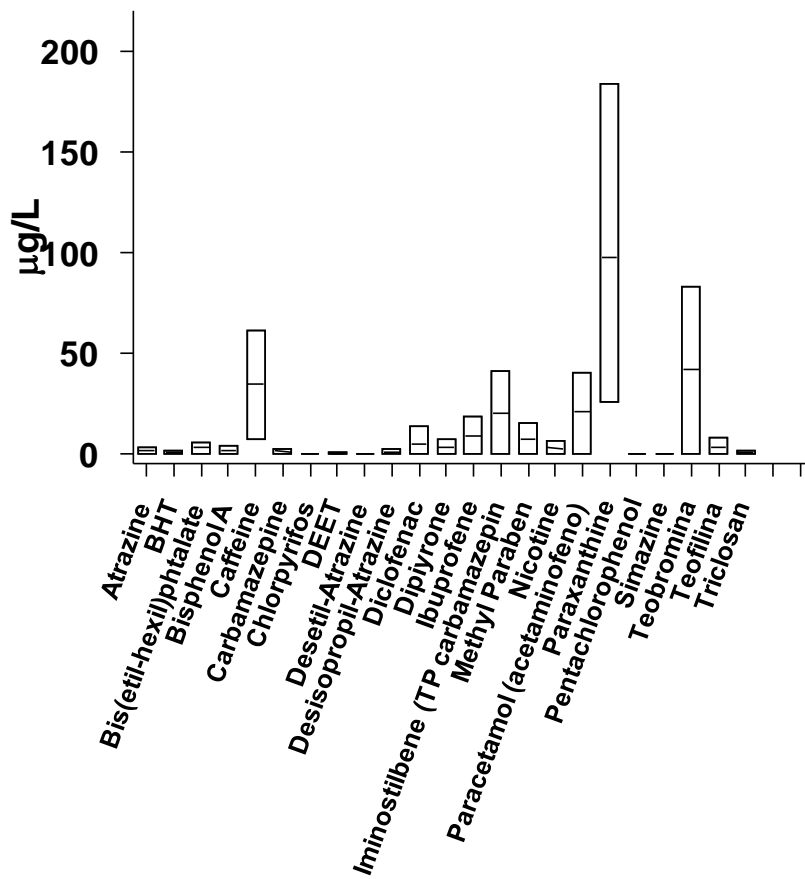


Figura 51: Promedios (línea media), máximos y mínimos de concentración de los contaminantes estudiados durante el monitoreo de efluentes de agua residual.

Por otro lado, en las muestras de efluentes presentaron máximos de paraxantina (184 µg/L) seguido por teobromina (83 µg/L) evidenciando degradación biológica durante el tratamiento de aguas residuales.

3.2.3.2 Análisis estadístico

En el ACP los tres primeros factores representan más del 60% de la varianza de los datos (64%), por tanto se consideraron adecuados para explicar el comportamiento principal. Mediante las puntuaciones factoriales (Tabla A6a, véase ANEXO 6) es posible saber que variables aportan más en cada eje factorial en graficos descriptivos. Particularmente, 12 compuestos tienen sus mayores puntajes absolutos en el eje negativo del Factor 1 y es posible observar en los gráficos que en dicho eje predominan las observaciones de la salida de la planta (Figura 52a y b). En tanto, las muestras de entrada se agrupan ya que poseen valores positivos del Factor 1, lo que permite inferir una agrupación descriptiva de estas muestras tanto en el gráfico que utiliza el Factor 2 como el Factor 3 (Figura 52a y b, respectivamente). El Factor 2 provee en muestras de entrada y salida valores cercanos a cero mientras que en el Factor 3 predominan los valores positivos aunque con un mayor grado de dispersión. Se observa que las muestras de salida ofrecen comportamientos más dispersos que las muestras de entrada. En ambos gráficos aparece una muestra que se desvía de la agrupación encontrada para el resto de muestras.

Sin embargo, para estos datos, no existe una clara agrupación de comportamiento de los contaminantes tomando en cuenta la hora de muestreo (Figura 53 a y b). No se puede inferir en este caso, una clara observación de “ritmo circadiano” de los contaminantes en el agua residual conforme transcurre el día.

El análisis MANOVA sólo encontró diferencias entre muestras de entrada y salida en la planta de tratamiento ($p < 0,0001$, Tabla A6b, ANEXO 6). Este resultado confirma el comportamiento observado en el ACP (Figura 52). Como se comentó

anteriormente, los niveles de contaminantes en muestras de salida fueron significativamente superiores en las muestras analizadas.

Finalmente, el análisis Wilcoxon sugiere significación univariada coincidente para bis(2etil-hexil)ftalato, bisfenol A, cafeína, carbamazepina, DEET, ibuprofeno, iminoestilbeno, metil parabeno, paracetamol, paraxantina, teobromina y teofilina (Tabla A6c, ANEXO 6).

3.2.4 Conclusiones

La metodología analítica propuesta ha permitido la evaluación preliminar de las aguas residuales de un grupo importante de contaminantes emergentes en aguas de la ciudad de Montevideo. Como se ha visto, el pretratamiento convencional de aguas residuales aplicando actualmente, no es eficaz en la remoción de este tipo de contaminantes, ya que se detectan habitualmente concentraciones de los contaminantes estudiados del rango de $\mu\text{g/L}$ en los efluentes de la planta de tratamiento y son liberados al Río de la Plata. Los resultados obtenidos también han puesto de manifiesto que para este tipo de análisis es necesario el seguimiento de metabolitos y productos de transformación de los compuestos ya que existe degradación durante el tratamiento. Sin embargo, los niveles de contaminantes emergentes polares encontrados en aguas residuales tratadas con la tecnología propuesta son mayores en los encontrados en muestras de agua sin tratar, probablemente debido a la liberación de estos desde partículas sólidas.

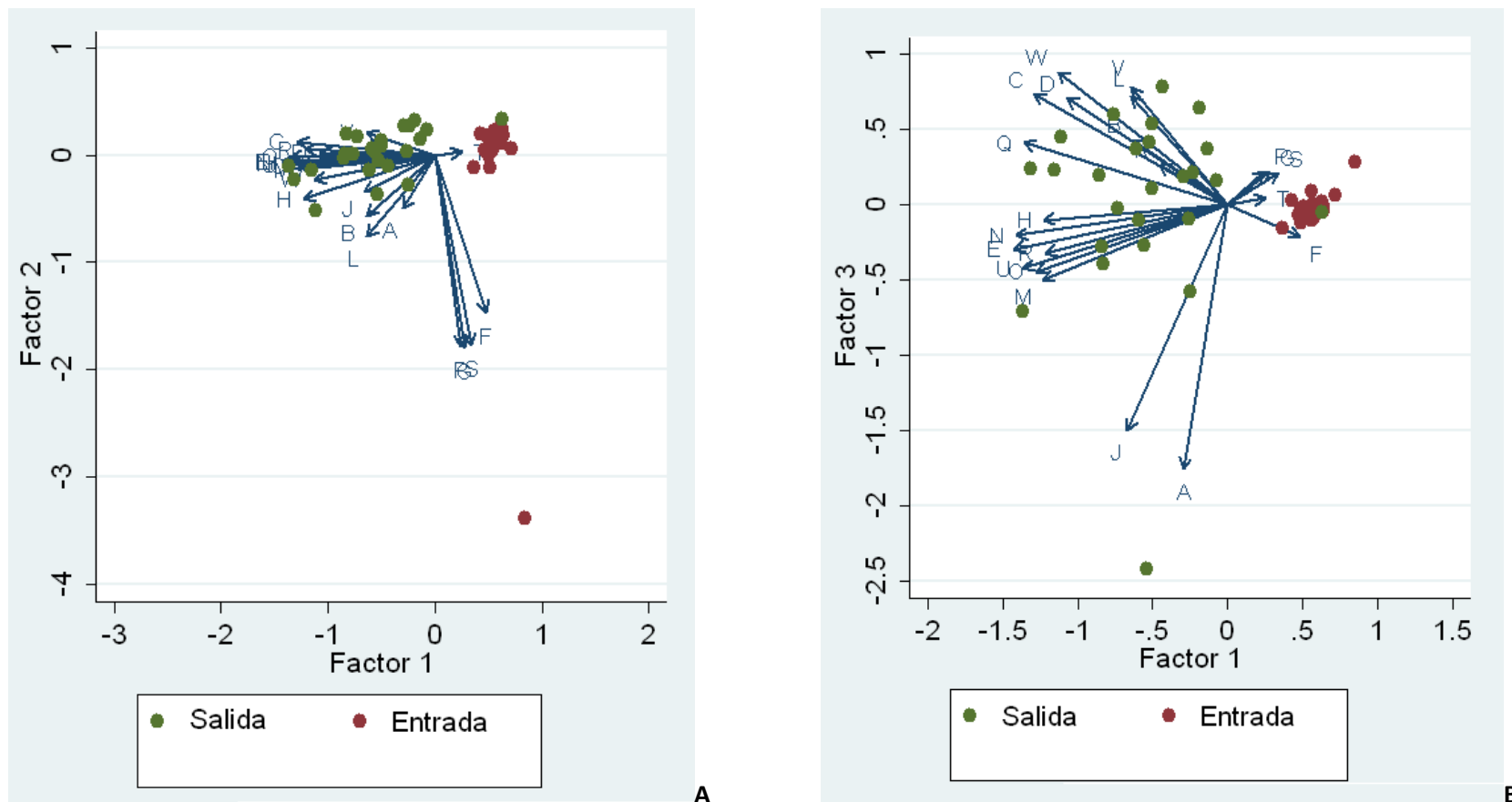


Figura 52: Representación simultánea de variables (flechas) y observaciones (círculos) resultado del ACP. En el gráfico A se presentan los factores 1 y 2 que explican un 55,2% de la varianza de los datos. Con el gráfico B se muestra los factores 1 y 3 que explican un 47,7% de la varianza de los datos. Mediante distinto color se discriminan las observaciones tomadas en la entrada y la salida de la planta del emisario. Códigos de letras disponible en Tabla A6a.

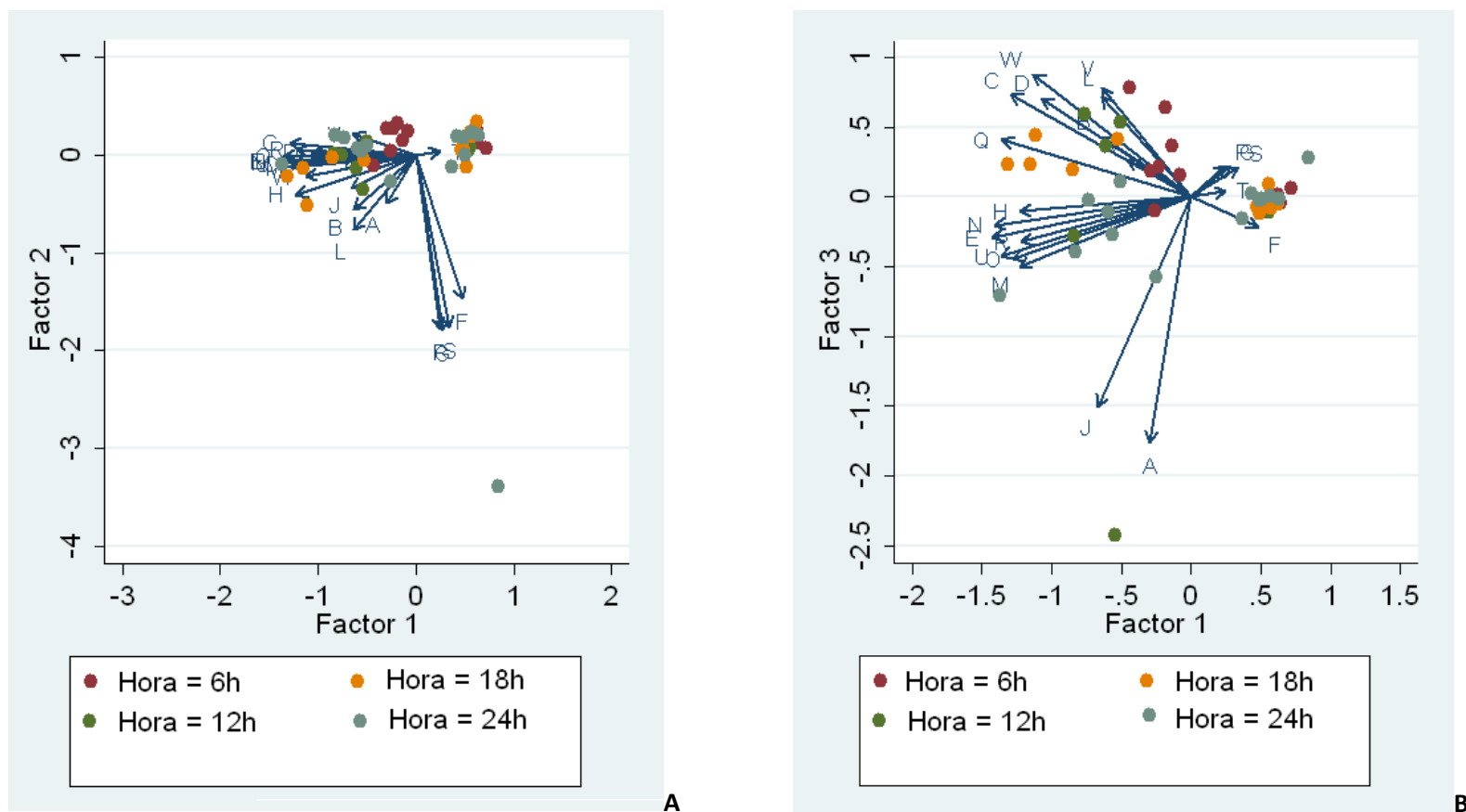


Figura 53: Representación simultánea de variables (flechas) y observaciones (círculos) resultado del ACP. En el gráfico A se presentan los factores 1 y 2 que explican un 55,2% de la varianza de los datos. Con el gráfico B se muestra los factores 1 y 3 que explican un 47,7% de la varianza de los datos. Mediante distinto color se discriminan las observaciones tomadas a distintas horas.

3.3 Desarrollo de estrategias de identificación y elucidación estructural de contaminantes emergentes en aguas por LC-MS/MS

3.3.1 Elucidación estructural de productos de transformación desconocidos de contaminantes orgánicos en el medio ambiente: el caso de la amoxicilina

3.3.1.1 Introducción

Las penicilinas son una subclase de antibióticos β -lactámicos, que representan al grupo más ampliamente utilizado de antimicrobianos desde hace un siglo para tratar o prevenir las infecciones bacterianas en humanos y animales. El consumo mundial de penicilinas para uso humano sigue creciendo siendo la amoxicilina (AMX) la más ampliamente difundida. Hoy en día, existe una creciente preocupación en los residuos de PPCPs, así como de sus productos de transformación (PTs) en el medio ambiente. La contaminación con antibióticos en el medio acuático ofrece especial interés, ya que pueden inducir a la aparición de resistencia (Andreozzi *et al.* 2004). Curiosamente, en comparación con otros productos farmacéuticos, AMX tiene una tasa de metabolización muy baja en humanos, ya que el 80-90% se excreta como tal y es eliminada por la orina a las aguas residuales y/o el medio ambiente (Hirsch *et al.* 1999).

Sin embargo, debido a su escasa detección en aguas residuales se supone que las penicilinas no serían una amenaza para el medio ambiente, previsiblemente debido a la escasa estabilidad que presenta el anillo β -lactámico en condiciones específicas de pH y actividad β -lactamasa (Moreno-Bondi *et al.* 2009).

La apertura de este anillo está además relacionada con la pérdida de actividad microbiológica (Lamm *et al.* 2009). En cuanto a sus los residuos en las aguas residuales, no es frecuente la detección de AMX pero teniendo en cuenta su elevado uso por la población, su monitoreo en el medio ambiente presenta una relevancia considerable. Fueron identificados residuos de AMX en plantas de tratamiento de aguas residuales de hospitales (Castiglioni *et al.* 2005) y aguas superficiales (Christian *et al.* 2003). Una gran variedad de productos de degradación de AMX fueron descritos como impurezas de la propia droga (EP 2008) además de que productos de degradación hidrolítica fueron previamente identificadas en aplicaciones de la industria farmacéutica (Valvo *et al.* 1998; Nägele & Moritz 2005). Sin embargo, aun existe poca información disponible sobre el destino y el comportamiento de AMX en el medio acuático. Lamm *et al.* 2009 informó por primera vez la presencia de un PT de AMX en aguas residuales: la amoxicilina dicetopiperazina 2', 5' (AMX-DKP) mediante la combinación de identificación y confirmación por resonancia magnética nuclear (RMN) y LC-MS. Posteriormente, un fotoproducto identificado como sulfóxido de amoxicilina fue reportado (Gozlan *et al.* 2010). Recientemente varios autores, han comenzado a trabajar sobre mecanismos para acelerar la degradación de AMX en medio acuático (Martins *et al.* 2009; Mavronikola *et al.* 2009; Trovó *et al.* 2011; Xu *et al.* 2011). En este sentido, es esperable que los principales PTs de AMX en el medio acuático puedan estar química y/o estructuralmente relacionados con su degradación por hidrólisis, ya que implican la apertura del anillo β -lactámico. Por otro lado, la identificación de los metabolitos y PTs ambientales representa un desafío analítico debido a la sensibilidad y selectividad requeridas en las técnicas instrumentales aplicadas para identificar y confirmar inequívocamente los compuestos. A fin de proporcionar información útil de carácter cualitativo para el reconocimiento a través de la

elucidación estructural de los compuestos, el uso de técnicas avanzadas de espectrometría de masas exacta como las proporcionadas por el analizador QTOF serán utilizados en este trabajo como una herramienta útil para identificar y confirmar los PTs de AMX formados en el medio ambiente y se propondrá además una ruta principal de transformación ambiental. Sumado a eso, se expone la identificación de un nuevo PT no descrito en la literatura, formado durante el análisis de residuos de AMX.

3.3.1.2 Materiales y métodos: artículo científico N° 5 (Véase ANEXO 7)⁶

⁶ Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main transformation products by liquid chromatography – electrospray quadrupole time of flight mass spectrometry.

Pérez-Parada A., Agüera A., Gómez-Ramos M.M., García-Reyes J.F., Heinzen H., Fernández-Alba A.R.

Rapid Communications in Mass Spectrometry (2011) 25, 731-742

3.3.1.3 Resultados y Discusión

3.3.1.3.1 Contribución de la hidrólisis a la degradación de amoxicilina

Se realizaron experimentos preliminares para monitorear el comportamiento de AMX en medio acuoso. Se selecciono el rango de pH donde se encuentran las aguas residuales domesticas analizadas (pH entre 7 y 8). La Figura 54 muestra la desaparición de AMX en el monitoreo semanal en ausencia de luz. Esto demuestra que AMX es relativamente inestable en el rango estudiado además de que es muy sensible al pH del medio.

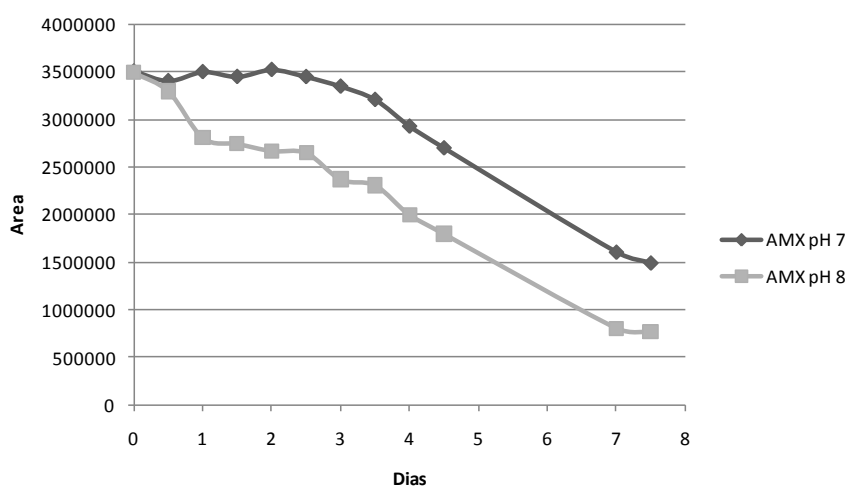


Figura 54: Estabilidad de AMX (1 mg L^{-1}) en solución acuosa a pH 7 y 8 medida por LC-QTOF-MS ($[M+H]^+$).

En estadios iniciales, se identifica la vía principal de degradación que transcurre mediante la apertura del anillo β -lactámico formando el ácido amoxiciloico (AMXC) tal como ocurre en el metabolismo humano (Nägele & Moritz 2005). Se observa que la vida media de AMX es superior a 4 días, lo que supondría que el mecanismo de hidrólisis directa no es el único contribuyente a la degradación de AMX en aguas residuales y matrices ambientales.

Se postula entonces las potenciales contribuciones de la fotólisis y degradación microbiana en el agua residual como contribuyentes a la transformación ambiental de AMX. Cabe mencionar que el agua residual dependiendo de su composición específica, puede catalizar los eventos de hidrólisis y fotólisis de los compuestos orgánicos.

3.3.1.3.2 Elucidación estructural y confirmación de productos de transformación de amoxicilina

De los estudios preliminares de degradación de AMX surge la caracterización de los productos de degradación hidrolítica tal como describen algunos documentos de control de calidad de la droga farmacéutica (Valvo *et al.* 1998; Nägele & Moritz 2005; EP 2008). La caracterización de estos productos fue lograda mediante obtención de tiempos de retención y iones $[M+H]^+$ específicos de formulas elementales reportadas (véase ANEXO 7).

En el intento de elucidar estructuralmente los iones de fragmentación de AMX mediante espectrometría de masas tándem de alta resolución, se muestra en la correspondiente Figura 55, el espectro de masas obtenido por QTOF-MS/MS de AMX. Otros autores (Nägele & Moritz 2005) habían postulado previamente un espectro de alta resolución obtenido por CID TOF-MS para AMX que contiene un patrón y iones diferentes a los encontrados por QTOF-MS/MS en este experimento. Nägele y Moritz hallan el ion m/z 114,0383 que fue asignado a la formula molecular C_5H_8NS . En cambio, por QTOF fue obtenido abundantemente el ion de formula C_4H_8NOS (m/z calculada 114,0008).

Se indica entonces, la existencia de diferentes mecanismos de colisión para este compuesto por CID en la fuente de ionización tal como ocurre en los analizadores TOF-MS en comparación a la obtenida a través de CID en una celda de colisión tal como es llevado a cabo en un QTOF MS/MS. Por tanto, se propone una ruta de fragmentación tal como se observa en la Figura 56 donde se proponen las estructuras de los iones formados y las correspondientes pérdidas neutras.

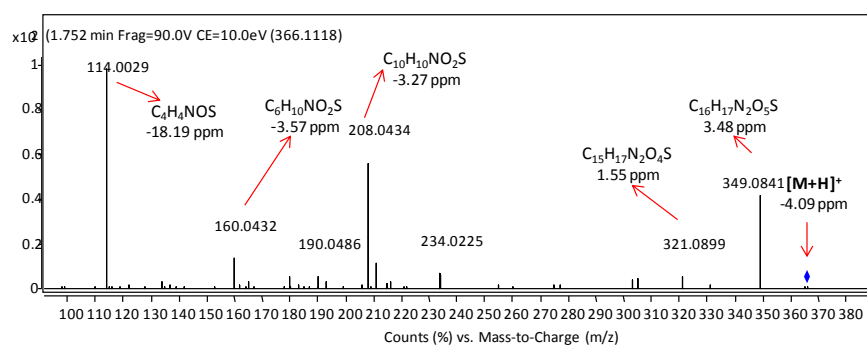
**AMX**

Figura 55: Espectro MS/MS de masas exacta de AMX a 10eV de energía de colisión.

Figura 56: Ruta de fragmentación propuesta para AMX.

Cabe destacar la presencia del ion de formula $C_6H_{10}NO_2S$ (m/z calculada 160,0427) característico de las penicilinas, que se obtiene mediante la ruptura del anillo de cinco miembros de tiazolidina (Nägele & Moritz 2005). Este ion si es buscado a través de un XIC para la m/z 160,0427 en muestras de efluentes preparados según se detalla en ANEXO 7, se observa la aparición de dos picos a tiempos de retención 7.9 y 8.3 min diferentes al de AMX que en las mismas condiciones posee un tiempo de retención de 1.7 min.

La comparación espectroscópica y cromatográfica de una muestra de AMX sujeta a hidrólisis en los experimentos preliminares es tomada como referencia del compuesto identificado como amoxicilina dicetopiperazina 2',5' (AMX-DKP) surgido de la condensación intramolecular de AMXC. Estos dos picos son asignados a los diasterómeros (*5R*) AMX-DKP y (*5S*) AMX-DKP según el orden de elución

reportado en análisis de impurezas de AMX (Valvo *et al.* 1998). Ambos isómeros no presentan diferencias sustanciales en sus espectros de masas. Sólo cuatro iones fragmento fueron encontrados para ambos compuestos: m/z 207, 160, 114 y 113. El análisis de masa exacta soporta la propuesta a las siguientes fórmulas elementales: $C_{16}H_{20}N_3O_5S$; $C_{10}H_{11}N_2O_3$; $C_6H_{10}NO_2S$, C_5H_8NS y $C_4H_5N_2O_2$ para las m/z calculada de 366,1118, 207,0764; 160,0427; 114,0372 y 113,0346. Debe notarse además que AMX y AMX-DKP son compuestos isobáricos (misma masa molecular), ya que poseen la misma fórmula elemental y por tanto la misma masa de ion molecular $[M+H]^+$, aunque tienen diferentes tiempos de retención. En el análisis de 3 muestras de influentes y sus correspondientes efluentes se identifica la presencia de ambos diasterómeros en el agua residual aunque se estimó un grado de degradación durante el tratamiento de 16 y 19 % para (*5R*) AMX-DKP y (*5S*) AMX-DKP, respectivamente. Se puede afirmar que en las muestras de agua residual analizadas, se identificó la presencia de AMX-DKP mientras que en ninguna se pudo identificar AMX.

La Figura 57a muestra el espectro de (*5R*) AMX-DKP comparando su espectro de referencia, al obtenido en una muestra de efluente y en agua de río Henares (Madrid, España), destacándose entonces este PT como un compuesto de relevancia ambiental. El resto de compuestos identificados en la degradación preliminar de AMX en medio acuoso también fueron buscados en las muestras de aguas residuales. El producto de degradación llamado ácido amoxiloico (AMXO) presenta una situación similar a la AMX-DKP. El AMXO (fórmula elemental $C_{15}H_{21}N_3O_4S$, m/z teórica 340,1326) posee dos diasterómeros (*5S*) AMXO y (*5R*) AMXO localizados a tiempos de retención 1,8 y 2,1 min. Tres fragmentos con iones comunes fueron obtenidos para ambos diasterómeros a m/z 323, 229 y 189 como se muestra en la

Figura 57b. El análisis de masa exacta soporta las siguientes fórmulas: $C_{15}H_{19}N_2O_4S$ y $C_9H_{13}N_2O_3S$ y $C_7H_{13}N_2O_2S$ cuyos errores de masa fueron menores a 5 ppm en todos los casos.

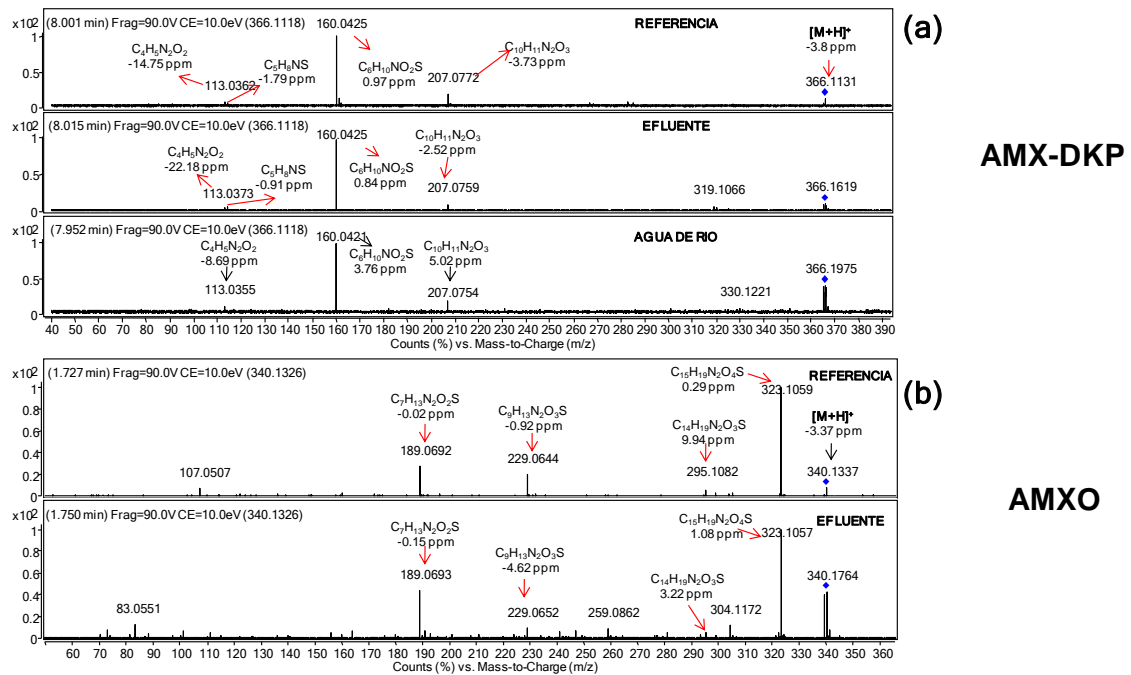


Figura 57: Comparación del espectro MS/MS de masas exacta (10eV) obtenido durante experimentos de degradación en laboratorio y muestras positivo de a) (5R) AMX-DKP en efluentes y agua de río y b) (5S) AMXO en efluente.

Ambos isómeros de AMXO también fueron identificados en muestras de efluentes e influentes aunque no fueron detectados en las muestras de aguas de río analizadas. La degradación entre influentes y sus correspondientes efluentes se estima en 54 y 56% para los isómeros (5S) y (5R) de AMXO. Las rutas de fragmentación lógica tanto para los diasterómeros de AMX-DKP como para los AMXOs es mostrado en Figura 58a y b, lo que permitiría justificar categóricamente los espectros obtenidos.

(a)

(b)

Figura 58: Ruta de fragmentación propuesta para a) AMX-DKP y b) AMXO.

Este hallazgo representa la primera vez en la literatura especializada que se postula la identificación y elucidación estructural del AMXO en una muestra ambiental además que sugiere que (*5R*) AMX-DKP representa el compuesto de mayor relevancia ambiental en cuanto a frecuencia de detección en aguas superficiales. Este último diasterómero fue repetidamente detectado en cinco de los ocho puntos de muestreo de agua del Río Henares. En base a estos resultados, se propone una ruta principal de transformación de AMX que está basada en la ruptura del anillo β -lactámico con formación de AMXC mediante mecanismos hidrolíticos y/o metabólicos, aunque los mecanismos de fotólisis y biotransformación no pueden descartarse. La formación de AMXCs produce la

epimerización en el carbono 5 lo que conduce a la formación de diasterómeros (*5R*) y (*5S*) ya sea de AMXO como de AMX-DKP (véase Figura 59).

De esta forma se identificaron, cuatro PTs que pertenecen a pares de diasterómeros. Sin embargo, no fueron identificados PTs posteriores a los identificados lo que deberá ser investigado en el futuro, al igual que una estimación cuantitativa (dependiente a la estándares de estándares de estos compuestos) y la evaluación del riesgo de esos PTs en el medioambiente.

Figura 59: Principal ruta de transformación ambiental propuesta para AMX.

3.3.1.3.3 Identificación y elucidación estructural de un nuevo producto de transformación de AMX formado durante el análisis

En el estudio de contaminantes emergentes, las etapas de preparación de muestra de aguas residuales y superficiales basadas en SPE con determinación por LC-MS generalmente incluyen una etapa de elución basada en solventes orgánicos polares (Fatta *et al.* 2007). Una práctica ampliamente difundida para ello es la utilización de MeOH en métodos multiresiduo empleando HLB como fase sólida tal como revelan diversas publicaciones (Petrovic *et al.* 2006; Gómez *et al.* 2007b; Kasprzyk-Hordern *et al.* 2007; Martínez Bueno *et al.* 2007a; Farré *et al.* 2008; Gómez *et al.* 2010; Martínez Bueno *et al.* 2010a) incluso para el monitoreo de AMX (Cahill *et al.* 2004; Gros *et al.* 2006b; Martínez Bueno *et al.* 2007b; Martínez Bueno *et al.* 2010a). Sin embargo, la inestabilidad de penicilinas en medios alcohólicos ha sido previamente descrita (Tyczkowska *et al.* 1992).

Durante este trabajo, se encontró una degradación gradual de AMX incluso cuando las soluciones estándar fueron preparadas en MeOH:H₂O (1:9) o los extractos se reconstituyen en esta mezcla de disolventes. Los experimentos preliminares para simular la extracción de AMX en las aguas residuales se hicieron en el agua residual sintética (OECD 2001) conteniendo AMX a 1 mg/L. Bajas recuperaciones para AMX fueron obtenidas ($35 \pm 9\%$, $n = 3$). Por este motivo, el uso de MeOH se evitó en la preparación y reconstitución de los extractos, aunque se noto que AMX podría ser transformado durante la etapa de preparación de la muestra mediante el uso de MeOH como eluyente. Al igual que para los anteriores PTs, el uso de la espectrometría de masas exacta en tándem fue utilizada para elucidar estructuralmente la asignación tentativa del compuesto éster metílico del ácido amoxiciloico (AMXC-Me). Se evidenció que en la etapa de elución, se daba

formación a cantidades apreciables de AMXC-Me (ion fórmula $C_{17}H_{23}N_3O_6S$, m/z 398,1378 y 0,20 ppm de error de masa del $[M+H]^+$. La elucidación estructural de este compuesto se basa en mediciones de masa exacta con experimentos MS/MS para obtener datos de iones producto. En este caso, la molécula protonada (m/z 398) fue utilizada como ion precursor tal como se muestra en la Figura 60.

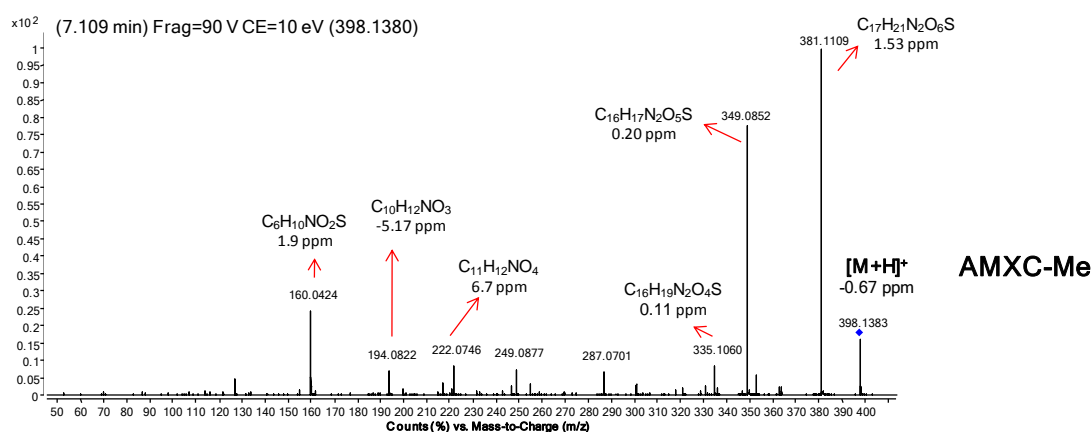


Figura 60: Espectro de masas exacta en MS/MS para AMX-Me a 10eV de energía de colisión: iones identificados, formulas, errores.

Se puede deducir de este espectro que la masa experimental del ion precursor de AMXC-Me (m/z 398,1383) posee una desviación de -0,67 ppm a la masa teórica. La propuesta de estructuras para los fragmentos de iones se incluye también en la Figura 61 (iones fragmento a m/z 381,1109; 349,0852; 222,0746 y 194,0822 y 160,0424). Las siguientes fórmulas fueron asignados con sus correspondientes errores de masa, $C_{17}H_{21}N_2O_6S$ (1,53 ppm), $C_{16}H_{17}N_2O_5S$ (0,20 ppm), $C_{11}H_{12}NO_4$ (1,49 ppm), $C_{10}H_{12}NO_3$ (-1,00 ppm), $C_6H_{10}NO_2S$ (0,30 ppm) que proporcionan evidencia adicional sobre la identidad del derivado de AMX. La presencia simultánea de los iones m/z 222 y m/z 160 revelan la apertura del anillo β -lactámico con formación de un grupo éster metílico.

Figura 61: Ruta de fragmentación propuesta para AMXC-Me.

3.3.1.4 Conclusiones

El instrumental LC-QTOF operado en modos MS y MS/MS demuestra ser una herramienta versátil para la elucidación y confirmación de estudio de contaminantes emergentes. En este trabajo fue descrito por primera vez la elucidación estructural del compuesto AMXC-Me usando experimentos MS/MS con mediciones masa exacta. Se observa además que la AMX, como tal, se transforma antes del tratamiento de aguas residuales ya que no se encontraron residuos de AMX en las muestras analizadas. Se mostró que la principal ruta de transformación para AMX se lleva a cabo a través de la apertura del anillo β -lactámico. Fueron identificados cuatro PTs de AMX que corresponden a pares de diastereómeros: (*5S*) AMXO y AMXO (*5R*) junto con (*5S*) AMX-DKP y (*5R*)-AMX DKP. Este trabajo representa el primer reporte de AMXO en el medio ambiente. Dado que el diastereómero (*5R*) AMX-DKP fue frecuentemente

detectado en aguas superficiales, se sugiere una persistencia relativa superior para este compuesto por sobre el resto de PTs de AMX identificados. Estos datos revelan que a pesar de que AMX no está presente como tal, los PT de la droga original no son eliminados de manera eficiente durante el tratamiento de aguas residuales en las que el impacto sobre las aguas receptoras es aún desconocido.

3.3.2 Construcción y aplicaciones de bases de datos de masas exactas de contaminantes emergentes

3.3.2.1 Introducción

Las estrategias de detección de analitos con instrumental contemporáneo están necesariamente ligadas a técnicas espectrométricas de masas ya que estas conservan y proveen información estructural de las moléculas presentes en las matrices ambientales a muy bajas concentraciones (Krauss *et al.* 2010). Esto hace posible no solo la detección de contaminantes conocidos sino también la postulación del destino de estos, a menudo también en relación con sus posibles PTs ambientales (Pérez & Barceló 2007). Es sabido que los contaminantes orgánicos sufren transformaciones durante su paso a través del plantas de tratamiento de aguas residuales e incluso una vez que alcanzan el medio ambiente. La hidrólisis, fotólisis y otras transformaciones bióticas puede conducir a la formación de PTs inesperados, a veces incluso más tóxicos y persistentes que los compuestos originales (Richardson & Ternes 2011). Los reportes preliminares en esta materia, ya advertían en la espectrometría de masas un potencial que derivaría en la aplicación de nuevos analizadores de masa y la optimización de técnicas ya existentes (Richardson 2001a).

Hoy en día, los estudios referentes a la detección de muchos analitos en una muestra sumado a la identificación de los PTs presentes, es una tarea muy compleja y lenta, que se basa fundamentalmente en la interpretación espectral y la eliminación de señales ruidosas pertenecientes a la propia matriz que contiene a los contaminantes. Esto deriva en la necesidad de realizar un estudio minucioso de

cada contaminante simulando su degradación u ocurrencia en la matriz de análisis en condiciones de laboratorio (tal como se observó para AMX en el punto 3.3.1).

Las técnicas de espectrometría de masas de alta resolución (TOF-MS, QTOF-MS/MS, Orbitrap) son entonces utilizadas para proponer estructuras químicas, debido a la capacidad de estas en proporcionar la composición elemental de los compuestos (Lacorte & Fernández-Alba 2006; García-Reyes *et al.* 2007a; Kosjek *et al.* 2007). Sin embargo, este proceso es lento ya que se realiza normalmente mediante inspección manual de los cromatogramas para masas de composiciones elementales discretas, conociendo datos del contaminante o la muestra e incluso sometiendo a degradación al contaminante. Por otra parte, las condiciones en que los experimentos se desarrollan, difícilmente se adaptan con las que ocurren en los procesos reales (Picó *et al.* 2007). Los estudios en muestras obtenidas en condiciones reales, proporcionan una visión más realista del desafío analítico. Bajo este esquema, el potencial del analizador de masas por tiempo de vuelo (TOF o QTOF) ha sido ampliamente descrito en la literatura para el análisis de contaminantes orgánicos objetivo (de interés) y/o no objetivo en muestras ambientales (Lacorte & Fernández-Alba 2006; Sancho *et al.* 2006; Kosjek *et al.* 2007; Radjenović *et al.* 2007; Farré *et al.* 2008). En consecuencia, se han requerido nuevas herramientas de tratamiento de datos para acelerar y optimizar estos procesos, asegurando al mismo tiempo una alta certeza en los resultados. Las aplicaciones con motores de búsqueda basados en software capaces de buscar masas exactas discretas o muchas masas exactas secuencialmente a lo largo del cromatograma han sido recientemente empleadas con éxito en la búsqueda de algunos contaminantes orgánicos en alimentos y muestras ambientales (García-Reyes *et al.* 2007a; Farré *et al.* 2008). Con la introducción de nuevos paquetes de

software la estrategia ha sido desarrollar una base de datos de masas de iones de una lista de compuestos objetivo (Ferrer *et al.* 2006; Mezcua *et al.* 2009; Meng *et al.* 2010; Díaz *et al.* 2011) que no necesariamente es extrapolable a diferentes instrumentos y/o condiciones instrumentales. Desde el punto de vista de la formación de iones, se ha descrito la relación “fragmentación (en el espectrómetro de masas) - degradación ambiental” que ocurre empleando fuentes de ionización a baja energía (ej. ESI) como una herramienta útil para identificar y elucidar estructuralmente PTs de pesticidas en alimentos (García-Reyes *et al.* 2007b). El comportamiento observado marca que a partir de una especie dada, el patrón de fragmentación CID de un ion padre que ocurre en una fuente de ionización) de un espectrómetro de masas podría ser utilizado como referencia para predecir la degradación de los compuestos. Esto sugiere que los compuestos a menudo se transforman en productos de degradación de la misma manera que se fragmentan dentro del instrumento (García-Reyes *et al.* 2007b). Se supone entonces, que las fragmentaciones que ocurren dentro de un espectrómetro de masas conservan cierta huella química que mantiene la identidad de cada molécula ya que las fragmentaciones (bajo determinadas condiciones) ocurren a través de enlaces químicos susceptibles produciendo fragmentos predecibles con estadios energéticamente favorables.

Se abre entonces una nueva dimensión en el uso de bases de datos de masa exacta no sólo para la búsqueda de compuestos objetivo, sino también a PTs desconocidos cuando los fragmentos de iones característicos son incluidos en la base de datos. En este trabajo, un enfoque analítico junto con un flujo de trabajo ha sido desarrollado y evaluado para simplificar, sistematizar y automatizar la identificación de contaminantes emergentes objetivo y sus PTs en muestras de

interés ambiental. El objetivo trazado en este procedimiento fue incrementar el conocimiento sobre la ocurrencia, formación y destino de los PTs en el medio ambiente así como la identificación de PTs desconocidos. La estrategia propuesta para identificación de PTs se basa en: (i) el supuesto de que estos mantienen centros con una estructura similar que el compuesto original y por lo tanto, los fragmentos pueden poseer iones comunes, y (ii) el uso de herramientas avanzadas basadas en paquetes de software comercial de procesamiento de datos adquiridos por LC-MS (aplicación ECM, extracción de características moleculares) combinada con una base de datos de masa exacta creada en condiciones de ensayo para los analitos de interés, que incluye información de las masas exactas de los compuestos y sus fragmentos característicos.

3.3.2.2 Materiales y métodos: artículo científico N° 6 (Véase ANEXO 8)⁷

⁷ Use of an accurate-mass database for the systematic identification of transformation products of organic contaminants in wastewater effluents

Gómez-Ramos M.M., Pérez-Parada A., García-Reyes J.F., Fernández-Alba A.R. Agüera A.,

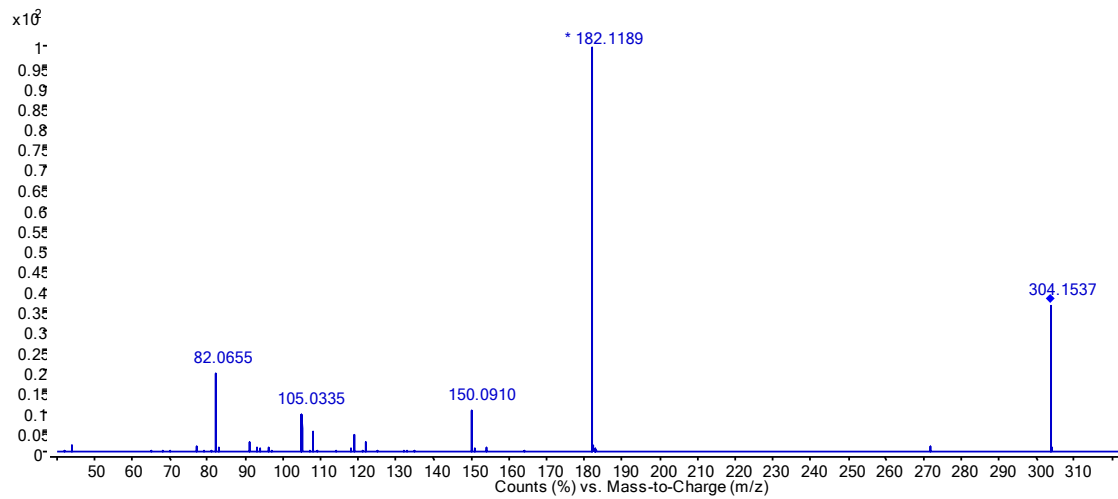
Journal of Chromatography A (2011) 1218, 8002-8012

3.3.2.3 Resultados y Discusión

3.3.2.3.1 Construcción de base de datos de contaminantes emergentes

Si bien la búsqueda automatizada empleando herramientas de software requeriría únicamente el uso de tiempos de retención cromatográficos además de los valores de masas exactas para composiciones elementales específicas, fueron adquiridos todos aquellos datos, tales como abundancias de iones a diferentes condiciones experimentales (principalmente variando energía de colisión). La interpretación espectral es posible debido a que las masas exactas ofrecen la posibilidad de conocer la composición elemental de los fragmentos. Las herramientas informáticas de identificación de iones reconocen los patrones de distribución de iones con composición específica, ponderando su distribución isotópica para masas determinadas (Thurman *et al.* 2007; Thurman & Ferrer 2010). Esto ofrece la eventualidad de confirmación de compuestos químicamente relacionados, que conservan iones o patrones de fragmentación, además de que hace posible elucidar moléculas desconocidas. La primera etapa entonces en la construcción de una base de datos de masas supone la interpretación lógica de un conjunto de iones que componen el espectro de masas obtenido. De esta forma se evita la inserción de entradas falsas o contaminaciones espectrales a la base de datos de iones provenientes de la propia muestra. La base de datos fue construida agregando para un compuesto conocido un código de fragmento con número progresivo de sus fragmentos (F1, F2, F3,...). Véase ANEXO 9 para conocer la lista de 92 compuestos seleccionados.

La Figura 62 muestra un espectro de masas junto con una propuesta lógica de fragmentación útil en la elucidación estructural de cocaína.



Cocaína

Figura 62: Espectro MS/MS y ruta propuesta de fragmentación de cocaína por ESI(+)-QTOF-MS/MS, Fragmentor 90V y energía de colisión 20 eV.

De forma ilustrativa, la Figura 63 demuestra la evolución cualitativa que sufre un espectro de masas de un compuesto determinado conforme se aumenta la energía de colisión en un experimento MS/MS.

Esto supone dos observaciones inmediatas: (i) bajas energías de colisión (5 a 10 eV en este caso) fragmentan los enlaces químicos más débiles y (ii) altas energías de colisión (20 a 30 eV) producen iones de masa pequeña por el alto grado de fragmentación.

Sin embargo, ambos experimentos en instrumentos LC-QTOF-MS/MS, llevados a cabo a energías diferentes son complementarios desde el punto de vista de la información que prevén, en la confirmación/elucidación de una molécula.

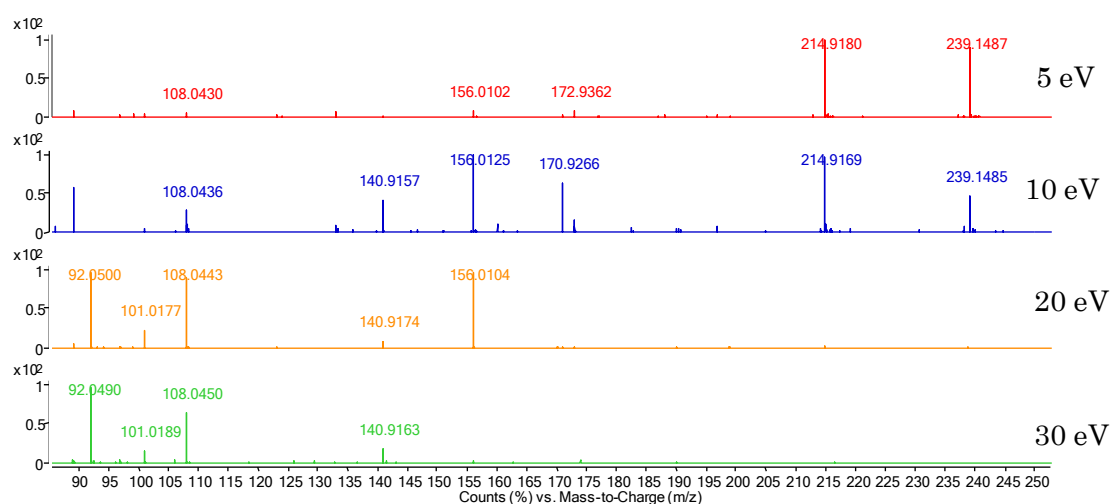


Figura 63: Espectro ESI(+)-QTOF-MS/MS de sulfadiazina. Fragmentor 90V y energías variables de colisión (5-30 eV).

Por tal motivo, fueron incluidos en la base de datos, todos los fragmentos relevantes (abundancia relativa >10%) y su composición lógica según su interpretación espectral. La variación estructural entre los compuestos abre una dimensión de complejidad en cualquier estrategia propuesta para la búsqueda de

compuestos orgánicos empleando base de datos de masas exactas. La base de datos fue desarrollada, buscando aumentar los compuestos detectados a la vez de minimizar el tiempo de procesamiento de datos y el número de falsos positivos y negativos. Por ende, se vislumbró que la mejor opción para un análisis exhaustivo de las muestras, sería realizar el análisis de las muestras a diferentes condiciones experimentales previo al contraste con la base de datos e incluir todos los fragmentos en la base, aunque esto último incrementa el tiempo de procesamiento de datos. En este sentido, se puede observar en la Figura 64 el aumento de complejidad espectral que presenta el espectro del β -bloqueante metoprolol en dos energías de colisión consecutivas.

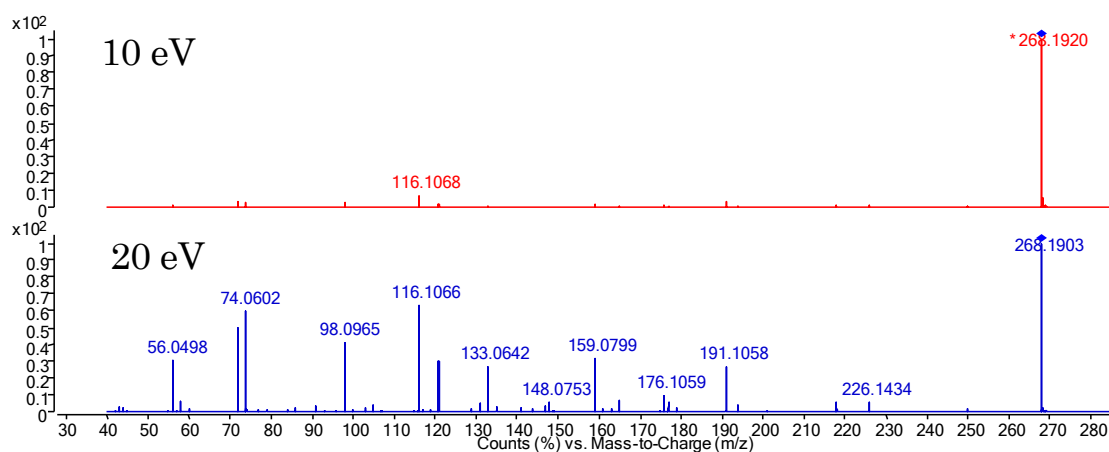


Figura 64: Espectro MS/MS y ruta propuesta de fragmentación de metoprolol. ESI(+)-QTOF-MS/MS, Fragmentor 90V y energías de colisión 10 y 20 eV.

Puede notarse que en primer lugar, sería posible identificar únicamente dos iones de este compuesto (m/z 268 y 116) a 10eV mientras que a 20eV, son obtenidos una gran variedad de iones lógicos (véase Figura 65) con capacidad de soportar confirmación.

Metoprolol

Figura 65: Propuesta de fragmentación MS/MS de metoprolol.

En base a estos principios, la base de datos desarrollada consta finalmente de 887 entradas (masas exactas de iones y formulas elementales) para los 92 compuestos seleccionados incluyendo iones padre y iones fragmentos. Bajo las condiciones seleccionadas, se marca entonces la existencia de 92 tiempos de retención diferentes mientras que la gran mayoría de las entradas de fragmentos ocurren entre los tiempos 0-3 min (compuestos de elución rápida) y 5-16 min (compuestos de elución media), con máximos de coelución entre 2 y 9 min (véase Figura 66).

Nótese además que es escasa la ocurrencia de contaminantes emergentes a tiempos altos de retención..

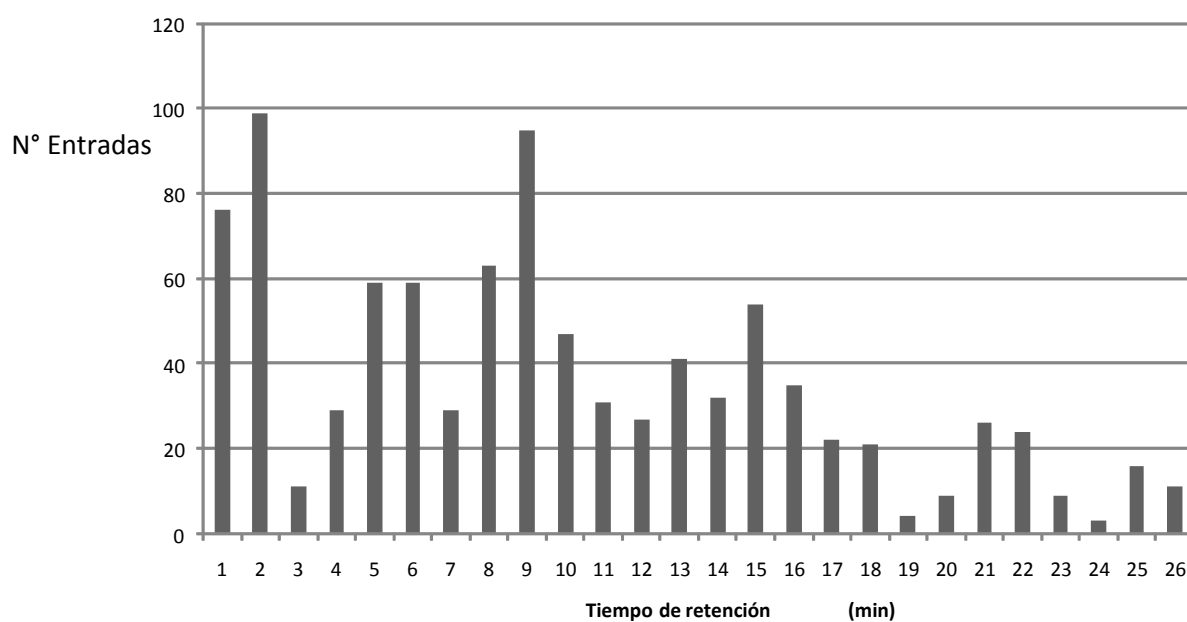


Figura 66: Distribución de entradas (inputs) de la base de datos según el tiempo de retención cromatográfico (screening objetivo). En total son 887 entradas para los 92 compuestos estudiados (la base completa es suministrada en ANEXO 9).

3.3.2.3.2 Identificación y confirmación de compuestos objetivo (target screening)

El flujo de trabajo propuesto, puede dividirse básicamente en la identificación de compuestos objetivo y compuestos a priori no objetivos, tales como metabolitos o PTs ambientales. Los compuestos objetivo son aquellos que fueron los utilizados para construir la base datos por de los que se dispone de estándar primario y se conoce su tiempo de retención . Por otra parte, los compuestos no objetivo podría decirse que son aquellos de los que no se dispone de estándar primario (o bien no existen comercialmente o son desconocidos) y se pueden relacionar con PTs. Necesariamente, al no disponer de tiempo de retención como dato útil en la identificación, los compuestos no objetivo generalmente necesitan una etapa posterior de confirmación de identidad a través de un experimento MS/MS dirigido para tal fin.

Esto último dependerá del número de iones de masa exacta con valor confirmatorio que posean el mismo tiempo de retención, y permitan confirmar inequívocamente una molécula ($n \geq 2$) (CE/657 2002).

La contribución de este trabajo al área del conocimiento fue expandir la identificación objetivo tal como ha sido previamente reportada (Ferrer *et al.* 2006; Gómez *et al.* 2010) con instrumentos operando en modo de barrido de MS (LC-TOF-MS) a la identificación de compuestos no objetivo empleando un análisis secundario de masas tándem MS/MS usando LC-QTOF-MS/MS.

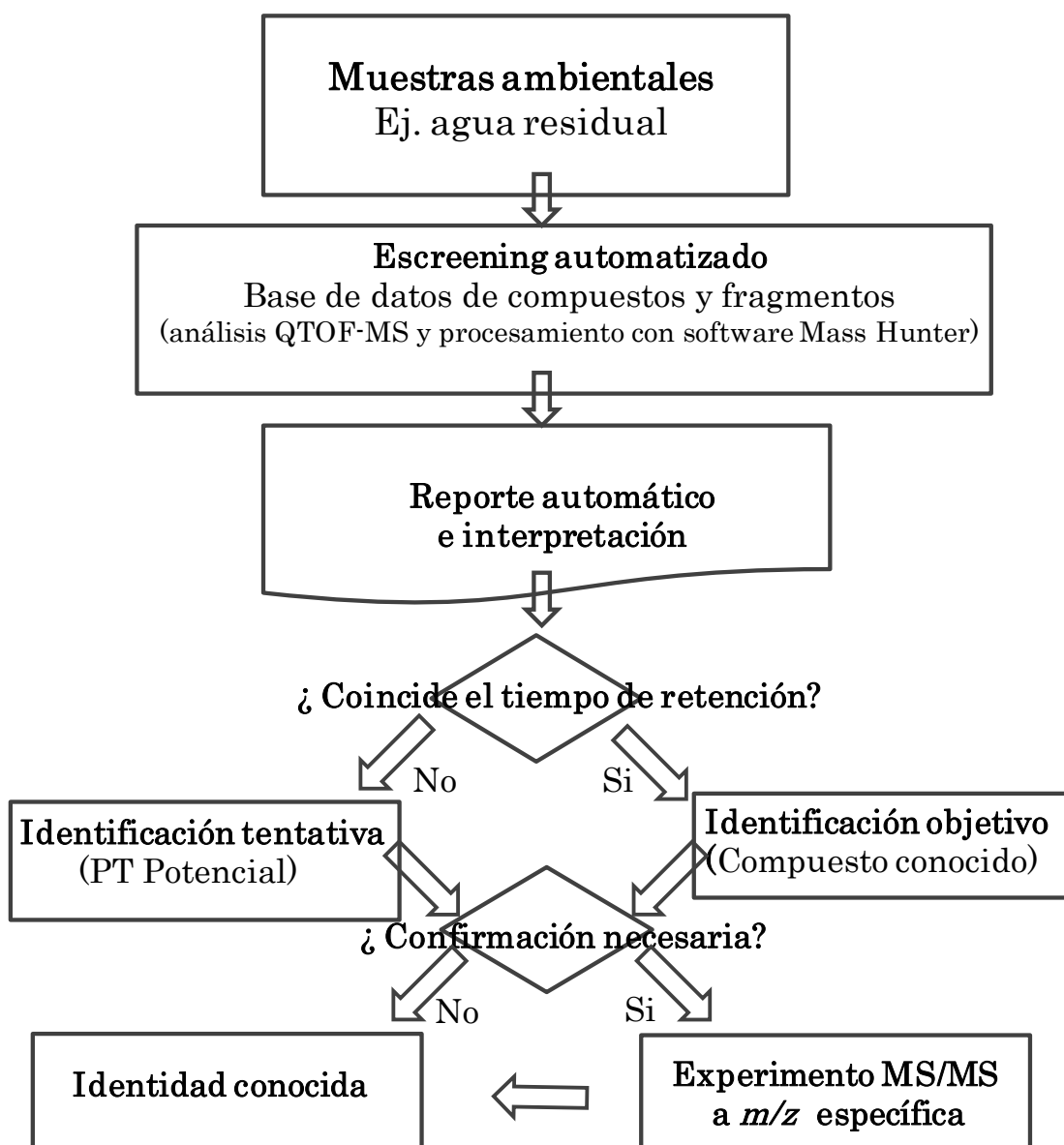


Figura 67 Flujo de trabajo propuesto para la identificación de productos de transformación por LC-QTOF-MS/MS. La estrategia comprende de tres etapas: a) Screening asistido por software, b) identificación de tentativos y c) confirmación por MS/MS si fuera necesario.

Bajo este esquema (véase Figura 67), la decisión de identificación de una masa exacta determinada a lo largo de un cromatograma obtenido por LC-QTOF (modo MS), la determina el tiempo de retención (tolerancia aceptada de desviación $\pm 2\%$, SANCO 2011) a menos que ocurra una situación excepcional de que se trate de iones isobáricos y además coeluyentes para compuestos diferentes.

La mejora operacional que posee un LC-QTOF es que puede trabajar en modos MS y MS/MS ofreciendo la posibilidad de realizar un número de experimentos tal de permitan confirmar o rechazar el hallazgo de un contaminante.

Un ejemplo de lo anteriormente citado puede observarse en la Figura 68a que refiere al screening, identificación y confirmación de residuos de ranitidina en una muestra de agua de río. En este ejemplo, en el screening es identificado por el software un único ion de ranitidina a su tiempo de retención, ingresado en la base de datos. Nótese, que el espectro de MS posee muchas interferencias espectrales provenientes de la propia matriz de agua de río. Esto no sería suficiente para confirmar la presencia de ranitidina en la muestra. Sin embargo, el espectro MS/MS realizado realizando un barrido de iones de entrada a m/z $315 \pm 1,3$, confirma la identidad de residuos de ranitidina en la muestra, obteniéndose dos iones fragmento del ion $[M+H]^+$ con desviaciones de masa menores a 2,74ppm a la formula esperada.

Una diferencia sustancial que vale la pena nombrar de los espectros de masa en modos operativos MS y MS/MS es que estos últimos, incrementan la selectividad ya que eliminan señales ruidosas a expensas de perder resolución isotópica, ya que los isotopos son discriminados por el cuadrupolo que actúa como filtro de masas. Esto repercute en la perdida de automatismo de la herramienta informática que interpreta erróneamente una composición elemental diferente, bajándole la calificación de probabilidad a la formula elemental correcta y aumentando el número de formulas elementales probables a poseer una misma masa (véase Figura 68b).

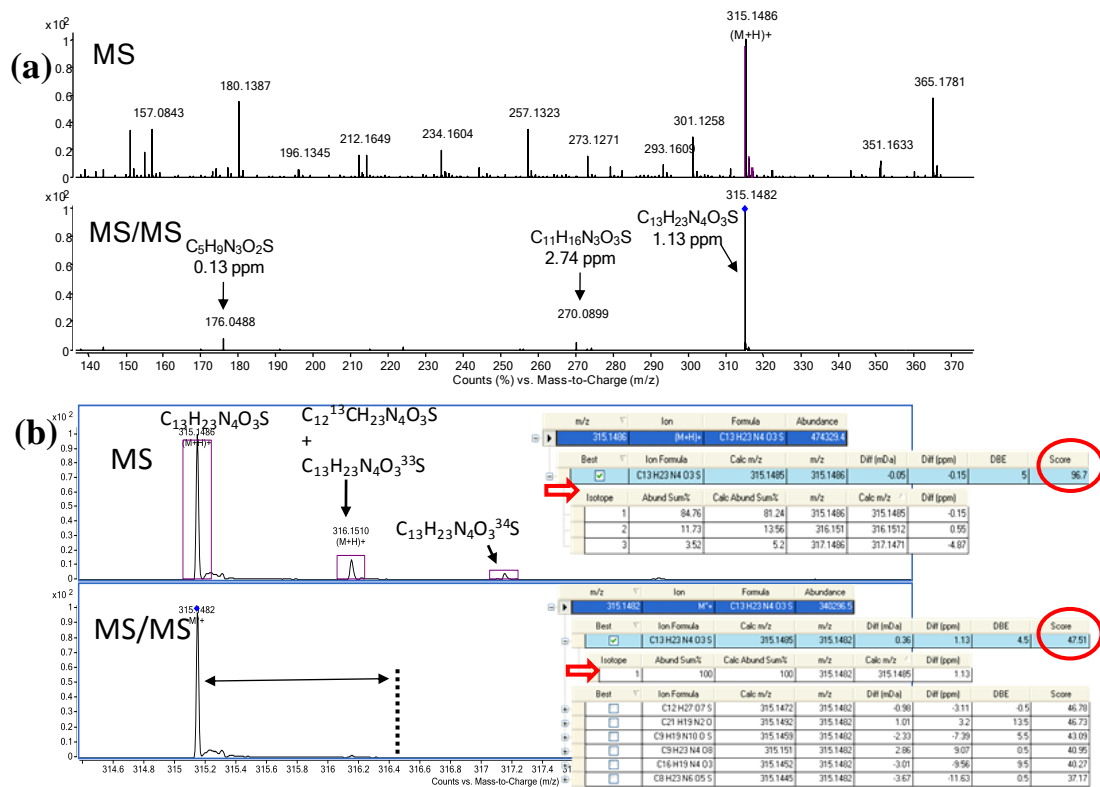


Figura 68: Screening y confirmación objetivo de ranitidina por QTOF. a) Espectros MS y MS/MS de ranitidina en agua de río. b) patrón isotópico de ion $[M+H]^+$ de ranitidina (ion formula $C_{13}H_{23}N_4O_3S$, m/z exacta teórica 315,1485) por MS y MS/MS ($\Delta m/z = 1,3$).

Finalmente y como se expondrá posteriormente, se resalta que la confirmación no es automatizada ya que la decisión de informar un hallazgo positivo o negativo pasa por la interpretación de un analista experimentado en elucidación espectral.

3.3.2.3.3 Identificación y confirmación de productos de transformación y relacionados

Como se comentó anteriormente, el enfoque desarrollado comprende básicamente de tres etapas: (a) de detección asistida por software, (b) identificación de contaminantes tentativos y (c) la confirmación/rechazo por análisis MS/MS.

a) Detección asistida por software: Al igual que en la búsqueda de compuestos objetivo, la detección asistida por software se realiza automáticamente con la herramienta de software Mass Hunter® v3.0B.

Esta etapa consiste en dos pasos:

- Extracción de los compuestos mediante el algoritmo "Extracción de características moleculares (aplicación MFE, Mass Hunter®, Agilent Technologies)".

En este primer paso, el software examina el cromatograma a fin de buscar entre todos los iones adquiridos, un grupo de iones que pueden ser lógicamente asociados con un pico cromatográfico real y representar una "característica" de una molécula (véase Figura 69). El MFE crea una lista de todos los compuestos asociados a picos cromatográficos que representan la distribución espacial de moléculas reales. Los parámetros de la búsqueda en el software son ajustados manualmente de acuerdo con la aplicación. En matrices complejas como aguas residuales se exige la aplicación de algunos filtros para disminuir el número de total de compuestos extraídos que provienen directamente de la matriz.

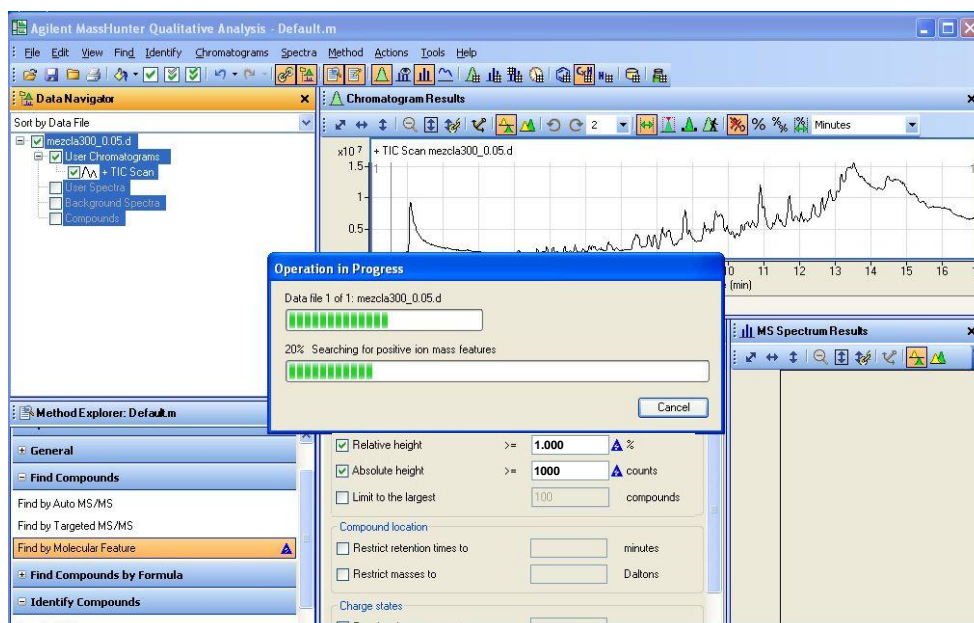


Figura 69: Búsqueda de PTs usando la aplicación MFE (Mass Hunter v3.B, Agilent Technologies)

En la etapa de validación del software con muestras de agua residual, se encontró experimentalmente que la aplicación necesita un filtro de picos cromatográficos con altura ≥ 100 cuentas para la extracción de iones y un filtro para iones en el pico con una abundancia absoluta ≥ 100.000 cuentas. Para aumentar la velocidad del análisis y simplificar el paso de identificación, es importante aplicar además una tolerancia de errores de masas. Se utilizó un filtro de error de masas con una tolerancia máxima de 5 ppm de error de masas basado en un criterio ampliamente aceptado para estos instrumentos tal como se recomienda en la normativa Europea basada en el criterio de puntos de identificación (CE/657 2002). Mediante esta opción, el algoritmo de búsqueda de MFE busca y extrae desde un cromatograma TIC sólo aquellos iones pertenecientes a compuestos cuyas masas exactas coinciden, dentro de las tolerancias especificadas, con las masas incluidas en la base de datos.

- Identificación de compuestos mediante asociación con la "base de datos de búsqueda"

La lista de los compuestos resultantes de la extracción por MFE es asociada nuevamente a la base de datos mediante una evaluación de los datos empíricos de los iones presentes con masa y fórmula elemental de los iones. Se realiza en esta etapa una evaluación automatizada no solo de la masa exacta, sino de su composición elemental (incluidos los defectos de masas y distribución isotópica) y tiempos de retención (véase Figura 70).

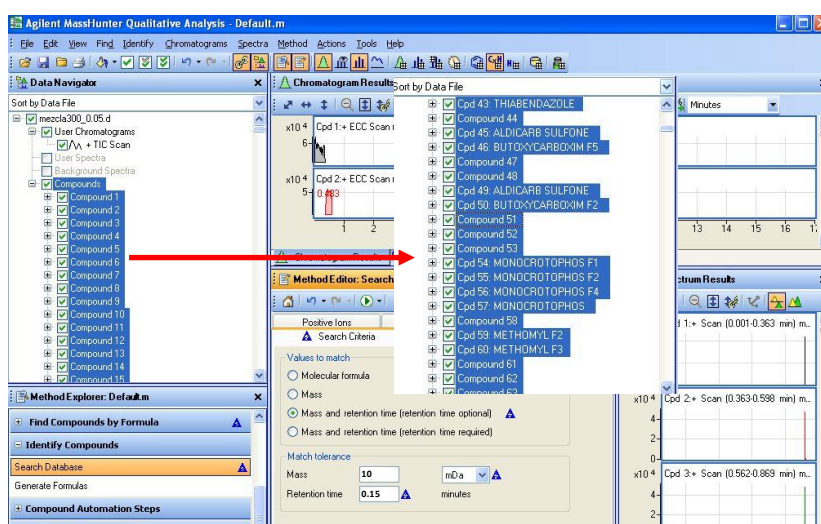


Figura 70: Búsqueda y asociación con base de datos (Mass Hunter v3.B, Agilent Technologies)

Los criterios de búsqueda definidos en el software fueron: (i) el error de masa exacta, con una tolerancia de 5 ppm para verificar la exactitud de masas, y (ii) una ventana de desviación de tiempo de retención con tolerancia de $\pm 0,3$ min (1%). Con esto último se discrimina el análisis de compuestos objetivo de no objetivo, como procesos bien diferenciados.

b) Identificación de productos de transformación tentativos

La detección automática como se ha descrito anteriormente genera un informe o reporte con la lista de iones coincidentes con la base de datos. La identificación positiva de compuestos genera datos coincidentes con la base de datos en la masa exacta a tiempos de retención esperados. Estos compuestos corresponden con analitos objetivo junto con sus fragmentos presentes en la muestra.

Conjuntamente, el informe también incluye los compuestos que dan buena correlación en la masa exacta, pero presentan tiempo de retención diferente. Estos compuestos se consideran inicialmente como PTs o potenciales fragmentos de PTs (PTs tentativos). La base de datos fue evaluada mediante el uso de un parámetro de puntuación (ranking o score). La puntuación se presenta en una escala de 0 a 100 y se calcula teniendo en cuenta la correlación de masas exactas y su distribución isotópica (abundancia y defectos de isótopos). Este es un parámetro útil para discriminar entre los hallazgos positivos reales y los falsos positivos. Por lo tanto cuanto mayor sea el valor, más plausible es la composición elemental propuesta. En este estudio se estableció experimentalmente, un umbral inferior de 60 de score ya que hasta este valor han podido ser confirmados algunos hallazgos. Los compuestos con valores por debajo de 60 no son considerados debido a la alta probabilidad que estos presentan en ser falsos positivos, algo que debería ser investigado en profundidad en estudios posteriores.

c) Confirmación por análisis MS/MS

Una vez que los PTs han sido identificados tentativamente en el paso anterior, es necesario confirmar su identidad mediante la obtención de información estructural adicional para proponer una estructura correcta o descartar el hallazgo. Esto puede

obtenerse a través de más de una fragmentación o experimento MS/MS del compuesto seleccionado a condiciones específicas. La estructura propuesta se basa en todos los casos de un análisis lógico de los iones e interpretación de la fragmentación aunque finalmente la confirmación inequívoca puede obtenerse a través del análisis de patrones analíticos. Sin embargo, en general para los PTs los estándares no están disponibles por lo cual se emplean los criterios empleados de la reglamentación Europea de identificación de analitos por instrumentos de masas exactas. En general, como no se dispone de tiempos de retención (primer punto de identificación), se necesita un ion adicional para confirmar un hallazgo, por tanto se utiliza un mínimo de 3 iones de masa exacta conocida para soportar una estructura (CE/657 2002).

Metoprolol

Terbutalina

Figura 71: Estructura de iones isobáricos de dos β -bloqueantes.

Cabe finalmente remarcar que la identificación de un único ion de masa exacta poco aporta al análisis estructural o a la identificación de un compuesto.

Basta imaginar tal como se muestra en la Figura 71 para metoprolol y terbutalina, que compuestos orgánicos (con formulas elementales principalmente basadas en C, H, O y N) diferentes pueden generar iones isobáricos estructuralmente muy diferentes, incluso cuando estos conservan sus equivalentes de dobles enlaces (EDE). Se ratifica que la elucidación de la ruta de fragmentación por un analista que interprete la estructura de los iones, juega un rol preponderante en la confirmación de un PT.

3.3.2.3.3.1 Iones genéricos de una familia o grupo químico

Una vez creada la base de datos de iones padre y fragmentos, se observó que determinadas familias o grupos químicos de compuestos mantienen ciertos iones en común con sus congéneres ya que conservan similitudes estructurales. Se destaca por ejemplo, que las tetraciclinas conservan el ion m/z 154 de formula $C_7H_8NO_3$, las sulfas conservan el ion m/z 156 de formula $C_6H_6NO_2S$ y las penicilinas la m/z 160 proveniente del anillo tiazolidínico de formula $C_6H_{10}NO_2S$ (véase la Figura 72). La estrategia de búsqueda de un ion genérico simplifica la búsqueda manual de compuestos objetivo de una misma familia.

Figura 72: Estructuras coincidentes, formulas elementales y masas exactas de algunos iones genéricos de una familia de compuestos.

Sin embargo, esto supone un incremento en la complejidad de identificación de PTs empleando búsquedas asistidas por software, ya que un mismo hallazgo de esta clase de familias puede originarse desde varios compuestos. La etapa de confirmación y elucidación estructural por análisis MS/MS es entonces la más relevante cuando se trata de compuestos con origen similar.

Un ejemplo son las penicilinas y su anillo tiazolidínico de ion formula $C_6H_{10}NO_2S$. La identificación no objetivo (sin coincidencia en tiempo de retención con cualquier penicilina) de este ion en un cromatograma de una muestra de agua residual podría corresponder a un PT originado de cualquier penicilina. Supone del análisis estructural de este hallazgo que este corresponde con la presencia de

diasterómeros de AMX-DKPs, tal como se expuso anteriormente (véase ANEXO 7, Pérez-Parada *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011). Puede observarse en la Figura 73, el corrimiento en tiempos de retención obtenido en este ejemplo de caracterización de dos PTs.

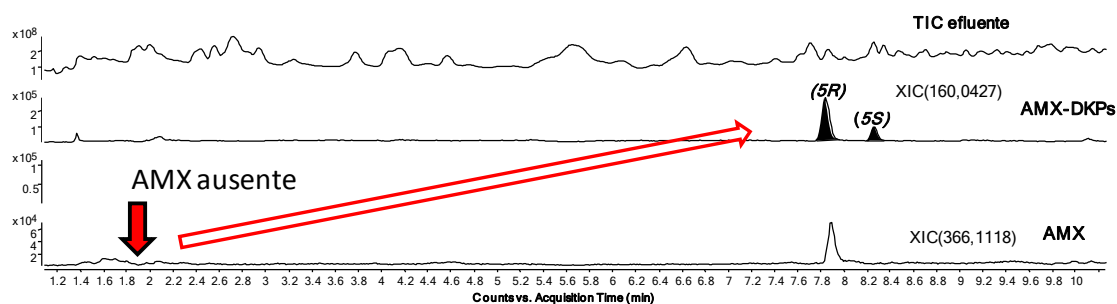


Figura 73: Identificación de AMX-DKPs en agua residual utilizando fragmentos genéricos.

Sin embargo, aunque utilizando debidamente la búsqueda de iones genéricos se han podido hallar estos dos PTs, la evaluación final de esta estrategia de identificación es incompleta, ya que no permite identificar los diasterómeros AMXOs también provenientes de AMX, porque estos no poseen iones genéricos con la droga padre.

3.3.2.3.3.2 Búsqueda de productos de transformación usando iones fragmento comunes

Esta estrategia ya había sido reportada para el caso de búsquedas manuales de contaminantes (García-Reyes *et al.* 2007b) no así claramente para la búsqueda asistida por software. Cabe remarcar que en la presente base de datos obtenida por

QTOF-MS/MS en comparación a otras bases de datos obtenida por QTOF-MS (Gómez *et al.* 2010; Díaz *et al.* 2011) es que esta amplía el concepto ya que incrementa sustancialmente el número de entradas (iones fragmentos) con capacidad de identificación y/o confirmación de las moléculas. Esto se da porque generalmente los iones fragmento comunes son pequeños fragmentos que además son producidos a altas energías de colisión, lo que desfavorece su ocurrencia en un cromatograma en modo de barrido MS obtenido con una fragmentación en la fuente a energía nominal. La búsqueda de iones comunes mostro ser la estrategia más exitosa de búsqueda de PTs de determinadas familias químicas, principalmente de aquellas que poseen grupos fácilmente hidrolizables (ej. esterres, amidas, aminos secundarias). La búsqueda de iones comunes puede verse a la vez como una ampliación de la búsqueda de iones genéricos de familias químicas solo que se incrementa su potencialidad ya que en cierta forma conserva características de la molécula padre, a diferencia de los iones genéricos, que únicamente las conservan para su familia de origen. Esta estrategia probó ser efectiva en la identificación de β -bloqueantes, pesticidas organofosforados y triazinas, opioides, algunos antibióticos, metil-xantinas y contaminantes misceláneos (eritromicina, azitromicina y cloruro de benzalkonio).

Para ejemplificar el esquema seguido en la identificación de PT usando iones comunes se ejemplifica con el caso del pesticida diazinon. La Figura 74 muestra el espectro MS/MS obtenido usando como precursor el ion $[M+H]^+$ con m/z 305 (ion formula $C_{12}H_{22}N_2O_3PS$).

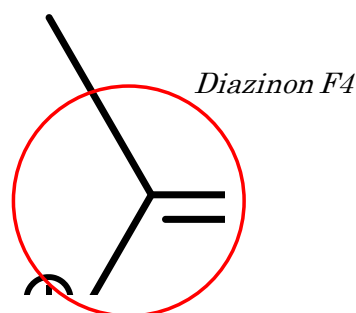
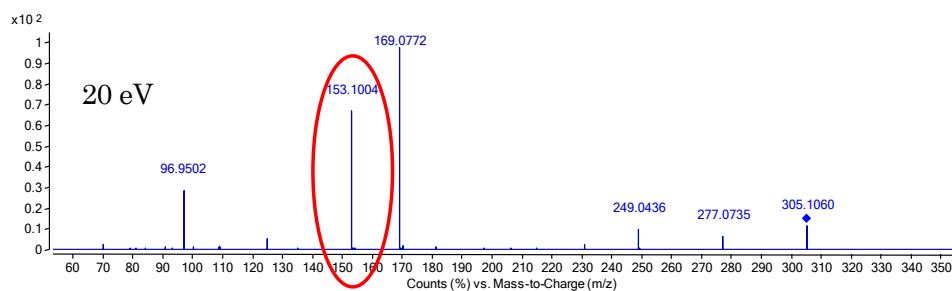


Figura 74: Espectro MS/MS y ruta propuesta de fragmentación de diazinon. ESI-QTOF-MS/MS, Fragmentor 90V y energía de colisión 20 eV.

La propuesta de fragmentación mostrada explicaría la formación del ion con fórmula $C_8H_{13}N_2O$ de m/z 153 proveniente de la ruptura del grupo éster fosfórico, correspondiente a la entrada Diazinon F4 en la base de datos.

El reporte de análisis en modo de barrido de MS en una muestra ambiental mediante el esquema asistido por software (Figura 75a) corresponde con la identificación del ion de masa exacta Diazinon F4 con alto score (Figura 75b) y su confirmación estructural por MS/MS mediante un segundo análisis (Figura 75c) tomando como precursor la m/z 153.

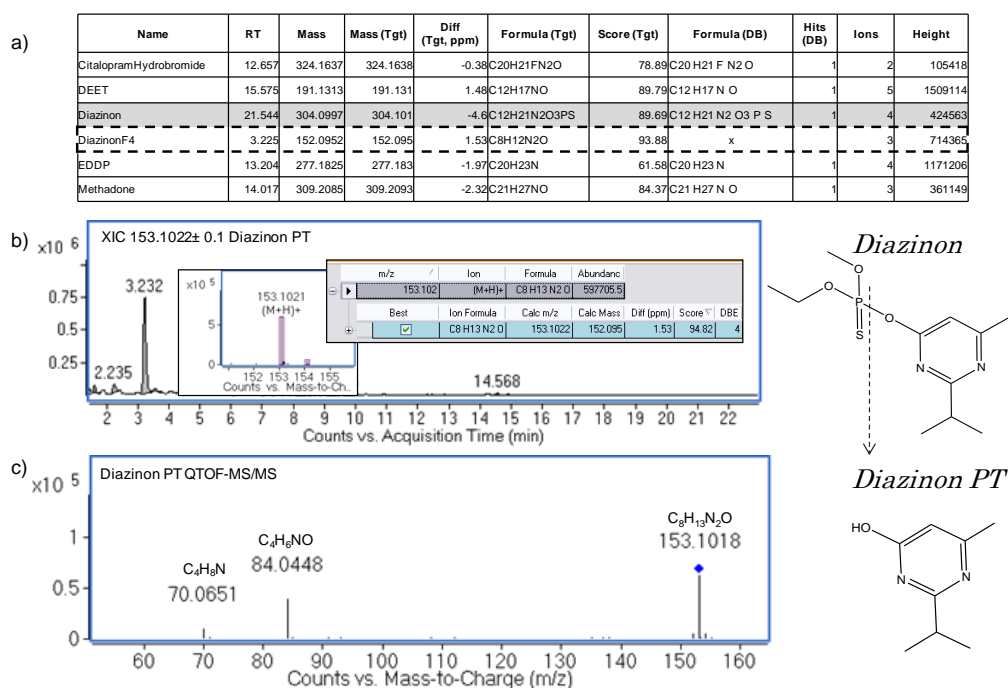


Figura 75: a) Reporte de screening de Mass Hunter denotando un PT encontrado con masa exacta de un ion fragmento de diazinon (diazinon F4, C₈H₁₃N₂O). b) pico cromatográfico para diazinon PT c) espectro de confirmación MS/MS para diazinon PT.

El esquema de búsqueda por iones comunes permitió identificar tres nuevos contaminantes no descritos anteriormente en muestras ambientales en la literatura, derivados de las drogas omeprazol, carbamazepina y eritromicina (véase ANEXO 8, Gómez-Ramos *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2011).

Volviendo al ejemplo de AMX retomado en el punto 3.3.2.3.3.1, la presente estrategia permitió identificar inambiguamente todos los PTs AMX-DKPs y AMXOs a través de una estrategia asistida por software, en lugar de la desarrollada bajo un esquema completamente manual. Sin embargo, esta estrategia aun es incompleta para caracterizar muchas transformaciones ambientales que pueden ocurrir para los mismos analitos, principalmente aquellas que pierden o ganan funcionalidades químicas importantes. Se denota además que

los parámetros de búsqueda están estrechamente relacionados con la exhaustividad del estudio y el número de análisis realizado a diferentes condiciones de adquisición. Vale la pena mencionar que este método no puede ser considerado una generalidad para todos los contaminantes estudiados ya que no todos los PTs poseen fragmentos comunes a los compuestos originales, como veremos posteriormente.

3.3.2.3.3 Aplicación de transformadas de masa exacta

Las aplicaciones basadas en esquemas de predicción asistidas con herramientas informáticas han sido recientemente introducidas para esclarecer el destino de los contaminantes en el medio ambiente. En el año 2009, la primera contribución en muestras ambientales aparece reportada mediante el empleo de una herramienta web de predicción de metabolismo microbiano llamada UM-PPS (sistema de predicción de vías metabólicas de la Universidad de Minnesota) con posterior análisis por HRMS con analizador Orbitrap (Kern *et al.* 2009). Otros autores han empleado una estrategia similar mediante el contraste con la base de datos de compuestos de Pubchem (NCBI, EE.UU) usando una estrategia espectroscópica combinada de LC-NMR/TOF-MS (Godejohann *et al.* 2011). La principal desventaja de ambos esquemas es que son dirigidos a compuestos objetivo con masa y/o fórmula conocidas además de que son poco intervenidas por el usuario.

Interesantemente, aparece un reciente reporte con enfoque metabólico del empleo de transformadas de masas exacta en la búsqueda de metabolitos en muestras biológicas (orina, sangre y pelo) (Liotta *et al.* 2010). Los analitos son identificados llevando a cabo una compensación de la masa que supone un cambio en la fórmula elemental mediante análisis por HRMS.

En el uso de transformadas de masa exacta se ven expresadas las diferencias de formulas elementales de los compuestos y tienen la simplicidad de que pueden acoplarse fácilmente a la base de datos desarrollada en el laboratorio empleando simples planillas de MS Excel.

Tabla 15 muestra algunas transformaciones reportadas y el cambio neto en masa y fórmula que supondría tal transformación. Este concepto podría verse como una nueva potencialidad de screening de bajo costo ya que no necesita de estándares ni materiales.

Mediante una búsqueda bibliográfica extensiva y un análisis teórico de las estructuras químicas, se identificaron para los compuestos incluidos en la base de datos de contaminantes, 66 transformaciones potenciales a ocurrir (véase ANEXO 10). En comienzo, la estrategia de búsqueda es la misma que la descrita en el punto 3.3.2.3.3, solo que previamente se aplican deliberadamente todas las transformadas posibles incluidas aquellas sin significado químico. Esto último, resulta en una clara extensión del tiempo de búsqueda informática (en el orden de minutos) además de una corroboración del significado del hallazgo en el reporte de datos por el analista

Transformación	Cambio exacto de masas	Cambio neto en formula	Ejemplo	Origen	Ref.
Desmetilación	- 14,0157	- CH ₂	Isoproturon	Degradación ambiental	Amine-Khodja <i>et al.</i> (2004)
Desetilación	- 28,0313	- CH ₂ CH ₂	Atrazina	Degradación ambiental	Ibáñez <i>et al.</i> (2004)
Hidratación	+ 18,0106	+H ₂ O	Amoxicilina	Metabolismo y degradación ambiental	Lamm <i>et al.</i> (2010)
Hidroxilación	+ 15,9949	+O	Diclofenac	Fotólisis y fotocatalisis	Vogna <i>et al.</i> (2006)
Acetilación	+ 42,0106	+C ₂ H ₂ O	Sulfadiazeno	Metabolismo	Lamshöft <i>et al.</i> (2010)
N-oxidación	+ 15,9949	+O	Sulfametoxazol	Potabilización de aguas	García-Galán <i>et al.</i> (2008)

Tabla 15: Ejemplos de algunas transformaciones y cambios de masa y formula reportadas para productos de transformación en matrices ambientales.

La estrategia de búsqueda deliberada para compuestos no objetivo simplemente busca reducir el tiempo que le toma al analista preparar una lista de búsqueda, aumentando la probabilidad de que alguna de esas entradas posea significado químico. Esto supondría que para cada entrada de masa exacta deberíamos aplicar 66 transformaciones, de las cuales muy pocas son lógicas y por lo cual para una base de datos de 887 entradas deberían buscarse en teoría 58.542 entradas transformadas. Sin embargo, sería posible depurar la lista, para aquellas entradas sin significado químico aunque no fue realizado en la práctica. Una hoja de cálculo programada de MS Excel es empleada a tal fin. Cabe esclarecer que se aplica un filtro en la hoja de cálculo para trabajar con masas >0.

Al igual que en las estrategias de búsqueda no objetivo, la decisión de hallazgo y/o confirmación analítica sigue estando sujeta a la decisión del analista.

A modo de ejemplo se puede citar un hallazgo de screening por masas exactas en una muestra de agua residual domestica analizada por LC-QTOF en modo de barrido MS, empleando transformadas de masas para un PT del pesticida azoxystrobin (formula $C_{22}H_{17}N_3O_5$; masa 403,1168 Da).

Las entradas de la base de datos para el azoxystrobin corresponden con cuatro fragmentos a los que se les aplicó transformadas de masas y screening asistido por software al cromatograma TIC adquirido por LC-QTOF.

La Figura 76 corresponde con una fracción del espectro de masas de un TIC a un tiempo de retención diferente al que la base de datos marca como el pertinente de la masa de azoxystrobin con una pérdida neta de CH_2 (-14,0157 Da), lo que hace sospechar de la identificación de un PT. Puede notarse claramente el patrón isotópico del ion fórmula $C_{21}H_{16}N_3O_5$; m/z 390 ($[M_{\text{azoxystrobin}}+H-CH_2]^+$) obtenido por modo de barrido MS que es hallado dentro de otras señales que provienen interferentes de la matriz. Se expone claramente que la identificación de este ion dentro de la matriz es posible gracias a que se trabaja con un instrumento de HRMS.

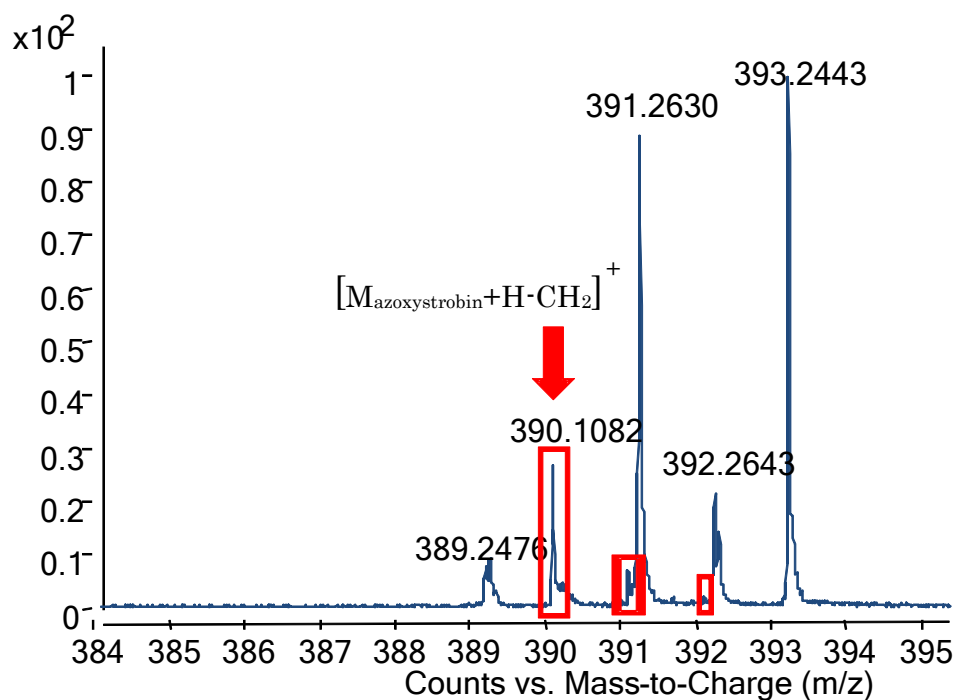


Figura 76: Espectro de alta resolución: Identificación del patrón isotópico del ion fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_5$ correspondiente al ion $[\text{M} + \text{H}]^+$ de azoxystrobin ácido.

De la inspección del reporte, surge además que este hallazgo posee un ion común al propio azoxystrobin (azoxystrobin F1, ion fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_4$, m/z 372) tal como se observa en la Figura 77. Puede verse que la fórmula soporta su estructura debido a una pérdida neta de H_2O en el espectro ($[\text{M}_{\text{azoxystrobin}} + \text{H} - \text{CH}_2 - \text{H}_2\text{O}]^+$). Finalmente este hallazgo permite confirmar al azoxystrobin ácido, un compuesto ya conocido en bibliografía debido a la degradación hidrolítica del pesticida original (Singh *et al.* 2010). La confirmación de esta estructura se realizó mediante la posterior elucidación de las fórmulas elementales de los iones de masa exacta encontrados junto con los EDE mediante el uso de experimentos de MS/MS tándem por QTOF. La ruta de transformación de azoxystrobin se esquematiza en la Figura 78.

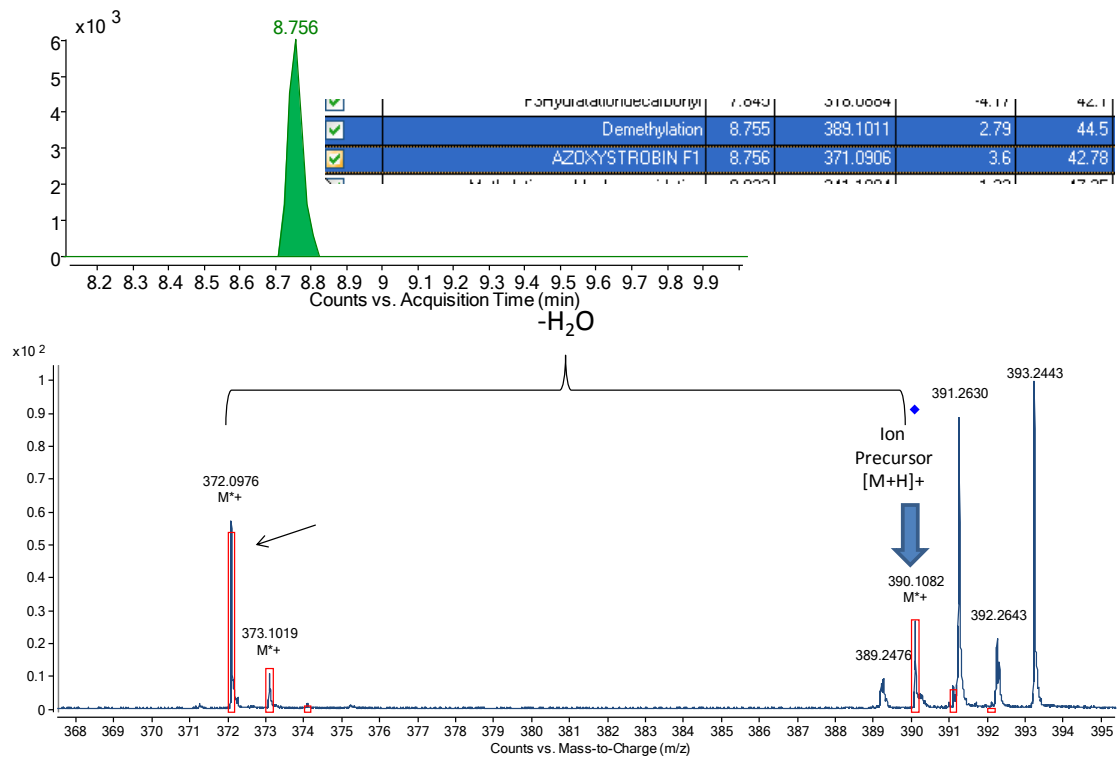


Figura 77: Identificación del pico cromatográfico del ion formula $C_{21}H_{16}N_3O_5$ correspondiente a azoxystrobin ácido y detalle de su espectro de MS mostrando la perdida de H_2O .

Azoxystrobin

Figura 78: Formación de azoxystrobin ácido ($C_{21}H_{15}N_3O_5$).

Compuesto padre	Transformación aplicada	Formula elemental del hallazgo	Calc. m/z	TR (min)	Estructura propuesta
Azoxystrobin	-CH ₂	C ₂₁ H ₁₃ N ₃ O ₄	390,1084	8,76	
Atrazina	- C ₃ H ₆	C ₅ H ₉ ClN ₅	174,0546	6,80	
Bupirimato	- SO ₂ N(CH ₃) ₂	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O	210,1601	5,50	
Imidaclorpid	-NO ₂	C ₉ H ₁₂ ClN ₄	211,0745	2,75	
Terbutrin	-C ₄ H ₉ N+O	C ₈ H ₁₀ N ₄ OS	187,0648	5,22	
Terbutrin	- C ₂ H ₄	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	214,1121	6,80	

Tabla 16: PTs de pesticidas identificados en muestras reales de aguas agrícolas empleando transformadas de masas exactas.

Bajo esta estrategia fueron identificados un grupo de PTs de pesticidas en aguas (véase Tabla 16) estando uno de ellos actualmente sin reportar en la literatura (formula $C_6H_{10}N_4OS$, MW 186,2348 Da, origen propuesto terbutrin). Se demuestra en esta aplicación una herramienta adecuada para el monitoreo de nuevos contaminantes tales como PTs en matrices ambientales, empleando una estrategia de screening sistematizado dirigida a compuestos no objetivo. Se ve una potencialidad de esta aplicación en la predicción de mecanismos de degradación de contaminantes así como el seguimiento de reacciones en cadena (ej. reacciones fotocatalizadas) además de que es posible hacer un análisis dirigido si se conoce la historia de la muestra o el analito. Sin embargo, se observaron algunas limitaciones respecto a la química involucrada ya que ciertas transformaciones inmediatas se ven favorecidas en la detección además de que la respuesta analítica es diferente para cada compuesto y está sujeta a la sensibilidad alcanzada (concentración del analito, eficiencia de ionización)..

Nuevamente se recomienda en el análisis utilizando transformadas, la adquisición de datos por LC-MS en modo de barrido MS empleando varios voltajes de ionización en la fuente de forma de inducir al incremento de fragmentación. Se nota además la necesidad de realizar un segundo análisis para confirmar los hallazgos, estableciendo una ruta lógica de fragmentación, al igual que las técnicas de identificación previamente comentadas. Una desventaja que resulta evidente es la dependencia a equipamiento sofisticado y un paquete de software comercial para llevar a cabo esta clase de estudios.

Por otra parte, se denota el desconocimiento por parte del analista de los algoritmos empleados por el software para realizar la deconvolución de masas y picos útiles en la identificación de analitos.

3.3.2.4 Conclusiones

Los PTs de contaminantes demuestran estar frecuentemente presentes en aguas residuales y superficiales. Las estrategias de identificación desarrolladas demuestran ser un valioso aporte a los métodos de screening de compuestos no objetivo. Se puede concluir que es posible hallar PTs sin la necesidad de estándares, simplemente con la creación de herramientas de procesamiento de datos adquiridos en modo de barrido HRMS. Las rutas de fragmentación de los contaminantes en un espectrómetro de masas pueden ser utilizadas para detectar PTs de contaminantes bajo un esquema predictivo. El uso de bases de datos que incluyen información de masas exactas de compuestos y sus fragmentos representa una herramienta útil para la identificación de PTs en un escenario realista. A pesar de las ventajas del uso del procedimiento semi-automático descrito en este trabajo, la confirmación definitiva de los PTs y su confirmación aún representan una tarea compleja que requiere de personal calificado en interpretación espectral capaz de realizar una revisión crítica de la información cruda suministrada por un software. Se sostiene que la confirmación inequívoca, para la gran mayoría de los casos es únicamente factible mediante la posibilidad de realizar experimentos MS/MS de los compuestos tentativamente identificados mediante las estrategias desarrolladas.

3.3.3 Mejoras analíticas de instrumentos híbridos de LC-MS/MS tándem (LC-QTOF y LC-QLIT) en la evaluación de contaminación emergente en aguas superficiales

3.3.3.1 Introducción

Las capacidades tecnológicas de los instrumentos de espectrometría de masas han avanzado significativamente en los últimos años sobre todo en términos de selectividad, sensibilidad y especificidad de señal. Debido a su sensibilidad y robustez, el analizador QqQ es el más reportado para el análisis objetivo de contaminantes emergentes en el medio ambiente (Petrovic *et al.* 2010). Algunas de las características analíticas que este proporciona van desde un excelente rendimiento para el análisis cuantitativo cuando se trabaja en el modo SRM lo que permite seleccionar el modo de dos transiciones específicas con confirmación del analito en la muestra [6, 7]. Sin embargo, estas características abordan un enfoque clásico dirigido al análisis de compuestos objetivo que es a menudo insuficiente para una evaluación exhaustiva de los contaminantes emergentes en medio ambiente (Gómez *et al.* 2010, Kosjek *et al.* 2007). Afrontando este desafío, las técnicas modernas de MS suelen estar equipadas con masas de alta resolución y/o alta sensibilidad. Estas dos características se complementan con capacidades adicionales provenientes de nuevos modos operacionales y herramientas de software que proporcionan información estructural adicional.

La búsqueda de contaminantes y sus PTs en aguas de río suele ser más exigente que aguas residuales, debido a los niveles más bajos de concentración de estos (pg/L – ng/L). La ventaja de los instrumentos de última generación es que ofrecen mayores capacidades de análisis desde procesos de separación e ionización más eficientes, mejoras electrónicas, ópticas, de diseño de analizador así como herramientas de software asociado. Sin embargo, una tendencia creciente es incluir varias funciones ofrecidas por los diferentes analizadores de MS en un único instrumento. Los espectrómetros de masas híbridos pueden mejorar el potencial individual de los analizadores de masa mediante la combinación de sus capacidades en un mismo instrumento así como una mejora de la calidad y confiabilidad de la información proporcionada. Si bien existen varios instrumentos híbridos disponibles, los instrumentos cuadrupolo - tiempo de vuelo (QTOF) y cuadrupolo - trampa lineal de iones (QLIT)) se pueden considerar una buena combinación para los laboratorios ambientales avocados a la investigación avanzada de contaminantes.

Se exponen en este trabajo algunas experiencias sobre las nuevas posibilidades y debilidades que ofrecen los espectrómetros híbridos de MS modernos direccionados al análisis integral de nuevos contaminantes orgánicos en aguas del río. En esta sección se introduce una discusión crítica de la potencialidad, tendencias y actuales limitaciones que presentan estos equipos y herramientas asociadas que pueden ser considerados buenos exponentes del estado del arte actual en instrumentación.

3.3.3.2 Materiales y métodos: artículo científico N°7 (Véase ANEXO 11)⁸

⁸ Analytical improvements of hybrid LC-MS/MS techniques for the efficient evaluation of emerging contaminants in river waters: a case study of the Henares River (Madrid, Spain)

Pérez-Parada A., Gómez-Ramos M.M., Martínez Bueno M.J., Uclés S., Uclés A. and Fernández-Alba A.R.

Environmental Science and Pollution Research (2012) 19, 467-681.

3.3.3.3 Resultados y Discusión

3.3.3.3.1 Espectrometría de masas de alta resolución: experiencia con QTOF

3.3.3.3.1.1 Estrategias de identificación rápida

En una serie de experimentos de screening objetivo de contaminantes emergentes se observó que el efecto matriz juega un papel importante en la exactitud de masa y consecuentemente en los errores de masas de analitos al analizar diferentes muestras de agua de río. Como se comento anteriormente en el apartado 3.3.2, en la búsqueda asistida por software de contaminantes por instrumentos HRMS, existe una serie de restricciones y tolerancias, que modifican el reporte de hallazgos para una muestra. Uno de los principales problemas, en esta estrategia surge de la suponer que no hay errores de masa superiores a la tolerancia marcada para los analitos o numero de cuentas bajo el umbral, al igual que una desviación inesperada de tiempo de retención por la influencia de la matriz o la propia naturaleza del analito. En estos casos, se puede arribar fácilmente a un resultado de ausencia (falso negativo) que es obviado por el software. Se desprenden algunas debilidades inherentes al análisis a las técnicas asistidas por software empleando LC-HRMS.

Para ejemplificar lo anteriormente citado, se muestra el análisis de una misma muestra de agua de río obtenida por SPE con preconcentración (400 veces) y el obtenido empleando una dilución a la mitad en fase móvil inicial (extracto: (MeCN: H₂O, 1:9))

La Tabla 17 muestra un resumen del reporte obtenido en la detección de masas exactas cuando se utiliza esta estrategia para un grupo de 17 contaminantes objetivo cuya presencia era conocida en la muestra. Bajo las condiciones de

screening seleccionadas empleando el algoritmo de búsqueda de masas exactas por MFE y estableciendo los parámetros del software comentados previamente (umbral de recuento, filtro de masa y tolerancia tiempo de retención) se encuentra que el rendimiento de detección automática es similar al conseguido sin la dilución de la muestra a pesar de algunas excepciones marcadas para ciertos contaminantes (teofilina, metroinidazole, eritromicina y diazepam).

Compuesto	T _R (min)	Formula	Masa	Con dilución de muestra		Sin dilución de muestra	
				Error (ppm)	Cuentas	Error (ppm)	Cuentas
Nicotina	1,4	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	162,1157	-3,96	2849	-4,51	1288
Cotinina	1,4	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	176,095	1,04	2884	7,41	1524
Atenolol	1,8	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	266,163	-0,2	965819	0,97	1456241
Sotalol	2,0	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	272,1195	1,36	36470	2,24	52256
Teofilina	2,8	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180,0647	5,9	8621	2,56	14529
Metroinidazol	3,0	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	171,0644	5,69	9947	1,21	17481
Codeína	3,2	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299,1521	1,24	31253	2,1	48252
Cafeína	5,2	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,0804	2,06	7468	-6,19	9124
4-AAA	5,6	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₂	245,1164	1,16	1202994	2,1	48252
Benzoilecgonina	8,4	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	289,1314	1,93	34181	2,71	47849
Eritromicina	12,2	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733,4612	-5,61	3157	0,42	12142
EDDP	12,5	C ₂₀ H ₂₃ N	277,183	2,04	38239	1,42	79047
Simazina	13,0	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201,078	0,46	10899	0,82	14081
Carbamazepina	13,5	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236,095	0,38	40059	0,98	57344
Metadona	14,1	C ₂₁ H ₂₇ NO	309,2092	0,59	13540	1,54	26699
DEET	15,3	C ₁₂ H ₁₇ NO	191,131	0,77	385171	1,11	589150
Diazepan	16,8	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284,0716	7,37	4140	0,14	6952

Tabla 17: Screening objetivo para un grupo de contaminantes usando fragmentor 190V y la base de datos suministrada en ANEXO 9, 10 ppm de filtro de masas y 1000 cuentas de umbral. Se muestra la comparación de resultados en detección automatizada utilizando un procedimiento por SPE (sin diluir) de una muestra de agua del río y una estrategia de dilución al ½ del mismo extracto. Nota: Los resultados en negrita indican los falsos negativos si se toma una tolerancia de < 5 ppm de error de masas.

En estos casos, fue obtenido un error de masa superior a 5 ppm empleando dilución, lo que sugiere que el reporte de resultados es significativamente afectado por falsos negativos debido a la inexactitud que presentan aquellos iones presentes en bajos números de cuenta.

Al mismo tiempo, cuando se obtuvo una sensibilidad suficiente, la dilución de la muestra fue encontrada como efectiva para reducir simultáneamente la supresión de iones y aumentar la exactitud (véase cotinina y cafeína, Tabla 17), mejorando la capacidad de reconocimiento de los iones adecuados en la detección asistida por software. En la misma línea, fue investigado el efecto de la tolerancia de tiempo de retención en la producción de hallazgos bajo screening objetivo utilizando la base de datos de masa exacta para esta misma muestra.

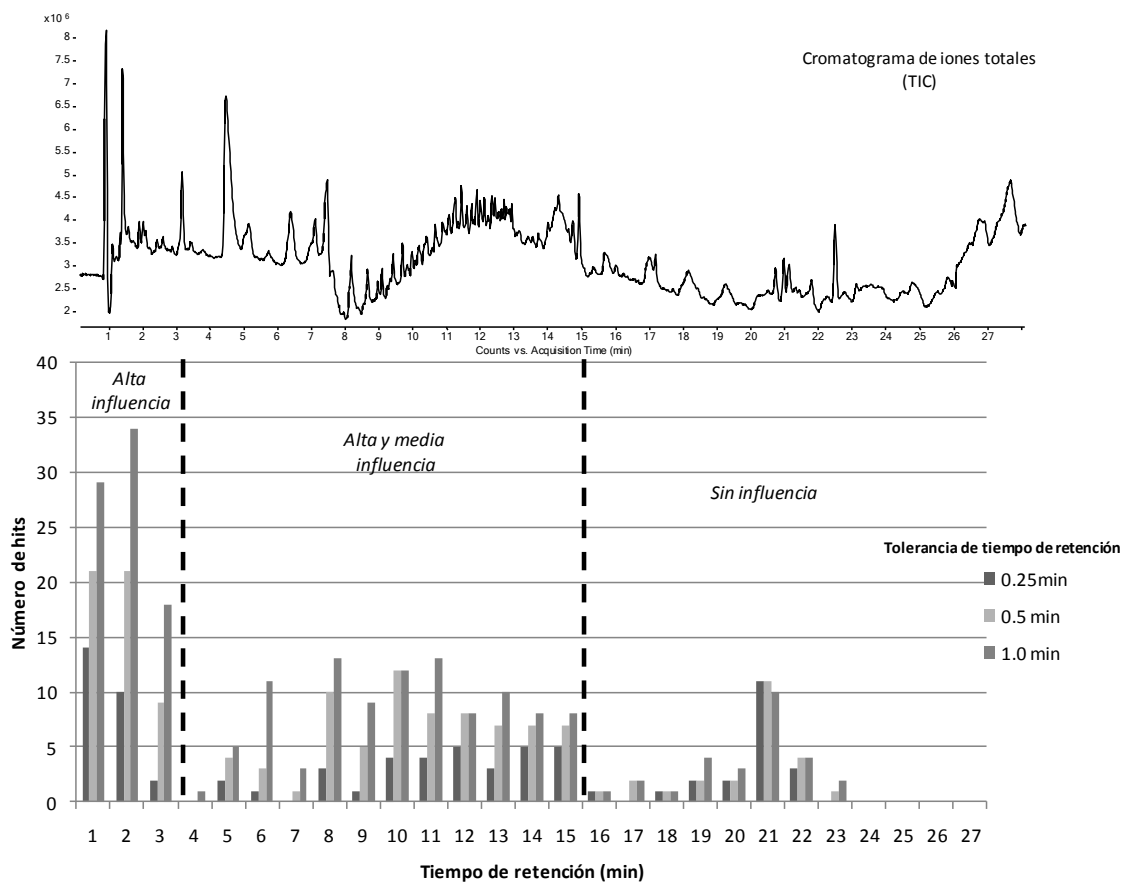


Figura 79: Variaciones de hallazgos en screening objetivo empleando base de datos en función de la tolerancia de TR (min)

Variando las tolerancias el tiempo de retención que el software necesita para emitir un hallazgo (0,25, 0,5 y 1,0 min.) se observa que a mayor tolerancia, mayor el número de hallazgos presentados (hits) (véase Figura 79). Se puede deducir que a lo

largo del cromatograma, se obtienen tres zonas distintivas, en función de las entradas de la base de datos. Se observa que las entradas correspondientes al comienzo del cromatograma (0-3 minutos) son particularmente sometidos a la influencia de una alta deriva cromatográfica para la presentación de hallazgos de la base de datos, seguido por una segunda zona que combina una influencia alta y media alta (rango de 3 - 15 min.) y un zona sin influencia aparente de deriva cromatográfica (15-27 min). Cabe remarcar que la mayoría de las entradas de masas están contenidas en la segunda zona (véase Figura 66), por lo que esta variabilidad en la capacidad de detectar compuestos a través de una puntuación (score) que toma en cuenta una tolerancia constante con distribución de tiempos de retención no uniformes a lo largo del cromatograma, en realidad no se ve expresada cuando se realiza la identificación asistida por software.

Dado que el conjunto de parámetros de extracción es constante durante todo el intervalo de tiempo y la existencia demostrada de regiones determinadas que poseen supresión de iones y zonas de deriva de tiempo de retención, es recomendable la modificación de las condiciones de adquisición y tratamiento de datos para identificación. Por lo tanto, la selección de las restricciones de software debe ser tomada conscientemente cuando se trabaja a bajas concentraciones empleando la búsqueda asistida por software. La variabilidad del tiempo de retención produce una reducción correspondiente al score de un ion correcto, bajando entonces la confiabilidad de los hallazgos que no pueden ser entonces considerados con la misma importancia durante todo el cromatograma, algo que podría ser mejorado por futuras herramientas de software.

La falta de sensibilidad está asociada a iones con estadística pobre (es decir, de bajas cuentas, iones débilmente sensibles y/o altamente fragmentados) que son

buscados bajo condiciones de software establecidas por defecto. Sumado a eso, es conocido que el efecto matriz afecta la exactitud de masas o niveles de concentración cercanos a los límites de detección (Calbiani *et al.* 2006). Por consiguiente, a pesar de su alta utilidad, se remarca que la identificación asistida por software no es absoluta, ya que puede fallar debido a la preselección de condiciones inadecuadas de identificación por parte del analista, por la falta de sensibilidad requerida para obtener buenas medidas de masa exacta, así como la influencia de la matriz en la exactitud de masa.

Por último, vale la pena mencionar el efecto preponderante que ejercen las interferencias isobáricas en la pérdida de capacidad de reconocimiento de la composición elemental de un ion objetivo, por una mayor inexactitud en las mediciones de masa exacta (véase Figura 80). El poder de resolución alcanzado con el analizador TOF contemporáneo sigue siendo limitado para aquellos desafíos relacionadas con bajas concentraciones de los analitos, la falta de sensibilidad o efectos matriz considerable. El potencial requerido para resolver diferentes problemas demuestra ser una función de la complejidad de la muestra inyectada y la sensibilidad conseguida para el analito objetivo en condiciones instrumentales determinadas.

La disponibilidad de nuevos instrumentos equipados con el aumento de resolución de MS como el analizador de Orbitrap ha logrado mejorar la capacidad de reconocimiento de la composición elemental de los iones que se ajusta perfectamente a las estrategias de screening en muestras complejas (Kellmann *et al.* 2009; Kaufmann *et al.* 2011). Por otra parte, el analizador híbrido trampa de iones lineal / Orbitrap (LTQ-Orbitrap) puede ser considerado como la tecnología HRMS de próxima generación, que ha mostrado excelentes capacidades de

detección e identificación para aplicaciones ambientales, aunque es realmente inaccesible en términos de costo para la mayoría de los laboratorios.

3.3.3.3.1.2 Efecto de la sensibilidad y el poder de resolución en la exactitud de masas

La tendencia de llevar los límites de detección hacia valores más y más bajos ha mantenido el interés en mejorar la sensibilidad y resolución proporcionadas por los equipos LC-HRMS. Diferentes mejoras fueron realizadas los últimos años para estos instrumentos que van desde modelos de analizadores con electrónica y óptica mejoradas, fuentes que proveen de mayor eficiencia de ionización y el acoplamiento a resolución cromatográfica mediante columnas con tamaño de partícula $<5 \mu\text{m}$.

El poder de resolución de los analizadores TOF se ha incrementado significativamente desde FWHM ~ 10.000 hasta ~ 20.000 en los últimos años y en consecuencia estos han ganado aceptación por el incremento en las capacidades. . Como desde el inicio, el examen de datos de espectros de masa exacta para la elucidación de estructuras por ESI-HRMS sigue basándose en la asignación heurística e interpretación de iones, la asignación de pérdidas neutras y definición de ruta de fragmentación. Las modalidades de resolución de un analizador contemporáneo TOF fueron exploradas en la correcta interpretación de la fórmula elemental de un PT conocido como *5(R)*-AMX-DKP. La Figura 80 muestra la distribución de masas obtenida por HRMS (LC-QTOF) del ion $[M+H]^+$ de (*5R*) AMX-DKP en dos muestras diferentes de aguas de río. Sobre estas muestras se analizó el efecto del poder de resolución en la exactitud de masas según los modos de adquisición disponibles en instrumentos QTOF (barrido de MS o MS/MS).

Calculando las relaciones señal/ruido (S/R) obtenidas para el perfil de iones a m/z 366,1118, se representa una comparación de las muestras revelando que la muestra 1 contiene mayor abundancia del ion $[M+H]^+$ (S/N que van desde 7,8 a 343,2) que la muestra 2 (S/N entre 5,3 y 37,9).

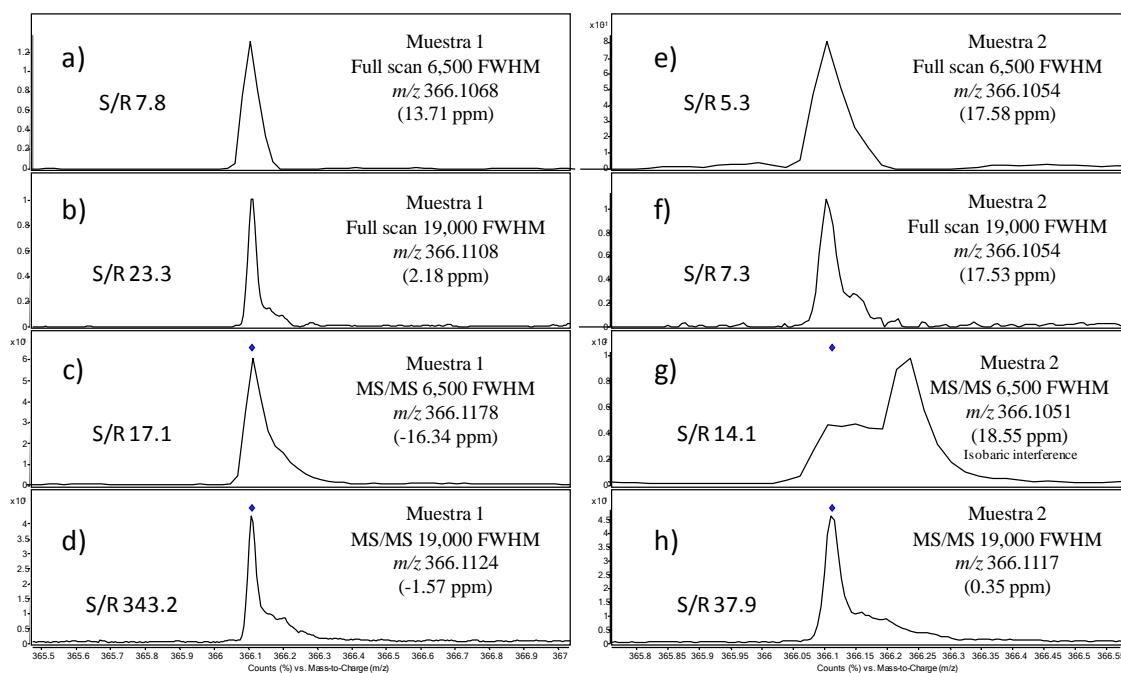


Figura 80: Comparación de análisis LC-HRMS en dos muestras diferentes conteniendo (δR) amoxicilina dicetopiperazina 2',5'; fórmula: $C_{16}H_{20}N_3O_5S$, m/z teórica 366,1118, Full scan MS fragmentor voltaje 90V, MS/MS Fragmentor 90V, Energía de colisión: 5 eV, Ion precursor (Δ 1,3 m/z).

El análisis de masa exacta de la muestra 1 (véase Figura 80 a) a d)) revela la importancia de operar en el modo de HRMS para la correcta e inequívoca identificación de los compuestos. Trabajando en modo de baja resolución (~6500 FWHM a m/z 322,0481), se obtienen errores de masa que producen incorrectamente las fórmulas elementales del ion cuando se trabaja tanto en barrido completo de MS, así como en modos de MS/MS. Sin embargo, cuando se trabaja en el modo de alta resolución (~19.000 FWHM a m/z 322,0481) la distribución de masas es visiblemente más estrecha, obteniendo al mismo tiempo la

identificación correcta del ion $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{20}N_3O_5S$; m/z teórica 366,1118) tanto en modos de barrido de MS (Figura 80 (b)) y MS/MS (Figura 80 (d)). Asimismo, para este compuesto aumenta la sensibilidad cuando aumenta la resolución tal como revela la S/R calculada y la selectividad de señal al realizar experimentos MS/MS. Basándose en la información representada en la Figura 80 (e) a (h) para la muestra 2, pueden observarse las limitaciones evidentes de HRMS cuando existe una insuficiente sensibilidad debida de la escasa abundancia de iones involucrados (es decir, baja concentración, fuerte supresión de iones o débil proceso de ionización). Como puede verse en la Figura 80 (f), el alto poder de resolución proporcionado por el TOF no es suficiente para la correcta identificación de ($5R$) AMX-DKP cuando se trabaja en el modo de barrido de MS ya que este conduce a un resultado falso negativo. Además, como también se representa en la Figura 80 (g); una resolución operativa de 6.500 FWHM en modo MS/MS es fácilmente influenciada por interferencias isobáricas de la matriz resultando en señales superpuestas de masa con baja especificidad, siendo este un gran inconveniente para aplicaciones ambientales. La Figura 80 (h) indica que cuando se trabaja simultáneamente en alta resolución a 19.000 FWHM y bajo MS/MS, la identificación del ion $[M+H]^+$ es factible (m/z experimental: 366,1117, error de masa: 0,35 ppm) debido a la mayor sensibilidad ($S/N = 37,9$) adquirida por el uso de las técnicas combinadas (HRMS y modo MS/MS). Resumiendo, se puede decir entonces que la incertidumbre en HRMS generalmente aumenta cuando se trabaja cerca del límite de detección siendo una limitación importante de esta técnica para el monitoreo de contaminantes en el medio acuático. Se establece que el uso de herramientas complementarias (es decir, técnicas híbridas de MS tales como QTOF, el aumento de la separación cromatográfica o eficiencia de ionización mejorada) que proporcionan una mayor sensibilidad, son sin duda necesarias para superar las

limitaciones de los instrumentos basados en TOF. En este ejemplo, la capacidad de desempeño por modo MS/MS aumento la S/R , tanto por aumento de señal como por propia reducción del ruido. Por lo tanto, la exactitud de masas combinada con sensibilidad instrumental en un equipo HRMS es de vital importancia para aplicaciones analíticas en muestras ambientales. Incluso cuando se utilizan HRMS más poderosos que los analizadores TOF tales como el Orbitrap, la sensibilidad obtenida, que aun no ha sido equiparada al aumento relativo en resolución de masas, se convierte en una limitación en la correcta asignación de composiciones elementales (Kaufmann *et al.* 2011). Se resalta que la capacidad de los instrumentos modernos de HRMS no pueden considerarse independientes de las herramientas de software asociado ya que por el momento, se extrae sólo una fracción de la información disponible (Amufan *et al.* 2011).

3.3.3.3.2 Espectrometría de masas de alta sensibilidad: experiencia de QLIT

3.3.3.3.2.1 Hacia la inyección directa por LC-MS/MS

La necesidad de etapas de preparación de muestra en determinaciones por LC-MS de aguas ambientales tiene por objetivos la remoción de interferencias o la preconcentración hasta la obtención de LODs adecuados para el análisis de trazas. Desde el punto de vista de la ionización, las interfaces API tales como las fuentes ESI sufren marcados efectos de supresión y aumento de señal de iones que pueden conducir a resultados cualitativos o cuantitativos cuestionables e inadecuados. Como alternativa al uso de técnicas de preparación de muestras, la inyección directa de grandes volúmenes de aguas en LC-MS (100 a 5000 μL) fue reportada para determinar contaminantes emergentes como estrategia para evitar los tratamientos convencionales de preparación de muestra (Chiaia *et al.* 2008; Berset

et al. 2010). Sin embargo, en estos reportes, la gran cantidad de muestra introducida en la fuente ESI provoca un aumento del efecto matriz junto con la introducción de suciedad en el instrumento provocando un mayor mantenimiento del equipo junto con la pérdida de fiabilidad de los resultados. La configuración híbrida de alta sensibilidad QLIT-MS/MS se destaca por una reducción significativa del volumen inyectado en el sistema (5 a 20 μ l), sin evidencia significativa en la reducción de la sensibilidad (Martínez Bueno *et al.* 2011). La aplicación de este instrumento es aún poco frecuente debido al costo inaccesible para la mayoría de los laboratorios ambientales, pero sus características excepcionales han permitido incluso la dilución de la muestra con el fin de reducir la carga de matriz en el sistema con una disminución de la supresión iónica. Con el fin de investigar la sensibilidad en muestras reales, se realizó una comparación de resultados analíticos sobre el efecto matriz y los límites de detección del método (LODs) de dos enfoques diferentes que utilizan QLIT-MS/MS para un grupo seleccionado de contaminantes en agua del río.

Como se describe en este artículo (véase ANEXO 11), la Estrategia A se basa en un tratamiento de muestra por SPE con determinación por LC-QLIT-MS/MS mientras que la Estrategia B se basa en el análisis por inyección directa del agua en un instrumento moderno LC-QLIT-MS/MS. Para la Estrategia A, se pueden inferir respuestas, sin EM significativo ($\leq |20\%|$) para la mayoría de los compuestos; EM medios ($|20-50\%|$) para nicotina, citalopram y primidona y EM significativo ($\geq |50\%|$) para carbamazepina. Por otro lado, para la Estrategia B de análisis por inyección directa, las respuesta está únicamente influenciada en la determinación de carbamazepina (37%) y ofloxacina (33%) (Figura 81). Sin embargo, se obtienen menores LODs cuando se utiliza en un enfoque con una preconcentración de muestra tal como en el mostrado en la Estrategia A que emplea una concentración

de muestra de 400 veces (Figura 82). Esto es de vital importancia para detectar determinados compuestos de interés presentes en agua del río (Martínez Bueno *et al.* 2010b; Martínez Bueno *et al.* 2011).

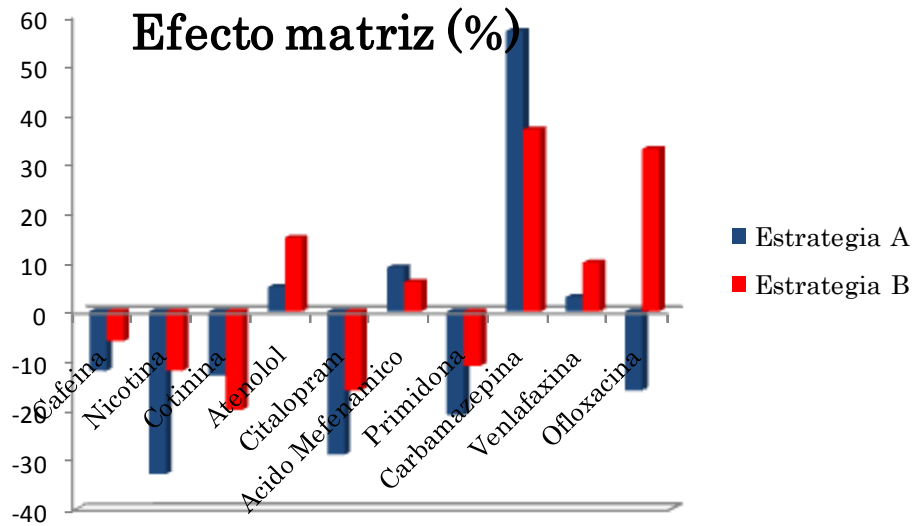


Figura 81: Comparación de efectos matriz en el análisis de un grupo de contaminantes emergentes por LC-QLIT-MS/MS.

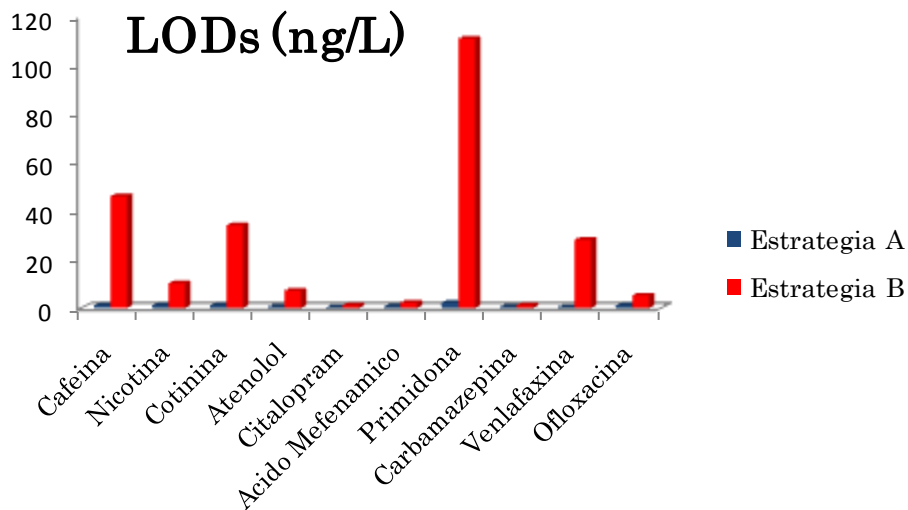


Figura 82: Comparación de LODs en el análisis de un grupo de contaminantes emergentes por LC-QLIT-MS/MS.

Desde el punto de vista de la exactitud en análisis cuantitativo se observo que en la mayoría de los casos la preconcentración de la muestra conduce a la subestimación debido a la supresión de iones experimentada principalmente para el atenolol, cafeína, nicotina y venlafaxina. La concentración de la muestra conlleva a obtener extractos más complejos y por lo tanto es sugerida la reducción o compensación del EM para una mejora cuantitativa. Para ilustrar esta afirmación, la Figura 83 muestra una fracción del cromatograma TIC obtenido por las dos estrategias de análisis para una misma muestra del agua de río.

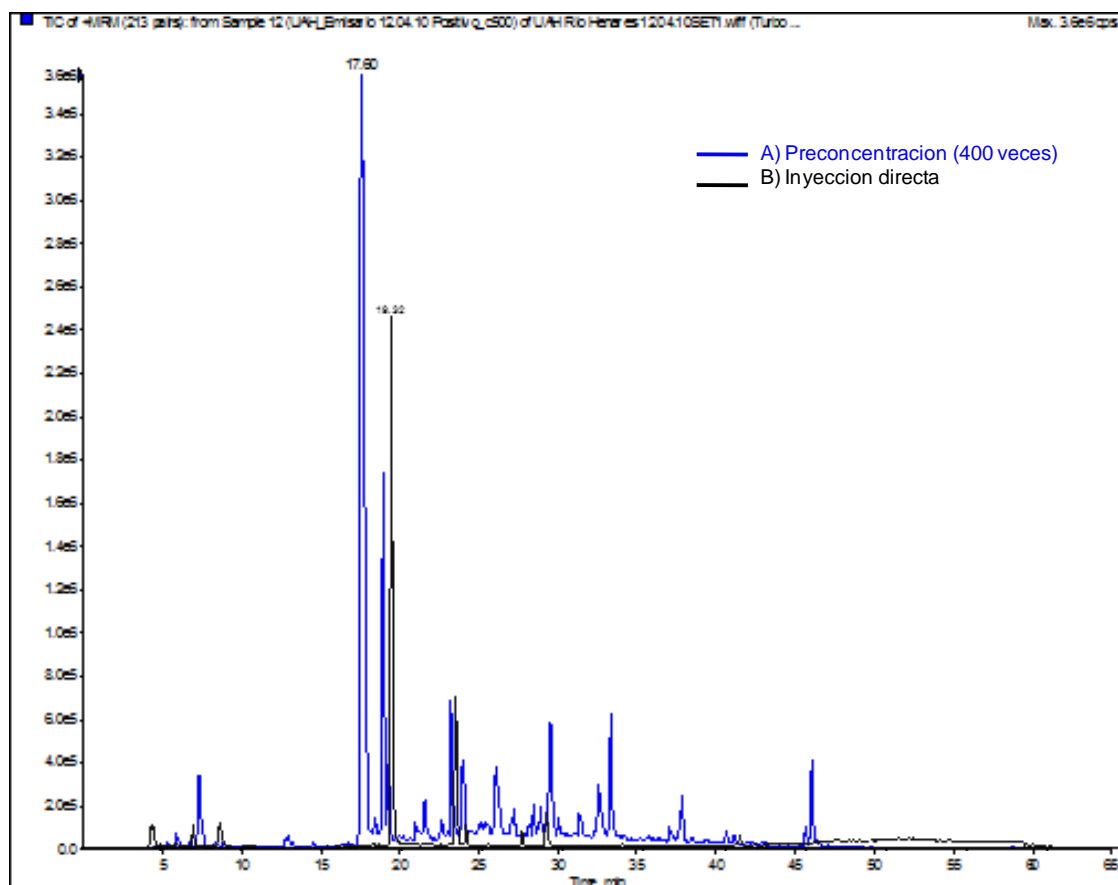


Figura 83: Comparación de cromatogramas TIC de estrategia A (con preconcentración; en azul), y estrategia B (inyección directa; en negro).

Para reducir el efecto matriz, pueden ser empleadas varias estrategias tales como el uso de calibración en matriz, dilución isotópica o de adición de estándar interno. En general, una menor supresión de iones es obtenida cuando se aplica la inyección directa de la muestra en LC-MS/MS, debido a la menor cantidad de interferentes coinyectados, lo que conduce a resultados más exactos en el análisis cuantitativo. Por consiguiente es obtenido un aumento de la confiabilidad cuando se aplica la inyección directa en especies sensibles al EM, difíciles de analizar o que no pueden ser incluidos en métodos multirresiduo (ej. analitos ácidos, bases).

La inyección directa mostró una mejor aptitud que los procedimientos basados en SPE para el análisis de trigonelina y ácido nicotínico. Estos compuestos han sido débilmente recuperados utilizando multirresiduo (Martínez Bueno et al. 2011). La Figura 84 muestra una comparación del pico cromatográfico obtenido por SRM para dos analitos básicos, cuando la muestra es preconcentrada 25 veces y bajo el enfoque de inyección directa. Para esta clase de analitos, se puede deducir una selectividad mejorada de las transiciones SRM de estudio, sin pérdida de sensibilidad cuando se utiliza el análisis de inyección directa.

Esta técnica presenta ventajas valiosas como la reducción de la manipulación de la muestra y el aumento de reproducibilidad, características atractivas para estudios extensivos que involucran el análisis de muchas muestras o muchos analitos. Por otra parte, se evitaría el uso de estudios de recuperación y de disolventes orgánicos lo que se puede considerar en la misma tendencia de técnicas ambientalmente amigables de la química analítica actual.

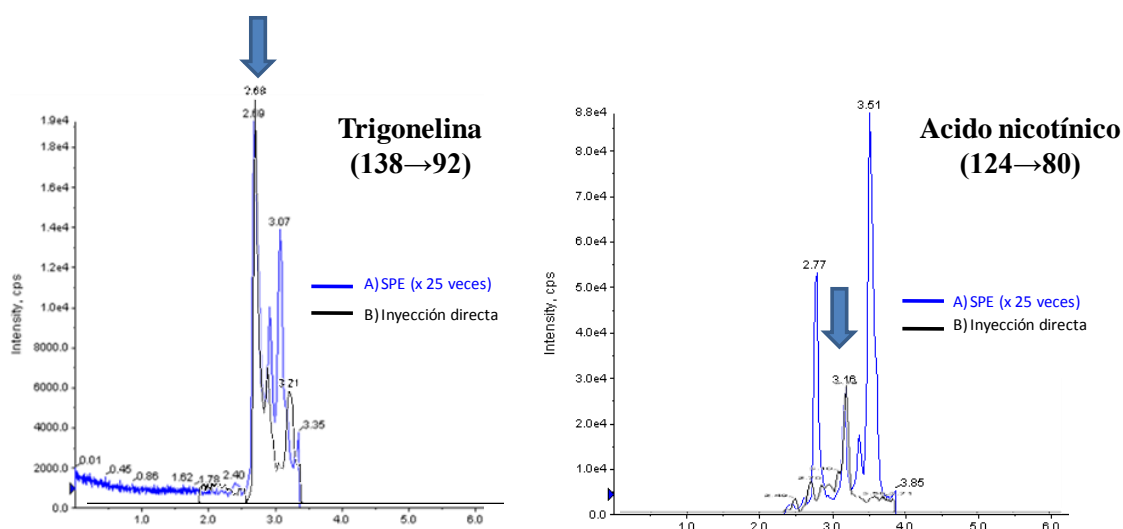


Figura 84: Comparación de cromatogramas SRM de trigonelina y ácido nicotínico por preconcentración (azul) e inyección directa (negro).

Sin embargo, a pesar de estas ventajas, el análisis por inyección directa tiene un inconveniente asociado a la detección de los compuestos menos concentrados o débilmente sensibles, ya que existe la posibilidad de obtener falsos negativos cuando la concentración del analito en la muestra es inferior al LOD instrumental.

3.3.3.3.2 Avances de confirmación por LC-MS/MS de resolución nominal

A pesar de la controversia instaurada en torno los criterios de identificación de compuestos orgánicos traza por espectrometría de masas, la utilización de puntos /de identificación es ampliamente utilizada para su identificación y la confirmación por LC-MS/MS (CE/657 2002). Un criterio generalizado de confirmación mediante LC-MS/MS (típicamente referido a analizadores QqQ implica el escaneo de iones precursores junto con la adquisición de dos transiciones SRM para cada compuesto. Además es condición necesaria la conservación del tiempo de retención del analito ($\pm 2\%$ de tolerancia) y el mantenimiento de abundancias relativas de las transiciones SRM (definidas como la relación entre las abundancias de las

transiciones utilizadas para identificación y la de cuantificación; SRM₂/SRM₁). La principal desventaja de estos criterios se relaciona con aquellos compuestos con espectros pobres en iones producto, así como los compuestos altamente influenciados por la concentración de la matriz y/o el analito. Por lo tanto, la utilización combinada de técnicas LC-MS para lograr confirmación de identidad en estudios de amplio alcance, es llevada principalmente entre análisis QqQ con posterior uso de TOF como revelan varios reportes de contaminantes emergentes en muestras ambientales (Martínez Bueno *et al.* 2007b; López-Roldán *et al.* 2010; Martínez Bueno *et al.* 2010b).

De acuerdo a la versatilidad proporcionada por los instrumentos QLIT, la confirmación por exploración asistida por software en modo IDA, resulta un aspecto novedoso en análisis de trazas (Martínez Bueno *et al.* 2009).

Esta aplicación combina el análisis SRM como estudio de exploración (escaneo) junto con dos análisis en modo de barrido de MS mediante el uso de la modalidad operativa EPI (Iones Producto Mejorados), durante el mismo análisis cromatográfico. Dado que los espectros EPI se pueden obtener a niveles de sensibilidad muy bajos, la confirmación del analito es posible aun cuando existen transiciones SRM débiles (Martínez Bueno *et al.* 2009). La característica excepcional de este enfoque es el mantenimiento del desempeño cuantitativo del modo SRM con el adicional de proporcionar espectros de iones producto con capacidad de confirmar los residuos.

Aplicado a un caso real, la herramienta IDA fue utilizada en la confirmación de etilamfetamina en una muestra de agua de río. En este ejemplo, no fue posible obtener una identificación adecuada por el método SRM debido a la falta de una segunda transición SRM característica (m/z 164 \rightarrow 119) que permita la

confirmación del analito (véase Figura 85). Sin embargo, el método de IDA permitió la confirmación de etil Anfetamina en la muestra a través de la comparación de los espectros EPI generados a dos energías de colisión diferentes (25 y 40 eV) para este analito comparando los que la biblioteca de espectros EPI que dispone el instrumento. Mediante este ejemplo se confirma la presencia de etil Anfetamina en la muestra evitando el reporte de un falso negativo mediante una técnica instrumental basada en MS/MS tándem de resolución nominal.

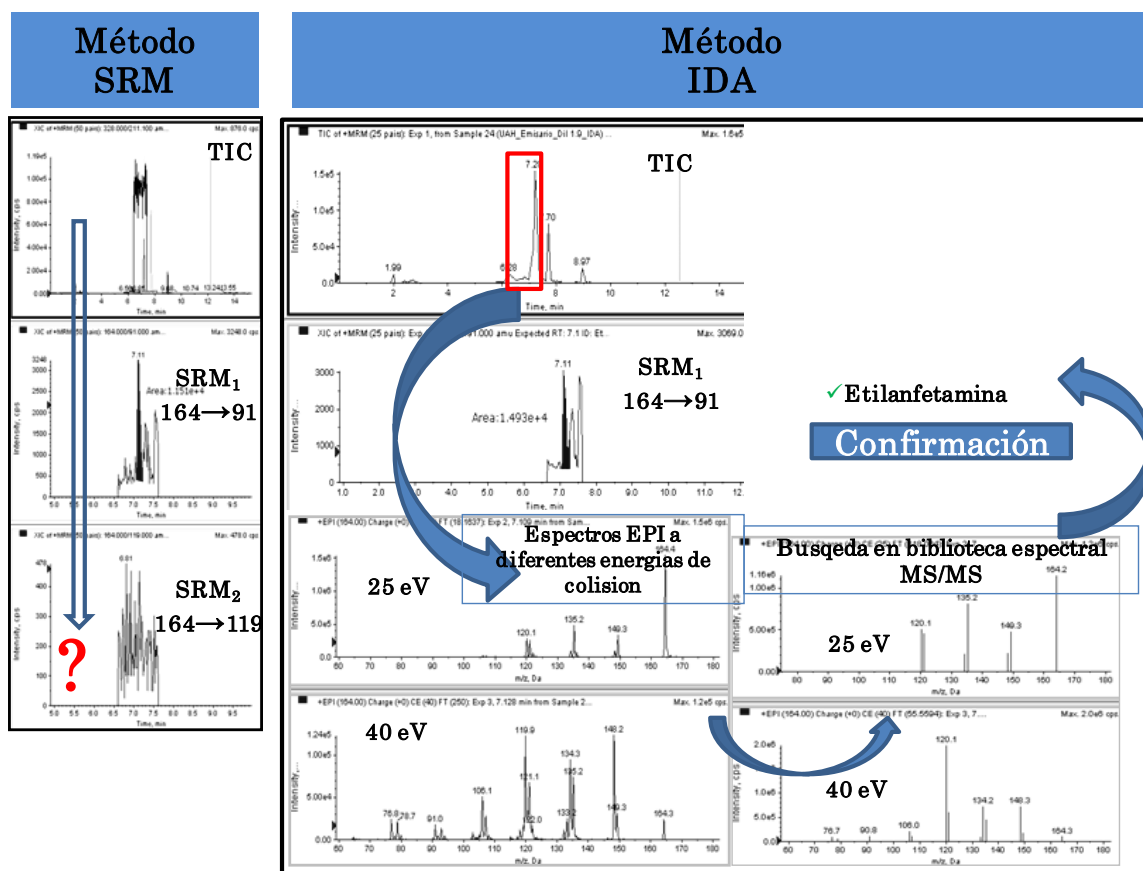


Figura 85: Identificación de etil Anfetamina en una muestra de agua de río usando el método SRM de transiciones y el método IDA con comparación de espectros EPI.

3.3.3.4 Conclusiones

La información necesaria para la investigación de contaminantes emergentes ha exigido mejoras tecnológicas de los espectrómetros de masas. Como se describe, dos principales características son el pilar de la espectrometría de masas moderna (i) la de alta resolución que provee exactitud de masa y (ii) la alta sensibilidad del instrumento. Estas características se pueden encontrar cuando se combinan analizadores modernos de MS. De esta forma, se han realizado avances en el desarrollo de instrumentos híbridos, tales como QTOF y QLIT, que han aumentado considerablemente la sensibilidad y la selectividad de las técnicas de LC-MS/MS en los últimos 5 años. Las herramientas de software asociadas han demostrado una contribución en el campo del análisis ambiental tanto en detección asistida por computadoras y herramientas de confirmación, elucidación estructural y el análisis cuantitativo. La posibilidad de realizar experimentos MS/MS que ofrecen los instrumentos híbridos para detectar, identificar, confirmar y cuantificar analitos, está llevando a aumentar la capacidad de los laboratorios en monitorear mas analitos y por tanto mejorando el conocimiento sobre la ocurrencia y destino de los contaminantes emergentes. Sin embargo, existe aún un margen de mejora para los próximos años en la sensibilidad ofrecida por estas técnicas, además de nuevas aplicaciones de las herramientas de software tales como deconvolución de espectros de masa y motores de búsqueda con mayor independencia del analista.

3.4 Referencias

- AMINE-KHODJA, A., BOULKAMH, A. & BOULE, P. (2004). Photochemical behaviour of phenylurea herbicides. *Photochemical and Photobiological Sciences* **3**, 145-156.
- ANDREOZZI, R., CAPRIO, V., CINIGLIA, C., DE CHAMPDORÉ, M., LO GIUDICE, R., MAROTTA, R. & ZUCCATO, E. (2004). Antibiotics in the environment: Occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environmental Science and Technology* **38**, 6832-6838.
- BALLESTEROS-GÓMEZ, A. & RUBIO, S. (2011). Recent Advances in Environmental Analysis. *Analytical Chemistry* **83**, 4579-4613.
- BARCELÓ, D. & PETROVIC, M. (2007). Emerging contaminants in wastewaters. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **26**, 1019.
- BERSET, J.-D., BRENNISEN, R. & MATHIEU, C. (2010). Analysis of llicit and illicit drugs in waste, surface and lake water samples using large volume direct injection high performance liquid chromatography - Electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Chemosphere* **81**, 859-866.
- BIJLSMA, L., SANCHO, J.V., HERNÁNDEZ, F. & NIESEN, W.M.A. (2011). Fragmentation pathways of drugs of abuse and their metabolites based on QTOF MS/MS and MSE accurate-mass spectra. *Journal of Mass Spectrometry* **46**, 865-875.
- BUCHBERGER, W. (2011). Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *Journal of Chromatography A* **1218**, 603-618.
- CAHILL, J.D., FURLONG, E.T., BURKHARDT, M.R., KOLPIN, D. & ANDERSON, L.G. (2004). Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1041**, 171-180.
- CALBIANI, F., CARERI, M., ELVIRI, L., MANGIA, A. & ZAGNONI, I. (2006). Matrix effects on accurate mass measurements of low-molecular weight compounds using liquid chromatography-electrospray-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **41**, 289-294.
- CASTIGLIONI, S., BAGNATI, R., CALAMARI, D., FANELLI, R. & ZUCCATO, E. (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *Journal of chromatography. A* **1092**, 206-215.
- CE/657/2002 (2002). European Commission, Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Union* **L221**, 8-36.
- CE (2008). Directiva 2008/105/CE. *Official Journal of the European Union* **L 5**, 84.
- CHIAIA, A.C., BANTA-GREEN, C. & FIELD, J. (2008). Eliminating Solid Phase Extraction with Large-Volume Injection LC/MS/MS: Analysis of Illicit and Legal Drugs and Human Urine Indicators in US Wastewaters. *Environmental Science & Technology* **42**, 8841-8848.
- CHRISTIAN, T., SCHNEIDER, R.J., FÄRBER, H.A., SKUTLAREK, D., MEYER, M.T. & GOLDBACH, H.E. (2003). Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* **31**, 36-44.
- CONOVER, W.J. (1999) *Practical nonparametric statistics*. John Wiley & Sons, 3rd Edition. Nueva York, EE.UU. pp. 584.
- CUADRAS, C.M. *Nuevos métodos de análisis multivariante*. CMC Editions. Barcelona. España, pp 297.
- DÍAZ, R., IBÁÑEZ, M., SANCHO, J.V. & HERNÁNDEZ, F. (2011). Building an empirical mass spectra library for screening of organic pollutants by ultra-high-pressure liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **25**, 355-369.
- FARRÉ, M., GROS, M., HERNÁNDEZ, B., PETROVIC, M., HANCOCK, P. & BARCELÓ, D. (2008). Analysis of biologically active compounds in water by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**, 41-51.
-

- FATTA, D., ACHILLEOS, A., NIKOLAOU, A. & MERİÇ, S. (2007). Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **26**, 515-533.
- FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. & GARCÍA-REYES, J.F. (2008). Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **27**, 973-990.
- FERRER, I., FERNANDEZ-ALBA, A., ZWEIGENBAUM, J.A. & THURMAN, E.M. (2006). Exact-mass library for pesticides using a molecular-feature database. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **20**, 3659-3668.
- GARCÍA-GALÁN, M.J., SILVIA DÍAZ-CRUZ, M. & BARCELÓ, D. (2008). Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *TrAC - Trends In Analytical Chemistry* **27**, 1008-1022.
- GARCÍA-REYES, J.F., HERNANDO, M.D., MOLINA-DÍAZ, A. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2007a). Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **26**, 828-841.
- GARCÍA-REYES, J.F., MOLINA-DÍAZ, A. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2007b). Identification of pesticide transformation products in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry via "fragmentation- degradation" relationships. *Analytical Chemistry* **79**, 307-321.
- GODEJOHANN, M., BERSET, J.-D. & MUFF, D. (2011). Non-targeted analysis of wastewater treatment plant effluents by high performance liquid chromatography–time slice-solid phase extraction-nuclear magnetic resonance/time-of-flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1218**, 9202-9209.
- GÓMEZ, M.J., GÓMEZ-RAMOS, M.M., AGÜERA, A., MEZCUA, M., HERRERA, S. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2009). A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in waters. *Journal of Chromatography A* **1216**, 4071-4082.
- GÓMEZ, M.J., GÓMEZ-RAMOS, M.M., MALATO, O., MEZCUA, M. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2010). Rapid automated screening, identification and quantification of organic micro-contaminants and their main transformation products in wastewater and river waters using liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry with an accurate-mass database. *Journal of Chromatography A* **1217**, 7038-7054.
- GÓMEZ, M.J., HERRERA, S., SOLE, D., GARCIA-CALVO, E. & FERNANDEZ-ALBA, A.R. (2011). automatic searching and evaluation of priority and emerging contaminants in wastewater and river water by stir bar sorptive extraction followed by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **83**, 2638-2647.
- GÓMEZ, M.J., HERRERA, S., SOLÉ, D., GARCÍA-CALVO, E. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2012). Spatio-temporal evaluation of organic contaminants and their transformation products along a river basin affected by urban, agricultural and industrial pollution. *Science of The Total Environment* **420**, 134-145.
- GÓMEZ, M.J., MARTINEZ BUENO, M., LACORTE, S., FERNANDEZ-ALBA, A. & AGÜERA, A. (2007a). Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* **66**, 993-1002.
- GÓMEZ, M.J., MARTINEZ BUENO, M.J., LACORTE, S., FERNANDEZ-ALBA, A.R. & AGÜERA, A. (2007b). Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* **66**, 993-1002.
- GOZLAN, I., ROTSTEIN, A. & AVISAR, D. (2010). Investigation of an amoxicillin oxidative degradation product formed under controlled environmental conditions. *Environmental Chemistry* **7**, 435-442.
- GROS, M., PETROVIĆ, M. & BARCELÓ, D. (2006a). Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* **70**, 678-690.
- GROS, M., PETROVIĆ, M. & BARCELÓ, D. (2006b). Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* **70**, 678-690.
- HERNÁNDEZ, F., SANCHO, J., IBÁÑEZ, M., ABAD, E., PORTOLÉS, T. & MATTIOLI, L. (2012). Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 1251-1264.
-

- HERNANDO, M.D., MEZCUA, M., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. & BARCELÓ, D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* **69**, 334-342.
- HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K. & KRATZ, K.-L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of The Total Environment* **225**, 109-118.
- IBÁÑEZ, M., SANCHO, J.V., POZO, Ó.J. & HERNÁNDEZ, F. (2004). Use of quadrupole time-of-flight mass spectrometry in environmental analysis: elucidation of transformation products of triazine herbicides in water after UV exposure. *Analytical Chemistry* **76**, 1328-1335.
- KASPRZYK-HORDERN, B., DINSDALE, R.M. & GUWY, A.J. (2007). Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1161**, 132-145.
- KAUFMANN, A., BUTCHER, P., MADEN, K., WALKER, S. & WIDMER, M. (2011). Semi-targeted residue screening in complex matrices with liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: current possibilities and limitations. *The Analyst* **136**, 1898-1909.
- KELLMANN, M., MUENSTER, H., ZOMER, P. & MOL, J.G.J. (2009). Full scan ms in comprehensive qualitative and quantitative residue analysis in food and feed matrices: how much resolving power is required? *Journal of the American Society Mass Spectrometry* **20**, 1464-1476.
- KERN, S., FENNER, K., SINGER, H.P., SCHWARZENBACH, R.P. & HOLLENDER, J. (2009). Identification of transformation products of organic contaminants in natural waters by computer-aided prediction and high-resolution mass spectrometry. *Environmental Science & Technology* **43**, 7039-7046.
- KOLPIN, D.W., BATTAGLIN, W.A., CONN, K.E., FURLONG, E.T., GLASSMEYER, S.T., KALKHOFF, S.J., MEYER, M.T. & SCHNOEBELN, D.J., Eds. (2008). *Occurrence of transformation products in the environment*. The Handbook of Environmental Chemistry. Elsevier B.V. Amsterdam, Países Bajos.
- KOSJEK, T., HEATH, E., PETROVIĆ, M. & BARCELÓ, D. (2007). Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **26**, 1076-1085.
- KRAUSS, M., SINGER, H. & HOLLENDER, J. (2010). LC-high resolution MS in environmental analysis: From target screening to the identification of unknowns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397**, 943-951.
- LACORTE, S. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2006). Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrometry Reviews* **25**, 866-880.
- LAMM, A., GOZLAN, I., ROTSTEIN, A. & AVISAR, D. (2009). Detection of amoxicillin-diketopiperazine-2', 5' in wastewater samples. *Journal Of Environmental Science And Health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering* **44**, 1512-1517.
- LAMSHÖFT, M., SUKUL, P., ZÜHLKE, S. & SPITELLER, M. (2010). Behaviour of 14C-sulfadiazine and 14C-difloxacin during manure storage. *Science of the Total Environment* **408**, 1563-1568.
- LEGENDRE, L. & LEGENDRE, P. *Numerical Ecology*. Elsevier B.V., 2nd Edition. Amsterdam. Países Bajos, pp. 853.
- LIOTTA, E., GOTTARDO, R., BERTASO, A. & POLETTINI, A. (2010). Screening for pharmaco-toxicologically relevant compounds in biosamples using high-resolution mass spectrometry: a 'metabolomic' approach to the discrimination between isomers. *Journal of Mass Spectrometry : JMS* **45**, 261-271.
- LÓPEZ-ROLDÁN, R., DE ALDA, M.L., GROS, M., PETROVIC, M., MARTÍN-ALONSO, J. & BARCELÓ, D. (2010). Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry. *Chemosphere* **80**, 1337-1344.
- MARTÍNEZ BUENO, M.J., AGÜERA, A., GÓMEZ, M.J., HERNANDO, M.D., GARCÍA-REYES, J.F. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2007a). Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Analytical Chemistry* **79**, 9372-9384.
- MARTÍNEZ BUENO, M.J., AGÜERA, A., GÓMEZ, M.J., HERNANDO, M.D., GARCÍA-REYES, J.F. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2007b). Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry

- and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Analytical Chemistry* **79**, 9372-9384.
- MARTÍNEZ BUENO, M.J., AGÜERA, A., HERNANDO, M.D., GÓMEZ, M.J. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2009). Evaluation of various liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry operation modes applied to the analysis of organic pollutants in wastewaters. *Journal of Chromatography A* **1216**, 5995-6002.
- MARTÍNEZ BUENO, M.J., HERNANDO, M.D., HERRERA, S., GÓMEZ, M.J., BUSTAMANTE, I., GARCIA-CALVO, E. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2010a). Pilot survey of chemical contaminants from industrial and human activities in river waters of Spain. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **90**, 321-343.
- MARTÍNEZ BUENO, M.J., HERNANDO, M.D., HERRERA, S., GÓMEZ, M.J., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., BUSTAMANTE, I. & GARCÍA-CALVO, E. (2010b). Pilot survey of chemical contaminants from industrial and human activities in river waters of Spain. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **90**, 321-343.
- MARTÍNEZ BUENO, M.J., UCLÉS, S., HERNANDO, M.D., DÁVOLI, E. & FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2011). Evaluation of selected ubiquitous contaminants in the aquatic environment and their transformation products. A pilot study of their removal from a sewage treatment plant. *Water Research*, in press.
- MARTINS, A.F., MAYER, F., CONFORTIN, E.C. & FRANK, C.S. (2009). A study of photocatalytic processes involving the degradation of the organic load and amoxicillin in hospital wastewater. *Clean - Soil, Air, Water* **37**, 365-371.
- MAVRONIKOLA, C., DEMETRIOU, M., HAPESHI, E., PARTASSIDES, D., MICHAEL, C., MANTZAVINOS, D. & KASSINOS, D. (2009). Mineralisation of the antibiotic amoxicillin in pure and surface waters by artificial UVA- and sunlight-induced fenton oxidation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **84**, 1211-1217.
- MENG, C.-K., ZWEIGENBAUM, J., FRST, P. & BLANKE, E. (2010). Finding and Confirming Nontargeted Pesticides Using GC/MS, LC/Quadrupole-Time-of-Flight MS, and Databases. *Journal of AOAC International* **93**, 703-711.
- MEZCUA, M., MALATO, O., GARCIA-REYES, J.F., MOLINA-DIAZ, A. & FERNANDEZ-ALBA, A.R. (2009). Accurate-mass databases for comprehensive screening of pesticide residues in food by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **81**, 913-929.
- MORENO-BONDI, M.C., MARAZUELA, M.D., HERRANZ, S. & RODRIGUEZ, E. (2009). An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **395**, 921-946.
- NÄGELE, E. & MORITZ, R. (2005). Structure Elucidation of Degradation Products of the Antibiotic Amoxicillin with Ion Trap MSn and Accurate Mass Determination by ESI TOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **16**, 1670-1676.
- OECD (2001). Monograph 303 A: Activated Sludge Units: OECD guideline for the testing of chemicals. OCDE/OECD: 6.
- PÉREZ, S. & BARCELÓ, D. (2007). Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **26**, 494-514.
- PETROVIC, M., FARRÉ, M., DE ALDA, M.L., PEREZ, S., POSTIGO, C., KÖCK, M., RADJENOVIC, J., GROS, M. & BARCELO, D. (2010). Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. *Journal of Chromatography A* **1217**, 4004-4017.
- PETROVIC, M., GROS, M. & BARCELO, D. (2006). Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1124**, 68-81.
- PHARMACOPEIA, E. (2008). Amoxicillin Sodium Monograph, Monograph 0577. C. o. Europe. Strasbourg, France.
- PICÓ, Y., FARRÉ, M., SOLER, C. & BARCELÓ, D. (2007). Confirmation of fenthion metabolites in oranges by IT-MS and QqTOF-MS. *Analytical Chemistry* **79**, 9350-9363.
- RADJENOVIC, J., PETROVIC, M. & BARCELÓ, D. (2007). Advanced mass spectrometric methods applied to the study of fate and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **26**, 1132-1144.
- RICHARDSON, S.D. (2001a). Mass spectrometry in environmental sciences. *Chemical Reviews* **101**, 211-254.
-

- RICHARDSON, S.D. (2001b). Water analysis. *Analytical Chemistry* **73**, 2719-2734.
- RICHARDSON, S.D. (2002). The role of GC-MS and LC-MS in the discovery of drinking water disinfection by-products. *Journal of Environmental Monitoring* **4**, 1-9.
- RICHARDSON, S.D. (2003). Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry* **75**, 2831-2857.
- RICHARDSON, S.D. (2007). Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry* **79**, 4295-4323.
- RICHARDSON, S.D. (2009). Water Analysis: Emerging contaminants and current Issues. *Analytical Chemistry* **81**, 4645-4677.
- RICHARDSON, S.D. & TERNES, T.A. (2005). Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry* **77**, 3807-3838.
- RICHARDSON, S.D. & TERNES, T.A. (2011). Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry* **83**, 4614-4648.
- RODIL, R., QUINTANA, J.B., LÓPEZ-MAHÍA, P., MUNIATEGUI-LORENZO, S. & PRADA-RODRÍGUEZ, D. (2009). Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1216**, 2958-2969.
- SANCHO, J.V., POZO, Ó.J., IBÁÑEZ, M. & HERNÁNDEZ, F. (2006). Potential of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the determination of pesticides and transformation products in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**, 987-997.
- SINGH, N., SINGH, S., MUKERJEE, I., GUPTA, S., GAJBHIYE, V., SHARMA, P., GOEL, M. & DUREJA, P. (2010). Metabolism of ¹⁴C-azoxystrobin in water at different pH. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **45**, 123-127.
- STATA CORP. 2011. STATA STATISTICAL SOFTWARE: RELEASE 12. COLLEGE STATION, T.S.L.
- TERZIĆ, S., SENTA, I., AHEL, M., GROS, M., PETROVIĆ, M., BARCELO, D., MÜLLER, J., KNEPPER, T., MARTÍ, I., VENTURA, F., JOVANČIĆ, P. & JABUČAR, D. (2008). Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Science of The Total Environment* **399**, 66-77.
- THURMAN, E.M. & FERRER, I. (2010). The isotopic mass defect: a tool for limiting molecular formulas by accurate mass. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397**, 2807-2816.
- THURMAN, E.M., FERRER, I., POZO, O.J., SANCHO, J.V. & HERNANDEZ, F. (2007). The even-electron rule in electrospray mass spectra of pesticides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**, 3855-3868.
- TROVÓ, A.G., PUPO NOGUEIRA, R.F., AGÜERA, A., FERNANDEZ-ALBA, A.R. & MALATO, S. (2011). Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process - Chemical and toxicological assessment. *Water Research* **45**, 1394-1402.
- TYCZKOWSKA, K.L., VOYKSNER, R.D. & ARONSON, A.L. (1992). Solvent degradation of cloxacillin in vitro: Tentative identification of degradation products using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **594**, 195-201.
- USEPA (2008). Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS
- USEPA (2009). Method 538: determination of selected organic contaminants in drinking water by direct aqueous injection- liquid chromatography/tandem mass spectrometry (DAI-LC/MS/MS).
- USEPA (2010). Method 539: determination of hormones in drinking water by solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)
- StataCorp. 2009. Stata Multivariate Statistics Reference Manual [MV]. College Station, TX: StataCorp LP. 687pp.
- StataCorp. 2011. Stata Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP.
- VALVO, L., CIRANNI, E., ALIMENTI, R., ALIMONTI, S., DRAISCI, R., GIANNETTI, L. & LUCENTINI, L. (1998). Development of a simple liquid chromatographic method with UV and mass spectrometric detection for the separation of substances related to amoxicillin sodium. *Journal of Chromatography A* **797**, 311-316.
- VOGNA, D., MAROTTA, R., NAPOLITANO, A., ANDREOZZI, R. & D'ISCHIA, M. (2004). Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H₂O₂ and ozone. *Water Research* **38**, 414-422.

- VULLIET, E., CREN-OLIVÉ, C.& GRENIER-LOUSTALOT, M.-F. (2011). Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Environmental Chemistry Letters* **9**, 103-114.
- XU, H., COOPER, W.J., JUNG, J.& SONG, W. (2011). Photosensitized degradation of amoxicillin in natural organic matter isolate solutions. *Water Research* **45**, 632-638.
-

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo de tesis ha sido enmarcado dentro del contexto de las nuevas tendencias en la química analítica de trazas y de las reglamentaciones internacionales vigentes tanto en el plano de metodologías de preparación de muestra como de sistemas instrumentales de determinación con aplicaciones cuantitativas o cualitativas. Se han desarrollado varias metodologías para el análisis de contaminantes orgánicos a nivel de trazas en diferentes matrices que son herramientas útiles para resolver problemas concretos de índole sanitario, ambiental y comercial.

Se han hecho aportes originales en el campo de las determinaciones analíticas de diversos compuestos orgánicos, tales como agroquímicos y contaminantes emergentes. Los diferentes métodos desarrollados en las distintas matrices han sido validados siguiendo procedimientos de aseguramiento de calidad conceptualmente actualizados

Es importante remarcar que el enfoque fundamental de este trabajo ha tomado en cuenta diferentes aspectos del análisis de trazas. Parte de esta tesis está direccionada a preparaciones de muestra novedosas en matrices poco estudiadas con instrumental disponible en la mayoría de los laboratorios ambientales y de alimentos mientras que la segunda está enfocada hacia la explotación del potencial de la espectrometría de masas avanzada utilizando instrumentos con instrumentos que ofrecen mayores posibilidades.

Las metodologías desarrolladas para materias primas farmacéuticas basadas en MSPD han probado ser útiles en la determinación multiresiduo de

pesticidas en matrices que son un verdadero reto analítico como la lanolina y los propóleos.

La versatilidad de esta técnica, ha permitido direccionar la remoción de componentes de la matriz para obtener extractos adecuados para análisis de rutina por cromatografía gaseosa. El concepto empleado para el desarrollo de métodos se basa en el conocimiento de las propiedades químicas y fisicoquímicas diferenciales entre las matrices y los pesticidas a estudiar. El desempeño del método para determinar pesticidas en lanolina fue adecuado a las normas de referencia como la Farmacopea Europea y de los Estados Unidos. En tanto el método para determinar residuos de pesticidas en extractos de propóleo constituye el primer reporte de determinación de residuos de pesticidas en esta matriz, siendo un insumo importante para la industria elaboradora de productos apícolas y autoridades gubernamentales de control.

Continuando con el estudio de matrices poco exploradas pero de importancia nutricional en la región, se estudió preliminarmente la contribución de los residuos de pesticidas en infusiones de yerba mate a la ingesta diaria de pesticidas por la población uruguaya. Se comprobó que los pesticidas son parcialmente extraídos de la yerba mate durante el proceso de infusión. En un ensayo bajo condiciones de simulación se pudo determinar un porcentaje de transferencia a la infusión para los analitos estudiados que demuestra guardar especial relación con la solubilidad y permite estimar niveles de residuos aceptables (NRAs) según guías de la OMS para plantas medicinales. Se espera que este trabajo contribuya como información suplementaria al establecimiento de LMRs de pesticidas en yerba mate.

Se ha demostrado que las metodologías de preparación de muestra más difundidas para el análisis de residuos de pesticidas en frutas y vegetales (métodos

mini-Luke, QuEChERS y acetato de etilo) son capaces de incorporar en su alcance dos nuevos analitos como los reguladores de crecimiento vegetal ácido 1-naftilacetico y 2(1-naftil)acetamida. Se concluye que se puede prescindir entonces de métodos específicos para su extracción como los hasta entonces reportados en la literatura. Este trabajo contribuirá al control de dos analitos poco estudiados por laboratorios de control de alimentos que demuestran ser actualmente usados empleados en agricultura.

Por otro lado, el acoplamiento ESI-LC-QqQ bajo el esquema SRM demuestra ser una poderosa herramienta para la cuantificación rutinaria de diversos contaminantes orgánicos aunque presenta algunas limitaciones de confirmación de identidad de los analitos. Por este motivo, como se expuso para el ácido 1-naftilacetico, los instrumentos capaces de medir masas exactas en modo de barrido en combinación con instrumentos QqQ son una buena elección para monitoreos de amplio alcance.

Otro tipo de trazas en el ambiente que plantean importantes desafíos analíticos de cara al futuro, son los contaminantes antropogénicos presentes en aguas residuales y superficiales. De la evaluación preliminar de una serie de contaminantes emergentes relevantes en la planta de pretratamiento de efluentes de Montevideo, se pudo concluir que la tecnología actual no solo es ineficiente en la remoción de estos contaminantes, sino que con esta tecnología, los efluentes liberados al Rio de la Plata poseen niveles marcadamente superiores de estos contaminantes emergentes, que los influentes que llegan a la planta.

Se han evaluado diversas combinaciones híbridas de analizadores operativos en MS/MS, para el estudio de contaminantes emergentes en sistemas acuáticos. Se ha comprobado que el instrumental LC-QTOF presenta un gran potencial para el

análisis cualitativo de contaminantes orgánicos, con excelente capacidad en identificación y confirmación a niveles de trazas. Gran parte de esta potencialidad se puede explotar actualmente gracias al avance de las herramientas informáticas que permitieron desarrollar y aplicar durante esta tesis, nuevos aportes a la identificación de analitos por medio de estrategias de screening en HRMS. Sin embargo, la elucidación estructural es la etapa limitante en la caracterización de rutas de transformación de contaminantes emergentes. El presente trabajo muestra la aplicación de instrumentos QTOF y los conceptos expandidos empleados en la elucidación de la ruta de transformación del antibiótico amoxicilina en medio acuático. Se han expuesto los desarrollos en bases de datos, diversas estrategias de búsqueda de contaminantes asistidas por software además de las fortalezas y debilidades de las estrategias de screening objetivo y no objetivo abocadas a la caracterización de PTs. Los trabajos reportados durante esta tesis son un buen indicador de la potencialidad que poseen los instrumentos QTOF en resolver problemas analíticos de la actualidad.

Otro sistema evaluado fue el sistema LC-QLIT, quien por su alta sensibilidad es una actual alternativa instrumental en casos donde la sensibilidad es un prerrequisito analítico. La inyección directa de muestras acuosas a estos sistemas, permite prescindir de la preparación de muestra, ofreciendo mejor exactitud y precisión. Estos nuevos sistemas posibilitan nuevos modos operacionales aptos para identificación de analitos irresolubles por estrategias tradicionales de MS/MS.

Desde una perspectiva global, en esta tesis se ha puesto de manifiesto la amplitud de desafíos analíticos y oportunidades inmersas en el tópico de determinaciones de contaminantes orgánicos con interés en aplicación para problemas de la actualidad y los años venideros.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Manifold con cartuchos de SPE Oasis® HLB durante el tratamiento de efluentes para el análisis de contaminantes emergentes.	26
Figura 2: Dispersión de extractos de propóleo en sulfato de aluminio por la técnica MSPD.....	28
Figura 3: Diagrama de flujo del método QuEChERS en su versión original (Anastassiades <i>et al.</i> 2003a).....	31
Figura 4: Extracción QuEChERS de muestras comerciales de caramelos de propóleos.....	32
Figura 5: Cromatógrafo de gases dual (GC-FPD/ GC-ECD).....	35
Figura 6: Fotografía del GC-MS cuadrupolo (Hewlett Packard GC 6890- MS 5973) empleado en esta tesis.	37
Figura 7: Fuente electrospray de iones Turbo V TM (AB Sciex) en un equipo 5500 LC-QLIT-MS/MS (AB Sciex).....	42
Figura 8: Rango de aplicación del acoplamiento GC-MS y las diferentes interfases en el acoplamiento de LC-MS en función de la polaridad de los analitos y su masa molecular.	43
Figura 9: Esquema de operación de un cuadrupolo.	45
Figura 10: Esquema de operación de un TOF con diseño MSD/TOF (Agilent Technologies).	48
Figura 11: Fotografía de un equipo LC-TOF-MS. LC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies) acoplado a un TOF (MSD TOF, Agilent Technologies) con fuente ESI.	49
Figura 12: Esquema de operación de un QqQ.	51
Figura 13: Fotografía de un equipo LC-QqQ-MS/MS. LC Agilent 1200 Series (Agilent Technologies) acoplado a un QqQ (Agilent Technologies) con fuente ESI.	52
Figura 14: Principales modos operativos de un analizador QqQ.....	54
Figura 15: a) CID en la fuente de QTOF b) CID en la celda de colisión de QTOF... ..	55

Figura 16: Esquema de operación de un QTOF de diseño 6530 Series (Agilent Technologies).	56
Figura 17: Fotografía de un equipo LC-QTOF-MS/MS. LC Agilent 1200 Series (Agilent Technologies) acoplado a un QTOF (6530 Series Agilent Technologies) con fuente ESI JetStream®.	57
Figura 18: Esquema de funcionamiento de un QLIT (5500, AB Sciex).	59
Figura 19: Fotografía de un instrumento QLIT con diseño 5500 (AB Sciex) con fuente ESI Tubo V®.	60
Figura 20: Liner de un GC-MS luego del análisis de muestras de alimentos.	67
Figura 21: Fuente ESI de iones (JetStream™, Agilent Technologies) luego del análisis de una serie de muestras de efluentes.	69
Figura 22: Confirmación de clorpirifos en muestra de propóleo por GC-MS.	73
Figura 23: Espectro QTOF de heroína (90V fragmentor, energía de colisión 20 eV)	75
Figura 24: Espectro de baja resolución y de alta resolución (TOF) de la masa del calibrante.	77
Figura 25: Procedimiento esquemático de MSPD para residuos de pesticidas en lanolina.	97
Figura 26: Ensayos preliminares de recuperaciones en función del solvente de elución.	98
Figura 27. Cromatograma GC-MS (TIC) comparando el residuo de matriz alcohólica de lanolina.	104
Figura 28. Optimización del volumen de CH ₂ Cl ₂ en la etapa de cromatografía en columna para los pesticidas seleccionados a 0,5 µg/kg (n=5).	113
Figura 29: (a) Cromatograma TIC de GC-MS de una muestra problema; (b) confirmación de coumafos en la muestra (m/z 362, 364, 334).	116
Figura 30: Esquema de preparación de muestra y cromatogramas en 3D mostrando el desempeño de cada etapa de preparación de muestra en la remoción de polifenoles. (a) dilución de muestra a 8 %; (a) MSPD en sulfato de aluminio anh.; (c) MSPD y Florisil como cosorbente; (d) extracto final usando cromatografía por SiO ₂	118
Figura 31: Curvas de calibración en solvente y matriz para cada pesticida evidenciando el fuerte efecto matriz de los extractos de propóleo (n=7).	119

Figura 32: Cromatogramas por GC-FPD: (a) muestra problema conteniendo clorpirifos y cumafós; (b) mezcla de estándares 1 µg/mL de (1) clorpirifos (2) bromofós metil (3) etion; (4) TPP; (5) cumafós.	122
Figura 33: Grafico de control de TPP (recuperación % vs numero de muestra) para dos analistas durante un mes de análisis ($n=83$).	122
Figura 34: Estructuras químicas del ácido 1-naftilacético (ANA) y 2-(1-naftil) acetamida (ANAm)	136
Figura 35: Esquema de métodos de preparación de muestra empleado para el análisis de ANA y ANAm en tomate y zucchini.....	137
Figura 36: Cromatogramas SRM de LC-QqQ-MS/MS en el análisis de un estándar de ANA a 1mg/L. Se observa que la transición m/z 186 →115 (trazo rojo) no se realiza.	140
Figura 37: Cromatograma SRM de ANA, ANAm y TPP por LC-(QqQ)MS/MS.....	141
Figura 38: Fragmentaciones ESI (+) de ANAm y ESI (-) de ANA.	142
Figura 39: Confirmación de residuos de ANA en zucchini fortificado a 50 µg/kg por LC-QTOF-MS. Detalle de XICs de m/z 185,0608 y 141,0710 y espectro de masas en el barrido de MS identificando los iones con los respectivos errores de masas.....	143
Figura 40: Curvas de calibración de ANA y ANAm en tomate y zucchini para los tres métodos de preparación de muestra evaluados con determinación LC-QqQ-MS/MS. Señal representada: Área SRM1.	145
Figura 41: Simulador de mate de vidrio utilizado para extraer los pesticidas de la yerba mate.....	157
Figura 42: Relación entre log Sw (solubilidad en agua) y T (%) hallado para los pesticidas en yerba mate.....	163
Figura 43: Relación entre log Kow y T (%) hallado para los pesticidas en yerba mate.	163
Figura 44: Relación entre pK_H (constante de Henry) y T (%) hallado para los pesticidas en yerba mate.....	164
Figura 45: Fotografía de muestras de influente y efluente de la planta de pretratamiento de Punta Carretas, Montevideo.....	182
Figura 46: Cromatograma de GC-MS mostrando los iones SIM de detección de algunos contaminantes emergentes relevantes en una muestra de efluente de agua residual.....	188

Figura 47: Carga total promedio y contribuciones individuales en el periodo de una semana para influentes (muestras de entrada, influentes) de la planta de tratamiento.....	189
Figura 48: Carga total promedio y contribuciones individuales en el periodo de una semana para efluentes (muestras de salida, efluentes) de la planta de tratamiento.	190
Figura 49: Frecuencias de detección de los compuestos analizados en aguas residuales.....	192
Figura 50: Promedios (línea media), máximos y mínimos de concentración de los contaminantes estudiados durante el monitoreo de influentes (muestras de entrada) de agua residual.	193
Figura 51: Promedios (línea media), máximos y mínimos de concentración de los contaminantes estudiados durante el monitoreo de efluentes de agua residual....	194
Figura 52: Representación simultánea de variables (flechas) y observaciones (círculos) resultado del ACP. En el gráfico A se presentan los factores 1 y 2 que explican un 55,2% de la varianza de los datos. Con el gráfico B se muestra los factores 1 y 3 que explican un 47,7% de la varianza de los datos. Mediante distinto color se discriminan las observaciones tomadas en la entrada y la salida de la planta del emisario. Códigos de letras disponible en Tabla A6a.....	197
Figura 53: Representación simultánea de variables (flechas) y observaciones (círculos) resultado del ACP. En el gráfico A se presentan los factores 1 y 2 que explican un 55,2% de la varianza de los datos. Con el gráfico B se muestra los factores 1 y 3 que explican un 47,7% de la varianza de los datos. Mediante distinto color se discriminan las observaciones tomadas a distintas horas.....	198
Figura 54: Estabilidad de AMX (1mg L ⁻¹) en solución acuosa a pH 7 y 8 medida por LC-QTOF-MS ([M+H] ⁺).	203
Figura 55: Espectro MS/MS de masas exacta de AMX a 10eV de energía de colisión.	205
Figura 56: Ruta de fragmentación propuesta para AMX.	206
Figura 57: Comparación del espectro MS/MS de masas exacta (10eV) obtenido durante experimentos de degradación en laboratorio y muestras positivo de a) (5R) AMX-DKP en efluentes y agua de río y b) (5S) AMXO en efluente.....	208
Figura 58: Ruta de fragmentación propuesta para a) AMX-DKP y b) AMXO.	209
Figura 59: Principal ruta de transformación ambiental propuesta para AMX.	211

Figura 60: Espectro de masas exacta en MS/MS para AMX-Me a 10eV de energía de colisión: iones identificados, formulas, errores.	213
Figura 61: Ruta de fragmentación propuesta para AMXC-Me.....	214
Figura 62: Espectro MS/MS y ruta propuesta de fragmentación de cocaína por ESI(+)-QTOF-MS/MS, Fragmentor 90V y energía de colisión 20 eV.	222
Figura 63: Espectro ESI(+)-QTOF-MS/MS de sulfadiazina. Fragmentor 90V y energías variables de colisión (5-30 eV).....	223
Figura 64: Espectro MS/MS y ruta propuesta de fragmentación de metoprolol. ESI(+)-QTOF-MS/MS, Fragmentor 90V y energías de colisión 10 y 20 eV.	224
Figura 65: Propuesta de fragmentación MS/MS de metoprolol.....	225
Figura 66: Distribución de entradas (inputs) de la base de datos según el tiempo de retención cromatográfico (screening objetivo). En total son 887 entradas para los 92 compuestos estudiados (la base completa es suministrada en ANEXO 9).....	226
Figura 67 Flujo de trabajo propuesto para la identificación de productos de transformación por LC-QTOF-MS/MS. La estrategia comprende de tres etapas: a) Screening asistido por software, b) identificación de tentativos y c) confirmación por MS/MS si fuera necesario.....	228
Figura 68: Screening y confirmación objetivo de ranitidina por QTOF. a) Espectros MS y MS/MS de ranitidina en agua de río. b) patrón isotópico de ion $[M+H]^+$ de ranitidina (ion formula $C_{13}H_{23}N_4O_3S$, m/z exacta teórica 315,1485) por MS y MS/MS ($\Delta m/z = 1,3$).	230
Figura 69: Búsqueda de PTs usando la aplicación MFE (Mass Hunter v3.B, Agilent Technologies).....	232
Figura 70: Búsqueda y asociación con base de datos (Mass Hunter v3.B, Agilent Technologies).....	233
Figura 71: Estructura de iones isobáricos de dos β -bloqueantes.....	235
Figura 72: Estructuras coincidentes, formulas elementales y masas exactas de algunos iones genéricos de una familia de compuestos.	237
Figura 73: Identificación de AMX-DKPs en agua residual utilizando fragmentos genéricos.	238
Figura 74: Espectro MS/MS y ruta propuesta de fragmentación de diazinon. ESI-QTOF-MS/MS, Fragmentor 90V y energía de colisión 20 eV.	240
Figura 75: a) Reporte de screening de Mass Hunter denotando un PT encontrado con masa exacta de un ion fragmento de diazinon (diazinon F4, $C_8H_{13}N_2O$). b) pico	

cromatográfico para diazinon PT c) espectro de confirmación MS/MS para diazinon PT.	241
Figura 76: Espectro de alta resolución: Identificación del patrón isotópico del ion formula $C_{21}H_{16}N_3O_5$ correspondiente al ion $[M+H]^+$ de azoxystrobin ácido.	246
Figura 77: Identificación del pico cromatográfico del ion formula $C_{21}H_{16}N_3O_5$ correspondiente a azoxystrobin ácido y detalle de su espectro de MS mostrando la pérdida de H_2O	247
Figura 78: Formación de azoxystrobin ácido ($C_{21}H_{15}N_3O_5$).	247
Figura 79: Variaciones de hallazgos en screening objetivo empleando base de datos en función de la tolerancia de TR (min).....	257
Figura 80: Comparación de análisis LC-HRMS en dos muestras diferentes conteniendo (<i>5R</i>) amoxicilina dicetopiperazina 2',5'; formula: $C_{16}H_{20}N_3O_5S$, m/z teórica 366,1118, Full scan MS fragmentor voltaje 90V, MS/MS Fragmentor 90V, Energía de colisión: 5 eV, Ion precursor (Δ 1,3 m/z).....	261
Figura 81: Comparación de efectos matriz en el análisis de un grupo de contaminantes emergentes por LC-QLIT-MS/MS.....	265
Figura 82: Comparación de LODs en el análisis de un grupo de contaminantes emergentes por LC-QLIT-MS/MS.	265
Figura 83: Comparación de cromatogramas TIC de estrategia A (con preconcentración; en azul), y estrategia B (inyección directa; en negro).	266
Figura 84: Comparación de cromatogramas SRM de trigonelina y ácido nicotínico por preconcentración (azul) e inyección directa (negro).	268
Figura 85: Identificación de etilamfetamina en una muestra de agua de río usando el método SRM de transiciones y el método IDA con comparación de espectros EPI.	270

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Máximas tolerancias recomendadas para intensidades relativas usando técnicas MS (SANCO 2011).....	71
Tabla 2. Tiempos de retención (T_R) tiempos de retención relativos (T_{RR}), limites de detección y cuantificación (LODs y LOQs) de los pesticidas analizados por GC-FPD.	99
Tabla 3: Tiempos de retención (T_R) tiempos de retención relativos (T_{RR}), limites de detección y cuantificación (LODs y LOQs) de los pesticidas analizados por GC-ECD.	101
Tabla 4. Promedio de recuperaciones y DSRs (%) del método propuesto en lanolina.	103
Tabla 5. Programa de confirmación de residuos por GC-MS (modo SIM).....	105
Tabla 6: Limites de detección y cuantificación (LODs and LOQs) y parámetros de regresión lineal en calibración en matriz.	115
Tabla 7: Tiempos de retención $T_{R(\min)}$ para análisis GC-FPD/ MS, Recuperaciones, Promedio de recuperaciones y DSRs (%), Efecto matriz (EM %) calculado, y reproducibilidad inter-día (%) para cada analito bajo estudio ($n=5$) por GC-FPD. Iones <i>Quals</i> y <i>Quant</i> de confirmación.	117
Tabla 8: Parámetros de análisis LC-(QqQ)MS/MS para el análisis de ANA, ANAm y el control interno de extracción TPP.	139
Tabla 9: Recuperaciones (%) y DSR(%) para niveles bajo y alto de ANA y ANAm en tomate y zucchini.	146
Tabla 10: Datos de validación obtenidos en ambas matrices por tres métodos MRM ensayados. Repetitividad y reproducibilidad expresadas como DSR (%) inter e intra-día calculada a un nivel de concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EU LMRs típico para frutas y vegetales).....	148
Tabla 11: Recuperaciones obtenidas a 1mg/L en infusión de yerba mate. Pesticidas analizados por GC-ECD o GC-FPD y tiempos de retención relativos (TRR). Los compuestos con más de un diastereoisómero poseen diferentes tiempos de retención.	160
Tabla 12: Transferencia porcentual de pesticidas a la infusión y datos físicoquímicos reportados en Tomlin, 2009.	161

Tabla 13: Ingesta diaria admisible (IDA) (Codex Alimentarius 1997) y nivel de residuos aceptable (NRAs) calculados para cada pesticida. Los pesticidas que no fueron calculados no presentan IDA reportada por el Codex Alimentarius.	167
Tabla 14: Iones seleccionados, tiempos de retención (T_R , min), recuperaciones a 10 $\mu\text{g/L}$ y LODs (en ng L^{-1}) para los compuestos estudiados. nd: no determinado.	187
Tabla 15: Ejemplos de algunas transformaciones y cambios de masa y formula reportadas para productos de transformación en matrices ambientales.	244
Tabla 16: PTs de pesticidas identificados en muestras reales de aguas agrícolas empleando transformadas de masas exactas.	248
Tabla 17: Screening objetivo para un grupo de contaminantes usando fragmentor 190V y la base de datos suministrada en ANEXO 9, 10 ppm de filtro de masas y 1000 cuentas de umbral. Se muestra la comparación de resultados en detección automatizada utilizando un procedimiento por SPE (sin diluir) de una muestra de agua del río y una estrategia de dilución al $\frac{1}{2}$ del mismo extracto. Nota: Los resultados en negrita indican los falsos negativos si se toma una tolerancia de < 5 ppm de error de masas.....	256

OTROS ARTICULOS RELACIONADOS A ESTA TESIS

- PAREJA, L.; Pérez-Parada A.; AGUERA A; CESIO V.M.; HEINZEN H.; FERNÁNDEZ-ALBA AR. (2012) Photolytic and photocatalytic degradation of Quinclorac in pure and paddy field water: identification of transformation products and pathways. *Chemosphere* **87**, 838–844.
- PAREJA, L.; COLAZZO, M.; Pérez-Parada A.; N. BESIL; BOKING, B; CESIO V.M.; HEINZEN H.; FERNÁNDEZ-ALBA A. R. (2012) Occurrence and distribution study of residues from pesticides applied under controlled conditions in the field during rice processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60** 4440 - 4448
- PAREJA, L.; COLAZZO, M.; Pérez-Parada A.; S. NIELL; CARRASCO-LETELIER L.; CESIO V.M.; HEINZEN H. (2011) Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **8** 3844 – 3858.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y ENCUENTROS

Item materias primas farmacéuticas

- Pérez A.; Barneche S. Minteguiaga M, Heinzen H. Analyte protectants for pesticide residue determination in lanolin according to the US 32th & 6th EU Pharmacopeias European Pesticide Residue Workshop (EPRW) 2010 Estrasburgo, Francia. Poster.
 - Heinzen H., Pérez A. MSPD applications for the pesticide residue analysis in fatty matrices. European Pesticide Residue Workshop (EPRW) 2010 Estrasburgo, Francia. Presentación oral.
 - Cesio V., Niell S, Hernandez V., Carrasco-Letelier L, Pérez A. Heinzen H. MSPD determination of pesticides residues in Beeswax 47th FPRW (Florida Pesticide Residue Workshop). 2010 Miami, FL, EE.UU. Poster
 - Barneche S., Minteguiaga M., Pérez A., Heinzen H. Evaluación de protectores de analito para la determinación multirresiduo de pesticidas en lanolina según USP
-

- 32-NF 27 2009. 1er Congreso Uruguayo de Química Analítica. Montevideo Uruguay. Poster
- Pérez A.; González G.; González J.; Heinzen H. MSPD based extraction of pesticides residues in cold-pressed citrus essential oils followed by GC/FPD-ECD determination and GC-MS confirmation 2008. European Pesticide Residue Workshop. 2008 Berlin, Alemania. Poster
 - Pérez A., Colazzo M., Besil N, Rey F., Heinzen H. Determination of fluvalinate and coumaphos residues in propolis in a single clean-up step followed by GC-MS European Pesticide Residue Workshop (EPRW) 2010 Estrasburgo, Francia. Poster
 - Pérez A., Colazzo M., Gonzalez G., Heinzen H. Determination of organophosphate pesticide residues using MSPD based extraction and column chromatography clean-up followed by GC-FPD in propolis extracts for pharmaceutical use. 3rd Crop Protection Chemistry in Latin America IUPAC, 2009 Rio de Janeiro, Brasil. Poster
 - Pérez A., Colazzo M., Gonzalez G., Heinzen H. Analysis of Organophosphate Residue in Propolis Extracts by an MSPD Approach with GC-FPD Determination 2nd Latin American Pesticide Residue Workshop. 2009 Santa Fe Argentina. Poster
 - Pérez A.; González G.; González J.; Heinzen H. Determination of pesticides residues in lanolin. A comparison of a new MSPD based extraction method and the GPC official procedure 2008. European Pesticide Residue Workshop. 2008 Berlin, Alemania. Poster.

Ítem Alimentos

- Munguía B., López A, Pérez A., Heinzen H., Cesio V., Domínguez L. Optimization of QuEChERS methodology for the determination of cypermethrin and ethion in raw milk with GC-ECD and GC-FPD 2nd Latin American Pesticide Residue Workshop. 2009 Santa Fe Argentina. Poster
 - Pérez A., Colazzo M., Geis-Asteggiante L., Gonzalez G., Heinzen H Behaviour of pesticide residues in mate drinking. 2nd Latin American Pesticide Residue Workshop. 2009 Santa Fe Argentina. Poster.
 - Pérez A., Colazzo M., Geis-Asteggiante L., Gonzalez G., Heinzen H. Transfer of pesticides to the brew during maté drinking process and their relationship with physicochemical properties 2009. 3rd Crop Protection Chemistry in Latin America IUPAC, Rio de Janeiro, Brasil. Poster.
 - Pérez A.; González G.; González J.; Heinzen H. Evaluación toxicológica de residuos de pesticidas en plantas medicinales: El caso de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*)
-

2008. 2º Congreso de Fitoterápicos del Mercosur VI Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fotoquímica. Poster.
- Besil N., Niell S., Pérez-Parada A.; Heinzen H.; Cesio V.M. Estudio piloto de la transferencia de pesticidas de la cascara la jugo de naranja durante el procesamiento, III Simposio de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus, 2010 Salto, Uruguay. Poster.
 - Besil N., Niell S., Pérez-Parada A.; Heinzen H.; Cesio V.M. Validation of a multi residue method for eight postharvest pesticides in mandarins, 43rd IUPAC World Chemistry Congress. 2011 Ciudad de Puerto Rico, Puerto Rico. Poster.
 - Pareja L., Colazzo M., Pérez-Parada A., Besil N., Boking, B., Cesio V.M., Heinzen H., Fernández-Alba AR. Preparation of an incurred rice simple and evaluation of pesticide residues in the commodities obtained after its processing. 3rd Latin American Pesticide Residue Workshop;2011 Montevideo Uruguay. Presentación oral.
 - Besil N., Cesio VM., Pérez-Parada A., Heinzen H. Determination of post harvest fungicide residues in concentrated orange juices. 3rd Latin American Pesticide Residue Workshop. 2011 Montevideo Uruguay. Poster.
 - Pérez-Parada A. Lozano A., Heinzen H., Fernández Alba AR. Inclusion of 1-naphtylacetic acid and 1-naphtylacetamide in 3 typical multiresidue methods for LC-MS/MS analysis of fruits and vegetables. 3rd Latin American Pesticide Residue Workshop. 2011 Montevideo Uruguay. Poster.
 - Pareja, L., Pérez-Parada A., Aguera A., Cesio VM., Heinzen H., Fernández-Alba AR. Photodegradation of Quinclorac: identification of intermediates and degradation pathways by LC-QTOF. 3rd Latin American Pesticide Residue Workshop. 2011 Montevideo Uruguay. Poster.
 - Colazzo M, Pérez-Parada A., Pareja, L., Cesio VM., Heinzen H. Evaluación del método QuEChERS original para la determinación de residuos de pesticidas en arroz blanco y arroz con cáscara , 6to Congreso Argentino de Química Analítica, 2011, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé, Argentina. Poster.
 - Besil N., Pareja, L., Pérez-Parada A., Colazzo M., Cesio VM., Heinzen H. Determinación de residuos de pesticidas en mandarinas: comparación de métodos, validación y análisis de muestras. 2do Encuentro Nacional de Ciencias Químicas, 2011 Montevideo, Uruguay. Poster.
 - Gérez N., Rey F., Pérez-Parada A., Heinzen H. Aportes al estudio de la presencia de residuos de pesticidas en caramelos elaborados con productos apícolas. 2do Encuentro Nacional de Ciencias Químicas, 2011 Montevideo, Uruguay. Poster.
-

Ítem Medio Ambiente

- Pérez-Parada A., Colazzo M., Cesio V., Heinzen H. Evaluación preliminar de la ocurrencia de contaminantes emergentes en aguas residuales de Montevideo, Uruguay. 7mo Congreso de Medio Ambiente de la AUGM, 2012. Universidad Nacional de La Plata Argentina. Presentación oral
 - Pérez-Parada A., Gómez-Ramos MM., Heinzen H. , Fernández-Alba, AR. Aplicación de cálculos *in silico* sobre bases de datos espectroscópicas de masas exactas en la detección automatizada de productos de degradación de contaminantes en muestras ambientales , 2011 2do Encuentro Nacional de Ciencias Químicas, Montevideo, Uruguay Presentación oral
 - Fernández-Alba, AR. Pérez-Parada A., Gómez-Ramos MM. Automated analytical procedures for the screening of non-target transformation products (TPs) in photochemical processes, ICCEE Zurich 2011 EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment, 2011 Zurich Suiza, Presentación oral
 - Pérez-Parada A.; Agüera A.; Gómez-Ramos M.M.; García-Reyes J.F.; Heinzen H.; Fernández-Alba A.R. Determination of penicillins and its main degradation products in influent and effluent from a wastewater treatment plant by LC-QTOF. 28th International Symposium on Chromatography. 2010 Valencia, España. Poster
 - García-Reyes J.F; Molina-Díaz A, Pérez-Parada A.; Agüera A.; Gómez-Ramos M.M.; Fernández-Alba A.R. Development of data processing workflows for the automated detection of transformation products of emerging contaminants in the environment. 28th International Symposium on Chromatography. 2010 Valencia, España. Poster.
 - A.R. Fernández-Alba A.R; Gómez-Ramos M.M.; Gómez M.J.; Martínez-Bueno M.J., Pérez-Parada A. Applications of new mass spectrometry (MS) techniques for the efficient evaluation of contaminants in river water. A case of study, Henares River (Madrid, Spain). SCARCE 1st Annual Conference: understanding effect of global change on water quantity in river basins 2010. Girona, España, Presentación oral.
 - Pérez-Parada A., Gonzalez G., Mendoza Y., Henizen H. Assesment of residues of Fipronil in bees and bees products from Uruguay: A correlation with the hive depopulation 2nd Latin American Pesticide Residue Workshop. 2009 Santa Fe Argentina. Poster y presentación oral.
-

Estudios de determinación de compuestos orgánicos a niveles traza en matrices complejas

Anexo 1

Pesticide Residues in Natural Products with Pharmaceutical Use: Occurrence, Analytical Advances and Perspectives

Andrés Pérez-Parada¹, Marcos Colazzo¹, Natalia Besil¹,
Eduardo Dellacassa¹, Verónica Cesio¹,

Horacio Heinzen¹ and Amadeo R. Fernández-Alba²

*¹Pharmacognosy and Natural Products, Facultad de Química
Universidad de la República, Montevideo*

²Pesticide Residue Research Group, Universidad de Almería, Almería

¹Uruguay

²Spain

1. Introduction

A pharmaceutical raw material is every active or inactive substance used in the manufacturing process of a pharmaceutical dosage form. According to their function in the medicament, they could be classified into two groups: (i) active ingredients with pharmacological activity; and (ii) excipients which allow the active ingredients dosification and makes suitable the route of administration (de la Rosa et al., 1995). In spite of the high number of synthetically produced pharmaceuticals and the progress in biotechnology and gene engineering, there are a number of raw materials of natural origin, which are still used for manufacturing active pharmaceutical products (Balandrin et al., 1985).

Quality is a mandatory requirement in the materials to accomplish the Pharmaceutical 'Good Manufacturing Practices'. Nowadays, the presence of pesticides in animal and vegetal commodities is a topic of public concern for the potential health hazards derived from them (WHO, 1998). The presence of pesticide residues in animal or vegetal raw materials can be originated in agricultural practices, environmental contamination or cross contamination. For example, oils rendered from whole fish and from fish offal represent an important dietary component in many areas of the world. In addition, fish oils are extensively used as ingredients in food and in dietary supplements for their therapeutic benefits in the treatment of cardiovascular, arthritic and dermatological diseases. Fish oils, however, are susceptible to contamination with lipophilic organic chemicals, in particular many organochlorine chemicals are now ubiquitous contaminants of marine ecosystems, but there is no specification on the pesticide residue allowed (Jacobs et al., 1997).

The number of trace pollutants to be monitored is continually growing and the levels at which these compounds need to be determined are becoming lower. Multi-residue methods (MRMs) are the preferred strategy over single analyte or class residue methods (SRMs). Analytical features of the MRMs allow to cover a large range of pesticides in a single analysis. Many MRMs employing different extraction and clean-up techniques and a variety

of detection methods, have been reported for the determination of pesticide residues in raw materials. The analytical method to be used depends mainly on the matrix composition, the physicochemical properties of the target analytes as well as the chemical nature of interferences from the analyzed matrices and/or the available instrumentation.

Currently, general methods to control pollutants in materials intended to be used in pharmaceutical preparations are described in the United States and European Pharmacopeias (USP 2007, EP 2008). Many herbs and spices that have been included in the Pharmacopeias, like Cinamon and Ginger, even when they were evaluated to detect low contaminant levels using the newest analytical methodologies and procedures available, their specifications remain unchanged. The different classes and wide range of pesticides and agricultural commodities containing them have fostered the development of new methods. However, the difficulty to cover all analytes in one single method and for all the possible matrices, has turned this approach into an almost impossible task, despite the advances in instrumentation in the last decade. Moreover, new pesticides have been introduced in the market which are more polar, non-chlorinated, less persistent or unstable leading to a change in the concept of the analytical and detection features required.

The actual trend in pesticides residue analysis focuses on the use of liquid chromatography coupled to mass spectrometry techniques (LC-MS) instead of gas chromatography (GC) with selective detection as electron capture (ECD), flame photometric (FPD), nitrogen-phosphorus (NPD) and thermal conductivity (TCD) detectors which represented the state-of-the-art at the end of the last century. They are intended for lipophilic (in many cases obsolete) pesticides like most organochlorine (i.e. *p,p'*-DDT, aldrin, dieldrin, lindane). Moreover, the targeted compounds monitored by such methods sometimes are neither pesticides of toxicological relevance or the most commonly found in a particular sample. Furthermore, MRMs could not be suitable and additional steps or SRMs are required. The wide scope of targeted analytes lies unchanged in the last editions of the most important Pharmacopeias as well as the methods for their analysis. The new instrumentation and sample preparation procedures, which allowed to diminish the limits of detection and consequently lowered the maximum residue levels (MRLs) in food commodities to 10 µg/kg for the great majority of pesticides in the European regulation, has not been yet included in the most important Pharmacopeias. The USP includes in its last Edition the detection of impurities in heparin using sophisticated high field NMR (nuclear magnetic resonance) techniques (USP, 2010). Nevertheless, the use of LC-MS/MS for pesticide residues and other contaminants is not mentioned at all. It is worth to consider that, these raw materials could be employed for pharmaceuticals which would be taken by people whose general health situation is jeopardized by their particular condition and therefore, the toxicological risk could be magnified. Therefore, strict regulations should rule the content of noxious substances like pesticides.

There is also a growing market for medicinal plants and their pharmaceuticals that is freely available in markets of Europe and USA: these Over The Counter (OTC) products are actually sold as "panaceas" for a well and long lasting living. There is a grey zone, from the regulatory point of view, with relation to pesticide residue allowable contents where all these kind of products are laid. The self medication and, therefore, uncontrolled use or misuse as well the lack of specific regulation in pesticide residue limits for OTC products deserves attention from the regulatory bodies. Nutraceuticals, natural cosmetics and phytopharmaceuticals share the same kind of regulatory alibi where the risk due to the

presence of pesticides residues has not been yet particularly considered. For many food products like oils or meals, processing factors have been estimated, but which is the processing factor for a specific pesticide in a *Hamamelis* tincture? Or in propolis tincture? Pesticides are concentrated or diluted? Undoubtedly, there are more open questions than answers.

New trends in pesticides residue analysis have been focused on the miniaturization of the sample preparation methodology, moving to the development of straightforward, faster, cost-effective, and environmentally friendly procedures, adaptable for routine use in laboratories. Even with the advent of highly sensitive mass spectrometry (MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS) detection techniques, the total knowledge of the contribution of pesticides in pharmaceutical products has not been completely developed yet, as for food and feed commodities or environmental samples. This situation makes the development of new methods in organic contaminants residue analysis in pharmaceutical raw materials, a non closed and challenging issue.

This chapter addresses the main features of pesticide residue analysis in natural complex matrices frequently used in the pharmaceutical industry and folk medicine. An overview in the literature for methods and new improvements to determine pesticide residues in some critical pharmaceuticals raw materials is here presented. Expected pesticides, strategies in sample preparation procedures, recent applications in detection capabilities about these particular uses of the above mentioned pesticides are critically discussed. The authors are aware of reports in literature that were published in a variety of languages or in restricted access publication that were not included in this chapter. However, we tried to set priority on the most relevant, high impact and recent developments in the area.

2. Natural products of economical importance in the pharmaceutical industry

As above mentioned, some natural products are widely used in pharmacy. Table 1 shows an overview of selected commodities studied in this chapter and features for which are used. Particularly, traditional Chinese medicines are the most used, being more than 1.5 billion people all over the world which trust in their efficacy and safety (Li et al., 2010). The use of medicinal plants in both crude and prepared forms has increased greatly. The WHO has estimated that 80% of the global population relies on traditional medicine for health care. About 51% of all drug preparations in industrialized countries derive from plants, acting as sources of therapeutic agents or models for new synthetic compounds, or as raw material for semi-synthetic production of highly complex molecules (Zuin & Vilegas, 2000).

Aromatic plant drugs including essential oils and natural aromachemicals have been used extensively in the pharmaceutical industry as flavouring, and to mask the foul odour or taste of some pharmaceuticals as excipients.

However, in recent years, many aromatic plant drugs are used as active ingredients of botanicals. The simplest common traditional and modern use of aromatic plant drugs is as herbal tea. In many countries, pharmacies can freely dispense established tea formulations to patients for mild indications (Wichtl et al., 1994). Thus, essential oils could also make their way from the traditional into the modern medical domain (Bakkali et al., 2008).

Beeswax, instead, is constituted by saturated and unsaturated hydrocarbons, long chain saturated, mono and di-unsaturated esters and is being used as a lipid in pill coatings for drug delivery systems from tablets although current cosmetic uses are also known (Üner et al., 2005). Propolis is well known for therapeutic and dermal contact applications due to

its antibiotic and antiviral activities; more activities of interest were widely reported principally cytotoxic, antioxidant and antifungal ones (Marcucci, 1995). Lanoline is a complex matrix composed principally by a mixture of esters involving different aliphatic acids combined with different alcohols. Lanolin is the by-product obtained after wool wax purification and it is widely used in cosmetic and pharmaceutical formulations because its unique surfactants properties. It also represents the world first source of cholesterol and lanosterol (Jover et al., 2002).

Commodity	Features/Properties	Pharmaceutical use
Beeswax	Compatibility with skin oils , UV inhibitor	Hand and body creams, ointments and pill coatings
Essential oils	Aromatic	Flavoring
Lanolin	Compatibility with skin oils, water absorbing, surfactant and emulsifying	Creams and ointments
Propolis	Antibiotic, anti-inflammatory, healing, antioxidant	Dermal contact, dietary supplement, cough candies
Medicinal Aromatic herbs	Wide variety of active constituents (i.e. antibiotic, anti-inflammatory)	Depending on active constituents. Dietary supplement

Table 1. Selected commodities and their uses in pharmacy.

3. Pesticide residues occurrence in natural products of economical importance

Since 1963 pesticide residues were detected in natural drug matrices although most monitoring reports have been published in the last 20 years. Organochlorines (OCs) such as DDT, aldrin, dieldrin, endrin, hexachlorocyclohexane (HCH) isomers and hexachlorobenzene (HCB) have been widely used as insecticides since the introduction of pesticides in management strategies for the protection of crops. Due to its well known environmental persistence, most OCs are currently banned worldwide. Synthetic pyrethroids and organophosphates (OPs) insecticides were then introduced as replacements, being most of them currently commercially available in several countries. The occurrence of pesticides residues in phytopharmaceuticals and phytomedicines reviewed by Zuin and Vilegas (2000) state evidence that most reports were focused on the detection of OCs and OPs. On the other hand scarce reports have deal with the monitoring of other insecticide families such as carbamates and bridged diphenyls; triazine and urea herbicides; phtalamides and benzimidazole fungicides; a trend which is slowly overcome nowadays. Efforts in stricter regulation in MRLs settling for pesticides was stated by Codex Alimentarius, European and United States legislation for food commodities which has change the concept of contamination with pesticide residues. Therefore, more and more compounds are being targeted in raw materials although also banned OCs are still being found.

3.1 Pesticide residues in citrus essential oils

Depending on the extraction procedures, some oils could concentrate pesticide residues, as the case of citrus oils and extracts, being necessary to control the impact of the different

processing steps from fruit to the essential oil and the storage materials used. Citrus essential oils are by far the most studied essential oil commodity for pesticide residues. Di Bella and co-workers have been extensively reported the occurrence of variety of contaminants in Italian citrus essential oils. From the technological package applied in citrus crops, lipophilic pesticides are suggested to be preferably present in the oil phase (Dugo & Di Bella 2002). Residues of the bridged diphenyls (BDPs) tetradifon and dicofol along with the its metabolite, 4,4'- dichlorobenzophenone, were firstly reported in a five years monitoring campaign in lemon, mandarin, bergamot and orange essential oils (Saitta et al., 2000). On the other hand, Uruguayan lemon essential oils were found containing the OPs methidathion and chlorpyrifos (Dellacassa et al., 1999). More recently, a wide variety of OPs were reported in bergamot essential oil (Di Bella et al., 2004) and biological celementine, lemon, mandarin and orange essential oils (Di Bella et al., 2006).

Finally, a recent study with variety of samples from Argentina, Brazil, Italy, South Africa and Spain, revealed the introduction of more compounds to the target list since residues of the BDP bromopropilate, and OPs fenthion, malathion, phentoate and pyridafenthion were found (Di Bella et al., 2010). From this work, the authors conclude the wide occurrence of chlorpyrifos and dicofol residues in most samples, being Brazilian and Spanish ones the largest contaminated with individual levels up to 4.8 and 8.5 mg/L respectively.

3.2 Pesticide residues in bee's by-products: Propolis and beeswax

The contamination of bee's by-products with acaricides residues was extensively investigated by Bogdanov and co-workers. Important contamination with the most worldwide used synthetic acaricides to control Varroasis such as achrinathrine, amitraz, bromopropilate, coumahos, flumathrin and τ -fluvalinate was depicted in several studies (Bogdanov, 2003, Bogdanov, 2006, Bogdanov et al., 2003, Wallner, 1999). Even in a less extent, studies reporting the occurrence of several lipophilic pesticides from environmental pollution in beeswax were established. Not only acaricide contamination occurs, residues of the OC lindane, and the OCs metabolites *p,p'*-TDE, endosulfan sulphate and 3-phenoxybenzaldehyde were found in beeswax from Spanish beehives (Jiménez et al., 2005). A wide variety of residues of OPs, synthetic pyrethroids and dicarboximide fungicides (procymidone and vinclozolin) were also detected in beeswax from France (Chauzat & Faucon 2007). Recently, Spanish commercial beeswax were found containing chlorimefon, chlorfenvinphos, chlorpyrifos, endosulfan and malathion residues (Serra-Bonvehí & Orantes-Bermejo, 2010). Over 197 samples analysed, the authors reported residues of chlorfenvinphos residues in 96 % of samples with concentrations up to 10.6 mg/kg (pesticide not legally authorised for use in beekeeping) whereas τ -fluvalinate was detected in 93.6% of samples with concentrations up to 88.7 mg/kg (Serra-Bonvehí & Orantes-Bermejo 2010). Currently, a critical situation with pesticide residues in bee's by-products is being found worldwide. A recent study carried out in hive matrices of USA and Canada, showed the occurrence of 121 different pesticides and metabolites (a variety of acaricides but also insecticides, fungicides and herbicides introduced in the hive by the bees from pesticide containing crops) within 887 beeswax samples analyzed (Mullin et al., 2010). The authors found that almost 98 % of the North American beeswax samples were contaminated with up to 204 and 94 mg/kg residues of τ -fluvalinate and coumaphos respectively. With relevant incidence, lower amounts of amitraz degradates and the fungicide chlorothalonil were found while an average of 6 pesticide detection per sample and a high of 39 was stated (Mullin et al., 2010).

On the other hand, since the composition of raw propolis contains high amount of beeswax, pesticide residues occurrence in propolis are expected to be in the same line to beeswax contamination (Bogdanov 2006, Wallner 1999). Recently our group investigated the presence of coumaphos, the most used acaricide, in propolis tinctures from Uruguay. Moreover, minor residues of ethion and chlorpyrifos were also detected (Pérez-Parada et al., 2011).

3.3 Pesticide residues in lanolin

To prevent fleece damage by sheep ectoparasites and to protect wool during storage, OCs, OPs and pyrethroid insecticides were extensively used in sheep sanitary treatments. Because of their lipophilic nature, these pesticides tend to accumulate in wool wax. Nowadays ectoparasite control is achieved exclusively through the application of OP and pyrethroid insecticides and chitin synthesis inhibitors such as diflubenzuron and triflumuron (Jones 1996). However, few efforts were carried out in the last decade to determine the occurrence of pesticide residues in wool wax and processed wool wax (lanolin). In a previous study, our group found residues of chlorpyrifos, cypermethin, diazinon and ethion in Uruguayan lanolin samples (Pérez et al., 2010). Furthermore, when recently searching for 40 OPs residues in raw sheep wool from Uruguay, the extracted wool wax was found only containing diazinon and ethion residues (Niell et al., 2011).

3.4 Pesticide residues in medicinal plant materials

The interest in pesticide residues in medicinal herbs have been mainly focused on method developments rather than in the publication of results for public concern. However, the main fact can be divided into (i) findings are still OCs and OPs insecticides and (ii) the occurrence of a growing amount of pesticides, mainly fungicides, contained in medicinal products which enlarge the target list of pesticides to search for. Most studies still revealed the high incidence of OCs pesticides in several herbal drugs worldwide (Abhilash & Singh, 2008, Jeon et al., 2007, Leung et al., 2005, Mishra et al., 2007, Sun et al., 2007, Zuin et al., 2003).

The occurrence of banned OCs is accentuated when determining pesticide occurrence in commodities based on roots principally due to the cultivation in contaminated soils with several decades of agricultural use (Hayward & Wong, 2009, Leung et al., 2005, Li et al., 2010, Wong et al., 2010, Wu et al., 2011). Additional interest lies on OCs residues in those commodities which are consumed with dietary supplement purpose such as Ginseng root powders (Wong et al., 2010). Other authors reported residues of carbendazim, cyazofamid, diethofencarb and pyrimethanil in Asian Ginseng (Choi et al., 2007).

A wide variety of pesticides were found in a study carried out with Korean herbs (Nguyen et al., 2010). Chlorfenapyr, chlorfluazuron, λ -cyhalotrin, metalaxyl, pyridalyl, fenvalerate, tebuconazole and tebufenozide residues were found suggesting new strategies in pest control for medicinal plants which include herbicides, fungicides and insecticides. However, residues of p,p'-DDE were also detected as main contaminants in several plants (Nguyen et al., 2010). Residues exceeding MRLs were reported (Abou-Arab & Abou Donia, 2001).

Monitoring campaign in Chinese and Korean medicinal drugs showed main contamination with 5 pesticides: methoxychlor, DDT, γ -HCH (lindane), endosulfan and procymidone with residues concentration ranging from 0.044 to 0.501 mg/kg. Intensive monitoring campaigns were suggested since the detection rate of pesticides in 30 different types of drugs was determined as 3.1% from the 229 samples analyzed. On critical observation was the detected amount of procymidone (0.501 mg/kg) and methoxychlor (0.382 and 0.312 mg/kg) (Oh

2009). Other studies showed that, from the 8 detected pesticides (residues between 0.034–0.579 mg/kg), 4 of them were fungicides (captan, chinomethionate, procymidone and tolyfluanid) (Oh 2007). Moreover, major residues of chlorothalonil fungicide were also detected in Brazilian *Passiflora L.* leaves (Zuin et al., 2003).

4. Pesticide residue analysis in natural products

Scientific advances in the employment of natural products with pharmaceutical relevance have focused on the analysis of constituents with the purpose of standardizing the applicability of such commodities. Aware for recent interest in residue analysis is intended to ensure assessment for safety consumption. Main pitfall in the study of pesticide residues in such matrices is the amount and nature of different commodities of interest and pesticides applied. Residue testing in this field is a major challenge because of the wide range of target agrochemicals but also it is an unexplored field, i.e. most medicinal plants are still lacking on analytical studies. This has led to the development of fit-for-purpose methods since official methodologies are often described for not to face real life conditions (i.e. laboratory infrastructure, variability between different commodities, variability between samples from different geographical origins, residue legislation of different countries and non-harmonized application of used pesticides or commodity consumption) (Zuin et al., 2003b). Therefore, method development for contaminants is currently of paramount interest to determine the quality of these materials as demonstrated for the increasing numbers of publications in the area. Effort has been carried out for the residue analysis of pesticides in medicinal derivatives in the last ten years by modifying sample preparation, the inclusion of unstudied pesticides along with the introduction of more reliable detection and quantitation techniques. In accordance to pesticide residue research in food, the need was directed to more accurate, faster and more sensitive analytical methods. Dynamic sample treatment methodologies are mandatory. Trends were intended for avoiding tedious; time consuming and expensive extraction and clean-up protocols. Generally, classical procedures (as those described in official methodologies) drawbacks were related to the use of liquid-liquid or solid-liquid extraction which uses high amount of hazardous organic solvents. Modern techniques are focused on miniaturization as well as rapid or cost-effective features of the selected sample preparation. This has promote methodologies based on the use of new sorbents (i.e. primary-secondary amine, PSA; graphitized carbon black, GCB) or tailored sorbents (molecular imprinted polymers, nanomaterials, immunosorbents); integrative methods (defined as those which perform simultaneously several steps, i.e. extraction and clean-up); automated or even non-automated methods which can be carried out without the need of specific equipments. Remarkable attention has been conducted since the development of versatile MRMs such as the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) (Anastassiades et al., 2003a) along with its modifications; or MSPD (Matrix Solid Phase-Dispersion) (Barker 2007) which are suitable for large scale residue analysis in a wide variety of matrices.

At the same time, numerous regulations have set MRLs for pesticides and their relevant metabolites in a broad range of commodities (principally for food, feed and environmental matrices). Nowadays, chromatography coupled to MS has emerged as the default tool for residue analysis because of its improved sensitivity and selectivity provided for quantitative and qualitative analysis in comparison to conventional detection systems (i.e. ECD and FPD). The successful coupling of LC-MS and MS/MS have become the most used

configuration for large scale residue analysis according to the offered capabilities such as simultaneous identification, confirmation and quantitative determination for residue analysis. However, natural products were comparatively neglected in such a trend.

4.1 Sample preparation: Extraction and clean-up techniques

Despite the increasing progress in detection, sample preparation still remains as the bottleneck in natural products residue analysis. Current methods involve the use of one or a combination of sample preparation steps. Table 2 shows an overview of reported methodologies in the latest ten years for the sample treatment and chromatographic determination of pesticide residues in pharmaceutical raw materials and medicinal plants. A valuable indicator of the advances in residue analysis scenario for natural products, can be found in the pesticide determination in medicinal plants reviewed by Zuin & Vilegas (2000) years ago and the current situation with the latest improvements concerning miniaturized sample preparation (Zhou et al., 2011) and hyphenated MS techniques (Wong et al., 2010).

4.1.1 Official methodologies and related techniques

Testing for pesticide residues in pharmaceutical raw materials is described in official monographs for pesticides in botanical origin commodities and lanolin (USP 2007, EP 2008). They are based in liquid phase extraction (LPE) and further size-exclusion chromatography (gel permeation chromatography, GPC) as clean-up step. Subsequent clean-up step using SPE (solid phase extraction) in alumina is used in EP prior to gas chromatography (GC) injection. By far, these procedures are rugged and slightly differ in the experimental conditions.

4.1.1.1 Solid-liquid / liquid-liquid extraction

Most sample preparation methods in phytopharmaceuticals are based on LPE procedures either liquid-liquid (L-L) or solid-liquid (S-L) methodologies. Maceration of coarsely powdered solid substances, both fresh and dry materials with acetone is currently employed for extraction of pesticide residues as described in both official documents (EP 2008, USP 2007). The obtained extract, is then purified using GPC and analyzed by GC with selective detectors. Earlier literature was based on this scheme (Lino et al., 1999, Lino et al., 1997, Zuin & Vilegas, 2000). After maceration, further L-L partitioning between an immiscible organic phase (commonly petroleum ether or hexane) was widely assayed as a variation of the official methods. Subsequent clean-up using sorbent based techniques such as column chromatography and SPE was required for GC determination. L-L partitioning between a polar phase such as methanol or acetonitrile (MeCN) and n-hexane was reported as a preliminary clean-up in the determination of variety of lipophilic pesticides from beeswax (Jiménez et al., 2005, Jiménez et al., 2004a, Jiménez et al., 2004b). Likewise, L-L was proposed as the first clean-up stage in order to remove most waxes for the residue determination of 17 OCs in raw propolis (Chen et al., 2009).

Recent literature still uses these procedures because of the offered versatility derived from independence from expensive analytical instrumentation which are limiting requirements for laboratories. Acidic digestion procedures of the obtained organic extracts employing H₂SO₄ were reported for the analysis of OCs pesticides in Ginseng root (Chan et al., 2007, Quan et al., 2004). Similarly, a selected group of OCs and OPs were determined in herbal essential oils by using this technique (Yoon et al., 1999). However this strategy is limited for

the analysis of a reduced group of non-hydrolysable compounds. Moreover, Soxhlet extraction was reported as enhanced extraction methodology for OCs determination in Ginseng root using EtAc (ethyl acetate):petroleum ether (7:3) (Chan et al., 2007) and acetone:petroleum ether (3:1) solvent mixtures (Quan et al., 2008). A selected group of carbamates (metalcarb, isoprocarb, fenobucarb, carbofuran, pirimicarb and carbaryl) were extracted with Soxhlet based extraction in CH_2Cl_2 from three different Chinese herbal medicines (Wu et al., 2005). Major pitfall of this strategy is its restriction for thermally stable compounds.

4.1.1.2 Gel permeation chromatography

GPC is a well established method for the fractionation and clean-up of non-fatty and fatty matrices in both plant and animal origin samples. It is generally recommended for purifying extracts obtained from complex samples. GPC is widely extended technique in routine laboratories for the analysis of pesticide residues after a preliminary LPE step and usually followed by GC analysis with different detectors. These conventional methodologies for pesticide residue analysis are often displayed as costly, time consuming and environmentally unfriendly because of the requirement of large amount of samples and greater volumes of hazardous solvents. The classical approach used in described official methodologies merely focus on GC based analysis with selective detection (i.e. ECD, TCD) or MS for confirmatory purposes. Although the inherent ruggedness, such methods cannot be applied to different conditions (target pesticides and different matrices) with the same analytical performance. Consequently several modifications were applied as evidenced for GPC based sample preparation of lanolin (Jones 1996, Jover & Bayona, 2002). The development of more straightforward, cost-effective and environmentally aware procedures while also providing the same analytical performance and fulfilling the requirements of regulatory issues is often suggested to substitute this kind of procedures (Pérez et al., 2010, Zuin et al., 2003a, Zuin et al., 2003b).

4.1.2 Recent advances, trends and achievements for pesticide residue analysis in natural products

Many modern multiresidue procedures employing different clean-up techniques and a variety of detection methods have been reported for the determination of pesticide residues in natural products with pharmaceutical application. Despite advances in the sensitivity of the analytical instrumentation for the end-point determination of analytes a pre-treatment is compulsory required to extract and isolate the target pesticides from the matrix, thus facilitating their determination (Gilbert-López et al., 2009). The sample treatment applied depends heavily in the complexity of the matrix. Modern sample treatment strategies for food and feed use to classify matrices depending on the water, sugar, acidic or fatty content matrices (DG SANCO 2009). Similarly, different natural product matrices can be grouped depending on its water content (low or high, i.e. dry and fresh herbs), waxy content (lanolin, beeswax and raw propolis) and polyphenolic content (propolis). This categorization is helpful because extraction strategies and involved interferences are of similar nature which is relevant for the development of the sample preparation step. Moreover, the selection of sample preparation methodology is directly related to the detection method available. The more sensitive and specific detection method is used, the less stages of sample treatment will be required (Gilbert-López et al., 2009). In general, selective capability of the detector would compromise the followed sample treatment methodology (i.e. TCD, ECD detectors in GC and diode array detection (DAD) in

LC) require exhaustive and dedicated clean-up stages. In all cases, it is often necessary further clean-up to remove non desired interferents of the matrix such as pigments (i.e. chlorophylls, polyphenols, carotenoids) and waxes for increased sensitivity and reliability of the results along with maintenance of the instrumentation.

It must be highlighted that most recent reports in such matrices focus on the sample preparation instead of the use of modern detection. The advent of advanced MS detectors equipped with high selectivity, specificity and sensitivity capabilities, was recently introduced in the field of pesticide residue analysis of pharmaceuticals raw materials. Another key issue is the nature and number of targeted analytes included in the method. There is a wide range of agrochemicals with different physicochemical properties. For this reason, large scale methods use generic or less specific sample treatment at the expense of the sensitivity and selectivity provided by the MS determination.

4.1.2.1 Solid phase extraction

Nowadays, SPE is by far the most popular technique in the extraction and clean-up of complex extracts. Distinctive purposes can be accomplished depending on the used strategy: to retain target compounds and exclude interferents from the solid-phase or either retain interferents while pesticides are selectively eluted. Several advantages of SPE over liquid partitioning procedures are highlighted in higher sample throughput and lower solvent consumption. Moreover, the formation of emulsions is avoided with concomitant increased repeatability of the sample preparation. The flexibility to work with different commercially available solid phases offer increased features in the application of difficult to handle samples with inexpensive equipment (Gilbert-López et al., 2009). The main issue in method development for SPE lies on the selection of the sorbent material and the elution protocol. As commented above widely reported is the combination of preliminary L-L partitioning clean-up prior to SPE in order to avoid saturation of the material capacity. Methods using combined clean-up steps based on GPC and SPE (Hayward & Wong, 2009, Jones 1996) or sequential SPE (Chen et al., 2009, Jiménez et al., 2004b) are often suggested for better GC maintenance and improved sensitivity. Early methods were focused on the use of silica gel, alumina and Florisil columns but currently there are a wide variety of polymeric phases, carbon based, basic and acidic sorbents or even a combination of phases for particular necessities. A validated multiresidue method was developed for the analysis of a selected group of LC and GC amenable pesticides in lemon essential oils using SPE on Florisil cartridges. The vast majority of terpenic oil is selectively removed in a rinsing step using pentane while elution of the pesticides is performed with CH_2Cl_2 (Barrek et al., 2003). Several applications were developed for the residue analysis of lipophilic insecticides and acaricides in beeswax. In this case, the preferred strategy is based on the retention of waxes in the sorbent whereas pesticides are eluted. Methodologies using Florisil (Adamczyk et al., 2007, Frison et al., 1999, Tsigouri et al., 2000, Tsigouri et al., 2004), C_{18} (Chauzat & Faucon, 2007, Jiménez et al., 2004a, Kamel & Al-Ghamdi, 2006) also combined with HLB (Jiménez et al. 2004b) were reported. Selective eluting step is carried out using non-polar mixtures (n-hexane:diethylether mixtures) to polar ones (based on MeOH and MeCN), respectively. A group of 17 OCs pesticides was determined in raw propolis after L-L extraction in n-hexane:acetone (1:1) mixture with further double column series SPE on graphitized carbon and Florisil with 6mL elution of EtAc:n-hexane (2:8) mixture and GC-ECD (Chen et al., 2009). Perez-Parada et al., (2011) proposed the use of final SiO_2 removal of polyphenolic interferents for increased maintenance of the equipment in OPs routine analysis.

Most relevant works in this matter addresses the use SPE for the clean-up of medicinal plants extracts. OCs residues were determined in three different leafy plants harvested in Brazil using a mixed cartridge containing Florisil and silica-gel and performing elution with n-hexane:CH₂Cl₂ mixture (Rodrigues et al., 2007). Combined salting-out MeCN extraction and SPE based multiresidue determination of pesticides in Ginseng root was firstly introduced for the analysis of 18 insecticides and fungicides by GC-NPD/ECD determination (Park et al., 2007). Compulsory for selective detection was the Florisil based clean-up in which the elution was performed by hexane:acetone (8:2) solvent.

Large scale methods with MS detection are currently the top choice for advanced residue surveys. Nevertheless, these multiresidue methods with increased scope of analytes need to be able to selectively eliminate most in interferences while quantities of pesticides are obtained in the final extract. Initially, 102 multiclass residue determination of medicinal plant extracts was stated using GPC clean-up with further Envicarb based SPE. Residues were determined by GC-MS after elution from the cartridge with acetone:EtAc:hexane (1:2:1) solvent (Huang et al., 2007). In addition, a 170 multiclass method containing PSA-GCB based SPE column was developed for final purification of GPC extracts. The combined capacity of GPC for co-extractives removal is complemented with this further clean-up. Quantitative elution of most pesticides was accomplished using a EtAc:toluene (3:1) mixture (Hayward & Wong, 2009).

4.1.2.2 Matrix solid-phase dispersion

Matrix solid phase dispersion (MSPD) is a procedure usually applied for sample treatment in a variety of matrices. This procedure often referred as a modified SPE, is based on the mechanical disruption of the sample in a proper sorbent material with a mortar and a pestle. Sample homogenization, extraction and clean-up can be accomplished simultaneously by using relatively small sample size, low solvent consumption and minimum amount of sorbent phase. After blending, the sorbent material is packed into a column and the analytes are eluted using a suitable eluting solvent. However, the selection of the experimental conditions is critical in the selective extraction and purification of the sample extract (Barker 2007).

Many MSPD procedures uses co-columns, which is the use of packed sorbent with complementary features of the disrupting phase at the bottom of the column in order to obtain exhaustive removal of interferences. Hence, the selection of proper dispersant phase plus elution volume is mandatory to achieve enhanced extraction of the matrix while giving purified extracts for quantitative analysis of pesticides. The use of co-columns has improved the applicability of MSPD by increasing the versatility of the purification step.

MSPD can also be used for extracting analytes from both solid and liquid samples. The potential of this strategy in tricky matrices is relatively new in the literature. A procedure for the determination of buprofezin, tetradifon, vinclozolin and bifenthrin in raw propolis was reported using MSPD over silica gel and Florisil co-column cleanup by elution with CH₂Cl₂:EtAc (9:1) mixture and GC-MS determination (Santana dos Santos et al., 2008). Analysis of propolis extracts is a challenging issue because of the high polyphenolic content of this matrix. The appropriate selection of conditions for enhanced extraction of polyphenols in propolis tinctures was recently stated by Pérez-Parada et al., (2011.) Propolis tinctures were dispersed on anhydrous Al₂(SO₄)₃ using a MSPD approach with Florisil co-column clean-up by performing elution with CH₂Cl₂:EtAc (9:1) solvent for the determination of coumaphos, ethion and chlorpyrifos.

On the other hand, various authors have used MSPD for the analysis of pesticides residues in medicinal plants. Firstly, Zuin et al., (2003b) reported the determination of 7 OCs and 4 OPs in *Passiflora L.* leaves using a MSPD on Florisil with a Na₂SO₄ co-column to remove wet by eluting with a n-hexane:EtAc (7:1) mixture and GC-ECD determination. Method performance was evaluated and compared to that described in EP. Moreover, matalaxyl, triadimefon, paclobutrazol, vinclozolin, tebuconazole and fenatimol residues were determined by GC-NPD in *Isatis indoctica* and *Paeonia lactiflora* herbs using MSPD on SiO₂ and Na₂SO₄ co-column by eluting with acetone (Tang et al., 2006). Similarly, HCH isomers were determined in *Withania somnifera* and *Ocimum sanctum* by GC-ECD using Florisil MSPD and MgSO₄-NaCl co-column by eluting with n-hexane:EtAc (7:3) mixture (Abhilash et al., 2007, Abhilash et al., 2009, Abhilash & Singh, 2008). Analytical features were in the same line to those official methodologies but with more flexibility to work. Other authors have determined acephate, chlorpropham, pyrimicarb, bifenthrin, tetradifon and phosalone residues in *Cordia salicifolia* leaves by using neutral alumina and peat as dispersant phases plus Na₂SO₄ and C₁₈ co-columns and eluting with cyclohexane:CH₂Cl₂ and GC-MS determination (de Carvalho et al., 2009a, de Carvalho et al., 2010). In addition, Qi (2010) proposed sonicated MSPD approach on Florisil sorbent and EtAc:hexane (7:3) elution to determine pentachloronitrobenzene, pentachloroaniline, methylpentachlorophenyl sulphide and procymidone in Ginseng extracts by GC-ECD. On the other hand, Pérez et al., (2010) reported the determination of a variety of OCs, OPs and pyrethroids in lanolin using MSPD on C₁₈ plus alumina co-column with elution performed by MeCN:n-hexane saturated and further GC-ECD/FPD determination. Method performance was also evaluated to that attainable in USP and EP without significant loss of reliability.

Finally, the applicability of modern MSPD sorbents was assayed for the quantitative residue determination of bifenthrin, tetradifon and phosalone in *Cordia salicifolia* leaves using the two dimensional DPA (di-2-pyr-idylamine) coordination polymer (∞ [Gd(DPA)(HDPA)]). Purified extracts were obtained after elution with acetone:petroleum ether (5:3) while residues were determined by GC-MS (de Carvalho et al., 2009b)

4.1.2.3 Ultrasonic and microwave assisted extraction

A straightforward approach on LPE based extractions is the employment of waves for rapid and enhanced extraction of analytes from solid matrices. Ultrasonic wave assisted extraction (UAE) was reported for the pesticide residue analysis in different medicinal plants materials. Determination of 18 different OPs from *Flos lonicera* herbal material was performed by using UAE extraction and further SPE and GC-FPD analysis (Xiang et al., 2006). Furthermore, UAE in acetone:petroleum ether (5:3) solvent mixture was proposed for rapid extraction of 15 fungicides from *Isatis indigotica* herb and granule formulation. Subsequent clean-up to obtain proper extracts was performed by using L-L extraction in n-hexane (Tang et al., 2005). GC-ECD residue analysis of 20 multiclass pesticides (OCs, OPs, pyrethroids and fungicides) in five different traditional Chinese medicines using UAE in acetone:CH₂Cl₂ (2:1) mixture with subsequent SiO₂ column chromatography clean-up was recently reported (Qian et al. 2010). Most relevant improvement of this strategy was recently reported by Wang et al. (2011) for large scale determination of 195 multiclass pesticides in different traditional Chinese herbs using UAE in acetone with further GPC clean-up and GC-MS determination.

Microwave assisted extraction (MAE) was also employed for extracting pesticides in medicinal plants. Water was used as extracting solvent for MAE of 7 OCs in Chinese herbs

as reported Ho & Hsieh, (2001) with further SPME (solid phase microextraction) and GC-ECD determination. Moreover, a rapid strategy was proposed employing MAE in ethanol for the extraction of 16 OPs in 4 different Chinese herbs with posterior dispersive SPE based PSA clean-up and GC-FPD determination (Wan et al., 2010).

4.1.2.4 Supercritical fluid extraction

Quantitative extraction of pesticides using supercritical fluid extraction (SFE) was less reported in the last years principally due to the need of high cost instrumentation and the difficulties in method development concerning the optimization of the extraction conditions. This methodology is based on the modification of a fluid extractability at the supercritical state by performing variation cycles of temperature and pressure. Main advantages are the use of non-toxic, non-flammable and inexpensive fluids, principally CO₂ (Gilbert-López et al., 2009). Firstly, SFE with CO₂ was assayed to extract a variety of OCs, OPs and pyrethroids from raw wool wax by GC-ECD/TCD determination. Extraction and clean-up was performed simultaneously with good recoveries and repeatability (85-108 %, RSD <8 %) (Jones, 1997). First attempts in the extraction and clean up in phytopharmaceuticals by SFE, were made for OCs and OPs pesticide residues in camomile using CO₂ as supercritical fluid and GC-ECD/FPD determination and GC-MS confirmation of residues (Carisano & Rovida, 1995). Other authors reported SFE for residue extraction of a variety of OCs and OPs pesticides in *Passiflora L.* and *Angelica sinensis* leaves by GC-ECD and GC-FPD (Zhao et al., 2002, Zuin et al., 2003a)

4.1.2.5 Accelerated solvent extraction

Pressurized liquid extraction (PLE), so-called accelerated solvent extraction (ASE) is a solvent based methodology working under elevated temperatures (50–200 °C) and pressure (500–3000 psi) conditions for short time periods (5–10min). Typically, a solid sample is packed into the extraction cell and analytes are extracted from the matrix with conventional low-boiling solvents or solvent mixtures at elevated temperatures up to 200 °C and pressure (30–200 atm) to maintain the solvent in the liquid state. A very interesting feature of this technique is the possibility of full automation and many samples can be extracted sequentially with good repeatability (Gilbert-López et al., 2009). However, the extraction efficiency of ASE is dramatically influenced by the extraction pressure and temperature conditions as well as the nature of the sample and its water content. Therefore, the extraction behaviour of ASE is not plain and the optimization of operating conditions is laborious. Fifteen OPs pesticide residues were extracted from Ginkgo leaves by using ASE in MeCN. Extracts for proper GC-FPD determination were cleaned-up by SPE cartridges (Yi & Lu, 2005). Moreover, also reported was ASE for routine extraction of 74 multiclass pesticides in six traditional Chinese herbs by LC-MS (Mao et al., 2010).

4.1.2.6 Solid phase microextraction and stir bar sorptive extraction

Solid phase microextraction (SPME) and stir bar sorptive extraction (SBSE) are solvent free methodologies applied for GC-amenable compounds in liquid samples. Interesting capabilities of these techniques derives from the integration of extraction, pre-concentration and injection of the analytes in the GC inlet by thermal desorption in one single step (Gilbert-López et al., 2009). With this aim, a suspended coated fiber either directly immersed in the liquid sample (normal SPME) or in the headspace (HS-SPME) is introduced in a vial. SPME was successfully assayed in a variety of infusions and extracts. Polydimethylsiloxane (PDMS) coated fibers were reported in the determination of a variety of herbal infusions and

formulations (Hwang & Lee, 2000). HS-SPME was applied for the residue analysis of five pesticides (3OCs and 2OPs) using a PDMS-polyvinylalcohol (PVA) fiber in *Passiflora L.* infusions by GC-ECD determination (Zuin et al., 2004).

SBSE is based on the sorption of the targeted analytes onto a coated stir bar. Solid phase normally used is typically also PDMS material. The analytes are extracted by stirring a magnetic the bar immersed in the aqueous sample and recovered by desorbing the stir bar thermally in the GC inlet. SBSE has successfully been applied to the analysis of 11 different OCs and OPs residues in *Passiflora L.* herbal infusions by GC-ECD/FPD (Bicchi et al., 2003).

4.1.2.7 Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction (DLLME)

Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) has become a very popular environmentally benign sample-preparation technique, because it is fast, inexpensive, easy to operate with a high enrichment factor and consumes low volume of organic solvent. DLLME is a modified solvent extraction method in which acceptor-to-donor phase ratio is greatly reduced compared with other methods. Its combination with different analytical techniques such GC, HPLC, inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) and electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) makes DLLME an interesting tool for contaminant analysis (Rezaee et al., 2010, Fariña et al., 2007).

4.1.2.8 QuEChERS and other means

Since the introduction of the QuEChERS method for fruits and vegetables (Anastassiades et al., 2003a) it has been widely expanded to other matrices principally due to the versatility of a miniaturized solvent based extraction and easy applicability for most laboratories. This fit-for-purpose procedure start with a liquid partitioning or salting-out of MeCN:water followed by a dispersive SPE (dSPE) clean-up step in dedicated sorbents (i.e. primary secondary amine (PSA), graphitized carbon black (GCB)) which is applied depending on the nature of the matrix and requirements for removal of interferents. Main advantages are the low solvent consumption and cost-effectiveness. Several modifications of the original method has been successfully introduced ranging from the modification of the salts, used extraction solvents and dSPE sorbents depending on the nature of the matrix and the targeted species. Few reports were recently stated for the QuEChERS method in these matrices. Firstly, a procedure for American and Asian dried Ginseng residue analysis was described (Wong et al., 2007).

Wu et al., (2011) has proposed QuEChERS sample preparation for the residue analysis of 15 OCs pesticides in American Ginseng root by GC-ECD determination. Excellent extraction rates were obtained with recoveries ranged from 81.4-95.2 % and RSD < 8 %. Major improvement was reported for the high throughput residue analysis in Ginkgo leaves of 81 multiclass pesticides in agreement to those widely accepted method performance requirements stated by DG SANCO (2009) guidelines. Of special interest was the recent proposal of Wong et al., (2010) for the residue analysis of 168 pesticides in Ginseng powder using MeCN o acetone based extraction. The inclusion of C₈ based dSPE step prior to the GCB+PSA dispersive clean-up, showed to be straightforward, relatively inexpensive and fast. Moreover, analytical features were similar to those attained in GPC based ones (Hayward & Wong, 2009). More recently, other miniaturized large scale analytical method based in the same scheme was reported by Nguyen et al., (2010) for the determination of 234 pesticides in Korean herbs, while Mullin et al., (2010) reported the determination of 121 pesticides residues in beeswax using a modified QuEChERS strategy for partitioning of the

wax material between of MeCN:H₂O. Widespread use of QuEChERS based methods for pesticide multiresidue analysis in these matrices is expected in a short term.

4.2 Separation sciences and detection techniques

4.2.1 Gas chromatography

In accordance to official methodologies, capillary GC is the most used separation technique in residue analysis of non-polar and semi-polar pesticides for this kind of matrices. Major attention has paid target determination of OCs, OPs and pyrethroids GC-amenable compounds. As discussed previously, most reports focuses on selective detection of pesticides using ECD, NPD, TCD and FPD detectors. The increased selectivity of FPD allowed direct injection of diluted citrus essential oil with proper internal standard as previously assayed for the determination of OPs residues without the use of clean-up steps (Dellacassa et al., 1999, Di Bella et al., 2004, Saitta et al., 1997). ECD is described as more sensitive than the rest of selective detectors although the lack of specificity needs to be accompanied with exhaustive clean-up steps. Evidence when performing determination of OCs in citrus essential oil by GC-ECD, was the required silica gel column chromatography for the removal of polyphenolic interferents (Di Bella et al., 2004, Saitta et al., 2000).

Most recent application of ECD still relies on the sensitive detection of OCs. ECD was recently described for the successful determination of variety of OCs, and halogenated OPs, pyrethroids or fungicides using different clean-up steps in several matrices.

Using hydrolysis and derivatization with heptafluorobutyric anhydride (HFBA), total amitraz residues were determined in beeswax with LODs < 0.08 mg/kg by GC-ECD (Jiménez et al., 2004a).

On the other hand, SPE is by far the most reported clean-up strategy prior to GC-ECD analysis. Fluvalinate residues were determined in beeswax by ECD after Florisil SPE (Tsigouri et al., 2000). Regarding medicinal plants, GC-ECD determination was widely used for the determination of HCH isomers with LODs at the ppb level (Abhilash et al., 2007, Abhilash et al., 2009, Abhilash & Singh, 2008). Twenty multiclass pesticides were also determined in variety of medicinal plants using this detection technique (Qian et al., 2010). Pentachloronitrobenzene, pentachloroaniline, methylpentachlorophenyl sulphide and procymidone residues were determined in Ginseng extracts by μ ECD with LODs at sub ppb level. Also QuEChERS sample treatment with GC-ECD analysis was used for the determination of 15 OCs in Ginseng (Wu et al., 2011).

Adequate selectivity attained with FPD operated in the phosphorous mode is often referred for proper determination of OPs pesticides. Most relevant report was described by Wong et al., (2007) for the determination of 108 OPs in Ginseng root; similar quantitative performance plus lower LODs for troublesome compounds than when applying GC-MS determination were obtained. Advances in carbamate determination was stated for metalcarb, isoporocarb, fenobucarb, carbofuran, pirimicarb and carbaryl analysis in traditional Chinese herbs by GC-NPD obtaining LOQs \leq 0.05 mg/kg (Wu et al., 2005). Moreover, NPD was described for the multiclass determination of metalaxyl, triadimefon, paclobutrazol, vinclozolin, tebuconazole and fenatimol (Tang et al., 2006).

Dual determination of residues using ECD/FPD was applied to medicinal plants (Tang et al., 2005, Zuin et al., 2003a), lanolin (Pérez et al., 2010) and propolis tinctures (Pérez-Parada et al., 2011) whereas ECD/NPD was also reported for Ginseng root (Park et al., 2007) and beeswax (Kamel & Al-Ghamdi, 2006).

The use of sample preparation should be considered together with the accessible detection technique. Generally, the most sensitive and selective detection is used; the more generic sample preparation would be required. However the sample features are of major importance independently of the determination technique as exposed for highly polyphenolic content matrices. As an example, exhaustive clean-up using SPE series was mandatory for the determination of OCs pesticides in raw propolis by GC-ECD (Chen et al., 2009). Selective features of ECD for the determination of OCs are not efficiently replaced when using other MS based detectors; therefore it is widely being used in laboratories dealing with the determination of OCs in Ginseng root as reported for proficiency testing results in Asia Pacific region (Chan et al., 2010).

In spite of the increased sensitivity of ECD for the determination of organohalogen pesticides, or increased selectivity of FPD and NPD, the use of MS is being compulsory introduced in order to obtain reliable identification and confirmation of residues. Commonly used in routine analysis, is to combine selective detection with MS confirmation. In this sense, our group has used combined ECD and FPD for the determination of OCs, OPs and pyrethroids in lanolin whereas confirmation of residues was carried out by GC-MS (Pérez et al. 2010). After selective detection, confirmation of residues by GC-MS was also described in citrus essential oils (Saitta et al., 2000), medicinal plants (Quan et al., 2004) and beeswax (Kamel & Al-Ghamdi, 2006).

Concerning GC-MS, fingerprinting features of EI (electron impact) mass spectra coupled to commercially available mass spectral libraries is widely used for identification purposes of small organic molecules. Nevertheless, this approach is insufficient when assessing residues due to the loss of ion specificity from the co-eluted matrix. The approach of enhanced selectivity of the selected ion monitoring (SIM) mode of single quadrupole (Q-MS) mass spectrometer results in improved sensitivity and is widely used in the determination of residues as seen in Table 2. In the same line, EI has been used as ionization technique in almost all of the studies described in these matrices although few reports based on chemical ionization (CI) were reported. Increased selectivity and enhanced detectability is achieved when using negative chemical ionization (NCI) for electron-capturing compounds (mainly organohalogens) because the co-eluted matrix does not efficiently ionize. Consequently, few ions with high abundance are usually observed in the relevant mass spectrum resulting in improved sensitivity. NCI was recently used for the analysis of 56 multiclass pesticides (Tagami et al., 2008) as well as in 10 pyrethroids residues (Tagami et al., 2006) and 10 OCs (Guo et al., 2010) in herbal medicines. The advent of MS has opened new perspectives in order to increase the scope of targeted analytes and reliability of the findings. EI-GC-(Q)MS working in the SIM mode was employed in the determination of 12 GC-amenable pesticide residues in lemon essential oil (Barrek et al. 2003).

Regarding bee's byproducts, Jiménez et al. (2005) and Santana dos Santos et al. (2008) have determined by GC-MS pesticide residues in beeswax and raw propolis, respectively. Significant attention in large scale methods using GC-(SIM)MS was recently described for the target trace analysis of 54 (Miao et al., 2010), 81 (Zhou et al., 2011), 102 (Huang et al., 2007), 108 (Wong et al., 2007), 168 (Wong et al., 2010), 170 (Hayward & Wong, 2009), 195 (Wang et al., 2011) and 234 (Nguyen et al., 2010) pesticides in plant matrices with medicinal use.

Less described in the literature is the use of advanced GC-MS techniques although some improvements were made in the last years. Major advantages of modern MS configurations, both full scan MS or MS/MS over conventional MS, are the increased specificity and

sensitivity to quantify residues principally when dealing with concentrations approaching the detection limit. Furthermore, performance in terms of selectivity with confirmation capability is improved remarkably when MS/MS is used. Multiple reaction monitoring mode of triple quadrupole (QqQ) MS/MS is currently the more appropriate determination technique for target analysis since it achieves lower LODs but also offers high dynamic ranges (almost four orders of magnitude). Selected qualifiers and quantifiers transitions ions are focused on quantitative and qualitative purposes respectively. Firstly, GC-(QqQ)MS/MS was employed for the determination of 18 pesticides (acaricides, insecticides and fungicides) in beeswax (Chauzat & Faucon, 2007). Other authors, have recently introduced comparative studies of multiresidue determination performance by GC-MS working in SIM mode and GC-(QqQ)MS/MS in Ginseng powders (Wong et al., 2010). Improved reliability in confirmation and sensitivity was stated which even allowed dilution of the extracts for better maintenance of the instrument but also decreasing the matrix effect and improving accuracy of results. On the other hand, pentachloronitrobenzene and its metabolites (pentachloroaniline and pentachloroanisole) were determined by GC-quadrupole-ion trap (QIT)MS/MS configuration (Li et al., 2009).

Target analysis is frequently referred to nominal Q-MS and QqQMS/MS (less often to ion traps) in which the need to select ions (SIM) or transitions limits the number of compounds that can be analyzed. Time-of-flight (TOF) analyzers have overcome these limitations thanks to the ability of accurate mass measurements of the ions by offering resolution powers at full width at half maximum (FWHM) in the 10,000-20,000 range. These instruments are typically mentioned as high resolution mass spectrometers (HRMS) which have recently found application in this topic. Mass accuracy with mass deviation errors < 5 ppm, permits the elucidation of the elemental composition of the ions by the coupling to an adequate software tool. Identification and confirmation capability of the compounds via parent and fragment ions recognition is highly improved. A comparative study was carried out using two different GC-MS instruments such as classical Q-MS operated in the SIM mode and TOF-MS for the analysis of 170 organohalogen and OPs pesticides (Hayward & Wong, 2009). In this case, although no significant differences were found in quantitative results, identification of incurred troublesome pesticides was only unambiguous when using accurate mass measurements provided by TOF-MS.

Compounds	Matrix	Sample treatment and clean-up step	Determination	Recovery rates (%) (RSD %)	Analytical features	Reference
9 OPa, 10 OCs, 4 Pys	Lanolin	MSPD on C ₁₈ plus neutral alumina co-column. Elution MeCN saturated in n-hexane	GC-ECD/FPD GC-MS confirmation	83-118 % (<20 %)	LOQs OPs ≤ 0.070 mg kg ⁻¹ LOQs OCs & Py ≤ 0.087 mg kg ⁻¹	(Pérez et al., 2010)
Simazine and cypermethrin	Orange essential oil	Extraction in methanolic phosphate buffer for simazine. Cypermethrin was extracted in hexane-acetonitrile partitioning followed by silica SPE	ELISA	-	LOQs simazine ≤ 0.04 mg kg ⁻¹ LOQs cypermethrin ≤ 0.5 mg kg ⁻¹	(Nichkova et al., 2009)

Compounds	Matrix	Sample treatment and clean-up step	Determination	Recovery rates (%) (RSD %)	Analytical features	Reference
22 Multi-class (12 GC amenable; 10 LC amenable) pesticides	Lemon essential oil	SPE (C ₁₈ and Florisil). Pentane rinsing, elution with CH ₂ Cl ₂	LC-(Q)MS and GC-MS	57-114.6 % (<6.6 %)	LC amenable LODs ≤ 0.06 mg L ⁻¹ GC amenable LODs ≤ 0.4 mg L ⁻¹	(Barrek et al., 2003)
70 Multi-class pesticides	Lavandin essential oil	10 fold dilution and direct injection	LC-(QTRAP)MS/MS	-	LOQs: ≤1 µg/L for 9 pesticides, ≤5 µg/L for 44, ≤10 µg/L for 9, and ≤20 µg/L for 5	(Fillâtre et al., 2011)
Synthetic acaricides (fluvalinate, coumaphos, bromopropylate and its metabolite 4,4'-dibromobenzophenone)	Beeswax	Dissolution in isoctane. SPE (Florisil) clean-up with elution by MeOH	LC-DAD	70-110 % (<15 %)	LODs ≤ 0.2 mg kg ⁻¹	(Adamczyk et al., 2007)
16 insecticides and acaricides 2 fungicides	Beeswax	SPE C ₁₈ , elution with MeCN	GC-(QqQ)MS/MS	N.D.	LODs ≤ 0.05 mg kg ⁻¹	(Chauzat & Faucon, 2007)
Total amitraz (amitraz and its degradation products)	Beeswax	Dissolution in MeOH and n-hexane L-L extraction. Hydrolysis to 2,4-dimethylaniline (DMA) and derivatization with Heptafluorobutyric anhydride (HFBA)	GC-ECD	~80 % (<15 %)	LOD = 0.08 mg kg ⁻¹	(Jiménez et al., 2004a)
Chlorfenvinphos, fluvalinate, amitraz, bromopropylate, acrinathrin, flumethrin, coumaphos, chlorpyrifos, chlordimeform, endosulfan and malathion	Beeswax	Dissolution in n-hexane plus heating: freezing cycles. Further SPE (Florisil) clean-up with elution by acetone:hexane (1:1)	GC-µECD/NPD/MS	86-108%	LODs ≤ 0.3 mg kg ⁻¹ (GC-µECD/NPD) and ≤ 0.085 (GC-MS)	(Serra-Bonvehí & Orantes-Bermejo, 2010)
Total amitraz	Beeswax	Hydrolysis in acidic buffer and HS-SPME	GC-ITD	-	LODs = 0.01 mg kg ⁻¹	(Leníček et al., 2006)
Up to 15 lipophilic pesticides (including acaricides, PCBs, OPs, Pys and OCs)	Beeswax	A) Dissolution in n-hexane and L-L extraction with MeCN. B) Subsequent SPE in HLB cartridges and additional SPE of C ₁₈ .	A) GC-MS (SIM) B) GC-ECD	A) 93-108 % (<16 %) B) 94-107 % (<20 %)	A) LOQs ≤ 0.065 mg kg ⁻¹ B) LOQs ≤ 0.12 mg kg ⁻¹	(Jiménez et al., 2005, Jiménez et al., 2004b)

Compounds	Matrix	Sample treatment and clean-up step	Determination	Recovery rates (%) (RSD %)	Analytical features	Reference
121 pesticides	Beeswax	Modified QuEChERS: addition of MeCN:H ₂ O, NaAc, MgSO ₄ . Organic phase is clean-up by dSPE using PSA, C18 and MgSO ₄ . For GC further SPE in GCB+PSA was used eluting with acetone:toluene (7:3).	LC- (Q)MS/MS and GC-MS (SIM)	-	LOD ≤ 0.03 mg kg ⁻¹	(Mullin et al., 2010)
Flumethrin, tau-fluvalinate, coumaphos, and amitraz	Beeswax	Dissolution in MeCN and SPE of C ₁₈ .	GC-NPD/ECD GC-MS	90-102 %	B) LODs ≤ 0.05 mg kg ⁻¹	(Kamel & Al-Ghamdi, 2006)
Fluvalinate	Beeswax	Dissolution in n-hexane, and the solutions is sonicated and transferred to Extrelut columns. The fluvalinate was extracted with MeCN, and a portion of the extract was cleaned-up on a Florisil cartridge. Elution with diethyl ether-n-hexane (1:1)	GC-ECD	77.4 to 87.3 (<8.31 %)	LOQs = 0.1 mg kg ⁻¹	(Tsigouri et al., 2000)
Coumaphos, ethion and chlorpyrifos	Propolis tinctures	MSPD on Al ₂ (SO ₄) ₃ and Florisil column. Elution with CH ₂ Cl ₂ :EtAc (9:1). Subsequent silica gel clean-up eluting with CH ₂ Cl ₂	GC-FPD and GC-MS confirmation	87.4 -115.0 % (<12.8 %)	LODs ≤ 0.0143 mg kg ⁻¹	(Pérez-Parada et al., 2011)
17 OCs	Raw propolis	L-L extraction n-hexane-acetone (1:1) plus tandem SPE graphitized carbon and Florisil cartridge clean-up with elution by EtAc and hexane (2:8)	GC-ECD	62.6-109.6 (<9.4 %)	LODs ≤ 0.038 mg kg ⁻¹	(Chen et al., 2009)
Buprofezin, tetradifon, vinclozolin, and bifenthrin	Raw propolis	MSPD on SiO ₂ and Florisil clean-up. Elution with CH ₂ Cl ₂ :EtAc (9:1).	GC-MS (SIM)	67-175 % (<12.1 %)	LOQs ≤ 0.25 mg kg ⁻¹	(Santana dos Santos et al., 2008)
7 OCs	Radix et Rhizoma Rhei	SiO ₂ hollow fiber sorptive microextraction	GC-MS (SIM)	63-115 % - (<10 %)	-	(Li et al., 2010)
16 OPs	4 Chinese herbs	MAE in ethanol and dSPE in PSA	GC-FPD	73.8-123% (<15.2 %)	LODs ≤ 0.09 mg kg ⁻¹	(Wan et al., 2010)

Compounds	Matrix	Sample treatment and clean-up step	Determination	Recovery rates (%) (RSD (%))	Analytical features	Reference
20 OCs	Herba epimedii	Maceration in EtAc and further SPE in Florisil+Na ₂ SO ₄ clean-up. Elution with diethylether: hexane (15:85).	GC-MS (SIM)	75.4-90.7 % (<18.3%)	LODs ≤ 0.055 mg kg ⁻¹	(Guo et al., 2010)
7 OCs 4 OPs	Passiflora L. leaves	MSPD on Florisil. Co-column of neutral alumina and Na ₂ SO ₄ . Elution with n-hexane:EtAc (7:1)	GC-ECD	75.2-110.6 (<17.4 %)	LODs ≤ 0.038 mg kg ⁻¹	(Zuin et al., 2003b)
A) 7 OCs & 6 OPs B) 12 OCs	A) Passiflora L. leaves B) Angelica sinensis leaves	SFE using CO ₂ as mobile phase	A) GC-ECD/FPD B) GC-ECD	A) 69.8-107.1 (<14.7 %) B) 83.3-98.1 (<6.1 %)	A) LODs ≤ 0.014 mg kg ⁻¹ B) LODs ≤ 0.010 mg kg ⁻¹	A) (Zuin et al., 2003a) B) (Zhao et al., 2002)
3 OCs 2 OPs	Passiflora L. infusions	Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) with polydimethylsiloxane-poly(vinyl alcohol) (PDMS/PVA) fiber	GC-ECD	78.7-91.5 (<14.2 %)	LODs ≤ 0.015 mg L ⁻¹	(Zuin et al., 2004)
102 multi-class pesticides	Traditional Chinese herbal infusions	L-L extraction acetone:EtAc:hexane (1:2:1) plus GPC and SPE (Envicarb) elution with the same solvent mixture	GC-MS (SIM)	59.7-120.9 (<20.8 %)	LOQs ≤ 2.5 mg L ⁻¹	(Huang et al., 2007)
15 OPs	Ginkgo leaves	ASE (accelerated solvent extraction) in MeCN and further SPE (Envicarb) eluting with MeCN:toluene (3:1)	GC-FPD	95.2 % (<4.6 %)	LODs ≤ 0.044 mg kg ⁻¹	(Yi & Lu, 2005)
18 OPs	Flos lonicerae	Ultrasonic wave assistant extraction (UAE) in acetone and further SPE clean-up.	GC-FPD	83.6-88.7 % (<6.0 %)	LODs ≤ 0.018 mg kg ⁻¹	(Xiang et al., 2006)
6 Carbamates (metolcarb, isoprocarb, fenobucarb, carbofuran, pirimicarb, and carbaryl)	Traditional Chinese herbs	Soxhlet extraction with CH ₂ Cl ₂	GC-NPD (SIM)	80.8-154.6	LOQs ≤ 0.05 mg kg ⁻¹	(Wu et al., 2005)
Multi-class 195 pesticides	Traditional Chinese herbs	UAE in acetone and further GPC clean-up.	GC-MS (SIM)	Normally 80-120 %	LOQs ≤ 0.05 mg kg ⁻¹	(Wang et al., 2011)

Compounds	Matrix	Sample treatment and clean-up step	Determination	Recovery rates (%) (RSD (%))	Analytical features	Reference
Acephate, chlorpropham, pirimicarb, bifenthrin, tetradifon, and phosalone	Cordia salicifolia	MSPD using the 2 dimensional coordination polymer (α [Gd(DPA)(HDPA)])	GC-MS (SIM)	20-107.7 % (< 29.1 %)	LOQs \leq 0.25 mg kg ⁻¹	(de Carvalho et al., 2009b)
Multi-class 15 pesticides (OCs, OPs, Pys and fungicides)	Isatis indigotica raw material, granule formulation and infusion	Twice UAE extraction in acetone: petroleum ether (5:3) mixture and L-L clean-up with hexane for raw material or granule. Infusion L-L extraction with petroleum ether.	GC-ECD/FPD	70.2-119.5% for raw material, 73.2-105.1% for granule formulation, and 72.8-113.3% for infusion formulation	LODs \leq 0.035 mg kg ⁻¹	(Tang et al., 2005)
6 multi-class (metalaxyl, triadimefon, and paclobutrazol, vinclozolin, tebuconazole, fenatimol)	Isatis indigotica Fort and Paeonia lactiflora	MSPD on silica gel. Packing on a column with Na ₂ SO ₄ co-column. Elution with acetone.	GC-NPD	80.6-106.1% (< 17.7 %)	LOQs \leq 0.05 mg kg ⁻¹	(Tang et al., 2006)
A) 9 OCs B) 19 OCs	A) Plant infusions B) Chinese herbal formulations	SPME with PDMS coated fiber	GC-MS (SIM)	A) 90-108 % (< 17.0 %) B) - (< 31.0 %)	A) LOQs \leq 0.012 mg kg ⁻¹ B) LODs \leq 0.001 mg kg ⁻¹	A) (Rodrigues et al., 2005) B) (Hwang & Lee, 2000)
7 OCs	Atractylo dis rhizoma, Glycyrrhizae radix and poria	MAE in water and SPME with PDMS coated fiber	GC-ECD	-	LODs \leq 0.00013 mg kg ⁻¹	(Ho & Hsieh, 2001)
11 pesticides (hexachlorobenzene, lindane, chlorothalonil, parathion methyl, parathion ethyl, fenitrothion, malathion, dieldrin, α - and β -endosulfan, and tetradifon)	Passiflora L.	SBSE with PDMS coated fiber	GC-ECD/FPD	30-90 %	B) LOQs \leq 0.117 mg kg ⁻¹	Bicchi et al., 2003)
9 OCs	Mikania laevigata, Maytenus ilicifolia and Cordia	Solid-liquid extraction (SLE) with n-hexane: CH ₂ Cl ₂ (4:1), followed by clean-up in solid phase mixed	GC-MS (SIM)	70-124 % (< 7.3%)	LOQs \leq 0.03 mg kg ⁻¹	(Rodrigues et al., 2007)

Compounds	Matrix	Sample treatment and clean-up step	Determination	Recovery rates (%) (RSD (%))	Analytical features	Reference
	verbenacea	cartridge (Florisil and silica-gel) eluting with n-hexane- CH ₂ Cl ₂ (3:2)				
A) 9 OCs B) 18 multi-class (fungicides, insecticides)	Ginseng root	A) Soxhlet extraction with acetone: petroleum ether (3:1) and cleanup with 5 mL H ₂ SO ₄ . The supernatant is separated. B) Chopped into small portions, add MeCN and NaCl and centrifugation for L-L extraction. The organic phase is separated, concentrated and directly injected for GC-NPD. Further clean-up is carried out using SPE (Florisil) elution with hexane:acetone (8:2) for GC-ECD.	A)GC-ECD and GC-MS confirmation B) GC-ECD/NPD	A) - B) 72.3-117.2 % (< 7.3%)	A) - B) LOQs ≤ 0.2 mg kg ⁻¹	A) (Quan et al., 2004) B) (Park et al., 2007)
5 OCs (hexachlorobenzene and hexachlorocyclohexanes (α-, β-, δ-, and γ-isomers))	Ginseng root	Soxhlet with EtAc: petroleum ether (7:3) mixture. H ₂ SO ₄ cc. digestion and the supernatant analyzed	Isotope dilution GC-MS (SIM)	-	Repeatability ≤ 1.4 % Expanded relative uncertainty ranging from 4.0-6.5 %	(Chan et al., 2007)
170 multi-class (OPs and OCs)	Ginseng root	S-L extraction with EtAc and combined clean-up by GPC plus (PSA)/graphitized carbon black (GCB) SPE column eluting with EtAc:toluene (3:1).	A) GC-(Q)MS (SIM) B) GC-TOF MS (HRMS)	A) Mean = 83; 79; 75 for 25, 100, and 500 µg kg ⁻¹ levels (< 5.0%) B) Mean = 93; 85; 81 for 25, 100, and 500 µg kg ⁻¹ levels (< 8.0%)	A) Geometric mean LOQ = 0.004 mg kg ⁻¹ B) Geometric mean LOQ = 0.003 mg kg ⁻¹	(Hayward & Wong, 2009)
168 multi-class (OPs and OCs) pesticides	Ginseng root	S-L extraction with A) MeCN or B) acetone/cyclohexane /EtAc (2:1:1) mixture. Further SPE (C8 + GCB/PSA) sorbents clean up and toluene elution.	1) GC-MS (SIM) 2) GC-MS/MS (QqQ)	86-88 % (< 14.0%)	Geometric mean LOQ A1)=0.053; A2)=0.006; B1)=0.048; B2)=0.007 mg kg ⁻¹	(Wong et al., 2010)

Compounds	Matrix	Sample treatment and clean-up step	Determination	Recovery rates (%) (RSD %)	Analytical features	Reference
20 multi-class (OCs, OPs, Pys and fungicides)	Radix paeoniae, Isatis indigotica Fort, Plicodon grandiflorum, Cotex mouta and Poria cocos	Powdered and UAE in acetone/CH ₂ Cl ₂ (2:1) with subsequent clen-up on silica gel column chromatography eluting with ether:acetone (40:60).	GC-ECD	72.5-113.5 % (< 14.0 %)	LOQs ≤ 0.082 mg kg ⁻¹	(Qian et al., 2010)
Pentachloronitrobenzene, pentachloroaniline, methylpentachlorophenylsulphide and procymidone	Ginseng extract	Sonicated MSPD. Dispersion on Florisil and extracted twice in EtAc-hexane (70:30)	GC-μECD	83.5-97.4 % (< 10.0 %)	LODs ≤ 0.004 mg kg ⁻¹	(Qi, 2010)
54 multi-class pesticides	6 traditional Chinese herbs	Extraction with MeCN and clean-up on SPE (C18/Envicarb/PSA).	GC-MS (SIM)	70-120 % (< 20.0 %)	LODs ≤ 0.01 mg kg ⁻¹	(Miao et al., 2010)
74 multi-class pesticides	6 traditional Chinese herbs	ASE and combined purification on GPC and SPE.	LC-(QqQ)MS/MS	70-110 % (< 15.0 %)	LODs ≤ 0.01 mg kg ⁻¹	(Mao et al., 2010)
Acephate, chlorpropham, pyrimicarb, bifenthrin, tetradifon, and phosalone	Cordia salicifolia leaves	MSPD on A) neutral alumina or B) peat, using Na ₂ SO ₄ and C ₁₈ co-column and eluting with cyclohexane:CH ₂ Cl ₂ (3:1).	GC-MS (SIM)	67.7-129.9 % (< 15.0 %) 64-118.0% (< 26.4 %)	LOQs ≤ 0.25 mg kg ⁻¹	A) (de Carvalho et al., 2009a) B) (de Carvalho et al., 2010)
4OCs: hexachlorocyclohexanes (α-, β-, δ-, and γ-isomers))	Withania somnifera and Ocimum sanctum	MSPD with Florisil and blended with MgSO ₄ and NaCl and eluting with n-hexane:EtAc mixture (70:30).	GC-ECD	93-103 % (< 10%)	LODs ≤ 0.005 mg kg ⁻¹	(Abhilash et al., 2007, Abhilash et al., 2009)
Aldrin, endrin, dieldrin and HCH isomers	Withania somnifera, Ocimum sanctum L. and Achyranthes aspera.	Modified EP method: maceration in acetone: CH ₂ Cl ₂ (3:1). Further MSPD (Florisil) eluting with the same solvent mixture.	GC-ECD	88-98 % (< 9.85%)	LODs ≤ 0.001 mg kg ⁻¹	(Abhilash & Singh, 2008)
108 OPs pesticides	Ginseng root	QuEChERS based MeCN:water extraction. dSPE with PSA:GCB	1) GC-MS (SIM) 2) GC-FPD	> 90 % for most compounds (< 37 %)	1) LODs ≤ 0.50 mg kg ⁻¹ 2) LODs ≤ 0.05 mg kg ⁻¹	(Wong et al., 2007)

Compounds	Matrix	Sample treatment and clean-up step	Determination	Recovery rates (%) (RSD %)	Analytical features	Reference
15 OCs	American Ginseng	QuEChERS based MeCN:water. dSPE with PSA:GCB	GC-ECD	81.4-95.2 (<8%)	-	(Wu et al., 2011)
234 pesticides	Korean herbs	QuEChERS based MeCN(HAc):water extraction. dSPE with PSA:GCB	GC-MS (SIM)	62-119 % (<21%)	1) LODs \leq 0.40 mg kg ⁻¹	(Nguyen et al., 2010)
81 multiclass pesticides	Ginkgo leaves	QuEChERS based MeCN:water. dSPE with PSA:GCB	GC-MS (SIM)	70-110 % for most compounds (<20%)	LOQs \leq 0.058 mg kg ⁻¹	(Zhou et al., 2011)

Table 2. Analytical features of most recent reports in pesticide residue analysis in pharmaceutical and medicinal plants.

4.2.2 Liquid chromatography

The trend, in which these matrices were not excluded, was the introduction of non-persistent and biodegradable pesticides which have lead to the introduction of more polar (and less volatile) agrochemicals. In agreement to food and environmental matrices, such compounds have prompted the use of LC-MS, which at the moment is widely accepted technique for monitoring purposes of polar and most semi-polar pesticides as well as for regulatory issues. Concerning this matter, few attempts were made in pharmaceutical matrices although major advances are expected in a short term.

LC-DAD was used in beeswax (Adamczyk et al., 2007) and medicinal plants (Choi et al., 2007, Peng et al., 2007, Tuzimski 2011) to determine pesticide residues. Main pitfall is the attained selectivity and sensitivity for proper and unambiguous trace determination.

Due to its versatility for wide variety of organic molecules, electrospray ionization (ESI) operating in positive mode is the preferred interface for most studies that uses LC-MS. In general, ESI can be applied for polar, ionized, and semi-polar analytes if adequate mobile phases are selected. Depending on the polarity, ionization process in ESI usually gives protonated or deprotonated molecules ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) although adducts can also be obtained (i.e. $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$).

Residues of methamidophos, imidacloprid, benomyl, thiophanate-methyl, bendiocarb, diflubenzuron, chlorpyrifos, flufenoxuron, carbosulfan and bifenthrin were determined in citrus essential oils by using LC-ESI(+)-(Q)MS with LODs \leq 0.05 mg/kg (Barrek et al. 2003). The authors noted high matrix effect for the analyzed extracts which cannot be overcome by simple LC-MS but also suggest the use of MS/MS experiments in further studies. Unfortunately, LC-MS/MS has not been reported until recently in the literature for the determination of pesticides residues in this topic. Nevertheless, advances in the application of LC-MS/MS for testing pesticides in pharmaceutical matrices are expected in a short term since the use of ESI sources and conventional QqQ analyzer is currently the most reported technique for target screening of pesticide residues in food and environmental samples.

Several analytical features are provided when using LC-MS/MS ranging from excellent performance for quantitative analysis when working in the selected reaction monitoring (SRM) mode; allowing the selection of two specific SRM transitions with subsequent confirmation of the analyte in the sample. A combined QqQ scanning functionality with a

sensitive linear ion trap (LIT) is offered in the QLIT (quadrupole-linear ion trap) system. Working in the LIT mode, the hybrid QLIT provides improved performance, higher versatility as well as enhanced sensitivity, both in full scan MS (EMS) and product ion (enhanced product ion; EPI) scan modes. Improvements in this hybrid system are also related to software developments as seen in the sSRM (schedule SRM mode) or the combination of SRM and EPI scans by the built-in information dependant acquisition (IDA) software tools used for confirmation purposes of the residues. Direct injection analysis of 10 fold diluted lavandin essential oil was recently reported for the determination of 70 multiclass pesticides using sSRM acquisition mode in a new generation LC-(ESI)-QLIT MS/MS instrument in both positive and negative ionization (Fillâtre et al., 2011). Obtained LODs were all below 20 µg/L. Major technological improvements in QLIT were focused on enhanced sensitivity. Nowadays the impressively low instrumental detection limits (IDLs) are offering new workflows and providing independence from time consuming sample preparation steps. Last but not least, LC-HRMS is expected to find application in large scale screening of contaminants and reliable conformation of residues using accurate mass measurements. An interesting example was stated by Schürmann and co-workers in the correct identification of false positive sebuthylazine residues in tarragon. The situation lies on the fact that nominal LC-MS/MS confirmation is accomplished by the use of 2 specific transitions plus retention time matching with standards. However, sometimes this approach is not possible to apply for troublesome analytes which even could lead to inadequate report of residues. However, it was found that false positive findings can be discarded by the use of resolving power provided by TOF-MS for the identification of the endogenous matrix compounds (Schürmann et al., 2009).

4.2.3 Matrix effect

Matrix effect is considered to be a suppression or enhancement of the analyte response due to the influence of the matrix. However, when dealing with MS determination, either in GC and LC, matrix effect is normally referred to ion suppression/enhancement. Compensation of the matrix effect is then compulsory for accurate quantitation. Several strategies were employed to reduce the matrix effect such as the use of external calibration, matrix matched calibration, isotopically labeled surrogate compounds, analyte protectants (APs) or internal standard addition. Matrix effect can be estimated by comparing the response obtained from the standard solution and that from the spiked sample extracts. Matrix effect may be partially solved before the detection technique for instance by exhaustive clean-up through the reduction of co-extractives, improved separation (comprehensive two dimensional gas chromatography (GCxGC) or ultra high pressure liquid chromatography (UPLC) by using sub 2µm particle size), sample dilution if enough sensitivity is obtained or reduction of the injected sample (Gilbert-López et al., 2009).

In GC this effect was widely investigated for food matrices principally when GC-(SIM)MS was used (Anastassiades et al. 2003b, Poole 2007). On the other hand, in LC this effect is typically faced at the expense of the sensitivity of MS/MS applying sample dilution (Gilbert-López et al. 2009). Among others, in GC, matrix-induced effect is mainly related to the silanol active sites present in the liner as well as in the chromatographic column which might interact with the analyte, resulting in analyte losses and distorted peak shapes (Anastassiades et al. 2003b). Chan and co-workers introduced the use of isotope dilution (ID) for the determination of HCB and HCH isomers by GC-MS in Ginseng root. ID-GC-MS showed to be a good quality assurance approach since inaccuracy and uncertainty were

significantly reduced in a difficult matrix (Chan et al., 2007). However, this strategy is generally expensive, time consuming for routine analysis and is intended for MS only.

The use of matrix matched calibration (MMC) or APs is being increasingly used since most reports still face determination of semi-volatile compounds by GC with different detection techniques. Moreover, note that when using selective and non specific detection such as ECD, matrix effect could involve co-eluted compounds which can increase the noise while negatively affect the peak area and reducing the quantitative performance. Jiménez et al., (2004b) reported MMC for the multiresidue analysis of pesticide residues in beeswax by GC-ECD. Moreover, Pérez et al., (2010) used MMC for the quantitative determination of pesticides in lanolin by GC-ECD/FPD when using MSPD as sample treatment. On the other hand, several authors used MMC in plant origin samples with medicinal purposes by GC-ECD (Zuin et al. 2003), GC-MS (Hayward & Wong 2009, Wong et al. 2007) and even when more sophisticated GC-(QIT)MS/MS (Li et al., 2009) and GC-(QqQ)MS/MS (Wong et al., 2010) were used. It should be highlighted that MMC is not referred in USP and EP.

Since the possibility of not getting reference matrices or representative materials to perform MMC, the use of alternatives such as APs is of great concern. Ideally, APs overcome these limitations by interacting with the active sites and conducting reliability in the response of the analyte. Dealing with real samples the compensation of the matrix effect cannot be solely related to new method developments, since it could be easily applied to official methodologies to obtain more accurate results. Recently, in accordance to food residue analysis, eight different APs were evaluated for GC-MS determination of an extensive group of 195 pesticides in medicinal plants (Wang et al., 2011). Troublesome and early eluting pesticides such as acephate and omethoate were successfully determined using d-ribonic acid- γ -lactone (2 mg/mL) whereas sorbitol showed the best compensation effect for late eluted compounds such as fenitrothion and methidation. From the results obtained, the authors concluded a mixture of d-ribonic acid- γ -lactone and d-sorbitol for the reliable determination of most pesticides by GC-MS although there is neither an ideal AP nor mixture of APs that can completely resemble these complex matrices in order to compensate the matrix-induced enhancement for such an amount of pesticides (Wang et al. 2011).

The need for sample treatment step in LC-MS determination encompasses the undesired effects of interferents on analytical performance to requested LODs for proper trace analysis of pesticides. In LC-MS instead, matrix effect is usually referred to co-elutants during the ionization process when using atmospheric pressure interfaces (such as ESI) which are prone to ion suppression and enhancement effects. The approach of MMC and sample dilution is widely assayed in LC-MS. A combined sample dilution and MMC strategy was also employed in QLIT-MS/MS determination of 70 pesticide residues in lavender essential oil. The authors reported that using this approach, weak matrix effect ($\leq 20\%$) for 70 % of the compounds was obtained (Fillâtre et al. 2011).

5. Conclusions

This chapter has outlined latest improvements concerning pesticide residues in natural products commodities employed as raw materials used in the pharmaceutical industry or for medicinal purposes. Occurrence of pesticide residues is demonstrated to be moving from classical compounds, in which official methodologies still focus their interest, to more specific compounds and crop treatments. As demonstrated, environmental pollution plays an important role in the occurrence of unexpected pesticides, principally for roots materials

or lipophilic matrices such as beeswax. Current occurrence of previously unstudied pesticides in these matrices corresponds to trends in the use of different pesticide classes and biological target actions (fungicides were also integrated to the sanitary packages) to more environmentally-friendly, more polar, less toxic but also troublesome to analyze. Notably, monitoring trends and exposure monitoring for risk assessment are revealing lack of legislation as well as dedicated studies in these matrices.

Scientists and regulators should recognize the current pesticide reality about residues occurrence in matrices with dermal contact or direct ingestion applications.

Last but not least, pest control is nowadays a matter of critical concern for bee's by-products which shows the higher contamination levels with pesticides from the studied matrices.

Advances in pesticide residue analysis were stated and discussed. Nowadays, it is being carried out an update in techniques for residue analysis as experimented for foodstuffs and environmental samples years ago. Both newer sample preparation and determination techniques based on chromatography coupled to mass spectrometric detection, are offering improved knowledge and reliability for residue analysis. However, since the magnitude of this problem, several strategies should be necessary to employ in order to cover more target analytes and matrices of interest.

Perspectives in this field are expected to be focused on the implementation of miniaturized, high throughput sample preparation methodologies and widespread use of advanced mass spectrometric techniques. This will help for the comprehensive assessment on pesticide occurrence in matrices particularly not yet well studied and difficult to handle. An update on residue methodologies is a necessary step in further Pharmacopeias along with urgent specific regulations for pesticide residues which are currently being found. Such a lack of information will encourage investigation in this topic in the years ahead.

6. Acknowledgments

Authors acknowledges to Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA Química, Uruguay), Facultad de Química (Universidad de la República, Uruguay) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC, Uruguay) for economical support.

7. References

- Abhilash P., Jamil S., Singh N. (2007): Matrix solid-phase dispersion extraction versus solid-phase extraction in the analysis of combined residues of hexachlorocyclohexane isomers in plant matrices. *Journal of Chromatography A* 1176, 1-2, 43-47.
- Abhilash P. C., Singh N. (2008): Multiple residue extraction for organochlorine pesticides in medicinal plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81, 6, 604-607.
- Abhilash P. C., Singh V., Singh N. (2009): Simplified determination of combined residues of lindane and other HCH isomers in vegetables, fruits, wheat, pulses and medicinal plants by matrix solid-phase dispersion (MSPD) followed by GC-ECD. *Food Chemistry* 113, 1, 267-271.
- Abou-Arab A. A. K., Abou Donia M. A. (2001): Pesticide residues in some Egyptian spices and medicinal plants as affected by processing. *Food Chemistry* 72, 4, 439-445.
- Adamczyk S., Lázaro R., Pérez-Arquillué C., Herrera A. (2007): Determination of synthetic acaricides residues in beeswax by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector. *Analytica Chimica Acta* 581, 1, 95-101

- Anastassiades M., Lehotay S. J., Štajnbaher D., Schenck F. J. (2003a): Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86, 2, 412-431.
- Anastassiades M., Maštovská K., Lehotay S. J. (2003b): Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A* 1015, 1-2, 163-184.
- Balandrin M. F., Klocke J. A., Wurtele E. S., Bollinger Wm H. (1985): Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228, 4704, 1154-1160.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar M. (2008): Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446-475.
- Barker S. A. (2007): Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70, 2, 151-162.
- Barrek S., Paise O., Grenier-Loustalot M. F. (2003): Analysis of pesticide residues in essential oils of citrus fruit by GC-MS and HPLC-MS after solid-phase extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376, 2, 157-161.
- Bicchi C., Cordero C., Iori C., Rubiolo P., Sandra P., Yariwake J. H., Zuin V. G. (2003): SBSE-GC-ECD/FPD in the analysis of pesticide residues in *Passiflora alata* Dryander herbal teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1, 27-33.
- Bogdanov S. (2003): Current status of analytical methods for the detection of residues in bees products. *Apiacta* 38 190-197.
- Bogdanov S., Ryll G., Roth H. (2003): Pesticides residues in honey and beeswax produced in Switzerland. *Apidologie* 34 484-485.
- Bogdanov S. (2006): Contaminants of bee products. *Apidologie* 37, 1, 1-18
- Carisano A., Rovida C. (1995): SFE-facilitated detection of pesticide residues in camomile. *LC-GC Int.* 8 334-337.
- Chan K. M., Cheung S. T. C., Wong Y. L., Cheng A. L. S., Mok C. S., Wong Y. C., Wong W. W., Tholen D. W. (2010): Proficiency tests for contaminants in food and herbal medicine in the Asia Pacific region. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 29, 6, 562-576.
- Chan S., Kong M. F., Wong Y. C., Wong S. K., Sin D. W. M. (2007): Application of isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in analysis of organochlorine pesticide residues in ginseng root. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9, 3339-3345.
- Chauzat M. P., Faucon J. P. (2007): Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Management Science* 63, 11, 1100-1106
- Chen F., Chen L., Wang Q., Zhou J., Xue X., Zhao J. (2009): Determination of organochlorine pesticides in propolis by gas chromatography-electron capture detection using double column series solid-phase extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 3, 1073-1079.
- Choi J. H., Abd El-Aty A. M., Park Y. S., Cho S. K., Shim J. H. (2007): The assessment of carbendazim, cyazofamid, diethofencarb and pyrimethanil residue levels in *P. ginseng* (C. A. Meyer) by HPLC. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 28, 3, 369-372.
- Dellacassa E., Lorenzo D., Di Bella G., Dugo G. (1999): Pesticide residues in Uruguayan lemon oils. *Journal of Essential Oil Research* 11, 4, 465-469.
- DG-SANCO. (2009): European Commission Document N° SANCO/10684/2009.
- de Carvalho P. H. V., De Menezes Prata V., Alves P. B., Navickiene S. (2009a): Determination of six pesticides in the medicinal herb *Cordia salicifolia* by matrix solid-phase

- dispersion and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 92, 4, 1184-1189.
- de Carvalho P. H. V., Santos Barreto A., Rodrigues M. O., de Menezes Prata V., Barreto Alves P., de Mesquita M. E., Alves Júnior S., Navickiene S. (2009b): Two-dimensional coordination polymer matrix for solid-phase extraction of pesticide residues from plant *Cordia salicifolia*. *Journal of Separation Science* 32, 12, 2132-2138.
- de Carvalho P. H. V., De Jesus A. M. D., Prata V. M., Bezerra D. S. S., Romão L. P. C., Navickiene S. (2010): Tropical peat as a versatile material for solid-phase extraction of pesticides from medicinal plant *Cordia salicifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21, 4, 659-664
- de la Rosa M. C., Medina M. R., Vivar V. (1995): Microbiological quality of pharmaceutical raw materials. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 70, 3, 227-232.
- Di Bella G., Saitta M., La Pera L., Alfa M., Dugo G. (2004): Pesticide and plasticizer residues in bergamot essential oils from Calabria (Italy). *Chemosphere* 56, 8, 777-782.
- Di Bella G., Serrao L., Salvo F., Lo Turco V., Croce M., Dugo G. (2006): Pesticide and plasticizer residues in biological citrus essential oils from 2003-2004. *Flavour and Fragrance Journal* 21, 3, 497-501.
- Di Bella G., Lo Turco V., Rando R., Arena G., Pollicino D., Luppino R. R., Dugo G. (2010): Pesticide and plasticizer residues in citrus essential oils from different countries. *Natural Product Communications* 5, 8, 1325-1328.
- Dugo G., Di Bella G. (2002): Contaminants in citrus essential oils *Citrus: The Genus Citrus*. Taylor & Francis, London, pp. 518-531.
- EP (2008): European Pharmacopeia 6th Ed. In: Europe Co (Hrsg.), Strasbourg, France, pp. 3222-3225.
- Farina L., Boido E., Carrau F., Dellacassa E. (2007): Determination of volatile phenols in red wines by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 1157, 1-2, 46-50.
- Fillâtre Y., Rondeau D., Bonnet B., Daguin A., Jadas-Hécart A., Communal P. Y. (2011): Multiresidue analysis of multiclass pesticides in lavandin essential oil by LC/MS/MS using the scheduled selected reaction monitoring mode. *Analytical Chemistry* 83, 1, 109-117.
- Frison S., Bretkreitz W., Currie R., Nelson D., Sporns P. (1999): The analysis of fluvalinate in beeswax using GC/MS. *Food Research International* 32, 1, 35-41.
- Gilbert-López B., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A. (2009): Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta* 79, 2, 109-128.
- Guo Q., Deng M., Yu B., Tan L. (2010): Analysis of the residues of 20 organochlorine pesticides in *Herba epimedii*, a chinese herbal medicine, by solid-phase extraction with gas chromatography/negative chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 93, 1, 295-305.
- Hayward D. G., Wong J. W. (2009): Organohalogen and organophosphorous pesticide method for Ginseng root – a comparison of gas chromatography-single quadrupole mass spectrometry with high resolution time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 81, 14, 5716-5723.
- Huang Z., Li Y., Chen B., Yao S. (2007): Simultaneous determination of 102 pesticide residues in Chinese teas by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 853, 1-2, 154-162.

- Ho W.-H., Hsieh S.-J. (2001): Solid phase microextraction associated with microwave assisted extraction of organochlorine pesticides in medicinal plants. *Analytica Chimica Acta* 428, 1, 111-120.
- Hwang B. H., Lee M. R. (2000): Solid-phase microextraction for organochlorine pesticide residues analysis in Chinese herbal formulations. *Journal of Chromatography A* 898, 2, 245-256.
- Jacobs M. N., Johnston P. A., Wyatt C. L., Santillo D., French M. C. (1997): Organochlorine pesticide and PCB residues in pharmaceutical, industrial and food grade fish oils. *International Journal of Environment and Pollution* 8, 1-2, 74-93.
- Jeon H.-R., Abd El-Aty M., Cho S.-K., Choi J.-H., Kim K.-Y., Park R.-D., Shim J.-H. (2007): Multiresidue analysis of four pesticide residues in water dropwort (*Oenanthe javanica*) via pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction, and liquid-liquid extraction and gas chromatographic determination. *Journal of Separation Science* 30, 12, 1953-1963.
- Jiménez J. J., Bernal J. L., del Nozal M. J., Alonso C. (2004a): Extraction and clean-up methods for the determination of amitraz total residues in beeswax by gas chromatography with electron capture detection. *Analytica Chimica Acta* 524, 1-2, 271-278.
- Jiménez J. J., Bernal J. L., Nozal M. J. D., Alonso C. (2004b): Liquid-liquid extraction followed by solid-phase extraction for the determination of lipophilic pesticides in beeswax by gas chromatography- electron-capture detection and matrix-matched calibration. *Journal of Chromatography A* 1048, 1, 89-97.
- Jiménez J. J., Bernal J. L., Del Nozal M. J., Martín M. T. (2005): Residues of organic contaminants in beeswax. *European Journal of Lipid Science and Technology* 107, 12, 896-902
- Jones F. W. (1996): Multiresidue analysis of pesticides in wool wax and lanolin using gel permeation and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 10, 3197-3201.
- Jones F. W. (1997): supercritical fluid extraction as a cleanup technique for gas chromatographic analysis of pesticides in wool wax. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 7, 2569-2572.
- Jover E., Bayona J.M. (2002): Trace level determination of organochlorine, organophosphorus and pyrethroid pesticides in lanolin using gel permeation chromatography followed by dual gas chromatography and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometric confirmation. *Journal of Chromatography A* 950, 1-2, 213-220.
- Kamel A., Al-Ghamdi A. (2006): Determination of acaricide residues in Saudi Arabian honey and beeswax using solid phase extraction and gas chromatography. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 41, 2, 159-165.
- Leníček J., Sekyra M., Novotná A. R., Vášová E., Titěra D., Veselý V. (2006): Solid phase microextraction and gas chromatography with ion trap detector (GC-ITD) analysis of amitraz residues in beeswax after hydrolysis to 2,4-dimethylaniline. *Analytica Chimica Acta* 571, 1, 40-44.
- Leung K. S.-Y., Chan K., Chan C.-L., Lu G.-H. (2005): Systematic evaluation of organochlorine pesticide residues in Chinese materia medica. *Phytotherapy Research* 19, 6, 514-518.
- Li J., Zhang H.-F., Shi Y.-P. (2010): Application of SiO₂ hollow fibers for sorptive microextraction and gas chromatography-mass spectrometry Determination of

- organochlorine pesticides in herbal matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398, 3, 1501-1508.
- Li J., Dong F., Liu X., Zheng Y., Yao J., Zhang C. (2009): determination of pentachloronitrobenzene and its metabolites in Ginseng by matrix solid-phase dispersion and GC-MS-MS. *Chromatographia* 69, 9, 1113-1117.
- Lino C. M., Da Silveira M. I. N. (1997): Extraction and clean-up methods for the determination of organochlorine pesticide residues in medicinal plants. *Journal of Chromatography A* 769, 2, 275-283.
- Lino C. M., Guarda L. M. C., Silveira M. I. N. (1999): Determination of organochlorine pesticide residues in medicinal plants sold Coimbra, Portugal. *Journal of AOAC International* 82, 5, 12.
- Marcucci M.C. (1995): Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity *Apidologie* 26, 83-99.
- Mao X. H., Jia Z. W., Chen K., Wang K., Ji S. (2010): Simultaneous determination of 74 pesticides in traditional Chinese herbal medicines by LC-MS/MS. *Chinese Pharmaceutical Journal* 45, 1, 64-70.
- Miao S., Lu J. W., Jia Z. W., Mao X. H., Li W. T., Wang K., Ji S. (2010): Simultaneous determination of 53 pesticide residues in traditional Chinese herbal medicines by GC/MS. *Chinese Pharmaceutical Journal* 45, 16, 1263-1270.
- Mishra C., Sharma S., Kakkar P. (2007): A Study to evaluate heavy metals and organochlorine pesticide residue in *Zingiber officinale* Rosc. collected from different ecological zones of india. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79, 1, 95-98.
- Mullin C. A., Frazier M., Frazier J. L., Ashcraft S., Simonds R., vanEngelsdorp D., Pettis J. S. (2010): High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE* 5, 3, e9754.
- Nguyen T. D., Lee K. J., Lee M. H., Lee G. H. (2010): A multiresidue method for the determination 234 pesticides in Korean herbs using gas chromatography mass spectrometry. *Microchemical Journal* 95, 1, 43-49.
- Nichkova M., Fu X., Yang Z., Zhong P., Sanborn J. R., Chang D., Gee S. J., Hammock B. D. (2009): immunochemical screening of pesticides (simazine and cypermethrin) in orange oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 13, 5673-5679.
- Niell S., Pareja L. a., González G., González J. n., Vryzas Z., Cesio M. V. n., Papadopoulou-Mourkidou E., Heinzen H. (2011): Simple determination of 40 organophosphate pesticides in raw wool using microwave-assisted extraction and GC-FPD analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* dx.doi.org/10.1021/jf103983m.
- Oh C.-H. (2007): Multi residual pesticide monitoring in commercial herbal crude drug materials in South Korea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78, 5, 314-318.
- Oh C.-H. (2009): monitoring of residual pesticides in herbal drug materials of Korea and China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82, 5, 639-643.
- Park Y.-S., El-Aty A. M. A., Choi J.-H., Cho S.-K., Shin D.-H., Shim J.-H. (2007): Pesticide multiresidue analysis in Panax ginseng (C. A. Meyer) by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen-phosphorus detection. *Biomedical Chromatography* 21, 1, 29-39.
- Peng F., Tian J. G., Jin H. Y., Du Q. P. (2007): Determination of residual carbendazim in Chinese traditional medicine of ginseng by HPLC. *Chinese Pharmaceutical Journal* 42, 6, 475-477.

- Pérez-Parada A., Colazzo M., Besil N., Geis-Asteggiane L., Rey F., Horacio H. (2011): Determination of coumaphos, chlorpyrifos and ethion in propolis tinctures by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to flame photometric and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* (in press).
- Pérez A., González G., González J., Heinzen H. (2010): Multiresidue determination of pesticides in lanolin using matrix solid-phase dispersion. *Journal of AOAC International* 93, 2, 712-719
- Poole C. F. (2007): Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1158, 1-2, 241-250.
- Qi X. (2010): Development of a matrix solid-phase dispersion-sonication extraction method for the determination of fungicides residues in ginseng extract. *Food Chemistry* 121, 3, 758-762.
- Qian G., Rimao H., Feng T., Xiangwei W., Xuede L., Haiqun C., Yanhong S., Jun T. (2010): A multiresidue method for 20 pesticides in *Radix paeoniae alba* of Chinese herb by gas chromatography with electron-capture detection. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84, 6, 779-783.
- Quan L., Li S., Tian S., Xu H., Lin A., Gu L. (2004): determination of organochlorine pesticides residue in ginseng root by orthogonal array design Soxhlet extraction and gas chromatography. *Chromatographia* 59, 1-2, 89-93.
- Rezaee M., Yamini Y., Faraji M. (2010): Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A* 1217, 16, 2342-2357.
- Rodrigues M. V. N., Reyes F. G. R., Rehder V. L. G., Rath S. (2005): An SPME-GC-MS method for determination of organochlorine pesticide residues in medicinal plant infusions. *Chromatographia* 61, 5, 291-297.
- Rodrigues M. V. N., Reyes F. G. R., Magalhães P. M., Rath S. (2007): GC-MS determination of organochlorine pesticides in medicinal plants harvested in Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18, 1, 135-142.
- Saitta M., Di Bella G., Salvo F., Lo Curto S., Dugo G. (2000): Organochlorine pesticide residues in Italian citrus essential oils, 1991-1996. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3, 797-801.
- Santana dos Santos T. F., Aquino A., Silveira Dórea H., Sandro N. (2008): MSPD procedure for determining buprofezin, tetradifon, vinclozolin, and bifenthrin residues in propolis by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390, 5, 1425-1430.
- Schürmann A., Dvorak V., Crüzer C., Butcher P., Kaufmann A. (2009): False-positive liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmation of sebutylazine residues using the identification points system according to EU directive 2002/657/EC due to a biogenic insecticide in tarragon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23, 8, 1196-1200.
- Serra-Bonvehí J., Orantes-Bermejo J. (2010): Acaricides and their residues in Spanish commercial beeswax. *Pest Management Science* 66, 11, 1230-1235.
- Srivastava L. P., Kumar N., Gupta K. P., Raizada R. B. (2006): Status of HCH residues in indian medicinal plant materials. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76, 5, 782-790.
- Sun N., Hao L., Xue J., Jin H., Tian J., Lin R. (2007): Multi-residue analysis of 18 organochlorine pesticides in 10 traditional Chinese medicines by gas chromatography (GC). *Journal of Health Science* 53, 4, 464-469.

- Tagami T., Kajimura K., Satsuki Y., Nakamura A., Okihashi M., Takatori S., Kakimoto K., Obana H., Kitagawa M. (2008): Rapid analysis of 56 pesticide residues in natural medicines by GC/MS with negative chemical ionization. *Journal of Natural Medicines* 62, 1, 126-129.
- Tang F., Yue Y., Hua R., Ge S., Tang J. (2005): Development of methods for determination of the residues of 15 pesticides in medicinal herbs *Isatis indigotica* Fort. by capillary gas chromatography with electron capture or flame photometric detection. *Journal of AOAC International* 88, 3, 720-728.
- Tang F., Yue Y., Hua R., Cao H. (2006): Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination of pesticide residues in medicinal herbs by gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector. *Journal of AOAC International* 89, 2, 498-502.
- Tsigouri A., Menkissoglu-Spiroudi U., Thrasyvoulou A. T., Diamantidis G. C. (2000): Determination of fluvalinate residues in beeswax by gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of AOAC International* 83, 5, 1225-1228.
- Tsigouri A. D., Menkissoglu-Spiroudi U., Thrasyvoulou A., Diamantidis G. (2004): Fluvalinate residues in honey and beeswax after different colony treatments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72, 5, 975-982.
- Tuzimski T. (2011): Determination of analytes in medical herbs extracts by SPE coupled with two-dimensional planar chromatography in combination with diode array scanning densitometry and HPLC-diode array detector. *Journal of Separation Science* 34, 1, 27-36.
- Üner M., Gönüllü Ü., Yener G., Altınkurt T. (2005). A new approach for preparing a controlled release ketoprofen tablets by using beeswax. *Il Farmaco* 60, 1, 27-31.
- USP (2007): United States Pharmacopeia USP30-NF 25. Rockville, MD, pp. 2724-2726.
- USP (2010): United States Pharmacopeia USP33-NF 28. Rockville, MD.
- Wallner K. (1999): Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* 30, 2-3, 235-248.
- Wan Y.-Q., Mao X.-J., Yan A.-P., Shen M.-Y., Wu Y.-M. (2010): Simultaneous determination of organophosphorus pesticides in Chinese herbal medicines by microwave-assisted extraction coupled with dispersive-solid phase extraction and gas chromatography. *Biomedical Chromatography* 24, 9, 961-968.
- Wang Y., Jin H.-Y., Ma S.-C., Lu J., Lin R.-C. (2011): Determination of 195 pesticide residues in Chinese herbs by gas chromatography-mass spectrometry using analyte protectants. *Journal of Chromatography A* 1218, 2, 334-342.
- Wichtl, M. and Bisset, N.G. (1994): Herbal drugs and phytopharmaceuticals. Medpharm, Stuttgart.
- Wong J. W., Zhang K., Tech K., Hayward D. G., Krynitsky A. J., Cassias I., Schenck F. J., Banerjee K., Dasgupta S., Brown D. (2010): Multiresidue pesticide analysis of ginseng powders using acetonitrile- or acetone-based extraction, solid-phase extraction cleanup, and gas chromatography-mass spectrometry/selective ion monitoring (GC-MS/SIM) or -tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 10, 5884-5896.
- Wong J. W., Hennessy M. K., Hayward D. G., Krynitsky A. J., Cassias I., Schenck F. J. (2007): analysis of organophosphorus pesticides in dried ground ginseng root by capillary gas chromatography-mass spectrometry and -flame photometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4, 1117-1128.
- Wu J., Li L., Zou Y. (2005): Determination of carbamate insecticides in Chinese medicinal herbs by gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector. *Journal of AOAC International* 88, 4, 1261-1264.

- Wu J., Liu Y., Zhao R., Xu R. (2011): Fast pesticide multiresidue Analysis in American ginseng (*Panax quinquefolium* L.) by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Natural Medicines* 65, 2, 406-409.
- Xiang Z. X., Zhao W. J., Guo Q. S. (2006): Determination of 18 organophosphate pesticide residues in Flos Lonicerae. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 31, 16, 1321-1323.
- Yi X., Lu Y. (2005): Multiresidue determination of organophosphorus pesticides in ginkgo leaves by accelerated solvent extraction and gas chromatography with flame photometric detection. *Journal of AOAC International* 88, 3, 729-735.
- Yoon H. R., Cho S. Y., Kim J. M., Yoon I. B., Park M. K., Park J. H. (1999): Analysis of multi-component pesticide residues in herbal medicines by GC-MS with electron impact ionization and with positive- and negative-ion chemical ionization. *Chromatographia* 49, 9-10, 525-534.
- Zhao C., Hao G., Li H., Chen Y. (2002): Supercritical fluid extraction for the separation of organochlorine pesticides residue in *Angelica sinensis*. *Biomedical Chromatography* 16, 7, 441-445.
- Zhou L., Duan C., Wang M., Wang J., Zhang R. (2011): Analysis of residues of 81 pesticides on Ginkgo leaves using QhEChERS sample preparation and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 94, 1, 313-321.
- Zuin V. G., Lopes A. L., Yariwake J. H., Augusto F. (2004): Application of a novel sol-gel polydimethylsiloxane-poly(vinyl alcohol) solid-phase microextraction fiber for gas chromatographic determination of pesticide residues in herbal infusions. *Journal of Chromatography A* 1056, 1-2, 21-26.
- Zuin V. G., Yariwake J. H., Bicchi C. (2003a): Fast supercritical fluid extraction and high-resolution gas chromatography with electron-capture and flame photometric detection for multiresidue screening of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazil's medicinal plants. *Journal of Chromatography A* 985, 1-2, 159-166.
- Zuin V. G., Yariwake J. H., Lanças F. M. (2003b): Analysis of pesticide residues in Brazilian medicinal plants: matrix solid phase dispersion versus conventional (European Pharmacopoeia) methods. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14, 2, 304-309.
- Zuin V. G., Vilegas J. H. Y. (2000): Pesticide residues in medicinal plants and phytomedicines. *Phytotherapy Research* 14, 2, 73-88.

Estudios de determinación de compuestos orgánicos a niveles traza en matrices complejas

Anexo 2

Multiresidue Determination of Pesticides in Lanolin Using Matrix Solid-Phase Dispersion

ANDRÉS PÉREZ, GABRIEL GONZÁLEZ, JOAQUÍN GONZÁLEZ, and HORACIO HEINZEN

Farmacognosia y Productos Naturales, Facultad de Química, UdelaR Avda, General Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay

An efficient, fast, and accurate matrix solid-phase dispersion sample cleanup procedure was developed specifically for the determination of pesticide residues in lanolin. The scope of the method for organophosphorus, organochlorine, and pyrethroid insecticides is the same as that of official methods from various pharmacopeias. After lanolin dispersion on C₁₈ bonded silica, pesticides are eluted with acetonitrile saturated with *n*-hexane. Recoveries ranged from 83 to 118% with RSD values of <20% for most pesticides listed, in compliance with the requirements of European and U.S. pharmacopeias.

Lanolin is a complex mixture of high molecular-weight esters of fatty acids with fatty alcohols, sterols, and triterpene alcohols; diesters, small amounts of long-chain alcohols and diols, long-chain fatty acids, and hydroxyacids, secreted by the sebaceous glands of sheep. It is obtained after the wool grease is removed by washing, the aqueous phase is centrifuged, and the fatty layer is subjected to a final purification step (1–3).

Lanolin is widely used in baby care, and in cosmetic, and pharmaceutical formulations because of its high compatibility with human skin oils, its unique surfactants, and its water-absorbing and emulsifying properties.

To prevent fleece damage by sheep ectoparasites and to protect wool during storage, organochlorine (OC), organophosphorus (OP), and pyrethroid insecticides are extensively used in sheep sanitary treatments. Because of the lipophilic nature of these pesticides, they accumulate in wool wax (4–6). Today ectoparasite control is achieved exclusively through the application of OP and pyrethroid pesticides and chitin synthesis inhibitors such as diflubenzuron and triflumuron (6).

Pesticide residues in lanolin are strictly controlled; the *United States Pharmacopeia* (USP; 7) and the *European Pharmacopoeia* (EP; 8) specify individual and maximum residue limits. These residues have been determined by using various extraction and cleanup methods, such as solvent/solvent partition of lanolin between *n*-hexane and

acetonitrile with further cleanup by Florisil column chromatography (9), sweep codistillation (6, 10), and supercritical fluid extraction (11). Also deserving of special mention are the dispersion of lanolin on diatomaceous earth and elution of the adsorbate with acetonitrile, followed by two successive cleanup steps on C₁₈ and Florisil columns (12), as well as dispersion on celite with further silica gel SPE column cleanup (13), which was optimized to determine OC pesticides in lanolin. However, the cleanup method most commonly used to determine pesticide residues in lanolin is gel permeation chromatography (GPC; 4–6, 11, 14–16), with subsequent alumina SPE column treatment and GC analysis, which is also the official method of the USP and EP (7, 8). Although the methodology is rugged and robust, the GPC procedures involve several steps for sample preparation; they require large amounts of solvent and are time-consuming. Recently, a new GPC procedure for greasy wool was proposed (17). Because the new trends in pesticide residue analysis have focused on the miniaturization of analytical methodology, they have led to the development of faster, cost-effective, and environmentally friendly procedures, which are in great demand for routine use in laboratories (18).

Matrix solid-phase dispersion (MSPD) achieves sample homogenization, extraction, and cleanup simultaneously by using a relatively small sample size, low solvent consumption, and a minimum amount of solid phase (18–20). Recently, MSPD has been shown to be applicable to pesticide residue analysis of highly fatty matrixes (21–25), i.e., virgin olive oil (21, 22).

The work described in this paper was focused on the development and evaluation of a simple and rapid multiresidue method based on MSPD as the extraction and cleanup technique, followed by capillary GC with selective detection, i.e., electron capture detection (ECD) and flame photometric detection (FPD) for the determination of pesticide residues in lanolin and GC/MS confirmation of identity. The scope and performance of this method are similar to those of the official methods described in the USP and EP (7, 8).

Experimental

Materials

(a) *Solvents*.—HPLC grade *n*-hexane was purchased from Baker (Deventer, The Netherlands); acetonitrile and dichloromethane were obtained from Pharmco (Brookfield,

Table 1. Retention time (RT), relative retention time (RRT),^a and LOD and LOQ values obtained in the GC/FPD determination of the pesticides used in this study

No.	Pesticide	RT, min	RRT	LOD, g/g	LOQ, g/g
1	Diazinon	8.02	0.759	0.005	0.015
2	Propetamphos	8.21	0.777	0.009	0.030
3	Dichlofenthion	8.94	0.846	0.010	0.033
4	Fenchlorphos	9.49	0.898	0.012	0.039
5	Pirimiphos-methyl	9.69	0.917	0.005	0.015
6	Chlorpyrifos	10.11	0.956	0.007	0.025
7	Bromophos-methyl	10.57	1.000	—	—
8	Chlorfenvinphos	11.19	1.059	0.020	0.070
9	Ethion	13.15	1.244	0.004	0.015

^a Relative to bromophos-methyl (IS).

CT). Acetonitrile saturated with *n*-hexane was prepared by adding 100 mL *n*-hexane to 500 mL acetonitrile (21).

(b) *Chromatography materials*.—The solid phase used for dispersion was bulk C₁₈ octadecylsilyl-derivatized silica, average pore size 60 Å, particle size 40–63 μm, from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). Neutral alumina bulk powder, 0.0063–0.200 mm, 70–230 mesh, was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

(c) *Pesticides and pesticide stock solutions*.—Pesticide analytical standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). A mixture of OP pesticides and a combined mixture of OC pesticides, and synthetic pyrethroids were prepared in *n*-hexane at 100 g/mL. Appropriate levels of working standard solutions were prepared by diluting the mixed standard solutions.

(d) *Internal standard (IS) solution*.—Bromophos-methyl was chosen as the IS because of its unlikely presence in real lanolin samples and its good response with both flame photometric and electron capture detectors. Bromophos-methyl, 99.5% purity, was purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH. A stock solution at 2000 g/mL and a working standard solution at 1 g/mL were prepared in *n*-hexane and stored at –18 C until analysis. A 1.00 mL aliquot of the IS working standard solution was added to the final extracts as a QC standard before they were directly injected for analysis.

(e) *Matrix-matched standards*.—Matrix-matched standards were prepared in blank extracts by adding 1.00 mL mixed pesticide standard solution at the concentration levels assayed, including the IS at 1 g/mL, to blank sample extracts.

(f) *Lanolin sample*.—The lanolin sample was supplied by Lanco S.A. (Montevideo, Uruguay) as refined pesticide-free grade lanolin. To verify the absence of any pesticides, the lanolin sample was analyzed according to current USP requirements (7).

Table 2. Retention times (RT), relative retention times (RRT)^a, and LOD and LOQ values obtained in the GC/ECD analysis of the pesticides used in this study

No.	Pesticide	RT, min	RRT	LOD, g/g	LOQ, g/g
10	-HCH	12.43	0.659	0.003	0.010
11	-HCH (lindane)	13.66	0.725	0.003	0.010
12	-HCH	14.73	0.781	0.003	0.012
13	Aldrin	17.82	0.945	0.002	0.007
14	Bromophos-methyl	18.85	1.000	—	—
15	-Endosulfan	21.86	1.160	0.010	0.033
16	Dieldrin	23.97	1.272	0.003	0.010
17	<i>p,p</i> -DDE	24.80	1.316	0.005	0.017
18	-Endosulfan	26.89	1.427	0.020	0.067
19	<i>p,p</i> -DDD	29.27	1.553	0.005	0.017
20	<i>p,p</i> -DDT	33.53	1.779	0.011	0.037
21	-Cyhalothrin I	38.74	2.055	0.015	0.050
22	-Cyhalothrin II	39.06	2.072	—	—
23	Cypermethrin I	41.21	2.186	0.025	0.083
24	Cypermethrin II	41.24	2.188	—	—
25	Cypermethrin III (a)	41.39	2.196	—	—
26	Cypermethrin IV	41.47	2.200	—	—
27	Fenvalerate I	42.35	2.247	0.022	0.074
28	Fenvalerate II	42.61	2.260	—	—
29	Deltamethrin I	42.99	2.281	0.020	0.067
30	Deltamethrin II	43.24	2.294	—	—

^a Relative to bromophos-methyl (IS).

Apparatus and Operating Conditions

(a) *GC/FPD and GC/ECD systems and conditions*.—OP pesticides were determined by FPD in the phosphorus mode; OC and pyrethroid pesticides were determined by ECD. Pesticide residue analysis was conducted with a double-channel Shimadzu GC-17A gas chromatograph equipped with a programmed temperature vaporization injector, a Shimadzu AOC-20i autosampler, and Shimadzu electron capture and flame photometric detectors. The injector temperature program was as follows: from 60 to 270 C at 500 C/min, and then held at 270 C for 25 min. Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.7 mL/min. Injection volume was 1.0 μL. OP pesticides were determined with a MEGA 68 (cyano-phenyl-methylpolysiloxane) fused silica capillary column (25 m × 0.32 mm id, 0.25 μm film thickness). The temperature of the column oven was programmed from an initial value of 150 C (2 min hold) to 270 C at 7.5 C/min (12 min hold). OC and pyrethroid pesticides were determined with an SE 54 (5% diphenyl, 95% dimethylsiloxane) column (25 m × 0.32 mm id, 0.25 μm film thickness). The temperature of the column oven was

Table 3. Features of the GC/MS/SIM program for the selected pesticides used in this study

Elution order	Pesticide	Molecular weight	Selected ions monitored, <i>m/z</i>	Start/end times of scanning, min
1	-HCH	288	121,181,219	
2	-HCH (lindane)	288	146,181,219,253	15.0–18.5
3	Propetamphos	281	138,194,222,236	
4	Diazinon	304	179,276,304	18.5–20.0
5	-HCH	288	181,219,207,254	
6	Dichlofenthion	314	223,251,279	20.0–21.5
7	Fenclorophos	320	125,285,289	
8	Pirimiphos-methyl	305	276,290,305	21.5–24.0
9	Aldrin	362	91,101,263,293	
10	Chlorpyrifos	349	125,197,286,314	
11	Bromophos-methyl (IS)	364	125,329,331	24.0–29.0
12	Chlorfenvinphos	358	267,295,323	
13	-Endosulfan	404	195,207,241,267	29.0–32.0
14	Dieldrin	378	79,263,279,345	
15	<i>p,p</i> -DDE	316	246,318,176	32.0–35.0
16	-Endosulfan	404	195, 207,241,269	
17	<i>p,p</i> -DDD	313	165,200,235,237	
18	Ethion	384	125,153,231,384	
19	<i>p,p</i> -DDT	352	75,165,199,235	35.0–39.0
20	-Cyhalothrin	449	161,181,197,208	
21	Cypermethrin	415	127,163,181,209	39.0–44.0
22	Fenvalerate	419	125,167,181,225	
23	Deltamethrin	503	172,181,208,253	44.0–48.0

programmed from 100 C (2 min hold) to 180 C at 5.5 C/min (15 min hold), and then to 295 C at 10 C/min (8 min hold). Tables 1 and 2 give the retention times, relative retention times (calculated with respect to bromophos-methyl), and the LODs and LOQs of the pesticides determined under the selected conditions.

(b) GC/MS system and conditions.—GC/MS analyses were performed using a Thermo Scientific Focus gas chromatograph coupled with a DSQ mass spectrometer supported by reference libraries, equipped with an HB-5 column (30 m 0.25 mm 0.25 μm film thickness). Electron impact mass spectra were obtained at 70 eV and monitored from 50 to 400 *m/z* for sample matrix full scan analysis. The MS system was programmed in the selected-ion monitoring (SIM) mode for confirmation as indicated in Table 3. The working parameters were injector temperature, 250 C; interface temperature, 250 C; carrier gas, He at 1.7 mL/min; oven conditions were 100 C initial (2 min), increased to 180 C at 5.5 C/min (15 min hold), and increased to 295 C at 10 C/min (8 min hold). The injection mode was splitless, and the injection volume was 1.0 μL. The identification of the compounds was confirmed by injection of pure standards and

comparison of their retention indexes and relevant mass spectra.

Sample Preparation, Extraction, and Cleanup

(a) Spiking procedure.—A 1.0 g portion of melted lanolin was weighed accurately into a 10 mL volumetric flask. The sample was spiked by adding 1.00 mL of an appropriate mixed standard solution and adjusting the volume to 10.00 mL with *n*-hexane–dichloromethane (1 + 1). Fortified samples for the recovery study were based on the requirements of the EP and USP for lanolin (levels of 0.05, 0.1, and 1 g/g).

(b) MSPD-based extraction and cleanup procedure.—A 1 g portion of RP-C₁₈ was weighed and blended in a mortar with 1.00 mL fortified lanolin solution. The mixture was placed into a 5 mL glass syringe (50 mm 5 mm id; Super Eva Glass, Milan, Italy) packed with 0.5 g water-deactivated neutral alumina at the bottom. The material was plug-pressed, and the pesticides were eluted with 8 mL acetonitrile saturated with *n*-hexane at a flow rate of 1–2 drops/s under gravity. The eluate was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream. In each case, 1.00 mL IS working standard solution in *n*-hexane was added, and the final extracts were transferred to

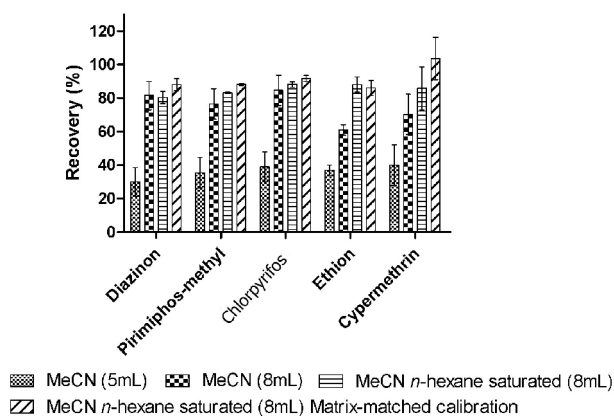


Figure 1. Recoveries obtained after elution of pesticides with various solvents.

autosampler vials for GC analysis. Matrix-matched calibration was also used to evaluate the matrix effect in the recovery study.

(c) *Selection of solvent and elution volume.*—Acetonitrile (5 and 8 mL) and acetonitrile saturated with *n*-hexane (8 mL) were used to test the recoveries of the pesticides from lanolin, which was spiked at 1 g/g, as described above, with a mixture of diazinon, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, ethion, and cypermethrin. The eluates were analyzed and the recoveries were calculated. These four pesticides were selected because they are commonly used in sheep treatments and often found in commercial lanolin samples.

Results and Discussion

Evaluation of Extraction and Cleanup Method

Sample cleanup is the most important step in analysis involving very complex fatty matrixes like lanolin (14). The MSPD procedure involves forces applied to the sample by mechanical blending. In this methodology, selection of the experimental conditions is critical in the selective extraction or cleanup of the sample. Lanolin is a waxy apolar matrix, having low water content, 0.25% (7), with a relatively high affinity for widely used OP, OC, and synthetic pyrethroid insecticides and low solubility in polar solvents like acetonitrile (26).

Dispersant Phase and Solvent Selection

Polar stationary phases such as Florisil, silica gel, and neutral alumina were unsuitable as dispersant phases, because the fractionation between the pesticides and wax could not be performed properly. The elution step using nonpolar solvents such as *n*-hexane, dichloromethane, and ethyl acetate, either alone or in different blends, always yielded high matrix coextraction. The extract thus obtained was inappropriate for residue analysis using either selective or universal detection like mass selective detection (MSD). On the other hand, RP-C₁₈ has been successfully used for the cleanup of fatty samples in pesticide residue analysis because of its high affinity for neutral lipidic compounds (12, 25, 27–30). The more polar pesticides can be separated easily from the matrix. In our case, C₁₈ proved to be a suitable dispersant phase for lanolin. Cosorbent material was selected as described by Jones (5). Neutral alumina provides a further reduction of

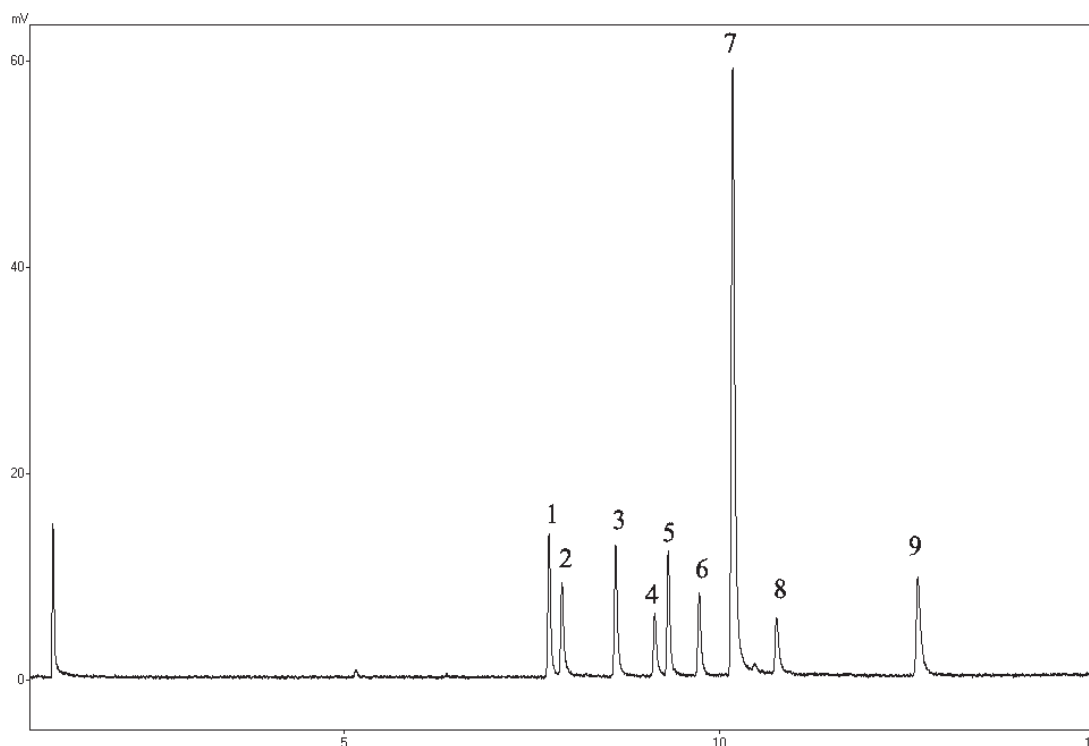


Figure 2. FPD chromatogram showing the separations of nine pesticides.

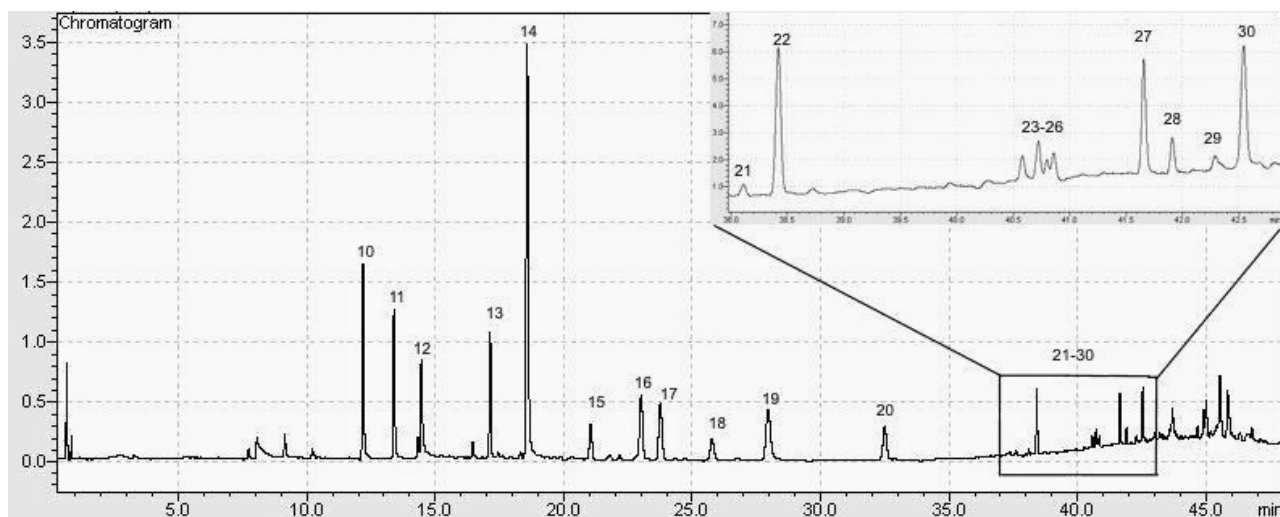


Figure 3. ECD chromatogram showing the coelution of high-molecular-weight components such as sterol esters.

background noise because it effectively removes lipid coextractives and destroys sterol ester peroxides produced during auto-oxidation of the sample (5, 6).

Adjustment of MSPD Conditions

The best ratio of sample/dispersant phase was 0.1 g sample equivalent/g C_{18} . Higher lanolin/ C_{18} ratios resulted in mixtures that were difficult to handle and probably saturated. During blending, solvent evaporation occurs; the material is then packed dry, plug-pressed, and directly used for elution.

Elution with 5 and 8 mL acetonitrile gave low recoveries, although little if any lipidic material was eluted. The elution power of the solvent was increased in order to optimize pesticide recoveries. Acetonitrile saturated with *n*-hexane gave good-to-excellent recoveries ranging from 83 to 101% with RSD values of <10.7% for those selected pesticides (Figure 1).

Method Validation

The MSPD extracts were analyzed by GC/ECD and GC/FPD. All pesticides included in this study showed linear relationships ($r^2 > 0.99$; data not shown) with bromophos-methyl in the concentration range assayed (0.05–1 g/g) and at higher levels (tested dynamic range, from the respective LOQ to 5 g/g for all pesticides). Response factors were calculated using matrix-matched calibrations and *n*-hexane as the solvent. LOD values were determined using the graphic approach at an S/N of 3 for each pesticide in spiked lanolin samples, whereas the LOQ values were obtained at an S/N of 10 under the conditions described above.

The LOD values achieved with the proposed method are lower than those previously obtained by other researchers (5, 6, 14), and they comply with the requirements of the official methods (7, 8). FPD chromatograms are cleaner because of greater detector selectivity (Figure 2), but peaks of some matrix components appear in the chromatograms when ECD is used. As shown in Figure 3, no interferences were

found, but some high-molecular-weight components, such as sterol esters, coeluted near the pyrethroids zone.

GC/MSD was used only for identification. Table 3 shows the order of elution, the selected ions monitored, and the start/end times of the search for the selected ions. An example of the MS confirmation of the identities of diazinon, chlorpyrifos, ethion, and cypermethrin residues in a lanolin sample is shown in Figure 4. Furthermore, Figure 5 shows the SIM printout for the selected ions of ethion and cypermethrin residues.

Table 4 shows the results of the recovery study for the selected pesticides at the different spiking levels tested. The results generally fell within the commonly accepted range of 70–120% recovery and 15% RSD for quantitative pesticide residue methods (31). The MSPD method showed very good accuracy because all the recoveries of the individual

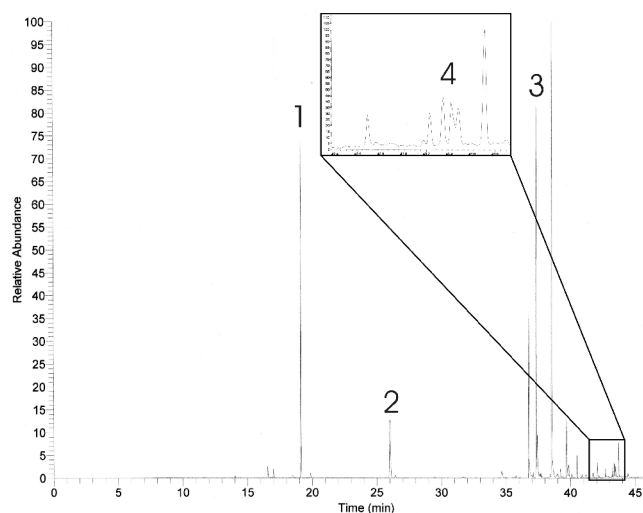


Figure 4. Mass spectrum confirming the identities of diazinon, chlorpyrifos, ethion, and cypermethrin in a lanolin sample.

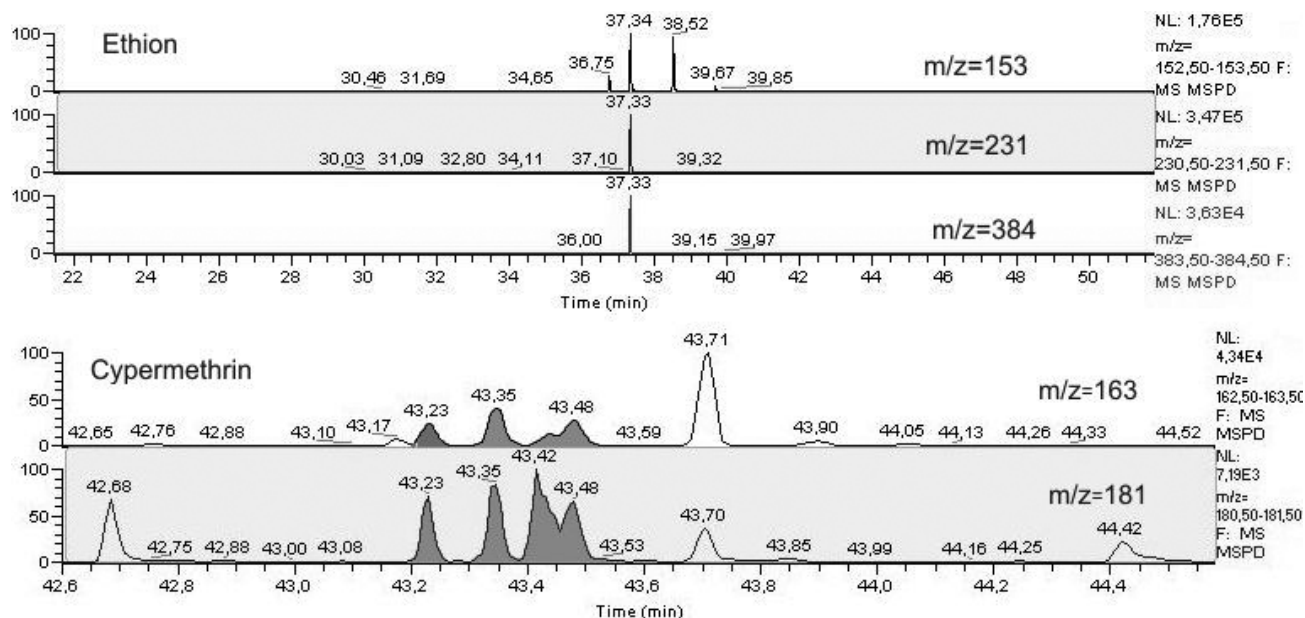


Figure 5. SIM printout for the selected ions of ethion and cypermethrin residues.

pesticides ranged from 82.8 to 117.7% for all pesticides except *p,p*-DDD, which had recoveries of 135.4–139.1% at the concentrations assayed.

Regarding precision, the RSD values ranged from 1.7 to 20.1% for the most unfavorable case. FPD showed better robustness than did ECD because the RSD values obtained by FPD were smaller. If we consider other method validation guidelines (32) that expand this acceptable range to 50–150% recovery and 20% RSD, certainly all analytes would have met these lower criteria (25).

Comparison with the Official Methods

GPC cleanup, followed by GC determination coupled with selective detection, is the most widely used method, and is the official procedure for the determination of pesticide residues in lanolin (4–8). Although this method is rugged and robust, some drawbacks are associated with GPC methodology; these are listed below and compared with MSPD improvements.

Analytical Time

GPC cleanup takes 32 and 50 min for elution/sample, according to the USP and EP, respectively. In addition, sample preparation can require subsequent SPE of the extract as described by Jones (5) or EP methodology (8). The MSPD approach takes a maximum of 15 min for handling and elution, and the extracts are analyzed directly after evaporation without further cleanup.

Solvent Consumption

Organic solvent mixtures, such as *n*-hexane–dichloromethene (1 + 1) and cyclohexane–ethyl acetate (7 + 1), are used in GPC methodology from the USP and EP,

respectively (7, 8). USP uses 160 mL and EP uses 250 mL solvent mixture, whereas MSPD uses only 8 mL per sample.

Waste Generation

After the evaporation step in a reduced-pressure evaporator, the official methods generate solvent waste that must be disposed of safely. The MSPD approach generates minimal waste, which demonstrates its environmentally friendly features.

Regulatory Issues

The USP currently authorizes a maximum of 10 ppm of any individual pesticide in lanolin, and the sum of all pesticides present in the sample must be 40 ppm. European regulation is stricter, allowing a maximum of only 0.05 ppm for OC pesticides and 0.5 ppm for any pesticide from other pesticide classes; the total concentration of pesticides in lanolin must be 1 ppm. The performance of the MSPD method fulfills the requirements of both pharmacopeias, as shown in Tables 1 and 2.

Residual Components and Matrix Effect on Pesticide Recoveries

The selection of the cut-off time for starting collection of fractions from the GPC system implies a compromise between pesticides recoveries and the residual amount of matrix in the extract (14, 21). Synthetic pyrethroids, free sterols (mainly cholesterol), and triterpene alcohols, such as lanosterol, have similar molecular weight (MW; 350 < MW < 500), resulting in overlapping and unsuccessful separation of pesticides from the alcoholic fraction of the lanolin matrix.

Table 4. Average recoveries of pesticides from lanolin spiked at 0.05, 0.1, and 1.0 g/g

Pesticide	Mean recovery, % (RSD, %) ^a		
	0.05, g/g	0.1, g/g	1.0, g/g
Diazinon	—	87.9 (3.7)	82.8 (4.2)
Propetamphos	—	85.0 (7.3)	84.7 (12.0)
Dichlofenthion	—	91.0 (3.1)	88.8 (5.5)
Fenclorphos	—	91.8 (6.4)	94.5 (2.5)
Pirimiphos-methyl	—	88.2 (0.5)	87.3 (1.8)
Chlorpyrifos	—	91.7 (1.7)	86.9 (3.6)
Chlorfenvinphos	—	94.3 (4.2)	87.7 (8.2)
Ethion	—	85.8 (4.5)	88.4 (1.5)
-HCH	102.1 (20.1)	95.7 (11.3)	—
-HCH (lindane)	102.7 (15.4)	111.1 (10.6)	—
-HCH	107.5 (10.4)	91.5 (11.4)	—
Aldrin	105.7 (19.1)	105.0 (13.1)	—
Endosulfan (+)	86.9 (11.0)	92.4 (11.6)	—
Dieldrin	105.0 (7.3)	112.4 (10.9)	—
<i>p,p</i> -DDE	107.1 (14.7)	91.9 (12.2)	—
<i>p,p</i> -DDD	139.1 (19.0)	135.4 (10.8)	—
<i>p,p</i> -DDT	109.7 (15.3)	117.7 (12.3)	—
-Cyhalothrin	—	92.4 (15.4)	88.1 (12.5)
Cypermethrin	—	103.6 (12.7)	101.7 (10.1)
Fenvalerate	—	91.9 (16.4)	112.9 (8.2)
Deltamethrin	—	102.5 (9.6)	108.8 (11.3)

^a *n* = 5. Bold numbers indicate values that do not meet the criteria of 70–120% recovery and 15% RSD.

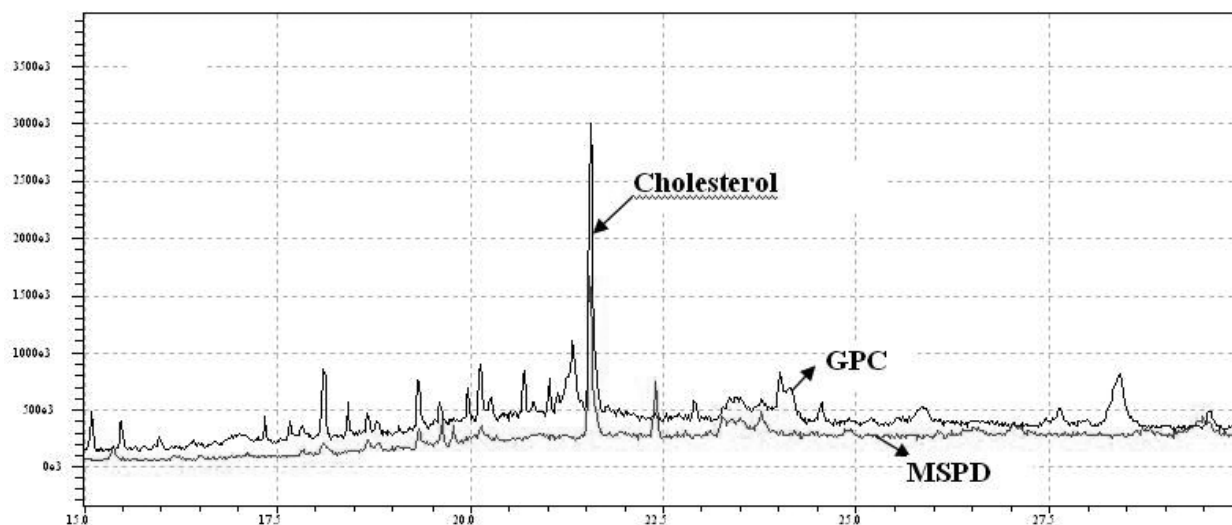


Figure 6. Comparison of full-scan mass spectra obtained after cleanup by GPC and MSPD.

The lanolin residues obtained with the GPC and MSPD methods used are gravimetrically comparable (7 and 10 mg, respectively). Cholesterol is the main component of the free alcohol wax residue in both cases. The MSPD method, as developed, shows lower amounts of long-chain mono alcohols, sterols, sterol derivatives, and triterpene alcohols as demonstrated by GC/full-scan MS (Figure 6). In regard to the response factor, it was found that generally better results were obtained by using matrix-matched calibration. The FPD response was markedly enhanced for OP pesticides because of matrix effects and had to be adjusted. The same effect was observed in the ECD determination of synthetic pyrethroids at low concentrations, and this response was also adjusted.

Thus, the MSPD method can help to overcome some drawbacks in sample throughput and can provide greater flexibility. However, lack of automation is its main disadvantage (18–20).

Conclusions

In this study, we have applied MSPD as a sample treatment strategy to clean up a highly fatty matrix, such as lanolin, and to extract the pesticide residues therein. The cleanup and extraction steps are performed simultaneously. No expensive equipment is needed, organochloride solvents are mostly avoided; the overall solvent consumption is reduced 20-fold, and sample preparation is straightforward; the whole manipulation can be carried out in 10–15 min. This method would be useful in routine analysis. The method presented here has remarkable analytical advantages over the features of the official methods based on GPC. There are no significant differences between the results obtained by this MSPD method and those obtained by following the USP or EP protocols.

Acknowledgments

We acknowledge financial support from Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria-Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria, No. 238, EUROLANTRAP & LANCO S.A. We wish to thank Eleuterio Umpiérrez and Virginia Villagrán from Laboratorio de Análisis Orgánico, Facultad de Química, UdelaR, Uruguay, for technical assistance.

References

- Jover, E., Moldovan, Z., & Bayona, J.M. (2002) *J. Chromatogr. A* **970**, 249–258
- Margenat, L., Torres, A.I., Moyna, P., Heinzen, H., González, G., & Jachmanían, I. (2008) *J. Supercrit. Fluids* **45**, 177–180
- Schlossman, M.L., & McCarty, J.P. (1979) *Contact Dermatitis* **5**, 65–72
- López-Mesas, M., Crespi, M., Branch, J., & Mullender, J.P. (2000) *Analysis* **28**, 159–162
- Jones, F.W. (1996) *J. Agric. Food. Chem.* **44**, 3197–3201
- Jones, F.W. (1992) *Report No. G75*, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Belmont, Australia
- U.S. Pharmacopeia*, USP 30-NF 25 (2007) U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, pp 2724–2726
- European Pharmacopeia* (2008) 6th Ed., Council of Europe, Strasbourg, France, pp 3222–3225
- Miyahara, M., Suzuki, T., & Saito, Y. (1992) *J. Agric. Food. Chem.* **40**, 64–69
- U.S. Pharmacopeia*, USP-NF (1990) U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, pp 991–993
- Jones, F.W. (1997) *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2569–2572
- Diserens, H. (1989) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**, 991–993
- Polese, L., Sannomiya, M., Oliveira Sader, A.P., & Ribeiro, M.L. (2000) *Il Farmaco* **55**, 637–640
- Jover, E., & Bayona, M.J. (2002) *J. Chromatogr. A* **950**, 213–220
- López-Mesas, M., Crespi, M., Branch, J., & Mullender, J.P. (2000) *J. Chromatogr. Sci.* **38**, 551–555
- Heikes, D.L., & Craun, J.C. (1992) *J. Agric. Food. Chem.* **40**, 1586–1590
- Nunn, C.R., Grundy, L., & Russell, I.M. (2006) *Report No. 04*, International Wool Textile Organization, Cairo Meeting, May 9–12, Cairo, Egypt
- Kristenson, E.M., Ramos, L., & Brinkman, U.A.Th. (2006) *Trends Anal. Chem.* **25**, 96–111
- Barker, S.A. (2007) *J. Biochem. Biophys. Methods* **70**, 151–162
- García-López, M., Canosa, P., & Rodríguez, I. (2008) *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 963–974
- Ferrer, C.M., Gómez, M.J., García-Reyes, J.F., Ferrer, I., Thurman, E.M., & Fernández-Alba, A.R. (2005) *J. Chromatogr. A* **1069**, 183–194
- García-Reyes, J.F., Ferrer, C., Gómez-Ramos, M.J., Fernández-Alba, A.R., & Molina-Díaz, A. (2007) *Trends Anal. Chem.* **26**, 239–251
- Cunha, S.C., Fernandes, J.O., Beatriz, M., & Oliveira, P.P. (2007) *Talanta* **73**, 514–522
- Martínez, A., Ramil, M., Montes, R., Hernanz, D., Rubí, E., Rodríguez, I., & Cela Torrijos, R. (2005) *J. Chromatogr. A* **1072**, 83–91
- Lehotay, J.S., Maštovská, K., & Yun, S.J. (2005) *J. AOAC Int.* **88**, 630–638
- Jones, F.W. (1997) *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**, 1241–1245
- Long, A.R., Soliman, M.M., & Barker, S.A. (1991) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74**, 493–496
- Garrido Frenich, A., Plaza Bolaños, P., & Martínez Vidal, J.L. (2007) *J. Chromatogr. A* **1153**, 194–202
- Schenck, F.J., & Wagner, R. (1995) *Food Addit. Contam.* **12**, 535–541
- Yagüe, C., Bayarri, S., Lázaro, R., Conchello, P., Ariño, A., & Herrera, A. (2001) *J. AOAC Int.* **84**, 1561–1568
- Hill, A.R., & Reynolds, S.L. (1999) *Analyst* **124**, 953–958
- Agricultural Marketing Service (2007) *Quality Control Criteria*, U.S. Department of Agriculture, PDP-QC-04 Manassas, VA, www.ams.usda.gov

Estudios de determinación de compuestos orgánicos a niveles traza en matrices complejas

Anexo 3



Determination of coumaphos, chlorpyrifos and ethion residues in propolis tinctures by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to flame photometric and mass spectrometric detection

Andrés Pérez-Parada, Marcos Colazzo, Natalia Besil, Lucía Geis-Asteggiante, Federico Rey, Horacio Heinzen*

Pharmacognosy and Natural Products, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), General Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2011

Received in revised form 24 June 2011

Accepted 27 June 2011

Available online 3 July 2011

Keywords:

Acaricides

Coumaphos

Pesticide residues

Propolis tinctures

Gas chromatography

ABSTRACT

A new analytical method has been developed and successfully evaluated in routine application for the quantitative analysis of a selected group of organophosphate pesticides (coumaphos, chlorpyrifos and ethion) which can be found at trace levels in propolis tinctures (ethanolic propolis extracts); a valuable commodity used as raw material in the food and pharmaceutical industries for which there have been few attempts for pesticide residue analysis reported in the literature. The proposed methodology is based on matrix solid phase dispersion (MSPD) using aluminum sulfate anhydrous as a novel dispersant material and subsequent column chromatography clean-up in silica gel prior to gas chromatography (GC) with both flame photometric detector (FPD) and mass spectrometry (MS) detection used for the routine quantification and identification of the residues, respectively. The limits of detection, for coumaphos, chlorpyrifos and ethion were below 26.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in FPD and 1.43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for MS detection. Mean recoveries were in the range of 85–123% with RSD values below 13%, which suggests that the proposed method is fit for the purpose of analyzing pesticides in propolis tinctures containing high concentration of polyphenolics. The method has been successfully applied in our laboratory for the last 2 year in the analysis of real propolis tinctures samples.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Propolis is a valuable by-product from bees. Due to its well known biological activities such as antibacterial, antiviral, fungicidal, anti-inflammatory and anticancer properties, it is widely used in pharmaceutical and food industries. Propolis has been extensively used in dermal pharmaceutical preparations and nowadays it is increasingly being used as food or dietary supplement [1]. Pesticide residues in propolis arise from two main sources; either from contamination from agricultural practices or due to pesticide application in hives, to prevent parasitic acaroids like *Varroa destructor* [2–5]. Nowadays, few data are available on the influence of contaminants in propolis quality. Acaricides that are widely employed in apiculture are common propolis contaminants although neither published multiresidue method for residue determination nor residue regulation is given for this product and apicultural prac-

tices. Coumaphos is one of the preferred worldwide used acaricide for Varroasis control [2,6,7].

Since propolis consumption increased, contaminants are now considered of interest as described in recent publications for trace analysis of tetracyclines [8], chloramphenicol [9], polycyclic aromatic hydrocarbons [10] and pesticide residues [11,12] in raw propolis and processed propolis [13]. However, propolis tinctures are the actual commodity used, that is obtained after raw propolis processing which involves water washing and the removal of waxes through resin dissolution in ethyl alcohol with further filtration to separate insoluble waxes and remaining material [1]. Processed propolis gives a highly pigmented sticky gum with different physicochemical properties and composition from the raw material. Residue determination in propolis presents an analytical challenge because of the high polyphenolic composition of this matrix and the chemical variability of the samples depending on different geographical or botanical origins [12,14]. In this sense, clean-up steps must be exhaustive to yield purified extracts for proper routine gas chromatographic (GC) analysis. To the best of our knowledge, attempts for GC residue determination of pesticides in propolis are performed using general methods in products from animal or

* Corresponding author. Tel.: +598 29244068; fax: +598 29241060.
E-mail address: heinzen@fq.edu.uy (H. Heinzen).

botanical origin, which typically involves the use of gel permeation chromatography (GPC) as also described in most important Pharmacopeias [15–17]. To date, two recent methods were developed for trace determination of pesticide residues in raw propolis. Santana dos Santos et al. [11] applied MSPD (matrix solid-phase dispersion) to analyze residues of bifenthrin, buprofezin, tetradifon and vinclozolin by GC–MS (gas chromatography–mass spectrometry), whereas Chen and co-workers [12] developed a method for residue determination of 17 organochlorine (OC) residues in raw propolis using a combination of tandem graphitized carbon and florisil cartridges and analyzing by GC coupled to an electron capture detector (ECD). Recently, Acosta-Tejada et al. [17] applied MSPD with C_{18} as dispersive material and ethyl acetate as elution solvent, analyzing 5 organophosphates pesticides in propolis tinctures by GC–MS.

The aim of this study was to develop a methodology for routine analysis of coumaphos in propolis tinctures, which was further extended to ethion and chlorpyrifos. In this article, we present validation and analytical features of a new method based on MSPD using aluminum sulfate anh. as sorbent with subsequent clean-up step by column chromatography followed by GC–FPD (flame photometric detector) determination and GC–MS confirmation. Moreover, the method was widely tested in real propolis tinctures samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

Solid phase used for dispersion, $Al_2(SO_4)_3 \cdot xH_2O$ 98% purity, was provided from Sigma–Aldrich (Milwaukee, USA) and dried 24 h at 350 °C to yield an anhydrous powder. Florisil as bulk powder 0.15–0.25 mm/60–100 mesh and Silica gel 60, 0.063–0.2 mm/70–230 mesh for column chromatography were obtained from Macherey–Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Germany). Acetone, dichloromethane (CH_2Cl_2) and ethyl acetate (EtOAc) of HPLC grade were purchased from Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, USA). Technical 95% ethyl alcohol (EtOH) was purchased from ANCAP (Montevideo, Uruguay). Coumaphos, chlorpyrifos, ethion, triphenylphosphate (TPP) and bromophos-methyl analytical standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Individual pesticide stock solution of 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were prepared in pure EtOAc and stored at -18°C . Mixed pesticide standards were prepared at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by diluting stock solutions in EtOAc. Appropriate levels of working standard solutions were prepared by diluting the mixed standard solutions in acetone. TPP was selected as surrogate compound (SC) and bromophos methyl as an internal standard (IS) for quality assurance and quantification purposes, respectively. Stock solution of 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in EtOAc, working standard solution of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (SC) in acetone and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IS) in EtOAc were prepared and stored at -18°C until analysis.

2.2. Propolis samples

All raw propolis samples used in this study were supplied by Laboratorio APITER Ltda. (Montevideo, Uruguay). Samples were collected in the southwest part of Uruguay in the Colonia Department ($34^\circ 28' 11''\text{S}$; $57^\circ 50' 48''\text{O}$). Chemical characterization of propolis samples from this area was previously described by Kumazawa et al. [14].

All tinctures samples were prepared as defined in current United States (USP 30-NF25) and European Pharmacopeia (6th EP) monographs for extracts giving an standardized tincture of 20% (w/v) of soluble animal matter in EtOH [16,17].

2.3. Instrumentation

Pesticides residue analysis was conducted with a double-channel Shimadzu GC-17A GC equipped with programmable temperature vaporizer (PTV) injector, Shimadzu AOC-20i Autosampler and FPD operating in phosphorus mode. Injector temperature program was from 60 to 270 °C at a rate of 500 °C/min and then held for 15 min. Helium was used as carrier gas at a constant flow rate of 1.7 mL/min. Injection volume 1.0 μL . Separation was performed with a MEGA 68 (cyanophenyl-methylpolysiloxane) fused silica capillary column (25 m \times 0.32 mm i.d. \times 0.25 μm film thickness). The column oven was temperature programmed from an initial value of 150 °C (2 min hold) to 230 °C at a rate of 10 °C/min, then to 300 °C at 30 °C/min (10 min hold). In this study, MS detection was used for confirmatory purposes of residues. GC–MS analyses were performed using an HP 6890 GC coupled with an HP 5973 MS supported by reference libraries, equipped with an HP-5 (5% diphenyl 95% dimethylsiloxane) bonded fused-silica capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μm film thickness). Electron impact (EI) mass spectra were obtained at 70 eV and monitored from 50 to 550 m/z for full scan mode analysis. MS system was programmed in selected ion monitoring (SIM) mode for confirmation. The working parameters were: injector temperature 290 °C; interface temperature 300 °C; carrier gas He at 38 cm/s, oven conditions; from 150 °C initial (3 min hold), increased to 230 °C at a rate of 10 °C/min, then to 295 at 30 °C/min (10 min hold), injection mode: splitless; injection volume: 1.0 μL . The identification of the compounds was confirmed by injection of matrix matched standards and comparison of their retention index and relevant MS ratios in accordance to DG-SANCO guidelines [18].

2.4. Sample preparation

4.0 g of ethanolic propolis tincture (20%, w/v) were accurately weighted into a 10 mL volumetric flask. 1.00 mL of SC solution at 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was added and the final volume was adjusted to 10 mL with acetone to yield 8% (w/v) tincture.

2.4.1. Spiking procedure

4.0 g of propolis tincture (20%, w/v) were accurately weighted into a 10 mL volumetric flask. This sample was spiked by the addition of 1.00 mL of appropriate mix of standard solution and 1.00 mL of SC at 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ prepared in acetone. Volume was adjusted to 10 mL with acetone in all cases. Four levels of spiking were assayed (0.1; 0.5; 1.0 and 5.0 $\mu\text{g}/\text{g}$). The 5.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ level was assayed because of the existence of real samples containing high levels of coumaphos.

2.4.2. MSPD based clean-up

2 g $Al_2(SO_4)_3$ anh. were weighed and blended in a mortar with 1.00 mL of a fortified propolis solution. The mixture was placed into a glass column (300 mm \times 12 mm i.d.) packed with 2 g of water-deactivated florisil at the bottom. A first aliquot (2 mL) of the solvent was used to backwash both the mortar and the pestle. Elution was performed with total 30 mL of CH_2Cl_2 :EtOAc (9:1; v/v) mixture at a flow rate of 1–2 drops/s under gravity. Solvent was collected and evaporated to dryness with rotary evaporator at 40 °C. Extract was redissolved in 2 mL of CH_2Cl_2 .

2.4.3. Column chromatography clean-up

Column chromatography was performed in a glass column (300 mm \times 12 mm i.d.) packed with 7 g of wet silica gel in CH_2Cl_2 as further purification process. The redissolved extract was poured over the column while solvent was flushed to the solid phase, a total of 40 mL of CH_2Cl_2 were eluted and collected. The extract was evaporated until near dryness in a rotary evaporator at 40 °C and finally

to dryness with N_2 stream. In each case, 1.00 mL of IS 1 $\mu\text{g/mL}$ in EtOAc was added and the final extracts were transferred to amber autosampler vials for GC analysis.

2.4.4. Calibration curves

Quantitation was performed in both neat solvent and matrix-matched calibration. Matrix-matched standards were prepared by adding 1.00 mL of appropriate working standard solutions to yield the concentrations assayed including IS at 1 $\mu\text{g/mL}$, to blank sample extracts. Blank samples were previously analyzed in duplicate to evaluate for not containing any of these OP pesticides with the proposed method.

3. Results and discussion

3.1. Preliminary studies

Sample clean-up is the most important step in residue analysis of propolis samples [12]. In contrast to published reports dealing with raw propolis [11,12], propolis tincture is a homogeneous substance, without debris or waxes which would represent a major problem for sample preparation. MSPD showed very useful performance when working with propolis thanks to the ability of increased interactions between the sample and the dispersant phase by mechanical blending. Due to the complexity of propolis tinctures, preliminary studies using MSPD were performed to exhaustively remove polyphenolic compounds. Different sorbent materials were evaluated with this purpose such as neutral alumina, silica gel and florisil for normal phase MSPD by eluting with non-polar mixtures of CH_2Cl_2 :EtOAc as previously described [11]. Reversed phase MSPD in C_{18} was also tested eluting with EtOAc and acetonitrile but the procedure recently described in the literature [13] was not suitable for the high polyphenolic content of Uruguayan propolis. As stated above, MSPD allows the use of combinations of matrix/dispersant that ensures minimal coelution of interfering compounds. Since tinctures are prepared in EtOH we experienced problems when blending the mixture with typical sorbents because of the water content and affinity to the dispersant surface. The selected dispersant phase, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ anh. not only has high affinity for phenols, but also due to its high hygroscopic properties eliminates the residual water present in the tincture, allowing a better interaction between the sample and the solid phase for fast dispersion step. Complexation of flavonoids with Al (III) ion is a well known property [19] which was used to selectively remove polyphenols and aromatic compounds even in wastewater [20]. Al (III) has great affinity for hydroxyls, particularly the phenolic ones, changing dramatically the sample polarity. Also aluminum salts of carboxylic acids either aromatic or aliphatic are formed. Illustration of complexation of a typical flavonoid such as quercetin with Al (III) is depicted in Fig. S1. The complexation of phenols and acids with Al (III) does not allow their solubilization with common organic solvents like CH_2Cl_2 and EtOAc. During the elution step, most complexed polyphenols are not eluted by the relatively low polarity of the organic solvents employed. On the other hand, acetone was selected as diluting solvent for being a good solvent for propolis tincture and its increased volatility in the dispersion step when performing MSPD with this sorbent giving a homogeneous dry powder.

Investigations were performed to choose the extraction solvent and co-sorbent material. In agreement to Santana dos Santos et al. [11] florisil co-sorbent with subsequent CH_2Cl_2 and CH_2Cl_2 :EtOAc eluting mixtures provides extraction of pesticides and reduction of polyphenolic co-extractives. Different solvent mixtures were tested but finally CH_2Cl_2 :EtOAc (9:1) was selected as a compromise between quantitatively eluting pesticides and matrix

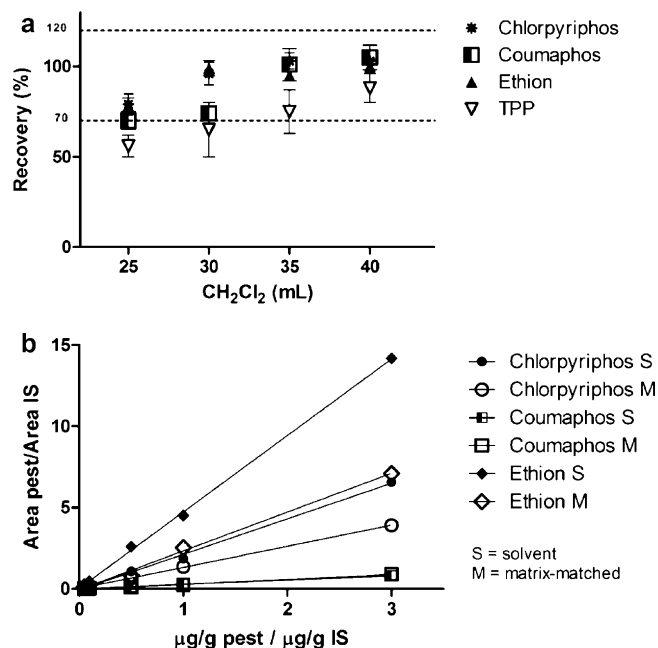


Fig. 1. (a) Optimization of CH_2Cl_2 volume on preliminary silica gel column chromatography at 500 $\mu\text{g/kg}$; (b) calibration curves evidencing the matrix effect for the selected pesticides.

co-extractives. However, a subsequent clean-up step was mandatory for adequate performance in routine analysis, ensuring further removal of co-eluted compounds by adding the commonly used silica gel column chromatography [15].

Fig. 1(a) shows a preliminary investigation performed at a level of 500 $\mu\text{g/kg}$ to determine the optimum CH_2Cl_2 volume in the quantitative extraction of pesticides from the column chromatography step. In accordance to widely accepted requirements (recoveries between 70 and 120%) [18], 40 mL of CH_2Cl_2 was employed for quantitative determination. Note that the dead volume at the selected conditions was approximately 10 mL.

3.2. Method development

The optimization of GC parameters (initial oven temperature, temperature gradient programme, PTV programme, etc.) was done to achieve high sample throughput but maintaining resolution between chlorpyrifos and bromophos methyl. GC–FPD was preferred to GC–MS for routine screening and quantification because of its higher robustness, wider dynamic range and lower maintenance when working in the phosphorous mode. Although the obtained extracts can be analyzed routinely in GC–MS, this technique was used for confirmatory presence or absence of pesticides since increased sensitivity was obtained compared to FPD. Table 1 shows the limits of detection and quantification (LODs and LOQs) of the analyzed pesticides along with their dynamic range and determination coefficient under the selected conditions.

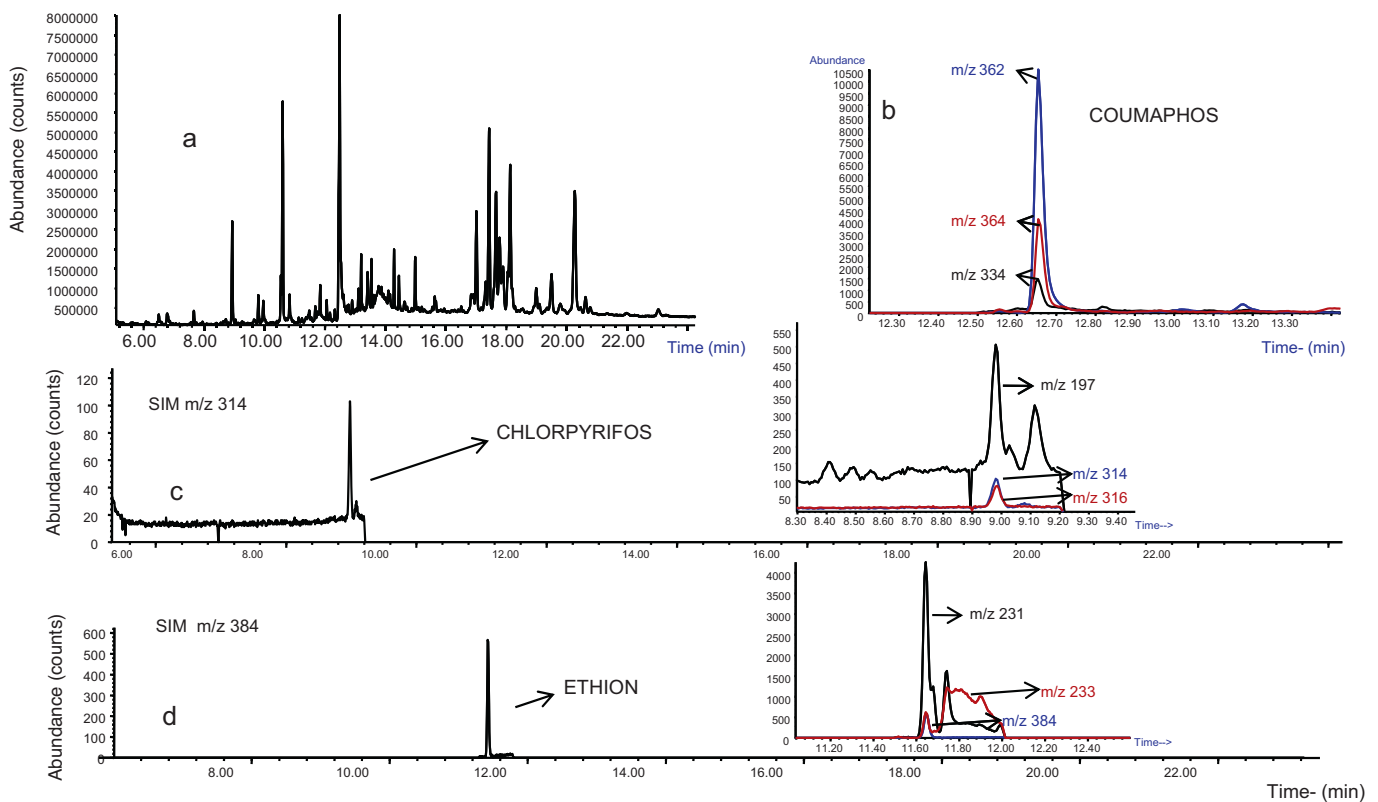
Three SIM ions were used for the identification of the positive findings. The confirmation criteria of positives consider the retention time matching in GC–FPD and GC–MS analysis plus 3 SIM ions with their corresponding relative ion abundance matching. However, when analyzing real samples the matrix usually presented some co-eluting isobaric interferences for the most intensive ions of chlorpyrifos (m/z 197) and ethion (m/z 231). The selected ions along with their relative abundances are summarized in Table 2 which also reports both retention times for FPD and MS analysis. Response factors were calculated for FPD analysis using matrix-matched and solvent-only calibration. LODs values

Table 1
Detection and quantitation limits (LODs and LOQs) and linear regression parameters in matrix-matched calibration.

Compound	GC-FPD					GC-MS
	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Dynamic range ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Calibration curve	Determination coefficient r^2	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Chlorpyrifos	9.1	30.0	0.03–5.00	$y = 1.0606x + 0.0672$	0.994	0.56
Coumaphos	26.0	88.0	0.09–20.00	$y = 0.7862x - 0.1452$	0.999	0.43
Ethion	4.7	15.0	0.05–5.00	$y = 1.6073x - 0.1152$	0.999	1.43

Table 2
Retention times t_R (min) for GC-FPD and MS analysis. Recoveries, average overall recoveries and RSDs (%), matrix effect (ME), and inter-day reproducibility (%) for each analyte under study ($n = 5$) for GC-FPD and selected quantifier and qualifier ions used for confirmation. Ion ratios obtained in matrix matched standards ($n = 3$).

Compound	t_R (min)	GC-FPD						GC-MS				
		Recovery \pm RSD (%)		Spiking level ($\mu\text{g}/\text{g}$)		Avg. overall recovery \pm RSD (%)	ME (%)	Inter-day precision (RSD, %)	t_R (min)	Selected ions	Ion ratio (%)	
		0.1	0.5	1.0	5.0							
Chlorpyrifos	8.6	88 \pm 10	87 \pm 1	123 \pm 4	112 \pm 3	102 \pm 17	-41	6.8	9.2	316 314 258 197	64 86 52 100	
Coumaphos	13.5	102 \pm 13	85 \pm 3	106 \pm 12	111 \pm 4	101 \pm 11	+14	7.2	12.2	364 362 334	42 100 12	
Ethion	11.2	98 \pm 6	92 \pm 1	115 \pm 6	110 \pm 3	104 \pm 11	-49	3.8	11.8	384 231 233	16 100 15	
Bromophos methyl	9.0	-	-	-	-	-	-	2.3	9.5	153 333 331	39 68 100	
TPP	11.8	92 \pm 12	88 \pm 9	92 \pm 8	89 \pm 10	90 \pm 2	+22	5.2	12.6	329 327 326 325	31 81 100 18	

**Fig. 2.** (a) Total ion chromatogram of final extract; (b) SIM chromatogram of coumaphos in a fortified propolis sample at 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. (c) SIM chromatograms for the confirmation of chlorpyrifos and (d) ethion in a real propolis tincture sample.

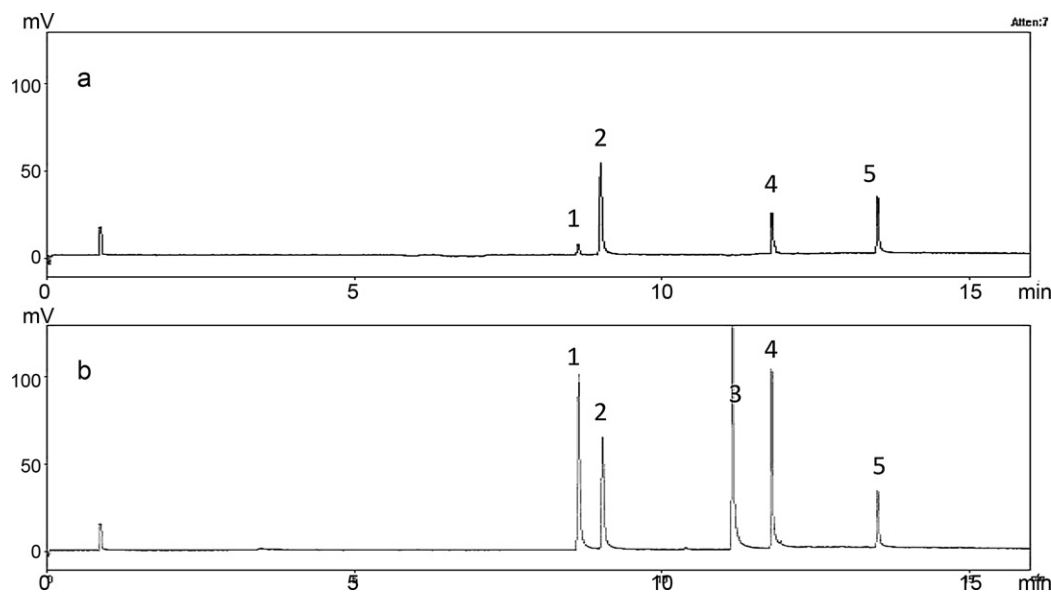


Fig. 3. Typical GC-FPD chromatograms of (a) real sample containing 86 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of chlorpyrifos and 960 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of coumaphos and (b) matrix-matched standards; 1 chlorpyrifos; 2 bromophos methyl (IS); 3 ethion; 4 TPP (SC); and 5 coumaphos.

were determined using the graphic approach at an S/N of 3 for each pesticide in spiked samples, whereas the LOQs values were obtained with S/N of 10. LOD for coumaphos in FPD analysis was 26 $\mu\text{g}/\text{kg}$ while in MS it was 0.43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ referred to m/z 334. As seen in Fig. S2, an exhaustive clean-up is performed as evidenced by liquid chromatography–diode array detector (LC-DAD) monitoring of polyphenols during each step (see Supplementary Information for conditions).

Matrix effect (ME) was evaluated in the dynamic range stated in Table 1. Comparison of the calibration slopes for solvent standards and standards prepared in matrix indicated large matrix effects for these pesticides, as seen in Fig. 1(b). The presence of matrix co-extractives suppressed the response of chlorpyrifos by -49% and coumaphos by -41% . By contrast the response for coumaphos was enhanced by $+14\%$ and for TPP by $+22\%$. Therefore, matrix-matched calibration solutions were employed for quantification. As reported in Table 2, recovery study showed recoveries between 70 and 120% and relative standard deviation (RSD) lower than 13%, showing good accuracy and repeatability complying with the analytical requirements stated in DG-SANCO [18]. In agreement with recent reports showing high levels of acaricides in bees by-products due to inadequate beekeeping practices and *Varroa* resistance [21,22], the 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ level was evaluated for a wide extent of the method performance due to findings in real samples contaminated with high levels of coumaphos.

The total ion chromatogram (TIC) depicted in Fig. 2(a) illustrates the complex volatile profile obtained in the injected extract even if exhaustive clean-up is employed to remove most polyphenols. In Fig. 2(b) is shown the SIM confirmation of incurred coumaphos (m/z 334, 362, 364) at a level of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The inter-day RSD ($n=5$) values were between 3.8 and 7.2% as can be seen in Table 2 which has been a major drawback reported in the literature for GC analysis of pesticides in propolis [11] demonstrating its effectiveness for routine quantitative purposes.

Another key point is the SiO_2 column chromatography clean-up. This step is limiting for multiresidue analysis of more polar pesticides since recoveries are affected by the CH_2Cl_2 eluting volume as seen in Fig. 1(a) and need to be optimized. Moreover, as propolis tinctures showed very variable composition, the amount of co-eluted material was different for each sample. The selected CH_2Cl_2 volume was the best compromise between recoveries and

an overloading of ME, ensuring good recoveries and reproducibility for the pesticides under study. The removal of this step or the use of increased volumes of eluting solvent is related with increased co-extractives elution, GC maintenance, ME and lower sensitivity. It should be emphasized that, since propolis extracts are commercialized in a variety of concentrations the method can be easily applied to the referred total solids content in the sample by performing dilution of solid extracts.

3.3. Application to real samples

The proposed method was applied to the analysis of over 1800 real samples from diverse apiaries in the last 2 years. As an example, Fig. 3 shows a typical GC-FPD chromatogram showing the pesticide residue findings in a real sample and comparing retention time of standards by the proposed approach.

Coumaphos and chlorpyrifos residues were identified in the vast majority of samples analyzed, whereas in few cases ethion residues were also identified. Detection rates and levels found for such pesticides in Uruguayan propolis tinctures are in agreement to those

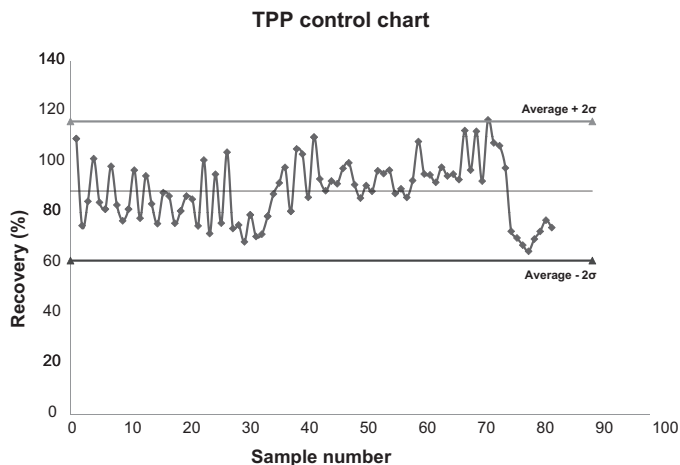


Fig. 4. Quality control chart for TPP surrogate compound at 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in 83 real samples tested during 10 days period.

recently reported in beeswax in the USA [22]. Actually, quantitative capability was found to be well adjusted in the dynamic range assayed. Examples of SIM confirmation of pesticides in real samples are shown in Fig. 2(c and d). Of great concern is that chlorpyrifos is not used in beekeeping due to its high toxicity to bees (0.36 µg/bee) [23] and therefore its presence in the analyzed samples could be associated to environmental pollution.

Under the proposed analytical strategy, the need for GC maintenance is evidenced after ~300 injected samples through broadening effect and loss of sensitivity for coumaphos where liner replacement and column shortening (50 cm from the injector port) is recommended. To track method performance, a quality control chart for TPP in 83 real samples during ten days period is shown in Fig. 4. Only one outlier sample was found using the proposed technique by two different analysts if considering 95% of confidence.

4. Conclusions

In this study, we presented a novel analytical method for trace quantitative determination of coumaphos, chlorpyrifos and ethion residues in propolis tinctures. Aluminum sulfate anhydrous employed as dispersant phase in a MSPD based scheme showed to be efficient in removing high amount of polyphenols in this troublesome matrix. However, subsequent clean-up was performed for routine application using GC–FPD/MS determination. The proposed method was sensitive, reliable and was successfully applied to the analysis of real samples, and it is actually employed in routine analysis in our laboratory. Validation of the method was carried out following EU guidelines. Moreover, as not only the EU banned coumaphos was detected, but also chlorpyrifos was frequently found in the analyzed real samples, more knowledge on the contamination of propolis tinctures by pesticide residues is needed. The future settling of maximum residue limits (MRLs) for this commodity seems to be mandatory.

Acknowledgments

Authors acknowledge to Facultad de Química (UdelaR, Uruguay), CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica, Montevideo, Uruguay), PEDECIBA Química (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, Uruguay) and ANII (Agencia

Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay) for financial support. We wish to thank to APITER Ltda. (Montevideo, Uruguay) for propolis samples and economical support along this study and Dr. L. Carrasco-Letelier for assistance in propolis blank samples.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chroma.2011.06.097.

References

- [1] G.A. Burdock, *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 347.
- [2] K. Wallner, *Apidologie* 30 (1999) 235.
- [3] M.P. Chauzat, J.P. Faucon, *Pest Manage. Sci.* 63 (2007) 1100.
- [4] S.R. Rissato, M.S. Galhiane, M.V. de Almeida, M. Gerenutti, B.M. Apon, *Food Chem.* 101 (2007) 1719.
- [5] S. Bogdanov, *Apidologie* 37 (2006) 1.
- [6] T. Portolés, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4079.
- [7] P. Tremolada, I. Bernardinelli, M. Colombo, M. Spreafico, M. Vighi, *Ecotoxicology* 13 (2004) 589.
- [8] J. Zhou, X. Xue, Y. Li, J. Zhang, F. Chen, L. Wu, L. Chen, J. Zhao, *Food Chem.* 115 (2009) 1074.
- [9] M. Bononi, F. Tateo, *J. Food Comp. Anal.* 21 (2008) 184.
- [10] S. Dobrinás, S. Birghilaa, V. Coatu, *J. Food Comp. Anal.* 21 (2008) 71.
- [11] T.F. Santana dos Santos, A. Aquino, H. Silveira Dórea, S. Navickiene, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1425.
- [12] F. Chen, L. Chen, Q. Wang, J. Zhou, X. Xue, J. Zhao, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 1073.
- [13] G.M. Acosta-Tejada, S. Medina-Peralta, Y.B. Moguel-Ordóñez, D. Muñoz-Rodríguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 885.
- [14] S. Kumazawa, K. Hayashi, K. Kajiya, T. Ishii, T. Hamasaka, T. Nakayama, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4777.
- [15] W. Specht, M. Tillkes, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 322 (1985) 443.
- [16] United States Pharmacopeia (USP 30-NF 25), Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, 2007, pp. 232–233.
- [17] European Pharmacopeia, 6th ed., Monograph 0765, Council of Europe, Strasbourg, France, 2008, pp. 682–684.
- [18] DG-SANCO, Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed, Document No. SANCO/10684/2009, 2009.
- [19] H. Heinzen, R. Martínez, S. García, P. Moyna, *Chromatographia* 35 (1993) 430.
- [20] J.R. Domínguez, T. González, H.M. García, F. Sánchez-Lavado, J. Beltrán de Heredia, *J. Hazard. Mater.* 148 (2007) 15.
- [21] J. Serra-Bonvehí, J. Orantes-Bermejo, *Pest Manage. Sci.* 66 (2010) 1230.
- [22] C.A. Mullin, M. Frazier, J.L. Frazier, S. Ashcraft, R. Simonds, D. van Engelsdorp, *J.S. Pettis, PLoS One* 5 (2010) e9754.
- [23] C.D.S. Tomlin, *The Pesticide Manual*, 15th ed., BCPC Publications, Hampshire, 2009, p. 203.

Estudios de determinación de compuestos orgánicos a niveles traza en matrices complejas

Anexo 4

RESIDUES AND TRACE ELEMENTS

Inclusion of 1-Naphthylacetic Acid and 2-(1-naphthyl)acetamide into Three Typical Multiresidue Methods for LC/MS/MS Analysis of Tomatoes and Zucchini

ANA LOZANO

European Union Reference Laboratory (EURL), Pesticide Residue Research Group, University of Almería, Department of Hydrogeology and Analytical Chemistry, Ctra. Sacramento S/Nº, La Cañada de San Urbano, 04120, Almería, Spain

ANDRÉS PÉREZ-PARADA

Pesticide Residue Research Group, European Union Reference Laboratory (EURL), Department of Hydrogeology and Analytical Chemistry, University of Almería, Ctra. Sacramento S/Nº, La Cañada de San Urbano, 04120, Almería, Spain

University of the Republic, School of Chemistry, Pharmacognosy and Natural Products, 1180 General Flores 2124, Montevideo, Uruguay

HORACIO HEINZEN

University of the Republic, Pharmacognosy and Natural Products, School of Chemistry, 1180 General Flores 2124, Montevideo, Uruguay

AMADEO R. FERNÁNDEZ-ALBA¹

European Union Reference Laboratory (EURL), Pesticide Residue Research Group, University of Almería, Department of Hydrogeology and Analytical Chemistry, Ctra. Sacramento S/Nº, La Cañada de San Urbano, 04120, Almería, Spain

In spite of high plant growth regulator application rates, little has been reported in the literature on determination of their residues in fruits and vegetables. This would be useful in monitoring good manufacturing practices and overall safety through the enforcement of maximum residue levels (MRLs). The present work describes method validation for the determination of 1-naphthylacetic acid (NAA) and 2-(1-naphthyl)acetamide (NAAm) in tomato and zucchini using the mini-Luke, ethyl acetate (EtOAc) and acetate-buffered quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) methods. Samples were spiked at two different levels: 50 and 100 µg/kg for NAA and 20 and 100 µg/kg for NAAm. These compounds were analyzed within the same chromatographic run with LC coupled to triple quadrupole MS (LC/(QqQ)MS/MS) in positive and negative electrospray ionization [ESI(+)] and [ESI(-)] modes for NAAm and NAA, respectively. For analyte confirmation, LC/ESI(-)QTOF-MS was also investigated given that NAA has only one multiple reaction monitoring transition (185.1→140.9 [AU: UNITS?]). These three common methods were used to determine linearity, recoveries, precision (RSD), matrix effects, repeatability, and reproducibility ($n = 5$) for the selected matrixes. In terms of the Directorate-General for Health and Consumers (DG-SANCO) guidelines, only insignificant differences were found for the multiresidue methods tested, regardless of the commodity. Matrix-matched calibration was used, and LODs were below 10.1 µg/kg for NAA and 6.0 µg/kg for NAAm, which were lower than the MRLs established in

current European Union (EU) legislation for these compounds. Obtained recoveries for NAA ranged from 87 to 107% with RSD values below 10% for mini-Luke, 83 to 107% with RSD <11% for EtOAc, and 76 to 85% with RSD ≤7% for QuEChERS. NAAm recoveries ranged from 74 to 102% with RSD ≤ 15% for mini-Luke, 76 to 97% with RSD < 4% for EtOAc, and 76 to 93% with RSD ≤ 5% for QuEChERS. The linearity of the response over two orders of magnitude was demonstrated ($r^2 > 0.996$) for all methods used. Good repeatability and reproducibility in terms of RSD were obtained (11.3–17.8%) for these analytical methods. The results were acceptable within the studied ranges for both analytes in all methods. As these multiresidue methods are used at the present time in many laboratories, this survey indicates that these analytes should be included in their monitoring scope.

Synthetic plant growth regulators (PGRs), which control specific physiological processes in plants, such as the division, elongation, and differentiation of plant cells, are used to promote flowering or improve setting in a variety of fruits and vegetables. The application of synthetic 1-naphthylacetic acid (NAA) and 2-(1-naphthyl)acetamide (NAAm) auxins (Figure 1) after blossoming is understood to prevent premature fall and thinning of fruits (1–3). However, greater amounts than necessary may act as growth inhibitors and, thus, be detrimental to the correct development of the plant crops (3).

In contrast to most agrochemicals, these compounds in particular are considered to be a moderate hazard to human health with a defined acute reference dose of 0.1 mg/kg bw/day for both NAA and NAAm, as recently reported by the European Food Safety Authority (4). Indeed, the current European Union (EU) regulation has established typical maximum residue levels (MRLs) of 0.05 mg/kg for both NAA and NAAm in most

Received November 22, 2011. Accepted by AK February 29, 2012.

¹ Corresponding author's e-mail: amadeo@ual.es

DOI: 10.5740/jaoacint.11-509

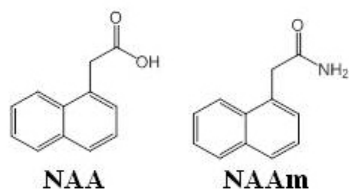


Figure 1. Chemical structures of NAA and NAAM.

vegetable matrixes, although there are a few exceptions, such as pome fruits (i.e., apples and pears), with MRLs between 0.1 and 1 mg/kg (5). Moreover, such compounds are included in Annex III, Part A of Commission Regulation No 149/2008 and are, thus, classified under the EU temporary MRLs list (6).

In spite of high PGR application rates, few attempts have been reported in the literature to determine their residue levels in fruits and vegetables. This would be useful in monitoring good manufacturing practices and safety levels through enforcement of MRLs. Most reported studies have been focused on determining endogenous auxins in plant matrixes (1, 7–12) rather than exogenic NAA (13–16), NAAM, or structurally related synthetic auxins, principally 2-naphthoxyacetic acid (BNOA; 11, 13, 17).

Different determination techniques were used to determine NAA, such as spectrofluorometry (18), capillary zone electrophoresis with a diode array detector (DAD; 13), micellar electrokinetic capillary chromatography (DAD; 19), pressurized capillary electrochromatography (DAD) (16), LC (18) coupled to a fluorescence detector (FLD; 7, 14), LC-DAD (20), and tandem MS (LC/MS/MS) (1, 15). On the other hand, few authors investigated the determination of NAAM: it was

only reported previously for fluorometric determination on apples (2) and LC-DAD on fertilizers (20).

Dedicated sample preparation methods were used for the analysis of auxins in plant matrixes. The reported NAA extraction methods were usually based on overnight macerations in organic solvents (10, 16, 19) and liquid partitioning using rigorous pH control in methanol (1, 21, 22), acetone (13, 14), and ethyl acetate (EtOAc; 11, 17) with subsequent SPE or liquid–liquid extraction used for the cleanup steps. Popular methods such as dispersive liquid–liquid microextraction have also recently been used to extract NAA from plant matrixes (7).

However, the inclusion of these analytes in multiresidue methods (MRMs) using LC/MS/MS determination makes them more attractive for increasing the scope of official and private laboratories. Recent studies have highlighted the importance of MRM evaluation in improving understanding of contaminant occurrence, the detection of sanitary alerts, and in increasing the reliability of residue laboratories to provide adequate testing (23).

The aim of this study is to evaluate the efficiency and fitness-for-purpose in determining NAA and NAAM using the most popular MRMs currently used by official EU laboratories when testing for pesticides in fruits and vegetables. These involve liquid partitioning with acetone (mini-Luke; 24), EtOAc extraction, and acetate buffered acetonitrile (ACN) quick, easy, cheap, effective, and safe extraction (QuEChERS; 23,25). A comparison of their qualitative and quantitative performance by LC/MS/MS determination in terms of recovery, precision, sensitivity, and confirmation capability was carried out.

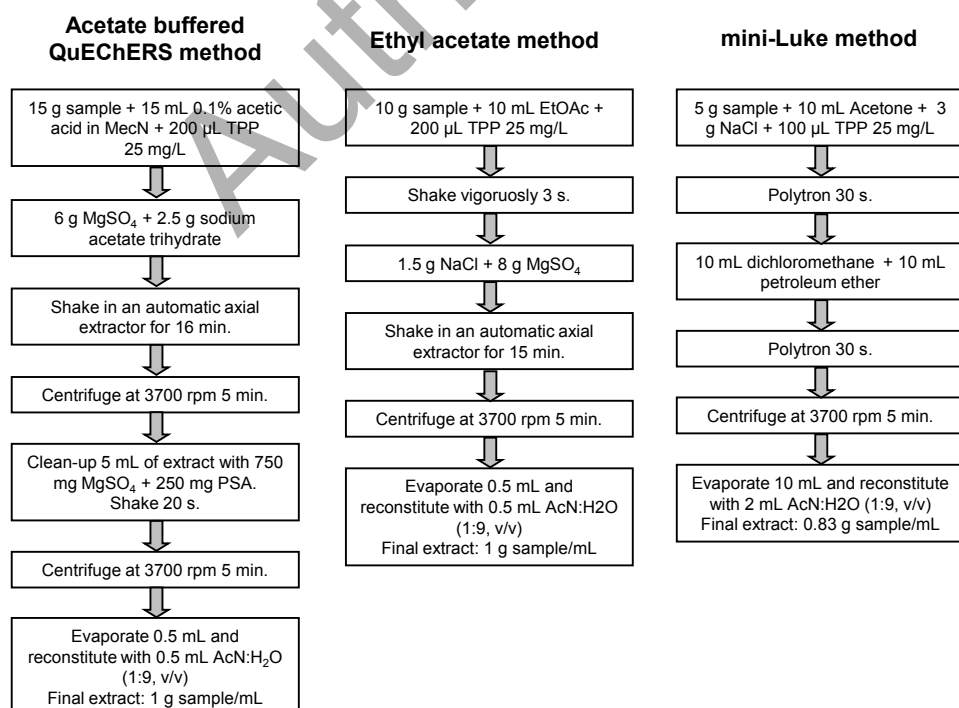


Figure 2. Schemes of the three MRMs applied to extract NAA and NAAM.

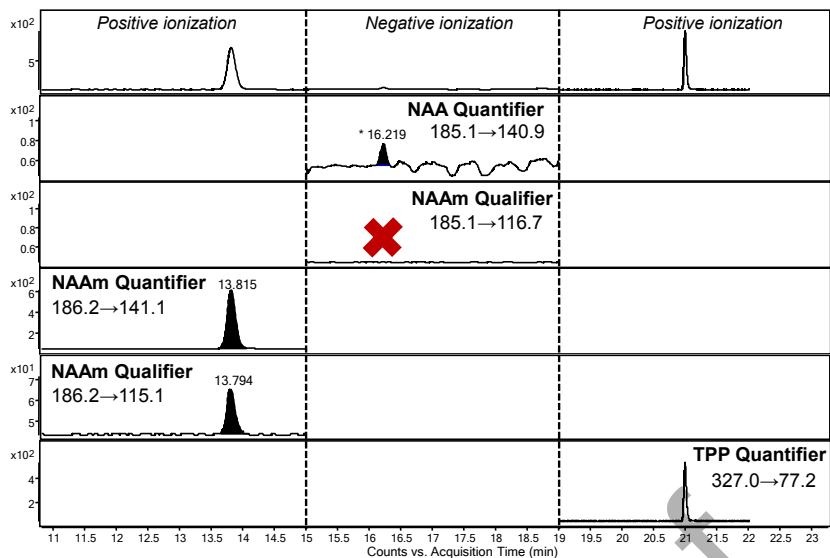


Figure 3. LC/(QqQ)MS/MS analysis of NAA and NAAM in zucchini extract using EtOAc extraction.

Experimental

Chemicals and Reagents

Pestanal[®] quality NAA and NAAM (see Figure 1 for structures) were supplied by Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Individual pesticide stock solutions (1000 mg/L) were prepared in ACN and stored in screw-capped glass tubes [AU: GIVE SOURCE AND ADDRESS] in the dark at -20°C . Spiking standard solutions were prepared by dilution in ACN.

Ultra-gradient HPLC grade ACN was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Dichloromethane, HPLC grade EtOAc, and formic acid (FA) were purchased from Fluka (Steinheim, Germany). Petroleum ether and sodium acetate trihydrate (NaAc) were supplied by Riedel-de Haën. Acetone pa. and acetic acid (HAc) were purchased from J.T. Baker (Steinheim, Germany). HPLC grade methanol (MeOH) and anhydrous sodium sulphate were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Primary-secondary amine (PSA) Bond-Elut was obtained from Supelco (Bellefonte, PA). Sodium chloride (NaCl) was purchased from J.T. Baker (Deventer, Holland). A Milli-Q-Plus ultrapure water system from Millipore (Billerica, MA) was used throughout the study to obtain the HPLC-grade water used during the analyses.

Spiking Procedure

For recovery studies, samples obtained from different local markets were spiked with standard solutions of NAA and NAAM at appropriate levels. A previous analysis of the samples was performed in order to ensure they did not contain any of the studied compounds, and these samples were selected as blanks for spiking, calibration curves, and recovery study purposes. A representative 150 g portion tomato and zucchini previously homogenized with a stainless-steel grinder (Sammic, Azpeitia, Spain) was weighed and transferred to a glass beaker, where it was fortified homogeneously with 1.5 mL working standard solution. The mixture was then gently blended for 30 min to assess the homogeneity of the sample. The samples were then allowed to stand at room temperature for 30 min prior to being kept at -18°C until analysis. The final spiking concentration levels in the samples for recovery studies were 20 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for NAAM and 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for NAA.

Extraction Procedures

In order to extend the scope of this study, three methods in widespread use were evaluated for NAA and NAAM determination. These were selected from among the main MRMs used by official laboratories in the EU and **third world** [AU:

Table 1. Values of the instrumental setting optimized for each compound (AU: PLEASE PROVIDE UNITS FOR PRECURSOR ION, SRM1, SRM2; WHAT IS THE RATIO OF?)

Compound	R _f , min	Precursor ion	Fragmentor, V	SRM1 ^a	CE 1, V ^b	SRM2	CE 2, V	Ratio
NAAM	14.1	186.2	120	141.1	15	115.1	20	3.7
NAA	16.4	185.1	60	140.9	5	116.7	20	–
TPP	21.1	322.0	120	77.2	35	152.2	30	7.7

^a SRM = Selected reaction monitoring.

^b CE = Collision energy.

Table 2. Results of the recovery study at two spiking levels ($n = 5$)

Sample	Analyte	Level, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Mini-Luke		EtOAc		QuEChERS	
			Recovery, %	RSD, %	Recovery, %	RSD, %	Recovery, %	RSD, %
Tomato	NAA	50	107.0	10.1	98.2	10.7	81.9	7.2
	NAAm	20	73.8	15.1	99.4	1.5	88.4	4.6
Zucchini	NAA	50	86.7	1.8	95.9	4.4	84.9	7.1
	NAAm	20	93.1	2.4	76.2	1.6	76.8	3.7
Tomato	NAA	100	92.7	9.7	106.9	4.5	81.5	5.8
	NAAm	100	95.4	5.5	97.8	4.0	92.5	5.0
Zucchini	NAA	100	98.3	6.3	82.6	4.5	76.2	7.3
	NAAm	100	102.1	3.5	91.6	2.9	89.5	1.4

OK AS ADDED?] countries. Descriptions of the extraction methods are given below, and schemes shown in Figure 2.

(a) *Acetate-buffered QuEChERS method.*—The well-known and accepted acetate-buffered QuEChERS sample preparation procedure (AOAC 2007.01; 26) was applied to the samples. After homogenization with a stainless-steel grinder, [AU: SOURCE AND ADDRESS?] a 15 g portion homogenized sample was weighed in a 50 mL PTFE centrifuge tube [AU: SOURCE AND ADDRESS?]. Then, 15 mL 0.1% HAc in ACN was added. Following this, a 200 μL volume of 25 mg/L triphenyl phosphate (TPP, [AU: SOURCE AND ADDRESS?] surrogate standard) was added. Afterwards, 6 g MgSO_4 and 2.5 g NaAc were added, and the samples were shaken in an automatic axial extractor (AGYTAX[®], Cirta Lab. S.L., [AU: CITY?], Spain) for 16 min. The extract was then centrifuged (3700 rpm) for 5 min. A 5 mL volume of supernatant was removed into a 15 mL PTFE centrifuge tube containing 750 mg MgSO_4 and 250 mg PSA. The extract was shaken vigorously in a vortex mixer for 20 s and centrifuged again (3700 rpm) for 5 min. Subsequently, an aliquot of supernatant was evaporated under a gentle nitrogen stream and reconstituted with ACN–water (10 + 90, v/v) for LC analysis. Prior to injection into the LC/MS system, the sample was filtered through a 0.45 μm PTFE filter (Millex FG, EMD Millipore). With this treatment, a 1 mL sample extract represented 1 g sample.

(b) *EtOAc.*—For EtOAc-based extraction, the procedure was performed on the samples as follows: 10 g previously homogenized sample was weighed in a 50 mL PTFE centrifuge tube with 10 mL EtOAc. A 200 μL amount of a TPP solution (25 mg/L) was added and shaken by hand for 3 s to make contact with the matrix. After this, 1.5 g NaCl and 8 g MgSO_4 were added, and the samples shaken with the automatic axial extractor for 15 min. Finally, the tubes were centrifuged (5 min at 3700 rpm), and a portion of the extract was evaporated using a gentle nitrogen stream and reconstituted with ACN–water (10+90, v/v) for subsequent LC analysis. Prior to injection into the LC/MS system, the sample was filtered through a 0.45 μm PTFE filter. With this treatment, a 1 mL sample extract represented 1 g sample.

(c) *Mini-Luke method.*—This method is a miniaturized version of the Luke method, as reported elsewhere (24). With this approach, 5 g previously homogenized sample was weighed in a 50 mL PTFE centrifuge tube. A 10 mL amount acetone, 3 g NaCl, and 100 μL TPP surrogate compound were added, and the sample was blended using a Polytron homogenizer [AU: GIVE

SOURCE AND ADDRESS] for 30 s. Following this, 10 mL dichloromethane and 10 mL petroleum ether were added, and the sample extract was blended again (the partitioning step) for 30 s. After centrifugation at 3500 rpm for 5 min, a 5 mL portion of the upper layer was evaporated to dryness under a nitrogen stream and reconstituted with 1 mL ACN–water (10+90, v/v) for LC analysis. Prior to injection into the LC/MS system, the sample was filtered through a 0.45 μm PTFE filter. With this treatment, a 1 mL sample extract represented 0.83 g sample.

LC/MS Analysis

(a) *Analytical conditions for LC-tandem MS (LC/MS/MS).*—For the LC analysis, an Agilent (Santa Clara, CA) 1200 HPLC system with a binary pump was used. This was equipped with an RP C18 analytical column, 250 \times 3 mm and 5 μm particle size (Agilent Zorbax SB). The mobile phases, A and B, were MilliQ water with 0.05% FA and MeOH, respectively. The gradient program started with 10% of B, followed by a linear gradient up to 50% B over 5 min. It was kept constant for 5 min, followed by a linear gradient up to 70% B for 1 min, and then held constant at 70% B for a further 5 min. Finally, a linear gradient up to 100% B was programmed for 1 min, and held constant for 5 min. After this 22 min run time, 7 min of post-run time followed using the initial 10% of B. The flow rate was constant at 0.5 mL/min during the whole process, and 10 μL sample was injected in each analysis. For the MS analysis, a triple quadrupole [AU: OK AS CHANGED?] LC/MS system [LC-(QQ)MS 6410 from Agilent Technologies] was used. The electrospray ionization source was operated in positive (ESI+) and negative (ESI-) modes. Its parameters were as follow: gas temperature, 325°C; gas flow, 9 L/min; nebulizer gas, 40 psi; and capillary voltage, 4000 V. Nitrogen was served as the nebulizer and collision gas. Three time windows with a ± 1 min overlapping range around the borders were constructed. The start time of the first, second, and third segments were 0 min for ESI(+), 15.1 min for ESI(-), and 19.1 min for ESI(+), respectively. Figure 3 shows a typical LC/MS/MS chromatogram for zucchini spiked with 50 and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ NAA and NAAm, respectively. Mass Hunter Data Acquisition and Qualitative Analysis and Quantitative Analysis software, version B.02 (Agilent Technologies) was used for method development.

(b) *Confirmation of NAA by LC/-quadrupole time-of-flight MS (LC/ESI(-)QTOF-MS).*—For the confirmation analysis, the Agilent 1200 HPLC system was used. LC analysis was

Table 3. Validation data obtained for both commodities using the three MRMs

Sample	MRM	Slope	r ²	ME, % ^a	Precision (RSD, %)				LOD, µg/kg	LOQ, µg/kg
					Intraday		Interday			
					Low level ^b	100 µg/kg	Low level ^b	100 µg/kg		
NAAm										
Tomato matrix	Solvent	161.24	0.999	–	–	–	–	–	4.1 ^c	20.0 ^a
	Mini-Luke	131.91	0.999	-18.2	2.1	2.5	17.1	14.8	6.0 ^c	20.0 ^a
	EtOAc	114.18	0.997	-29.2	0.2	2.0	4.4	6.2	3.0 ^c	20.0 ^a
Zucchini matrix	QuEChERS	128.37	0.999	-20.4	2.6	1.8	3.4	4.1	5.0 ^c	20.0 ^a
	Mini-Luke	161.85	0.999	0.4	10.3	3.3	17.8	12.6	5.0 ^c	20.0 ^a
	EtOAc	153.66	0.999	-4.7	1.6	1.5	7.2	6.3	4.2 ^c	20.0 ^a
	QuEChERS	137.61	1.000	-14.7	3.5	2.8	10.6	4.6	4.8 ^c	20.0 ^a
NAA										
Tomato matrix	Solvent	5.76	0.999	–	–	–	–	–	5.2 ^d	50.0 ^b
	Mini-Luke	4.56	0.999	-20.8	11.3	2.3	7.7	5.4	4.2 ^d	50.0 ^b
	EtOAc	3.75	0.996	-34.9	7.3	1.4	1.3	3.9	8.3 ^d	50.0 ^b
Zucchini matrix	QuEChERS	5.08	1.000	-11.7	8.6	5.7	5.2	6.2	6.5 ^d	50.0 ^b
	Mini-Luke	6.45	0.999	12.0	7.4	2.0	1.4	2.1	6.7 ^d	50.0 ^b
	EtOAc	5.46	0.999	-5.2	6.6	2.8	11.3	8.8	10.1 ^d	50.0 ^b
	QuEChERS	5.39	1.000	-6.4	10.4	7.2	6.7	4.9	6.0 ^d	50.0 ^b

^a ME % = [(slope matrix/slope solvent)-1] × 100.^b Low level = 50 µg/kg for NAA and 20 µg/kg for NAAm.^c Data referred to the qualifier ion.^d Data referred to the quantifier ion.

performed using a Zorbax Eclipse octylsilyl (C8) analytical column (150×4.6 mm id, 5 µm particle size) from Agilent Technologies. Gradient elution was performed with MeOH as solvent A and 0.1% FA in MilliQ water as solvent B. The method started isocratically for 1 min at 10% A. Then, a linear gradient progressed from 10% A (initial conditions) to 100% A over 10 min, after which the mobile-phase composition was maintained at 100% A for 6 min. The re-equilibration time was 7 min. The flow rate was 0.6 mL/min, and 20 µL sample was injected. For the MS analysis, an LC/QTOF-MS system (LC Agilent 6530 Q-TOF) was used. The ESI interface was operated in the negative ionization 4 GHz high-resolution mode. Ions were generated using an ESI source with Dual Jet Stream Technology (Agilent Technologies). Parameters for ESI(–) were the nitrogen sheath gas temperature, 350°C and flow rate, 12 mL/min. The conditions for the acquisition parameters were: capillary voltage, 4000 V; nebulizer, 40 psi; drying gas, 10 L/min; gas temperature, 150°C; fragmentor [in-source collision-induced dissociation (CID) fragmentation], 120 V; skimmer voltage, 60 V; octapole dc, 137.5 V; and octapole RF, 250 V. Nitrogen generated from pressurized air in a nitrogen generator (Kaeser Kompressoren, Coburg, Germany) was used as the nebulizing and drying gas. TOF-MS internal mass calibration was performed using a calibration solution (ESI-TOF reference mass solution, Agilent Technologies)

that provided *m/z* 112.9856 and 966.0007 in the negative mode. Under the selected conditions, TOF-MS resolution was approximately 7000 ± 500 at an *m/z* of 301.99814 (full peak width at half-maximum). The full-scan data recorded were processed with MassHunter WorkStation Qualitative Analysis software, version B.03 (Agilent Technologies).

Validation of the Analytical Procedure

A validation study was performed in terms of recovery, linearity, matrix effects, repeatability, and reproducibility. For the three extraction methods studied, the validation study was performed in the same way. The validation procedure for the methods was carried out using spiked zucchini and tomato extracts. Linearity of the (QqQ)MS system was evaluated assessing the signal responses of target analytes from matrix-matched calibration solutions prepared by spiking blank extracts at seven NAA and NAAm concentration levels, from 5 to 500 µg/L. The recovery studies were determined as the average of five spiked blank matrix analyses at concentration levels of 20 and 100 µg/kg for NAAm, and 50 and 100 µg/kg for NAA. The precision of the chromatographic method (represented as RSD) was obtained from the repeated injection (five times) of a spiked extract at concentration levels of 20 and 100 µg/kg for NAAm, and 50 and 100 µg/kg for NAA. Repeatability

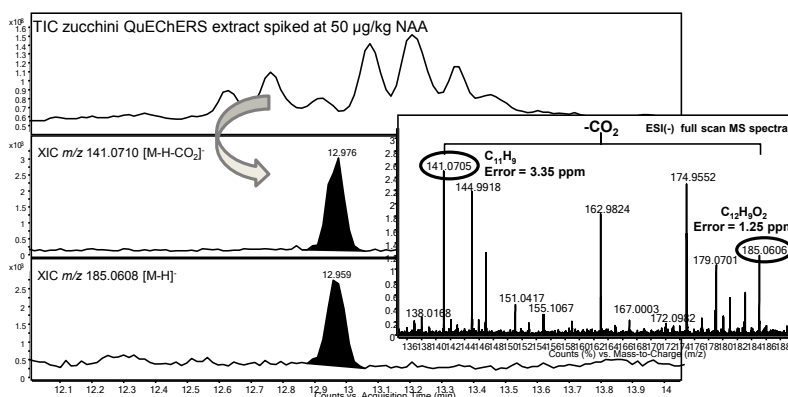


Figure 4. Confirmation of NAA residues by LC/ESI(-)QTOF-MS. Identification of $C_{12}H_9O_2$ and $C_{11}H_9$ accurate ions in zucchini extract at 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ obtained by the QuEChERS method.

and reproducibility were expressed as RSD of the intraday and interday analyses ($n=5$) over 1 and 5 days, respectively.

The analytical LOD was determined as the minimum concentration of analyte providing a chromatogram in which a qualifier selected reaction monitoring (SRM2) transition had an S/N of 3. The LOQ was set as the minimum concentration that can be quantified with acceptable accuracy and precision, as described in Document No. SANCO/10684/2009 (27). For the assessment of ion suppression/enhancement effects, chromatograms of standard solution and spiked sample extracts between 5–500 $\mu\text{g}/\text{L}$ were compared.

Results and Discussion

Optimization of LC/MS/MS Parameters

Due to its sensitivity and selectivity for trace analysis of complex extracts, LC/ESI(QqQ)MS/MS is currently the most commonly-used technique for large-scale determination of agrochemicals using MRMs (28). Optimization of the compounds was carried out via flow injection analysis (29) of individual standards at a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration in ACN–water (1 + 1, v/v) into a constant flow of this same solvent mixture, with a flow rate of 0.2 mL/min and 5 μL injection volume. The two most intense transitions were chosen for merging and creating the method. The most intense transition was used as a quantifier (SRM1), the other as the qualifier (SRM2). Fragmentor voltage was investigated in the 60–150 V range and collision energy between 5 and 20 V. The optimized conditions for each compound are shown in Table 1.

Both positive and negative ionization modes were tested. Increased NAA sensitivity was found when ionization was performed in the ESI(-) mode, while NAAm evidenced higher sensitivity in the ESI(+) mode. With the aim of carrying out simultaneous determination of such compounds by permitting an adequate change in the ionization polarity during chromatography, selected experiments were carried out to provide increased NAA and NAAm separation in the analytical column. In these experiments, both MeOH and ACN were investigated as the organic mobile phase solvent for LC. However, LC/ESI(-)MS/MS demonstrated higher NAA sensitivity when MeOH was used, while FA in the aqueous mobile phase was employed for narrowing NAA peak shape

without any evident loss in the sensitivity attained. Preliminary experiments using a C8 silica-based analytical column (150 \times 4.6 mm id, 5 μm particle size; Agilent Zorbax Eclipse XDB) did not provide efficient separation of such compounds over 29 min chromatographic run times using several mobile phase programs. A long C18 silica-based column (250 \times 3 mm id, 5 μm particle size), as described in the *Experimental* section, showed a change in the elution order of these analytes, resulting in a greater separation of the analytes [retention time difference (ΔR_T) = 2.3 min]. Identification of the target NAAm in the sample extracts was based on R_T matching and the identification of selected SRM transitions falling within Directorate-General for Health and Consumers (DG-SANCO) requirements of a $\pm 25\%$ tolerance for SRM ratio variations (27). However, NAA gave only one noticeable transition (185.1 \rightarrow 140.9 [AU: UNITS?]), regardless of the concentration in the studied range, for coupled LC/MS/MS at optimized conditions. For unambiguous confirmation of NAA residues, accurate mass measurements provided by LC/ESI(-)QTOF operating in full-scan MS were further investigated.

Optimization of LC/QTOF-MS Parameters for the Confirmation of NAA

Ionization conditions for LC/QTOF-MS were studied to achieve the highest sensitivity and selectivity for target NAA confirmation. We found that the temperature of the drying gas and sheath gas, as well as the fragmentor voltage used for ion-source CID in the ESI(-) mode, all had a strong influence on the sensitivity attained and the relative abundance of the product ion for such an analyte. In the end, NAA was in-source CID fragmented using a mild fragmentor value (90 V), and the sheath gas temperature was found to be optimum (350°C) when the drying gas temperature was 150°C.

Analyses were carried out under full-scan MS conditions using the extracted ion chromatogram (EIC) of the deprotonated molecule ([M-H]⁻) of NAA (m/z 185.0608, [$C_{12}H_9O_2$]⁻) from the total ion chromatogram using a 20 ppm extraction window. The R_T obtained for NAA was 12.9 min. Under these conditions, NAA yielded only the fragment ion belonging to its decarboxylation— m/z 141.0710, [$C_{11}H_9$]⁻—with similar ion abundance, which, when added to the R_T , was used for unambiguous confirmation. The accurate NAA mass spectrum was obtained once the

background of the EIC was subtracted. The accurate mass of the deprotonated molecule was successfully used for confirmation purposes for the spiked extracts containing NAA at 50 µg/kg. From the data collected, it was concluded that this method offers a high degree of confirmation capability because of its very high mass accuracy, enabling mass measurements of target ions within a 5 ppm error range.

Efficiency of the Extraction Procedures

Three different MRM methods were applied to spiked tomato and zucchini samples at two residue levels. Samples were spiked at a low level containing NAA and NAAm at 50 and 20 µg/kg, respectively (note that the lowest EU MRL for these compounds is 50 µg/kg), and at a high level containing 100 µg/kg of synthetic auxins, which were also assayed. Five replicates were tested at each level to determine the precision (RSD) of the overall extraction methods. Table 2 shows the results of the recovery study in tomato and zucchini matrixes.

Matrix-matched calibration was employed for quantification purposes and to set the LODs, which were below 10.1 µg/kg for NAA and 6.0 µg/kg for NAAm. Obtained recoveries for NAA ranged from 86.7 to 107.0% with RSD <10.1% for mini-Luke; 82.6 to 106.9% with RSD <10.7% for EtOAc; and 76.2 to 84.9% with RSD <7.3% for QuEChERS. For NAAm, recoveries ranged from 73.8 to 102.1% with RSD <15.1% for mini-Luke; 76.2 to 99.4% with RSD <4.0% for EtOAc; and 88.4 to 92.5% with RSD <5.0% for QuEChERS.

Results on method validation are presented in Table 3. Linearity, matrix effect (ME), repeatability, reproducibility ($n=5$), and LODs were determined for the selected matrixes with the proposed methodologies. Calibration curves were obtained with r^2 values higher than 0.996 in all cases within the range of 5 to 500 µg/kg. Intraday precision assessment was determined from the repeated injection of a spiked extract at concentration levels of 20 and 100 µg/kg for NAAm and of 50 and 100 µg/kg for NAA. Interday precision was acquired from injection of these spiked extracts over 5 consecutive days. RSDs obtained in intraday studies were lower than 10.3% for NAAm and 11.3% for NAA, whereas the interday RSDs were lower than 17.8% for NAAm and 11.3% for NAA. ME was evaluated in all methods and matrixes by the calculation of the ratios between slopes in matrix and solvent calibration. Particularly for these analytes, the ion suppression obtained was higher in tomato than in zucchini regardless of the MRM studied. Medium ME was obtained in the tomato matrix using the EtOAc method for NAA (-34.9%) and NAAm (-29.2%). Low ME (<20%) was obtained when performing the QuEChERS and mini-Luke methods. On the other hand, LODs were calculated for spiked extracts with NAAm using the graphic approach at the lowest concentration at which SRM2 produced an S/N of 3. However, for NAA, LODs were determined by referring to the available SRM1 transition. LOQs were 20 µg/kg for NAAm and 50 µg/kg for NAA, given that these were the lowest limits at which the complete analytical method was applied.

The results obtained are considered acceptable within the studied range. As shown, with regard to analytical features, nonsignificant differences were obtained for these three MRMs regardless of the commodity. This is in accordance with EU method validation guidelines (27), and complies with current EU regulatory requirements (5).

Confirmation of NAA Residues

Despite the high quality of information concerning LC/(QqQ)MS/MS in terms of sensitivity and selectivity, in the case of NAA, unambiguous confirmation was only obtained when using LC/ESI(-)QTOF-MS in incurred samples. Increased reliability of analytical results was obtained through accurate mass measurements. Figure 4 shows NAA confirmation by means of accurate ions (parent and product ions) and R_T matching by the proposed technique at a 50 µg/kg level in QuEChERS extracts. Searching for elemental composition by QTOF, operating in full-scan MS, permitted the identification of ions within the widely accepted accurate mass deviation value of <5 ppm.

LOD estimation, on the basis of an S/N of 3, for the selected confirmation technique was in the 20–30 µg/kg range for both studied matrixes and the three tested MRMs. This ensures correct confirmation below the levels officially required for NAA residues.

Furthermore, an additional concern regarding NAA, as also described in the literature, is that it is a degradation product of NAAm and its metabolite under certain environmental conditions (4, 30, 31). Preliminary stability tests, carried out in MeOH-H₂O (1+9, v/v) solvent with extracts obtained using these MRMs in amber vials over a two-week period, did not show any evidence of NAAm degradation under laboratory conditions.

Application to Real Samples

Eight samples of tomato and zucchini, purchased from different local supermarkets in Almería, were analyzed during March 2011 for NAA and NAAm residues. The EtOAc method was selected for residue extraction because of its good analytical performance, regarding additional time and cost-effective features when compared to the mini-Luke and QuEChERS methods, respectively. Residues of NAAm were found in all the zucchini samples analyzed. Despite the findings, the samples had residues below the LOQ, whereas one sample was found that contained 27.0 µg/kg of NAAm. NAA residues were not detected in any of the analyzed samples. In view of these results, NAAm is confirmed as needing to be included in the technological package used for zucchini cultivation, even though the findings comply with the MRLs in current EU regulation (5).

Conclusions

The inclusion of NAA and NAAm into the scope of laboratories that currently apply MRMs, such as mini-Luke, EtOAc, and QuEChERS, and that use LC/(QqQ)MS/MS, is both feasible and advisable. NAA confirmation was accomplished through the use of an accurate mass measurement strategy provided by LC/QTOF-MS. NAAm residues were detected in analyzed zucchini samples, even though the vegetables fully complied with regulatory issues. Nonetheless, more understanding of the occurrence of plant growth regulators is needed; that is why this survey encourages inclusion of these analytes in future agrochemical monitoring programs of plant-based food.

Acknowledgments

We acknowledge funding support from the European Commission, DG-SANCO (Specific Agreement No. 2007/1 to Framework Partnership Agreement No. SANCO/2007/FOOD SAFETY/025-Pesticides in Fruits and Vegetables) and the Regional Government of Andalucía “Junta de Andalucía” (Consejería de Economía, Innovación y Ciencia) and FEDER (Project Ref. AGR-4047). A.L. acknowledges the FPU fellowship (Research Teacher Training) from The Spanish Ministry for Science and Education. A.P.P. acknowledges the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay) POSNAC2010-2637 grant and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA Química, Uruguay) for economic support.

References

- (1) Lu, Q., Zhang, L., Chen, T., Lu, M., Ping, T., & Chen, G. (2008) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 2565–2572. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.3642>
- (2) Sigrist, R., Temperli, A., & Hurter, J. (1974) *J. Agric. Food Chem.* **22**, 568–570. <http://dx.doi.org/10.1021/jf60194a050>
- (3) Tomlin, C. (2009) in BCPC, Har [AU: SPELL OUT BCPC. IS IT A BOOK? EDITORS?] pp 806–809
- (4) E.F.S. [AU: SPELL OUT] Authority (2011) *EFSA J.* **9**, 2019–. [AU: GIVE INCLUSIVE PAGES]
- (5) EU MRLs (2005) http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm [AU: ACCESS DATE?]
- (6) European Commission (2008) *Off. J. Eur. Union* **L58**, 1–398
- (7) Lu, Q., Chen, L., Lu, M., Chen, G., & Zhang, L. (2010) *J. Agric. Food Chem.* **58**, 2763–2770. <http://dx.doi.org/10.1021/jf903274z>
- (8) Izumi, Y., Okazawa, A., Bamba, T., Kobayashi, A., & Fukusaki, E. (2009) *Anal. Chim. Acta* **648**, 215–225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.001>
- (9) Chiwocha, S.D.S., Abrams, S.R., Ambrose, S.J., Cutler, A.J., Loewen, M., Ross, A.R.S., & Kermod, A.R. (2003) *Plant J.* **35**, 405–417. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3113.2003.01800.x>
- (10) Chen, H., Zhang, Z.-X., Zhang, G.-M., Guo, X.-F., Zhang, H.S., & Wang, H. (2010) *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4560–4564. <http://dx.doi.org/10.1021/jf100581u>
- (11) Gennaro, M. (2003) *J. Chromatogr. A* **993**, 111–119. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00332-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00332-7)
- (12) Hou, S., Zhu, J., Ding, M., & Lv, G. (2008) *Talanta* **76**, 798–802. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.041>
- (13) Segura Carretero, A., Cruces-Blanco, C., Soriano Peña, M., Cortacero Ramirez, S., & Fernández Gutiérrez, A. (2004) *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1419–1422. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0305377>
- (14) Nagayama, T., Takano, I., Kobayashi, M., Tamura, Y., Tomizawa, S., Tateishi, Y., Kimura, N., Kitayama, K., & Saito, K. (2003) *J. Food Hyg. Soc. Jpn* **44**, 126–131. <http://dx.doi.org/10.3358/shokueishi.44.126>
- (15) Ma, Z., Ge, L., Lee, A.S.Y., Yong, J.W.H., Tan, S.N., & Ong, E.S. (2008) *Anal. Chim. Acta* **610**, 274–281. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.045>
- (16) Lu, Q., Zhang, L., Chen, L., Lu, M., Tong, P., & Chen, G. (2010) *J. Sep. Sci.* **33**, 651–657. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200900603>
- (17) Lucini, L., & Molinari, G.P. (2010) *Agrochimica* **54**, 34–40
- (18) Navalón, A., Blanc, R., & Vilchez, J.L. (1997) *Microchim. Acta* **126**, 33–38. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01242657>
- (19) Liu, B.F., Zhong, X.H., & Lu, Y.T. (2002) *J. Chromatogr. A* **945**, 257–265. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01503-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01503-5)
- (20) Gambino, G.L., Pagano, P., Scordino, M., Sabatino, L., Scollo, E., Traulo, P., & Gagliano, G. (2008) *J. AOAC Int.* **91**, 1245–1256
- (21) Oulkar, D.P., Banerjee, K., Ghaste, M.J., Ramteke, S.D., Naik, D.G., Patil, S.B., Jadhav, M.R., & Adsule, P.G. (2011) *J. AOAC Int.* **94**, 968–977. <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.SGEOulkar>
- (22) Banerjee, K., Kulkarni, S., Oulkar, D.P., & Mahesh, R. (2011) *J. AOAC Int.* [AU: REFERENCE CORRECT? ADD VOLUME AND PAGES]
- (23) Ferrer, C., Agüera, A., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A.R., Mack, D., Anastassiades, M., & Gamón, M. (2010) *J. AOAC Int.* **93**, 380–388
- (24) Luke, M.A., Froberg, J.E., & Masumoto, H.T. (1975) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **58**, 1020–1026
- (25) Lehotay, S.J. (2007) *J. AOAC Int.* **90**, 485–520
- (26) Lehotay, S.J., Mastovská, K., & Lightfield, A.R. (2005) *J. AOAC Int.* **88**, 615–629
- (27) European Commission DG-SANCO (2009) *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*, No. SANCO/10684/2009 [AU: ADDRESS?]
- (28) Fernandez-Alba, A.R., & Garcia-Reyes, J.F. (2008) *Trends Anal. Chem.* **27**, 973–990. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.009>
- (29) Lehotay, S.J., Mastovska, K., Amirav, A., Fialkov, A.B., Alon, T., Martos, P.A., de Kok, A., & Fernandez-Alba, A.R. (2008) *Trends Anal. Chem.* **27**, 1070–1090. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2008.10.004>
- (30) I. Footprint (2011) <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/1729.htm>, 2011 [AU: ACCESS DATE? WHAT DOES I STAND FOR?]
- (31) EPA (2007) in C. 0379 [AU: CORRECT? TITLE?] (Ed.) EPA 738-R-07-07017, U.S. Environmental Protection Agency, [AU: ADDRESS?]

Estudios de determinación de compuestos orgánicos a niveles traza en matrices complejas

Anexo 5

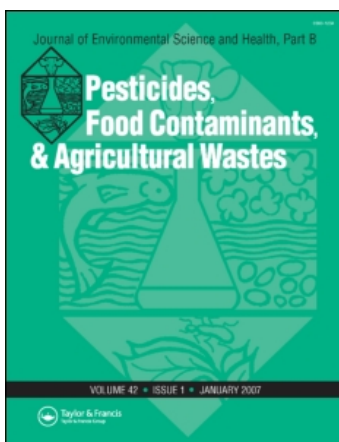
This article was downloaded by: [Heinzen, Horacio]

On: 15 October 2010

Access details: Access Details: [subscription number 928145399]

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Journal of Environmental Science and Health, Part B

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713597269>

Transfer of pesticides to the brew during mate drinking process and their relationship with physicochemical properties

ANDRÉS PÉREZ-PARADA^a; JOAQUÍN GONZÁLEZ^a; LUCÍA PAREJA^a; LUCÍA GEIS-ASTEGGIANTE^a; MARCOS COLAZZO^a; SILVINA NIELL^a; NATALIA BESIL^a; GABRIEL GONZÁLEZ^a; VERÓNICA CESIO^a; HORACIO HEINZEN^a

^a Departamento de Química Orgánica, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

First published on: 15 October 2010

To cite this Article PÉREZ-PARADA, ANDRÉS , GONZÁLEZ, JOAQUÍN , PAREJA, LUCÍA , GEIS-ASTEGGIANTE, LUCÍA , COLAZZO, MARCOS , NIELL, SILVINA , BESIL, NATALIA , GONZÁLEZ, GABRIEL , CESIO, VERÓNICA and HEINZEN, HORACIO(2010) 'Transfer of pesticides to the brew during mate drinking process and their relationship with physicochemical properties', Journal of Environmental Science and Health, Part B, 45: 8, 830 — 837, First published on: 15 October 2010 (iFirst)

To link to this Article: DOI: 10.1080/03601234.2010.515180

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2010.515180>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Transfer of pesticides to the brew during mate drinking process and their relationship with physicochemical properties

ANDRÉS PÉREZ-PARADA, JOAQUÍN GONZÁLEZ, LUCÍA PAREJA, LUCÍA GEIS-ASTEGGIANTE, MARCOS COLAZZO, SILVINA NIELL, NATALIA BESIL, GABRIEL GONZÁLEZ, VERÓNICA CESIO and HORACIO HEINZEN

Departamento de Química Orgánica, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

In order to evaluate the extraction of pesticide residues that are transferred to the brew during mate drinking process of P.U.1 yerba mate leaves (*Ilex paraguariensis*), a special device to simulate the way in which mate is drunk in Uruguay was developed. The transfer to the brew of 12 organophosphates, 5 synthetic pyrethroids and one organochlorine pesticide from spiked samples was studied. The relationship between the transfer data thus obtained and physicochemical properties like water solubility (Ws), octanol-water coefficient (Kow) and Henry's constant (H) was evaluated. The extractability of the pesticide residues from yerba mate can be correlated with log Ws and log Kow. These transfer values allowed the calculation of ARLs (acceptable residue level) for the pesticides following Food and Agriculture Organization (FAO), World Health Organization (WHO) guidelines. These results can help the future establishment of maximum residue levels (MRLs)

Keywords: Pesticides; Mercosur region; *Ilex paraguariensis*; yerba mate; Kow; water solubility; ARLs.

Introduction

Yerba mate (yerba maté or mate) is a beverage-like tea, made from dried leaves of *Ilex paraguariensis*, that is largely consumed in South American countries such as Uruguay, Brazil, Argentina and Paraguay. Yerba mate is a caffeine-rich plant material, whose consumption is spreading to other regions of the world.^[1] In the Río de la Plata basin, the infusion is prepared and consumed in a peculiar way. Dried, lightly toasted and crumbled *Ilex paraguariensis* processed leaves (50–70 g) (as described in the Uruguayan Regulation^[2]) are placed inside a gourd (called mate or

chimarrão). Small portions (about 30 mL) of hot water are poured over the yerba mate and let stand for 30 seconds. The resulting infusion is drunk by sucking through a silver pipe (called “bombilla”). The procedure is repeated until the herbal material is tasteless. The habit of mate drinking in the Mercosur region has been described by our group years ago.^[3]

An average of 300,000 tons of yerba mate is produced each year in South America. Uruguay is the largest consumer per capita of this herb, with an annual average of 8 kg inhabitant/year which means roughly 400 mL mate infusion/day/inhabitant. Argentina has an average of 5 kg/inhabitant. Yerba mate is also consumed as a cold beverage in Paraguay or in tea bags in Europe, particularly in Germany, and recently mate soft drinks are being sold in the United States and Canada.^[4,5]

Yerba mate is particularly known for its stimulant and diuretic properties due to its methyl-xanthine content: caffeine (0.5–0.8 %), theophylline (0.01–0.08 %), and theobromine (0.03 %). Recently, health promoting properties of mate have been suggested: strong free radical scavenging action^[6] and body weight reduction capacity.^[7]

Ilex paraguariensis is a small tree cultivated in Argentina, southern Brazil and Paraguay that uses the traditional

Address correspondence to Dr. Horacio Heinzen, Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, General Flores 2124, CP11800, Montevideo, Uruguay; E-mail: heinzen@fq.edu.uy.

This paper was presented at the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ‘Crop Protection Chemistry’ meeting, held during November 9–12, 2009 at Rio de Janeiro, Brazil.

Dr. Annemieke Farenhorst served as the guest editor for the publication of this paper.

Received June 2, 2010.

pest control strategies employed in agriculture worldwide. These include the use of insecticides, fungicides and herbicides in order to improve yields and productivity.^[8,9] The widespread use of pesticides in agriculture can lead to their presence as residues in crops. Thus, to prevent health problems to consumers and survey the accomplishment of good agricultural practices (GAPs), various international authorities have regulated the use of pesticides setting maximum residue levels (MRLs) for the combination commodity/pesticide that is currently employed in crops.^[10–12] Although yerba mate is consumed daily by around 50 million people in Mercosur, no MRLs have been settled for yerba mate leaves. The leaching of pesticides from plant material leaves to brews during the infusion process among other factors is strongly linked to the water solubility (Ws) and the octanol-water partition coefficient (Kow) of each pesticide.^[13–22] Therefore, in order to properly evaluate the yerba mate contribution to the daily pesticide residue intake in the Uruguayan population, pesticide transfer from leaves to hot water must be evaluated. The purposes of this study were to investigate the transfer of pesticide residues during the extraction process of commercial yerba mate as well as to examine the relationship between physicochemical properties of pesticides and their residue levels in the brew. These results will help to understand the actual contribution of pesticide intake by mate consumers. In order to accomplish this goal, an experimental model of pesticide extraction was developed to simulate the peculiar way of mate drinking by the Uruguayan population.

Materials and methods

Chemicals and materials

Acetone, CH₂Cl₂ (dichloromethane) and EtOAc (ethyl acetate) high performance liquid chromatograph (HPLC) grade were purchased from Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, USA). Anhydrous Na₂SO₄ (sodium sulphate) and Florisil as bulk powder 0.15–0.25 mm/60–100 mesh were obtained from Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Germany). Deionised water was prepared using a Milli-Q water purification system (Milford, MA, USA).

Yerba mate P.U. (Prepared for Uruguay) 1 type (without sticks and fine grinding) was purchased from a local market. As there is no blank sample available, a commercial sample was analyzed by the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) method^[23] in order to check the absence of the selected pesticides used in this study.^[24]

Pesticide analytical standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Individual pesticide stock solution of 2000 µg/mL were prepared in pure EtOAc and stored at –18°C. Mixed solutions of all pesticides at 100 µg/mL and calibration standard solutions for gas chromatograph (GC) analysis were prepared in EtOAc. Appropriate levels of standard solutions for the

spiking procedure were prepared by diluting mix standard solutions in acetone. Matrix-matched calibration was chosen for quantification purposes using bromophos-methyl (99.5 % purity) as internal standard (IS). The IS stock solution of 2000 µg/mL and working standard solution of 1 µg/mL in EtOAc were prepared and stored at –18°C until analysis. An amount measuring 1.00 mL of IS 1 µg/mL solution was added to the final extract and directly injected into the Gas Chromatograph (GC). Matrix-matched standards were also prepared by adding 1.00 mL of the mix of pesticide working solution in EtOAc containing the IS at 1 µg/mL level to blank sample extracts.

Spiking procedure

Fortified samples were obtained similarly as reported by Jaggi^[20] and Ozbey & Uygun^[13] for tea. An amount measuring 2 g of P.U. 1 yerba mate sample were spiked with 100 µg/mL of the mix standard solution in acetone and kept 24 hs. at room temperature to ensure total absorption and evaporation of the solvent. Herbal material was added to the previously spiked sample following a geometric progression (2+(2;4;8;16;32) until 64 g. In each mixing step the yerba mate was gently blended in a mortar for 30 min. in order to assess the total homogeneity of the spiked sample. Four replicates at 1 µg/g and control blanks were performed.

Mate drinking simulation

Fortified samples were extracted with hot water following a simulation of mate drinking. Sixty g of fortified yerba mate were packed into a glass device with curbi shape (gourd simulator) as shown in Figure 1. A small hole was dug in the yerba mate and 30 mL portions of hot water were poured along the flask wall in order to fill the cavity with the precaution of not covering the herb on the top with hot water. After 30 s, the resulting foamy and colored infusion was collected in a 1.5 L flask with vacuum. The procedure was repeated until a lightly colored solution was obtained, which indicates the complete extraction of the herb. Thereafter, a new hole was made in the herb, in a clockwise direction, covering the exhausted hole and starting the extraction procedure again as depicted above. This extraction procedure was repeated to complete a 360-degree rotation. The final water volume passed through was 1 L.

Pesticide residue analysis in mate infusions

Spiking procedure of mate infusion

Blank infusions were obtained as described above but using unspiked yerba mate leaves. One mL of mixed standards in acetone was transferred to a 100 mL volumetric flask and was driven to volume with blank infusion. Four replicates at 1 µg/mL were performed.

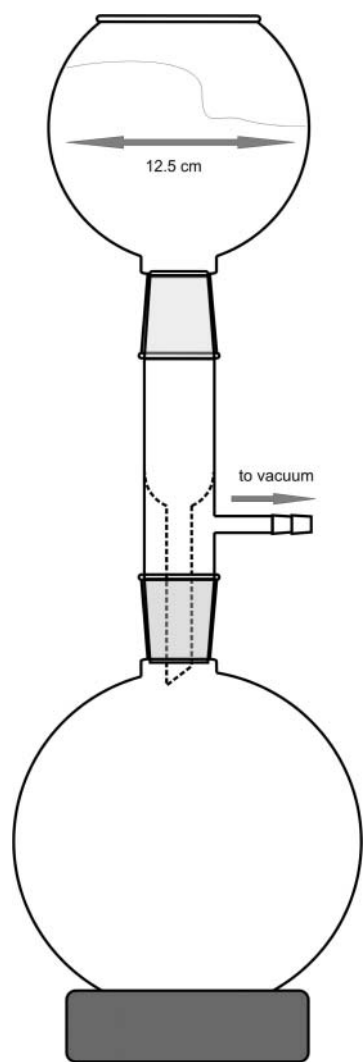


Fig. 1. Scheme of the simulation device used for the extraction of pesticides in yerba mate.

Extraction and clean-up procedure

A representative quantity of the infusion (100 mL) was placed in a 500 mL separating funnel and extracted thrice with 50 mL of CH_2Cl_2 . The combined organic extracts were dried over 5 g of anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure up to 5 mL. The extract was poured into a glass column (30 cm \times 1.1 cm i.d.) packed with 10 g of activated Florisil, 1 g of Na_2SO_4 and a glass wool plug. Thirty mL of CH_2Cl_2 were eluted from the column and the solution driven to dryness under reduced pressure. The residue was redissolved in 1.00 mL of the IS solution for GC analysis.

Apparatus and operating conditions

Organophosphorous pesticides (OPPs) were analyzed using a GC flame photometric detector (FPD) in the phosphorus mode while synthetic pyrethroids and organochlorine compounds (OCs) were analyzed simultaneously using GC

electron capture detector (ECD). Pesticide residue analysis was performed using a double-channel Shimadzu GC-17A Gas-Chromatograph equipped with Programmable Temperature Vaporizing (PTV) injector, Shimadzu AOC-20i autosampler and FPD/ECD detectors. The injector temperature program was: from 60 to 270°C at a rate of 500°C/min and then held for 15 min. Helium was used as carrier gas at a constant flow rate of 1.7 mL/min. The injection volume was 1.0 μL . OPPs analysis was done with a MEGA 68 (cyanophenyl-methylpolysiloxane) fused silica capillary column (25 m \times 0.32 mm i.d. \times 0.25 μm film thickness). The temperature of the column oven was programmed from an initial value of 100°C (5 min hold) to 270°C at a rate of 7.5°C/min (12 min hold). OCs and pyrethroid pesticides were determined with an SE 54 (5% diphenyl, 95% dimethylsiloxane) column (25 m \times 0.32 mm i.d. \times 0.25 μm film thickness). The temperature of the column oven was programmed from 100°C (2 min hold) to 180°C at 5.5°C/min (15 min hold), then to 295°C at 10°C/min (8 min hold).

Toxicological parameters estimation

As discussed earlier neither MRLs for yerba mate nor regulation were established for the pesticide residues found in it. The Acceptable Residue Level (ARL) was calculated following the World Health Organization (WHO) guidelines for quality control method for medicinal plant material^[25] according to Equation 1.

$$\text{ARL} = \frac{\text{ADI} \times \text{E} \times \text{P}}{100 \times \text{MDI}} \quad (1)$$

Where:

ARL = Acceptable Residue Level (mg/kg of plant material).

ADI = Maximum acceptable daily intake of pesticide (mg/kg of body weight (bw)).

E = Extraction or transfer factor which determines the transition rate of the pesticide from the herb to the dosage form.

MDI = Mean Daily Intake of medicinal plant product (kg), 0.028 kg in our case.

P = Body weight (kg), typical 60 kg.

Results and discussion

General

The interest in pesticide leaching during the infusion preparation of currently consumed beverages like tea has been increasing in recent years.^[13–22] As extensively reported, hot water may extract residues of certain pesticides that are transferred to the brew along with flavor and aroma.^[19] Nevertheless, no data has been published on the presence of pesticide residues in *Ilex paraguariensis* and the portion

Table 1. Descriptive comparison between tea and yerba mate drinking in Brazil, Argentina and Uruguay.

	Tea	Mate
Sample amount	2–5g	50–70 g
Brewing time	2–6 min.	0.5 min.
Water temperature	boiling	80±5°C
Final water amount	100–200 mL	1000 mL
Final water/herb ratio	100:1 to 100:2.5	100:5 to 100:7
Container	cup	gourd
Extraction type	single	successive
References	[17,19–20]	[3]

transferred to its brew. Pesticide leaching rates are influenced by the extraction method and their physicochemical properties.^[20–21] Therefore, the determination of the amount of residues that are actually ingested according to the way in which mate is drunk is important. A simulation model was developed to evaluate the transfer of pesticide to the brew following the most popular Uruguayan way of mate drinking regarding special attention on its experimental features. To simulate mate drinking conditions, sample and water amount, water temperature, brewing time and other experimental considerations were followed as it is described in Materials and Methods. Mate drinking cannot be considered a simple infusion process like tea. Whereas tea brew is usually obtained in a single 2–6 minutes step extraction in a 100:1 to 100:2.5 water-herb relationship^[17,19–20], mate brew is obtained in a different fashion. These differences have been put forward while designing the experimental model. The main differences between tea and yerba mate infusion process are represented in Table 1. As shown, in Uruguay and middle Mercosur region, the mate drinking process has lower brewing times (30 s), water temperature is usually lower (80 ± 5°C), the sample amount is higher (about 60 g) and the brew is not obtained after a single extraction step like tea but after 1 L of hot water added in portions (30 mL) continuously until tasteless.

The behavior of 12 OPPs, 5 synthetic pyrethroids and 1 OC were studied during the brewing process. Different criteria for the selection of these pesticides were followed. Pesticides found in real samples were included as well as dimethoate and some synthetic pyrethroids that are used to control the most common yerba mate pests.^[8,26] The list was completed with insecticides which have complementary physicochemical properties that can be helpful to understand the transfer phenomena and are amenable for GC analysis (see Table 2).

Pesticide residues in the infusion

The leaching behavior was studied through the determination of the percentage of transfer to the infusion (T

Table 2. Retention time (R_T ,min) and relative retention time (RR_T) of the pesticides used in this study.

	R_T (min)	RR_T^c
Bromophos-methyl ^{a,b}	21.20 ^a ;24.28 ^b	1
(Z+E) Chlorfenvinphos ^a	22.58	1.07
Chlorpyrifos ^a	20.69	0.98
Chlorpyrifos-methyl ^a	18.55	0.88
Coumaphos	29.88	1.41
λ-Cyhalothrin I ^b	36.05	1.48
λ-Cyhalothrin II	36.92	1.52
Cypermethrin I ^b	43.03	1.77
Cypermethrin II	43.13	1.78
Cypermethrin III	43.18	1.78
Cypermethrin IV	43.25	1.78
Deltamethrin I ^b	45.20	1.86
Deltamethrin I	45.59	1.88
Diazinon ^a	16.69	0.78
Dimethoate ^a	17.02	0.80
α-Endosulfan ^b	25.34	1.04
β-Endosulfan	34.80	1.43
Ethion ^a	26.31	1.24
Fenvalerate I ^b	44.42	1.83
Fenvalerate II	44.74	1.84
Malathion ^a	20.50	0.97
Methidathion ^a	23.47	1.11
Parathion-methyl ^a	19.61	0.93
Pirimiphos-methyl ^a	20.01	0.94
Propetamphos ^a	18.02	0.85
τ-Fluvalinate I ^b	44.88	1.85
τ-Fluvalinate II	44.99	1.85

^a)(GC-FPD) Gas chromatograph-flame photometric detector determination.

^b)(GC-ECD) Gas Chromatograph electron capture detector determination.

^c) Relative to bromophos-methyl (IS).

(%)) of the selected pesticides. In this way, pesticide residue analysis in the infusion was conducted according to procedures outlined by Ozbey and Uygun & Jaggi et al.^[13,20] but including some volumetric modifications in order to use a higher amount of mate infusion. A portion measuring 100 mL of infusion was used to assess the LODs and LOQs of the pesticides in the instrumental linear range as we previously reported.^[27]

Retention time for the selected compounds is shown in Table 2. The clean-up of the infusion can be considered as having the same features of tea brew samples, since high amounts of methyl-xanthines and polyphenols are co-extracted in both matrices. Method performance was studied with a recovery study at 1 µg/mL level. Most pesticides were extracted with recoveries between 75–125 % (data not shown). According to literature,^[14,20] the recovery studies were made at 1 µg/mL level assuming that T (%) varies with the type of pesticide but not with the residue concentration.

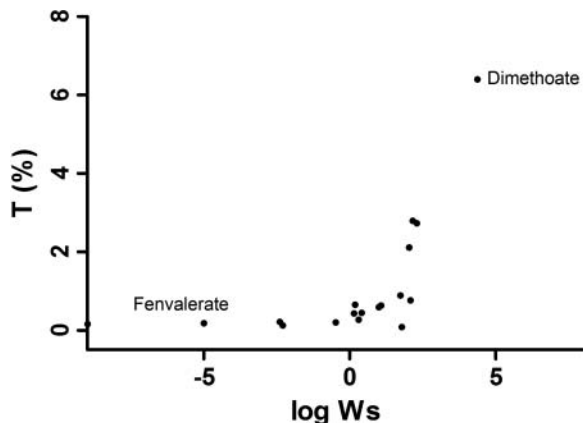


Fig. 2. Relationship between log (water solubility) Ws and T (%) (pesticide transfer).

Transfer of pesticides to the brew and relationship with their physicochemical properties

The results of the transfer of pesticides from the yerba mate to the infusion are summarized in Table 3.^[28] Residues extraction ranged from 6.40 to 0.08 % of the total amount present in the leaves. Eighty five percent of the RSDs values were <20 % while cypermethrin dimethoate and $\alpha + \beta$ endosulfan showed RSDs < 25 %. The relatively high RSD values can be assigned to the inherent variation during the mate drinking process; most of the less water-soluble pes-

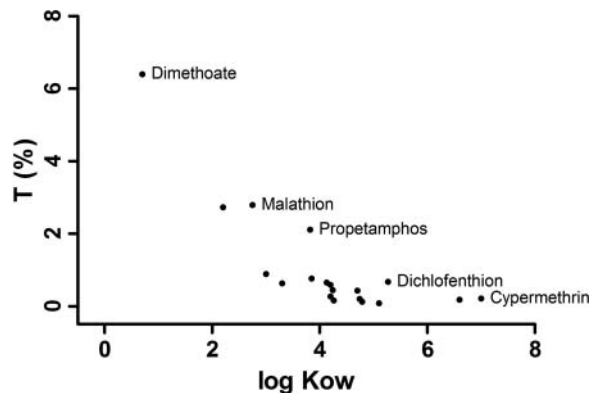


Fig. 3. Relationship between log Kow and percentage of transfer to the infusion (T%).

ticides showed the highest dispersion values. Dimethoate T (%) was the highest one (6.40 %) followed by malathion and methidathion (2.79 and 2.73 % respectively). On the other hand, deltamethrin residues are the least extracted (0.08 %). These results are in the same direction of those reported for tea,^[14,19,20] linden^[21] and peppermint brews^[13] but the T (%) values were lower for yerba mate. The T (%) of pesticides in those studies was related to their Ws. Figure 2 shows the T (%) vs log Ws of the pesticides. As expected,^[19–20] pesticides with lower Ws have the lower T (%), as it is shown for synthetic pyrethroids (λ -cyhalothrin,

Table 3. Percentage of transfer to infusion (T (%)), relative standard deviations (RSDs) and physicochemical properties of the pesticides under study.

Pesticide	T (%)	RSD (%)	log Kow*	log Ws (mg L ⁻¹) 20–25°C*	H (Pa m ³ mol ⁻¹)*
(Z+E) Chlorfenvinphos	0.76	18.6	3.85; 4.22	2.08; 0.86	—
Chlorpyrifos ^a	0.43	6.9	4.70	0.15	6.76 × 10 ⁻¹
Chlorpyrifos-methyl ^a	0.44	5.8	4.24	0.41	3.72 × 10 ⁻¹
Coumaphos	0.65	17.7	4.13	0.18	3.14 × 10 ⁻³
λ -Cyhalothrin	0.12	18.2	4.79	-2.30	2.00 × 10 ⁻²
Cypermethrin ^a	0.21	24.3	7.00	-2.40	2.00 × 10 ⁻²
Deltamethrin	0.08	15.4	5.10	-5.70	3.13 × 10 ⁻²
Diazinon ^a	0.63	18.3	3.30	1.78	6.09 × 10 ⁻²
Dichlofenthion	0.67	4.0	5.27	1.07	—
Dimethoate	6.40	21.7	0.70	4.37	1.46 × 10 ⁻⁶
$\alpha + \beta$ Endosulfan ^a	0.20	24.2	4.74	-0.48	1.48; 7.00 × 10 ⁻²
Ethion ^a	0.27	5.4	4.20	0.30	3.85 × 10 ⁻²
Fenvaterate	0.18	11.3	6.60	-5.00	—
Malathion ^a	2.79	2.3	2.75	2.16	2.21 × 10 ⁻²
Methidathion ^a	2.73	4.0	2.20	2.30	3.30 × 10 ⁻⁴
Parathion-methyl ^a	0.89	8.7	3.00	1.74	8.57 × 10 ⁻³
Pirimiphos-methyl ^a	0.59	6.1	4.20	1.00	6.00 × 10 ⁻²
Propetamphos	2.11	6.8	3.82	2.04	—
τ -Fluvalinate	0.16	18.3	4.60	-8.99	10 ⁻⁵

^a) Found in real samples.^[26]

*Data obtained from Tomlin C.^[28]

cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate and τ -fluvalinate) and $\alpha + \beta$ endosulfan. The OPPs pesticides showed from equal to higher transfer rates. Although Ws plays an important role, not necessarily T (%) depends only on this factor. An inverse trend was found when representing T (%) vs log Kow (see Fig. 3); thus the higher T (%) values were for pesticides having the lower log Kow value. According to the data presented in Table 3, the level of transfer of each pesticide can be roughly anticipated taking into account their log Ws and log Kow. According to the T (%) obtained, pesticides can be divided into three groups; T (%) < 0.2%; 0.4% < T (%) < 0.9% and T (%) > 1%. Pesticides in each level have similar range of log Kow and log Ws. Pesticides that have log Kow > 4.7 and negative values for log Ws (Ws < 1 mg/L) belong to the first group, the less extracted ones. Pesticides with intermediate T (%) level have 2.0 < log Kow < 4.7 and 0 < log Ws < 2.0. Finally, those having log Kow and log Ws > 2.0 showed the highest transfer rate. Nevertheless, no clear relationship could be inferred between T (%) and pKH (-log of the Henry's constant) but a general trend was observed (see Fig. 4): the higher T (%) the lower H value, confirming previous literature reports.^[13–14,19–21]

The pesticide transfer T (%) values described in the present work are lower than those reported in literature for other infusions.^[20] Jaggi et al.^[20] stated transfer rates values of 3.14 and 25.8% for chlorpyrifos and dimethoate respectively instead of 0.43 and 6.40% that were found for yerba mate. This behavior can be partially explained by lower temperatures used in mate drinking (80 ± 5°C) and shorter brewing times (30 s). As solubility is a temperature-dependent parameter, pesticide extractability has to be lower at lower temperature. Furthermore, it was demonstrated for these pesticides that the increase in brewing times resulted in an increased transfer of pesticides from the tea made to brew.^[20] Therefore, as the brewing time for yerba mate was 30 seconds instead of 2–6 minutes for tea, lower transfer rates are expected. It is also important to note that during mate drinking not all the herbal material

is completely extracted. The amount of extracted material depends on the way of pouring the water. This fact can lead to lower T (%) values. Nevertheless, it must be taken into account that for a similar residue level, the amount extracted is totally different. Considering, for example, 1.0 µg/g of dimethoate in tea or mate leaves, for 2 g of herb in the case of tea, the amount of pesticide to be ingested will be 0.5 µg, according to the transfer values reported;^[20] whereas in a 60 g portion of yerba mate the extracted pesticide will be 3.9 µg.

Toxicological parameters estimation

Concerning human health, MRLs for pesticides are established in food and feed following Codex Alimentarius recommendations and regional or national requirements.^[10–12] Moreover, risk evaluation and pesticide management can be assessed with internationally accepted concepts for chronic effects on human health like the ADIs. ARLs of pesticides in plant material can be calculated on the basis of the ADIs and the MDIs in kg of consumed plant^[25,29] as recommended by FAO and WHO in the guidelines for quality control of medicinal plants. Therefore, the ARLs are a good estimation of acceptable residues in the commercial yerba mate samples, taking into consideration national MDIs of plant material, pesticides used and transfer rates.

Table 4. Percentage of transfer to infusion (T (%)), Acceptable Daily Intakes (ADIs) and estimated Acceptable Residue Limits (ARLs).

	T (%)	ADI (mg/kg bw)*	Estimated ARL (mg pesticide/kg plant material)
(Z+E) Chlorfenvinphos	0.76	0.0005	0.0081
Chlorpyrifos	0.43	0.0100	0.0921
Chlorpyrifos-methyl	0.44	0.0100	0.0943
Coumaphos	0.65	0.0350	0.4875
λ -Cyhalothrin	0.12	0.0020	0.0051
Cypermethrin	0.21	0.0500	0.2250
Deltamethrin	0.08	0.0100	0.0171
Diazinon	0.63	0.0002	0.0027
Dichlofenthion	0.67	—	—
Dimethoate	6.4	0.0020	0.2743
$\alpha + \beta$ Endosulfan	0.2	0.0060	0.0257
Ethion	0.27	0.0020	0.0116
Fenvalerate	0.18	0.0200	0.0771
Malathion	2.79	0.3000	17.9357
Methidathion	2.73	0.0010	0.0585
Parathion-methyl	0.89	0.0030	0.0572
Pirimiphos-methyl	0.59	0.0300	0.3793
Propetamphos	2.11	—	—
τ -Fluvalinate	0.16	0.0100	0.0343

*Data obtained from Codex Alimentarius.^[30]

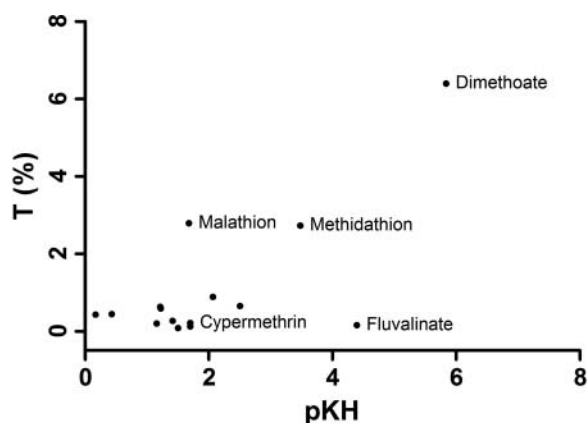


Fig. 4. Relationship between pKH (-log of the Henry's constant) and pesticide transfer T (%).

The determination of the T (%) is very useful to establish the contribution of yerba mate drinking to the daily intake of pesticides for susceptible population. ADIs values^[30] of the pesticides under study range from 0.0002 to 0.30 mg/kg bw, as it is shown in Table 4. Using the obtained T (%) values to estimate the ARLs in yerba mate and considering a 28 g MDI in Uruguay, a wide range of values were found, from 0.003 mg/kg for diazinon to almost 18 mg/kg for malathion. This estimation might help to assess further settling of pesticides MRLs for yerba mate in the Mercosur region. Nevertheless, diazinon, chlorfenvinphos and λ -cyhalothrin, have ARLs that fall beyond the limits of detection of most analytical methods available and the harmonized level of 10 μ g/kg for pesticide residues in produce.

Conclusion

It has been demonstrated that pesticide residues are extracted from yerba mate during the mate drinking process depending on their physicochemical properties. Those pesticides with higher Ws, lower log Kow and lower H, presented the higher transfer rates to the brew. This fact can be extended to other pesticides applied in yerba mate crops, like herbicides and fungicides that were not included in this study. It is noted that the amount of residues consumed is several times lower than those found in the herbal material because of the low T (%). However, the relative high amounts of yerba mate that are consumed daily can lead to high pesticide intake by the population. Future research will focus on gathering knowledge on pesticide concentration in commercial yerba mate samples to evaluate properly the contribution of mate drinking to pesticide intake by consumers. The establishment of MRLs values for pesticides in this largely consumed material is needed to ensure both GAPs accomplishment and human health protection.

Acknowledgments

This work was supported by PEDECIBA Química (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas), CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica) and Facultad de Química, UdelaR, Uruguay.

References

- [1] Heck, C.I.; de Mejia, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J. Food Sci.* **2007**, *72* (9) 138–151.
- [2] Ministerio de Salud Pública, Decreto No 315/994, *Reglamento Bromatológico Nacional*. 2nd Ed, IMPO (Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales): Montevideo, Uruguay, 1994, 198–199.
- [3] Vázquez, A.; Moyna, P. Studies on mate drinking. *J. Ethnopharm.* **1986**, *18*, 267–272.
- [4] Goldenberg, D.; Golz, A.; Zvi Joachims, H. The beverage mate: a risk factor for cancer of the head and neck. *Head & Neck* **2003**, 595–601.
- [5] Cawy Bottling Co. Inc. (Miami, FL) <http://www.cawy.net/cawy-eng.Wsf> (accessed October 2009).
- [6] Assis, J.R.; dos Santos Freitas, L.; Flores Peres, V.; Dariva, C.; de Oliveira, J.; Caramao, V.B.E. Chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): A study of extraction methods. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 2780–2784.
- [7] Dickel, M.L.; Kuze Rates, S.M.; Rejane Ritter, M. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *J. Ethnopharm.* **2007**, *109*, 60–71.
- [8] Schmalko, M.E.; Ramallo, L.A.; Ferreira, D.; Berlingheri, R.D. Dimethoate degradation in plants and during processing of yerba mate leaves. *Brazilian Archives in Biology and Technology* **2002**, *45*, 419–422.
- [9] Prat Kricun, S. Yerba Mate: Guía de buenas prácticas de producción y manufactura en yerba mate “*Ilex paraguariensis*”. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA): Buenos Aires, Argentina, 2003; 5–32. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar> (accessed October 2009).
- [10] Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO food standards programme. Report No. 08/31/24; FAO/WHO: Hangzhou, China 2008.
- [11] European Commission. Concerning the placing of plant protection products on the market, Regulation (EC) No: 1107/2009 of the European Parliament and of the Council; Off. J. Eur. Commun. No. L 309, **2009**, 1–50.
- [12] US Department of Agriculture (USDA). International Maximum Residue Level Database. <http://www.mrlidatabase.com/> (accessed March 2010).
- [13] Ozbey, A.; Uygun, U. Behaviour of some organophosphorus pesticide residues in peppermint tea during the infusion process. *Food Chem.* **2007**, *104*, 237–241.
- [14] Nagayama, T. Behavior of residual organophosphorus pesticides in foodstuffs during leaching or cooking. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2388–2393.
- [15] Sharma, A.; Gupta, M.; Shanker, A. Fenvalerate residue level and dissipation in tea and in its infusion. *Food Addit. Contam.* **2008**, *25*, 97–104
- [16] Kumar Tewary, D.; Kumar, V.; Ravindranath, S.D.; Shanker, A. Dissipation behavior of bifenthrin residues in tea and its brew. *Food Control.* **2005**, *16*, 231–237.
- [17] Gupta, M.; Sharma, A.; Shanker, A. Dissipation of imidacloprid in Orthodox tea and its transfer from made tea to infusion. *Food Chem.* **2008**, *106*, 158–164.
- [18] Kaushik, G.; Satya, S.; Naik, S.N. Food processing a tool to pesticide residue dissipation: a review. *Food Research International* **2009**, *42*, 26–40.
- [19] Manikandan, N.; Seenivasan, S.; Ganapathy, M.N.K.; Muraleedharan, N.N.; Selvasundaram, R. Leaching of residues of certain pesticides from black tea to brew. *Food Chem.* **2009**, *113*, 522–525.
- [20] Jaggi, S.; Sood, C.; Kumar, V.; Ravindranath, S.D.; Shanker, A. Leaching of pesticides in tea brew. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5479–5483.
- [21] Lino, C.M.; Silveira, M.I.N. Loss of organochlorine pesticide residues during the infusion processes of linden (*Tilia cordata* Mill.) *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2718–2722.
- [22] Gupta, M.; Shanker, A. Persistence of acetamiprid in tea and its transfer from mate tea to infusion. *Food Chem.* **2008**, *111*, 805–810.
- [23] Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the

- determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412–431.
- [24] Niell, S.; Pareja, L.; González, J.; Cesio, V.; Vryzas, Z.; Mourkidou, E.; Heinzen, H. Comparación de métodos analíticos para la determinación de residuos de plaguicidas en Yerba Mate. II Congreso de Fitoterápicos do Mercosul, Bello Horizonte MG-Brasil, December 2008, 128.
- [25] World Health Organization. Maximum limit of pesticide residues for medicinal plant materials, Quality control methods for medicinal plant materials. World Health Organization: Geneva, 1998, 54–57.
- [26] González, J.; Villagrán, V.; González, G.; Heinzen, H. Evaluation of pesticide residues in yerba mate. European Pesticide Residue Workshop, Corfu, Greece, May 2006, 84.
- [27] Pérez, A.; González, G.; González, J.; Heinzen, H. Multiresidue determination of pesticides in lanolin using Matrix Solid-Phase Dispersion. *J. AOAC Int.* **2010**, *93*, 712–719.
- [28] Tomlin, C. *The Pesticide Manual*, 14th Ed.; British Crop Protection Council: Farnahan, UK, 1996.
- [29] World Health Organization. Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues, 2nd rev. ed.; document WHO/FSF/FUS/97.7. World Health Organization: Geneva, 1997.
- [30] Codex Alimentarius Commission. Pesticide MRLs in food. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. FAO/WHO: Rome, Italy, 1997. <http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pestqs.jsp>. (accessed March 2010).

Estudios de determinación de compuestos orgánicos a niveles traza en matrices complejas

Anexo 6

Compuestos	Códigos	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Atrazina	A	-0.2970	-0.4959	-1.7586
BHT	B	-0.6387	-0.5619	0.4319
Bis (2etil-hexil) ftalato	C	-1.2911	0.1233	0.7328
Bisfenol A	D	-1.0728	0.0259	0.7070
Cafeina	E	-1.4248	-0.0586	-0.2954
Carbamazepina	F	0.4788	-1.4675	-0.2155
Clorpirifos	G	0.2777	-1.7994	0.2178
DEET	H	-1.2281	-0.4093	-0.1020
Desisopropil-Atrazina	J	-0.6678	-0.3375	-1.5034
Diclofenac	K	-0.4556	-0.0793	0.2655
Dipirona	L	-0.6404	-0.7619	0.7165
Ibuprofeno	M	-1.2318	-0.1291	-0.5007
Iminostilbeno	N	-1.4111	-0.0740	-0.2052
Metil Parabeno	O	-1.2758	-0.0973	-0.4472
Nicotina	P	0.2449	-1.7827	0.2212
Paracetamol	Q	-1.3569	-0.0120	0.4101
Paraxantina	R	-1.2151	0.0557	-0.3230
Pentaclorofenol	S	0.3363	-1.7712	0.2097
Simazina	T	0.2475	0.0324	0.0423
Teobromina	U	-1.3632	-0.0853	-0.4251
Teofilina	V	-0.6425	0.2115	0.7799
Triclosan	W	-1.1297	-0.2257	0.8815

Tabla A6a: Se muestran las puntuaciones de los primeros tres ejes factoriales para las variables. Se destacó en gris la puntuación mayor en valor absoluto de cada variable en los tres factores.

W = Wilks' lambda L = Lawley-Hotelling trace
P = Pillai's trace R = Roy's largest root

Source	Statistic	df	F(df1,	df2) =	F	Prob>F	
Model	W	0.0108	4	88.0	97.4	2.37	0.0000 a
	P	2.4446		88.0	108.0	1.93	0.0006 a
	L	12.2075		88.0	90.0	3.12	0.0000 a
	R	8.6933		22.0	27.0	10.67	0.0000 u
Residual		45					
Sitio	W	0.1049	1	22.0	24.0	9.31	0.0000 e
	P	0.8951		22.0	24.0	9.31	0.0000 e
	L	8.5353		22.0	24.0	9.31	0.0000 e
	R	8.5353		22.0	24.0	9.31	0.0000 e
Hora	W	0.1022	3	66.0	72.5	1.26	0.1685 a
	P	1.5616		66.0	78.0	1.28	0.1448 a
	L	3.5703		66.0	68.0	1.23	0.2026 a
	R	1.7036		22.0	26.0	2.01	0.0445 u
Residual		45					
Total		49					

e = exact, a = approximate, u = upper bound on F

Tabla A6b: Resultado del MANOVA de dos factores (Sitio y Hora).

Compuesto	W	Valor-p
Atrazina	633,5	0,937
BHT	535	0,046
Bis(2etil-hexil)ftalato	373	<0,001
Bisfenol A	473	0,001
Cafeína	343	<0,001
Carbamazepina	474,5	0,002
Clorpirifos	546	0,063
DEET	404,5	<0,001
Desisopropil-Atrazina	599	0,385
Diclofenac	635	0,96
Dipirona	607,5	0,56
Ibuprofeno	424,5	<0,001
Iminostilbeno	350	<0,001
Metil Parabeno	371	<0,001
Nicotina	593,5	0,393
Paracetamol	365	<0,001
Paraxantina	325	<0,001
Pentaclorofenol	612,5	0,153
Simazina	625	0,317
Teobromina	359	<0,001
Teofilina	500	0,008

Tabla A6c. Resultados del test de Wilcoxon para la comparación de las concentraciones de cada compuesto entre Entrada y Salida de la planta.

Estudios de determinación de compuestos orgánicos a niveles traza en matrices complejas

Anexo 7

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2011, 25, 731–742
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/rcm.4902

Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main transformation products by liquid chromatography/electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry

Andrés Pérez-Parada^{1,2}, Ana Agüera², María del Mar Gómez-Ramos²,
Juan F. García-Reyes³, Horacio Heinzen¹ and Amadeo R. Fernández-Alba^{2,4*}

¹Universidad de la República, Farmacognosia y Productos Naturales, Facultad de Química, 1180 General Flores 2124, Montevideo, Uruguay

²University of Almería, Department of Hydrogeology and Analytical Chemistry, Pesticide Residue Research Group, 04120 La Cañada de San Urbano, Almería, Spain

³University of Jaen, Department of Physical and Analytical Chemistry, 23071 Campus Las Lagunillas, Jaén, Spain

⁴Fundación IMDEA-Agua, C/Punto Net 4, 2ª planta, Edificio ZYE, Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Alcalá, 28805, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

The identification of transformation products (TPs) of pharmaceuticals in the environment is essentially a challenging task due to the lack of standards and the instrumental capabilities required to detect compounds (sometimes unknowns) that are produced under environmental conditions. In this work, we report the use of liquid chromatography/electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC/QTOF-MS/MS) as a tool for the identification of amoxicillin (AMX) and its main TPs in wastewater and river water samples. Laboratory degradation experiments of AMX were performed in both alkaline and acidic media in order to confirm that the expected transformation pathway in the aquatic media is through the β -lactam ring cleavage. A thorough study was carried out with both standards and real samples (wastewater and river water samples). Four compounds were identified as main TPs: both amoxicillin diketopiperazine-2',5' and amoxilloic acid diastereomers. Amoxilloic acid stereoisomers are reported for the first time in environmental matrices. The transformation product (5R)-amoxicillin diketopiperazine-2',5' was frequently detected in river waters. Besides, another AMX transformation product formed during analysis was also structurally elucidated for the first time (amoxilloic acid methyl ester) via accurate mass measurements. Collected data show that although AMX is not present as such in environmental samples, different TPs occur. This study represents a valuable indicator of the potential of LC/QTOF-MS/MS for the identification and structural elucidation of TPs in the environment using accurate MS/MS experiments, enabling thus the recognition of the environmental transformation pathway. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Penicillins are a subclass of β -lactam antibiotics which represent the most widely used antimicrobials in the last century and still constitute the most important group of antibiotics to treat or prevent bacterial infections in humans and animals.^[1] Consumption of penicillins for human use is still growing with amoxicillin (AMX) being the most widespread.^[2] Nowadays, there is an increasing concern about residues of pharmaceuticals and personal care products as well as their transformation products (TPs) in the environment. Antibiotic contamination of the aquatic environment attracts special interest as it may include the appearance of resistance.^[1,3–5] Interestingly, compared to other pharmaceuticals, AMX has a very low metabolism rate

in humans, since 80–90% AMX is excreted and therefore released to the environment as the unmodified form.^[6] However, penicillins are not usually thought to be a serious threat to the environment because of the poor stability of the β -lactam ring under pH conditions and β -lactamase activity.^[7] The opening of this ring is related to the loss of microbiological activity.^[8,9] Concerning the residues in wastewater, AMX is not regularly detected but considering its high use its analytical monitoring becomes relevant. AMX was identified in sewage treatment plants from hospitals^[10] and surface and river waters.^[11] A variety of AMX degradation products have been described as the main impurities of the drug^[12] and hydrolysis degradation products were previously identified for pharmaceutical applications.^[13,14] However, little information is available on the fate and behavior of AMX in the aquatic environment. Recently, Gozlan *et al.*^[15] and Lamm *et al.*^[9] reported for the first time the presence of AMX TPs in the environment: amoxicillin sulfoxide (an AMX photoproduct) and amoxicillin diketopiperazine-2',5' (AMX-DKP) by combining

* Correspondence to: A. R. Fernández-Alba, University of Almería, Department of Hydrogeology and Analytical Chemistry, Pesticide Residue Research Group, 04120 La Cañada de San Urbano, Almería, Spain.
E-mail: amadeo@ual.es

identification and confirmation by nuclear magnetic resonance (NMR) and liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). In this sense, it is expected that AMX TPs in the aquatic environment could be related to hydrolysis degradation, which involves the opening of the β -lactam ring. On the other hand, the identification of metabolites and environmental TPs is a challenging issue because of the lack of standards and the sensitivity and selectivity required in applied instrumental techniques. In order to provide useful qualitative information for the recognition through the structural elucidation of the compounds, the use of advanced mass spectrometric techniques which combine high sensitivity and selectivity could be a useful tool to identify AMX TPs.

LC/MS instruments with high resolution and accurate measurements capabilities, such as LC/TOFMS (time-of-flight mass spectrometry), have recently been used for confirmation of organic contaminants in the environmental field. However, its potential may be limited to unknown species because real MS/MS experiments isolating a precursor ion cannot be accomplished, so that the only fragmentation information that can be used is that from the in-source CID (collision-induced dissociation) experiments, as the fragmentation information heavily depends on the nature of the targeted species. Liquid chromatography/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (LC/QTOF-MS/MS) can overcome these limitations thanks to the ability of performing dedicated MS/MS experiments obtaining full scan product ion spectra (MS/MS) with accurate masses of fragment ions. The intrinsic characteristics of highly accurate mass measurement and sensitivity in full-scan acquisition mode originally from single TOF instruments are complemented with the structural information provided by the hybrid Q-TOF systems when working in product ion scan mode. This enables the effective screening and reliable identification of a large number of TPs even without the need for primary standards.^[16,17] In this work, we used LC/QTOF-MS/MS as a tool for the trace identification of main TPs of AMX. To investigate the fate of AMX in wastewater from a wastewater treatment plant (WWTP) and river waters from Spain, we have applied off-line solid-phase extraction (SPE) followed by LC/QTOF-MS/MS analysis. We focused on the simultaneous and unambiguous detection and confirmation of the main AMX TPs under environmental conditions by tandem (MS/MS) accurate mass spectrometric measurements. These identified analytes may be readily included in further monitoring programs and helped us to elucidate the main AMX transformation pathway in the aqueous environment.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

Amoxicillin sodium salt reference standard (97% purity) was obtained from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). A stock solution (at about 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was prepared in ultrapure water. Ultrapure water for residue analysis was obtained from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). High-purity grade methanol (MeOH) and acetonitrile (MeCN) were purchased from Merck GmbH (Darmstadt,

Germany). Formic acid (FA) and ammonium hydroxide (NH_4OH) were obtained as 98% and 28% solutions from Fluka (Buchs, Switzerland). Commercial SPE cartridges (OasisTM HLB; divinylbenzene/*N*-vinylpyrrolidone copolymer, 200mg, 6 cc) were purchased from Waters (Milford, MA, USA).

Samples and sampling sites

Wastewater samples used in this study were collected from a municipal WWTP located in Almería (southeast Spain). The plant is connected to a sewage system servicing a municipal area with $\sim 78\,000$ inhabitants. The plant applies a pre-treatment for solid removal, a primary treatment carried out in circular sedimentation tanks to eliminate suspended material, an activated sludge biological treatment and a final clarification.^[18] Daily composite samples of raw influent and discrete samples of treated effluent were taken during three consecutive days. The river water samples analyzed in this study were collected from five rivers located in Madrid (centre of Spain) at two different zones (centre and south of the province). The streams run through several residential, industrial and agricultural areas. A total of eight water samples were subject to research in this study (zones B and C, for details, see Martínez-Bueno *et al.*^[19]). Grab water samples (1 L) were collected in clean amber glass bottles. Before sample collection, each bottle was properly pre-rinsed. The samples were sent in boxes packed with ice to the laboratory for subsequent analysis. Upon reception, samples were filtered through a 0.7 μm glass fiber filter (Teknokroma, Spain), stored in the dark at 4°C and extracted within 48 h of collection in all the cases. The natural pH of the collected samples ranged from 7.4 to 8.0 in all the cases.

AMX laboratory degradation and stability experiments

A stock standard solution containing AMX was prepared at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in water and it was diluted 10-fold to give a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ working solution. Preparation of hydrolysis TPs was performed by preparing AMX aqueous solutions (500 ng/mL) in both alkaline and acidic media conditions through the addition of NH_4OH or FA (pH 10 and 2, respectively). These solutions were stored in amber vials to prevent possible contribution of photolysis reactions. In the absence of standards, analytical information obtained from the identification of these TPs generated (retention time, accurate mass, fragmentation pattern) was used to identify them in real samples. In the same way, to study the natural pH contribution for AMX hydrolysis, AMX stability experiments were performed at room temperature for pH 7 and 8. These solutions were analyzed in daily intervals for 10 days.

Sample treatment

A solid-phase extraction (SPE) procedure was applied to wastewater and river water samples using commercial HLB cartridges. A vacuum manifold from Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA) connected to an external 306 LC pump from Gilson (Villiers-le-Bel, France) was used for sample preparation. According to previous experience,^[19,20] HLB cartridges were preconditioned with 6 mL of MeOH and 5 mL of deionised water HPLC-grade (pH adjusted to 8 employing NH_4OH

solution) at a flow rate of 3 mL/min. After the conditioning step, aliquots of sample (also previously adjusted to pH 8) were loaded into the cartridge. The samples were passed through at a flow rate of 10 mL/min. The loaded sample volume was 100 mL for wastewater samples and 400 mL for river samples. Elution was performed by 2×4 mL portions of MeOH at a flow of 3 mL/min. The extracts were evaporated until near dryness under a gentle stream of nitrogen using a Turbo-Vap from Zymark (Hopkinton, Massachusetts), water bath temperature at 35°C. Before analysis, the samples were reconstituted with 1 mL of MeCN/water, 1:9 (v/v), and finally were directly filtered into a vial using a 0.45 μ m PTFE syringe filter.

LC/QTOF MS/MS

A LC/ESI-QTOF-MS/MS system operating in the positive ionization mode was used throughout the study. Separation was performed by an HPLC system (Agilent Series 1200, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a reversed-phase XDB-C₁₈ analytical column (4.6 \times 50 mm, 1.8 μ m particle size; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Mobile phase A was MeCN with 0.1% FA and 5% Milli-Q water. Mobile phase B was Milli-Q water with 0.1% FA. The elution gradient started from 10% A (3 min isocratic) to 100% A in 22 min, and kept for 3 min at 100% A. The flow rate was 0.5 mL/min and the injection volume 20 μ L. The HPLC system was connected to a hybrid quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer (Agilent 6530 Series Accurate Mass QTOF MS; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Ions were generated using an ESI Jet Stream ion source. Operation conditions were as follows: superheated nitrogen sheath gas temperature 400°C at a flow rate of 12 L/min; capillary voltage: 4 kV; nebulizer pressure: 60 psig; drying gas: 5 L/min; gas temperature: 250°C; skimmer voltage: 65 V; octapole RF peak: 750 V; fragmentor voltage: 90 V. The m/z axis was calibrated using the reference mixture provided by the manufacturer over the range 40–950 m/z . A second sprayer with a reference solution was used as continuous calibration in positive mode using the masses of purine (m/z 121.0509) and HP-921 (m/z 922.0098). The instrument was operated in the 4 GHz high-resolution mode. The resolution displayed by the instrument with these conditions was 21700 ± 500 at 922.0098 m/z . MS/MS spectra were acquired over the 40–950 m/z range at a scan rate of 0.5 s per spectrum. MS/MS spectra were obtained using variable collision energy (5–10 eV) for each compound. Acquired data were processed with Agilent MassHunter Workstation Software (version B.03.01).

RESULTS AND DISCUSSION

Identification and confirmation of AMX degradation products through laboratory degradation experiments

The main issue related to the unusual detection of AMX in the environment is related to its instability in aqueous systems. Stability of AMX in aqueous solution was assayed in the laboratory with standard solutions of AMX in both alkaline (pH 10) and acidic (pH 2) media. An LC/QTOF system operating in full scan mode was used with this aim.

Degradation of AMX is easily evidenced by the decrease in the AMX peak area while other peaks showed up in the total ion chromatogram (TIC). It was observed that the degradation of AMX was spontaneous and fast under both acidic and basic conditions (less than 5 min). However, the profile of degradation products found depends on the selected media, time and temperature. A 24-h period was enough to obtain the complete degradation of AMX in alkaline media while, in acidic media, residues of AMX could still be identified after 5 days. Preliminary identification of the species was based on accurate mass measurement of the molecular ions with a mass error <5 ppm in the full scan acquisition mode. Further accurate MS/MS measurement and observation of characteristic fragmentation pattern of the precursor ion provides valuable information for the reliable confirmation of TPs during laboratory degradation experiments. The possibility of a safe identification and confirmation using accurate mass analysis and performing MS/MS experiments is very helpful in the elucidation of a compound that is not present in a library (as normally occurs with metabolites and TPs) nor standard is commercially available.^[17] In spite of that, a variety of AMX degradation products could be obtained through laboratory degradation experiments that were further correlated with the positive findings of AMX TPs in real samples. It should be emphasized that any of these degradation products may not be relevant from an environmental point of view since there are minor or unstable degradation products as it is expected the main transformation pathway in the environment would be evidenced by the detection of stable TPs. In order to identify AMX TPs, the elemental compositions for previously reported hydrolysis degradation products^[12–14] and possible intermediates^[8,21] in both acidic and alkaline media were used as a reference (see Table 1). Under the selected conditions in full scan analysis, AMX degradation products were tentatively identified by extracted ion chromatograms (XICs) using a 10 ppm error window and the obtained retention times were recorded. As can be seen in Table 1 the experimental masses (m/z) for protonated compounds deviate from the calculated molecular masses ranging from -0.77 ppm for (5S)-amoxicillin diketopiperazine-2',5' to 3.31 ppm for 4-hydroxyphenylglycine. The accurate mass CID MS/MS spectrum of the parent drug AMX was obtained by selecting the protonated molecule ($[M + H]^+$) at m/z 366 as precursor ion to yield the fragment pattern shown in Fig. 1. The experimental mass of protonated AMX (m/z 366.1117) had a deviation of -4.09 ppm. Tentative structures for main fragment ions are also shown in Fig. 1. The presence of the characteristic diagnostic ion common to penicillins C₆H₁₀NO₂S (calculated m/z 160.0427) can be observed that is obtained by the cleavage of the five-membered thiazolidine ring.^[13] Besides, the product ion with m/z 349.0841 (C₁₆H₁₇N₂O₅S) corresponds to the neutral loss of ammonia. The tentative structures proposed are based considering the best fit of logical elemental formulas for the ions with accepted accurate mass error values together with the double bond and ring equivalent (DBE) values.

The accurate mass measurements and elucidation of product ions for AMX were consistent with previous identification using LC/TOFMS^[13] with the exception of the ion with m/z 114.0029 (100% relative abundance). Accordingly to recent results reported by Trovó *et al.*^[22] using CID TOF-MS,

Table 1. LC/QTOF-MS full scan acquisition for the identification of AMX degradation products and intermediates in laboratory degradation experiments

Compound number	Acronym Compound	Elemental formula	Experimental mass (<i>m/z</i>)	Calc. <i>m/z</i>	Error (ppm)	DBE	R _T (min)
1	AMX	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	366.1117	366.1118	0.21	9	1.9
2	(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-AMXC	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₆ S	384.1222	384.1229	0.55	8	1.5
3	(5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-AMXC	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₆ S	384.1217	384.1229	1.74	8	1.6
4	(5 <i>S</i>)-AMX-DKP	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	366.1120	366.1118	-0.77	9	8.3
5	(5 <i>R</i>)-AMX-DKP	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	366.1119	366.1118	-0.29	9	7.9
6	(5 <i>S</i>)-AMXO	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₄ S	340.1321	340.1326	1.35	7	1.8
7	(5 <i>R</i>)-AMXO	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₄ S	340.1324	340.1326	0.43	7	2.1
8	4-HPG	C ₈ H ₉ NO ₃	168.0651	168.0655	3.31	5	1.2
9	6-APA	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	217.0636	217.0641	2.58	4	1.1
10	N-P-4HG	C ₁₃ H ₁₇ NO ₄	—	252.1230	—	—	n.d.
11	2H-3(4H) PP	C ₁₀ H ₈ N ₂ O ₂	189.0654	189.0659	2.61	8	1.0
12	4-HPGA	C ₂₄ H ₂₆ N ₄ O ₇ S	515.1579	515.1595	3.10	14	3.3
13	AMX-PNA	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	—	209.0921	—	—	n.d.
14	AMX-PNAL	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₅ S	—	253.0819	—	—	n.d.
15	AMXC-Me	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₆ S	398.1378	398.138	0.5	8	7.0

Accurate mass measurements of molecular ions of target compounds with their elemental formulas, calculated accurate masses, mass errors, DBE (double bond and ring equivalent) values and retention times. 4-HPG = 4-hydroxyphenylglycine, 6-APA = 6-aminopenicillanic acid, AMXC = amoxicilloic acid ((5*S*,6*R*) & (5*R*,6*R*)), AMX-DKP = amoxicillin diketopiperazine-2',5' ((5*R*) & (5*S*)), AMXO = amoxilloic acid ((5*S*) & (5*R*)), N-P-4HG = N-pivaloyl-4-hydroxyphenylglycine, 4-HPGA = 4-hydroxyphenylglycyl-amoxicillin, AMX-PNA = amoxicillin penicilloaldehyde, AMX-PNAL = amoxicillin penaldic acid, AMXC-Me = amoxicilloic acid methyl ester, 2H-3(4H) PP-2-hydroxy-3-(4-hydroxy)phenylpyrazine, n.d. = not detected.

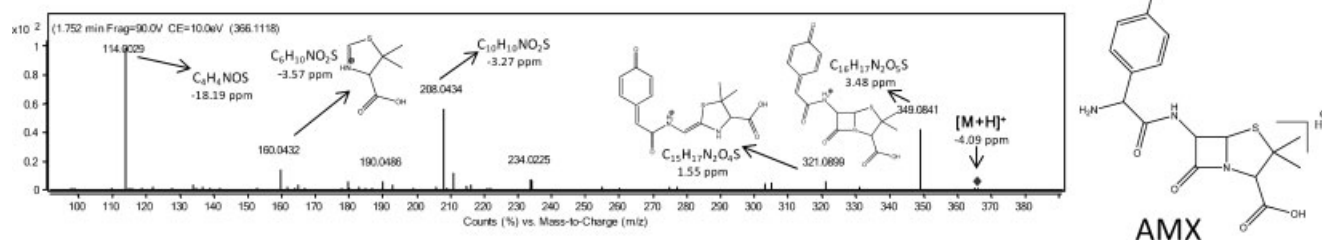
we assigned the ion formula C₄H₈NOS (calculated *m/z* 114.0008) with a deviation of -18.19 ppm. In contrast, Nägele and Moritz^[13] only found by using in-source CID TOF-MS the ion *m/z* 114.0383 that can be assigned the molecular formula C₅H₈NS (calculated *m/z* 114.0377).

On the other hand, the XIC of the AMX protonated molecule [M+H]⁺ at *m/z* 366 in the full scan analysis also reveals the appearance of two isobaric compounds in which the formation kinetics was readily favoured when degradation was performed in alkaline media. Identification through accurate mass measurements gave the same molecular formula of AMX (C₁₆H₁₉N₃O₅S) with mass deviations of -0.29 and -0.77 ppm at the retention times 7.9 and 8.3 min, respectively, as shown in Table 1. Further CID MS/MS analysis gave a different fragmentation pattern that helped to distinguish them from the parent drug, as shown in Fig. 2(a).

Table 2 shows the obtained fragments by MS/MS of the identified TPs during laboratory degradation experiments. Only four fragment ions were found for both compounds: *m/z*

207, 160, 114 and 113. Accurate mass analysis gave the following formulas: C₁₆H₂₀N₃O₅S, C₁₀H₁₁N₂O₃, C₆H₁₀NO₂S, C₅H₈NS and C₄H₅N₂O₂ for the calculated *m/z* 366.1118, 207.0764, 160.0427, 114.0372 and 113.0346. Mass errors vary for each peak from -14.95 to 0.97 ppm and -13.41 to 8.12 ppm at the retention times 8.3 and 7.9 min, respectively (see Table 2). However, precursor ions with three and two product ions were accurately obtained. The proposed ion structures for AMX-DKPs are shown in Fig. 2(a) in which the formation of the ion *m/z* 114 is consistent with a typical neutral loss of 46 Da corresponding to a carboxylic group moiety. Furthermore, the fragmentation pattern and relative abundances for both peaks were found to be very similar.

Therefore, through the fragmentation pattern^[13] and previously reported reversed-phase LC elution order in drug impurity analysis,^[14] these compounds were assigned to the diastereomers (5*R*)-amoxicillin diketopiperazine-2',5' and (5*S*)-amoxicillin diketopiperazine-2',5' ((5*R*)-AMX-DKP and (5*S*)-AMX-DKP, respectively).

**Figure 1.** AMX accurate MS/MS spectrum at 10 eV collision energy: identified ions and proposed ion formulas.

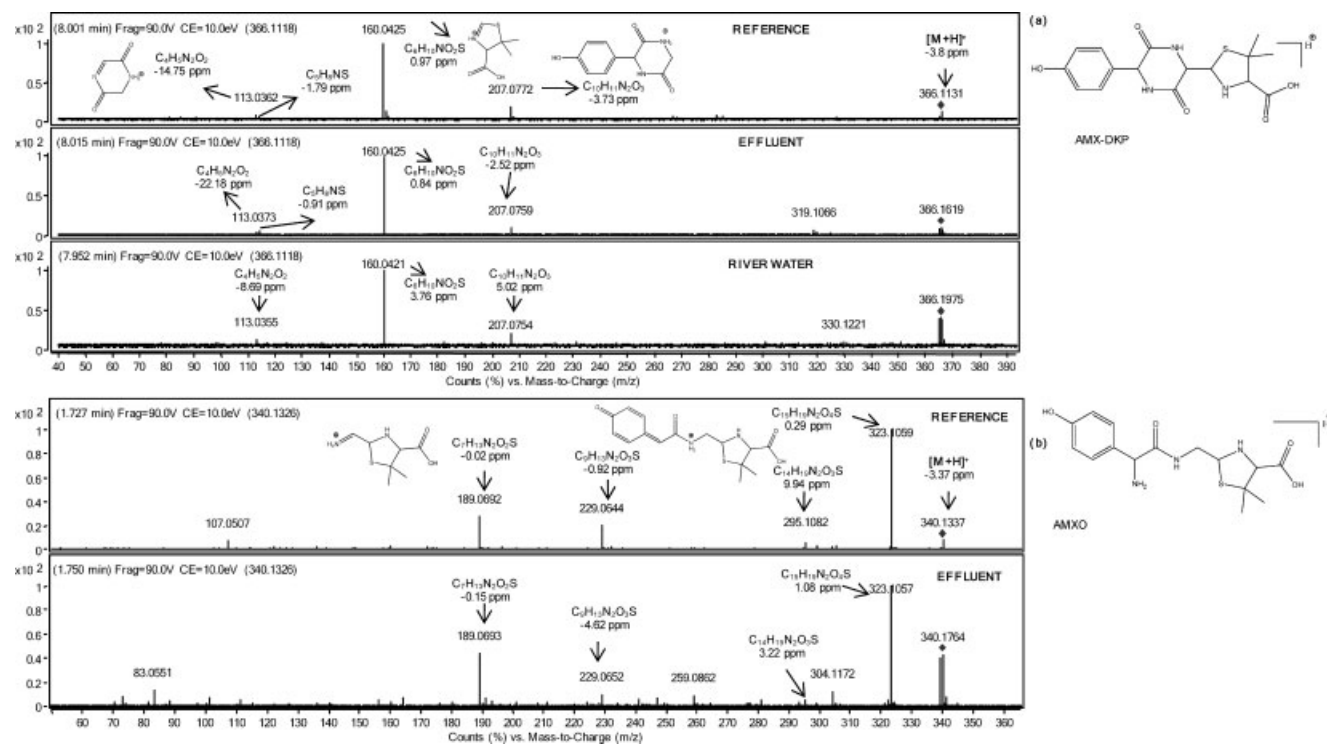


Figure 2. (a) Comparison of MS/MS spectra (10 eV) obtained during laboratory degradation experiments, and positive finding of the species (5R)-AMX-DKP in effluent and river water samples. (b) Comparison of (5S)-AMXO MS/MS spectra (10 eV) obtained during laboratory degradation experiments, and positive finding in effluent wastewater.

Besides, the XIC of $[M + H]^+$ (m/z 340.1326) also revealed the appearance of two new compounds with ion formula $C_{15}H_{22}N_3O_4S$ whose formation was favoured when degradation was performed in acidic media (mass errors 1.35 and 0.43 ppm at the retention times 1.8 and 2.1 min). Four common fragments ions were obtained for both peaks when performing CID MS/MS at m/z 323, 295, 229 and 189, as shown in Fig. 2(b). Accurate mass analysis gave the following formulas for both peaks: $C_{15}H_{22}N_3O_4S$, $C_{15}H_{19}N_2O_4S$, $C_{14}H_{19}N_2O_3S$, $C_9H_{13}N_2O_3S$ and $C_7H_{13}N_2O_2S$ whose respective mass errors were -3.37 and 2.94 , 0.29 ppm; 4.39 , 9.94 and 3.34 ppm; -0.92 and 6.18 ppm; -0.02 and 5.03 ppm (as can be seen in Table 2). Likewise to AMX-DKPs, these compounds were assigned to the diastereomers (5S)- and (5R)-amoxicilloic acid ((5S)-AMXO and (5R)-AMXO, respectively) based on the assignment through its previously reported fragmentation pattern^[13] and chromatographic elution order.^[14]

Identification of amoxicilloic acid methyl ester produced in sample preparation by LC/QTOF-MS/MS

The selection of sample preparation treatment for real samples was based on a universal pre-concentration method to detect AMX and its TPs in water instead of optimized conditions for further quantitative analysis. Off-line SPE using HLB was employed in wastewater and river water samples which achieved pre-concentration coefficients were 100-fold for wastewater and 400-fold for river water. Several studies have used SPE (HLB solid phase) and MeOH as eluent in the monitoring of AMX residues and pharmaceuticals.^[16,18–20,23–29] Similarly to this work, Li *et al.* reported the

selection of HLB and MeOH as eluent in the pre-concentration of a variety of TPs of penicillin G (PEN G) in wastewater and surface water from a PEN G production facility.^[8] However, the instability of penicillins in alcoholic media was also previously reported.^[30] We found a gradual degradation of AMX even when working standard solutions were prepared in MeOH/H₂O (1:9) or extracts were reconstituted in this solvent mixture. Therefore, the use of MeOH was avoided in the preparation of standards and reconstitution of the extracts but it is important to note that AMX could be transformed during the sample preparation step through the use of MeOH as eluent. Preliminary experiments to simulate the extraction of AMX in wastewater were made in spiked synthetic wastewater with AMX at 1 µg/L. Low recoveries for AMX were obtained ($35 \pm 9\%$, $n = 3$). Similarly to the other TPs, we used accurate tandem mass spectrometry to structurally elucidate the compound amoxicilloic acid methyl ester (AMXC-Me).^[31–33] It was evidenced that in the elution step appreciable amounts of AMXC-Me (ion formula $C_{17}H_{23}N_3O_6S$, m/z 398.1378; 0.50 ppm mass error) were formed (see Table 1). Structural elucidation for this compound was based on accurate mass measurements combined with MS/MS data from product ions.

The product ion mass spectra using the protonated molecule (m/z 398) as precursor ion is shown in Fig. 3. It can be inferred that the experimental mass of the precursor ion of AMXC-Me (m/z 398.1383) had a deviation of -0.67 ppm, as shown in Table 2. Tentative structures for the fragment ions are also included in Fig. 3 (fragment ions at m/z 381.1109, 349.0852, 335.106, 222.0746, 194.0822 and 160.0424). The following formulas were assigned with their corresponding

Table 2. Accurate mass analysis of AMX and AMX TPs by LC/QTOF-MS/MS in laboratory degradation experiments

	Formula	Calculated m/z	Experimental m/z	Error (ppm)	RA ^a	DBE ^b
AMX	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅ S	366.1118	366.1133	-4.09	2	8.5
	C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₅ S	349.0853	349.0841	3.48	43	9.5
	C ₁₅ H ₁₇ N ₂ O ₄ S	321.0904	321.0899	1.55	5	8.5
	C ₁₀ H ₁₀ NO ₂ S	208.0427	208.0434	-3.27	57	6.5
	C ₆ H ₁₀ NO ₂ S	160.0427	160.0432	-3.57	18	2.5
	C ₄ H ₄ NOS	114.0008	114.0029	-18.19	100	3.5
(5S)-AMXO	C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O ₄ S	340.1326	340.1337	-3.37	10	6.5
	C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₄ S	323.106	323.1059	0.29	100	7.5
	C ₁₄ H ₁₉ N ₂ O ₃ S	295.1111	295.1082	9.94	5	6.5
	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃ S	229.0641	229.0644	-0.92	20	4.5
	C ₇ H ₁₃ N ₂ O ₂ S	189.0692	189.0692	-0.02	28	2.5
	C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O ₄ S	340.1326	340.1316	2.94	8	6.5
(5R)-AMXO	C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₄ S	323.106	323.1046	4.39	100	7.5
	C ₁₄ H ₁₉ N ₂ O ₃ S	295.1111	295.1101	3.34	8	6.5
	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃ S	229.0641	229.0655	-6.18	22	4.5
	C ₇ H ₁₃ N ₂ O ₂ S	189.0692	189.0683	5.03	30	2.5
	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅ S	366.1118	366.1131	-3.5	8	8.5
	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₃	207.0764	207.0772	-3.73	11	6.5
(5R)-AMX-DKP	C ₆ H ₁₀ NO ₂ S	160.0427	160.0425	0.97	100	2.5
	C ₅ H ₈ NS	114.0372	114.0374	-1.79	4	2.5
	C ₄ H ₅ N ₂ O ₂	113.0346	113.0362	-14.75	15	3.5
	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅ S	366.1118	366.1124	-4.64	23	8.5
	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₃	207.0764	207.0748	8.12	28	6.5
	C ₆ H ₁₀ NO ₂ S	160.0427	160.0432	-3.51	100	2.5
(5S)-AMX-DKP	C ₅ H ₈ NS	114.0372	114.0377	-4.24	3	2.5
	C ₄ H ₅ N ₂ O ₂	113.0346	113.0361	-13.41	20	3.5
	C ₁₇ H ₂₄ N ₃ O ₆ S	398.138	398.1383	-0.67	16	7.5
	C ₁₇ H ₂₁ N ₂ O ₆ S	381.1115	381.1109	1.53	100	8.5
	C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₅ S	349.0853	349.0852	0.20	77	9.5
	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₄ S	335.106	335.106	0.11	9	8.5
AMXC-Me	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄	222.0761	222.0746	6.70	13	6.5
	C ₁₀ H ₁₂ NO ₃	194.0812	194.0822	-5.17	8	5.5
	C ₆ H ₁₀ NO ₂ S	160.0427	160.424	1.9	24	2.5

^a RA: relative abundance; ^b DBE: double bond and ring equivalent. Values at 10 eV collision energy.

mass errors for product ions: C₁₇H₂₁N₂O₆S (1.53 ppm), C₁₆H₁₇N₂O₅S (0.20 ppm), C₁₆H₁₉N₂O₄S (0.11 ppm), C₁₁H₁₂NO₄ (6.70 ppm), C₁₀H₁₂NO₃ (-5.17 ppm) and C₆H₁₀NO₂S (1.9 ppm), which provide further evidence on the identity of the proposed AMX derivate. The simultaneous presence of the ions m/z 222 and 160 reveals the opening of the β -lactam ring with formation of a methyl ester group. It is also evidence of AMX transformation during analysis. As an approach to every AMX determination, in order to ensure that AMX was not degraded during sample preparation, we have included AMX molecular ion $[M + H]^+ = m/z$ 366.1118 along with $[M + H + 32]^+ = m/z$ 398.1380 that is directly related with AMX occurrence in the samples. Moreover, we also identified minor conversion into the isobaric stereoisomers AMX-DKPs (m/z 366). These results are complementary information on multi-residue method performance for AMX which are typically related with low recoveries. Therefore, because of pH adjustment in the sample preparation step, the opening of the β -lactam ring with further arrangement of the molecule to give AMX-DKPs is another transformation pathway for AMX that needs to be considered.

LC/QTOF-MS/MS for target screening of AMX TPs in wastewater and river water samples

The confirmation of TPs in real samples was also accomplished by the use of the elemental composition information for both the protonated molecule and their characteristic fragment ions provided by LC/QTOF-MS/MS accurate mass measurements. Positive identification of the compounds was based on: accurate mass measurements of the precursor ion with a mass error <5 ppm and accurate mass measurement of at least one specific product ion, ion intensity relationships and LC deviation in retention time of the analyte compared with the obtained data from the laboratory degradation experiment of pure standard ($\pm 2\%$).^[26] Nevertheless, in some cases this approach could not be followed due to isobaric interferences of the matrix. We found that the selection of a narrow window for MS/MS analysis ($\Delta m/z = 1.3$) was not enough for a complete isolation of the precursor ion from the matrix (principally in wastewater samples). Normally, MS/MS experiments for AMX and its laboratory degradation products were carried out varying collision energy. In order

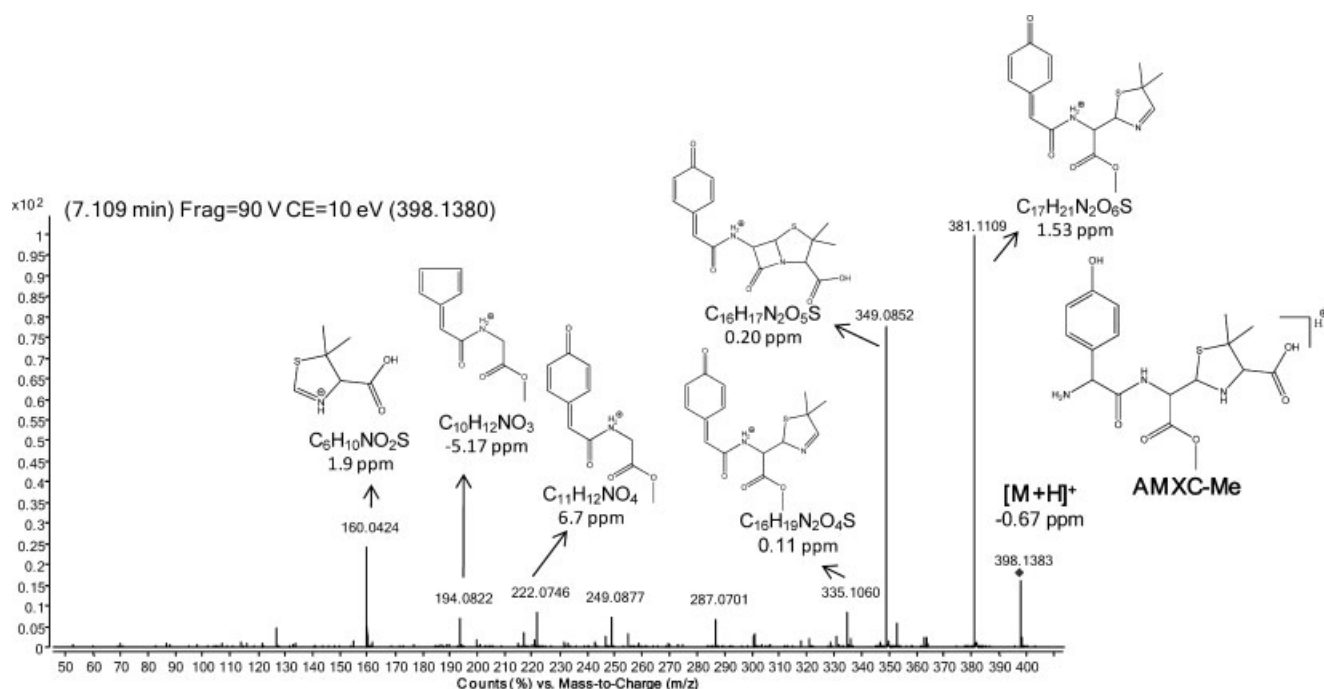


Figure 3. AMXC-Me spectrum at 10 eV collision energy: identified ions and proposed ion formulas.

to yield a higher fragmentation pattern in real samples, a collision energy of 10 eV was selected to obtain more sensitive response for product ions. Product ions with both accurate mass and relative abundance were also evaluated for

confirmatory purposes. This collision energy also provides confirmation and structural elucidation via product fragments. Higher collision energies resulted in the total loss of abundance of the $[M + H]^+$ ion.

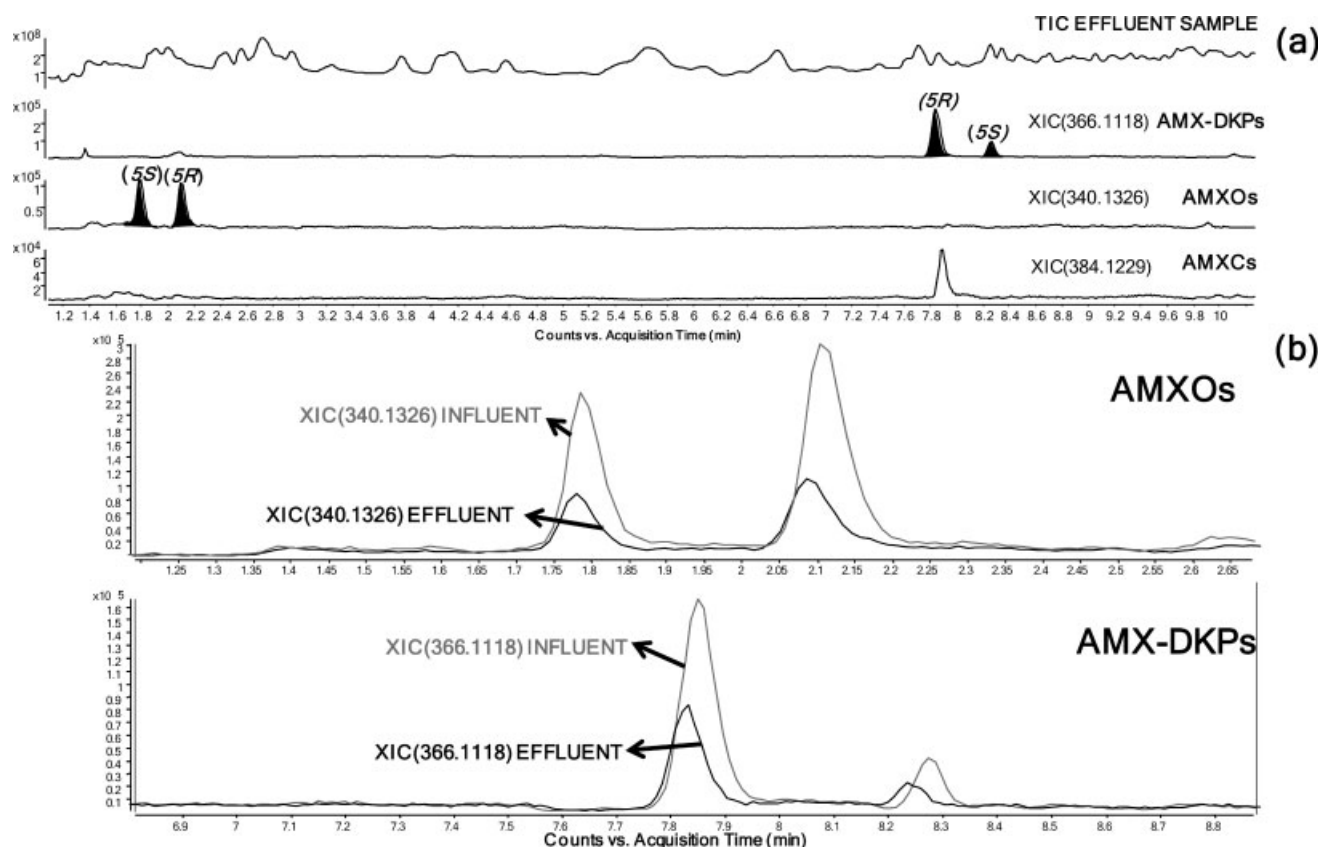


Figure 4. (a) TIC and XIC profile highlighting identified AMX TPs in effluent sample. (b) Decrease in AMXOs and AMX-DKPs diastereomer peak areas by LC/MS after wastewater treatment.

Table 3. Confirmation parameters of AMX TPs in real samples by LC/QTOF-MS/MS at 10 eV collision energy

Analyzed samples	Positive samples/ <i>n</i> samples	Precursor ion MS				Product ion MS/MS				ΔR_T (%) ^c
		Compound	Formula	Calc. <i>m/z</i>	Mean mass error (Mean Δ ppm)	Formula	Calc. <i>m/z</i>	MS/MS mean mass error (Mean Δ ppm)	MRA ^b	
3 Influent	3/3	(5S)-AMXO	C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O ₄ S	340.1326	1.47	C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₄ S	323.106	4.45	100	0.08
						C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃ S	229.0641	9.41	15	
						C ₇ H ₁₃ N ₂ O ₂ S	189.0692	3.16	22	
3/3	(5R)-AMXO	C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O ₄ S	340.1326	2.02	C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₄ S	323.106	2.49	100	0.05	
					C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃ S	229.0641	4.87	15		
					C ₇ H ₁₃ N ₂ O ₂ S	189.0692	7.20	18		
3/3	(5R)-AMX-DKP	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅ S	366.1118	2.55	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₃	207.0764	1.32	17	0.08	
					C ₆ H ₁₀ NO ₂ S	160.0427	2.08	100		
					C ₄ H ₅ N ₂ O ₂	113.0346	8.27	8		
3/3	(5S)-AMX-DKP	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅ S	366.1118	3.02	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₃	207.0764	3.90	19	0.05	
					C ₆ H ₁₀ NO ₂ S	160.0427	5.01	100		
					C ₄ H ₅ N ₂ O ₂	113.0346	13.47	10		
3 Effluent	3/3	(5S)-AMXO	C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O ₄ S	340.1326	1.61	C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₄ S	323.106	1.77	100	0.07
						C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃ S	229.0641	2.53	15	
						C ₇ H ₁₃ N ₂ O ₂ S	189.0692	4.66	29	
3/3	(5R)-AMXO	C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O ₄ S	340.1326	1.70	C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₄ S	323.106	2.78	100	0.03	
					C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃ S	229.0641	2.87	16		
					C ₇ H ₁₃ N ₂ O ₂ S	189.0692	4.53	20		
3/3	(5R)-AMX-DKP	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅ S	366.1118	3.31	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₃	207.0764	4.87	18	0.03	
					C ₆ H ₁₀ NO ₂ S	160.0427	6.94	100		
					C ₄ H ₅ N ₂ O ₂	113.0346	11.41	7		
3/3	(5S)-AMX-DKP	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅ S	366.1118	2.12	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₃	207.0764	7.45	19	0.06	
					C ₆ H ₁₀ NO ₂ S	160.0427	4.34	100		
					C ₄ H ₅ N ₂ O ₂	113.0346	12.79	9		
8 River water	5/8	(5R)-AMX-DKP	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅ S	366.1118	3.56	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₃	207.0764	5.92	13	0.04
						C ₆ H ₁₀ NO ₂ S	160.0427	4.02	100	
						C ₄ H ₅ N ₂ O ₂	113.0346	18.14	5	

^a $|\text{Mean deviation } (\Delta \text{ ppm})| = \frac{|\sum \text{ errors (ppm)}|}{n}$ where *n* indicates the number of positive findings.

^b Mean relative abundance.

^c ΔR_T (%) = percentage deviation in retention time.

Six wastewater samples from a WWTP (Almeria, Spain), three influents and their respective effluents, were analyzed as previously reported.^[19] AMX and AMXC-Me residues were absent in all samples. Screening of all protonated molecules of identified degradation products shown in Table 1 was performed in the acquired MS mode for all wastewater samples using the window tolerance of 10 ppm. Figure 4(a) shows the XIC of some investigated protonated molecules in MS acquisition of a wastewater effluent sample. TPs in real samples were identified based on the chromatographic retention times and the best fitted formulas given by the software tool. Best elemental formulas are calculated by specific accurate masses for precursor and product ions and isotope pattern matching. The tentative presence of both AMX-DKPs and AMXOs stereoisomers (formula $C_{15}H_{22}N_3O_4S$; (5*S*)-AMXO, mean mass error: 1.61 ppm; (5*R*)-AMXO, mean mass error: 1.70 ppm) and AMX-DKPs stereoisomers (formula $C_{16}H_{20}N_3O_5S$; (5*R*)-AMX-DKP, mean mass error: 3.31 ppm; (5*S*)-AMX-DKP, mean mass error: 2.12 ppm) was noticed in all samples while the rest of the investigated compounds were absent (see Table 3). In addition, the calculated m/z of one possible intermediate^[21] and TP^[8] was investigated: AMX-PNAL (amoxicillin penaldic acid) and AMX-PEN (amoxicillin penicilloaldehyde). For PEN G,^[8] it

has been reported that the penicilloaldehyde forms as the subsequent TP for the penilloic acid form (as AMXO form for AMX) under wastewater treatment. Nevertheless, neither AMX-PNA nor AMX-PNAL was identified in the analyzed samples.

A further confirmatory study was performed by the use of target accurate MS/MS at m/z 366 and 340 at the described retention times. Table 3 shows identified compounds with the proposed ion formulas, calculated m/z , mean mass errors in full scan MS and MS/MS acquisition, mean relative abundances of precursor and product ions as well as their deviation in retention times for confirmatory purposes. Accurate mass confirmation performed by four selected ions (precursor ion and three product ions) led to the reliable confirmation of AMXOs and AMX-DKP stereoisomers with errors generally <5 ppm in both effluent and influent samples as can be seen by the mean values calculated in Table 3. However, some experimental accurate masses gave unsatisfactory error ranges (>5 ppm) which vary from precursor and product ions. We found that in some wastewater samples the precursor ion was unnoticeable principally due to the masking effect of highly abundant isobaric interferences. Nevertheless, by selecting a collision energy of 10 eV consistent confirmation of the compound via accurate

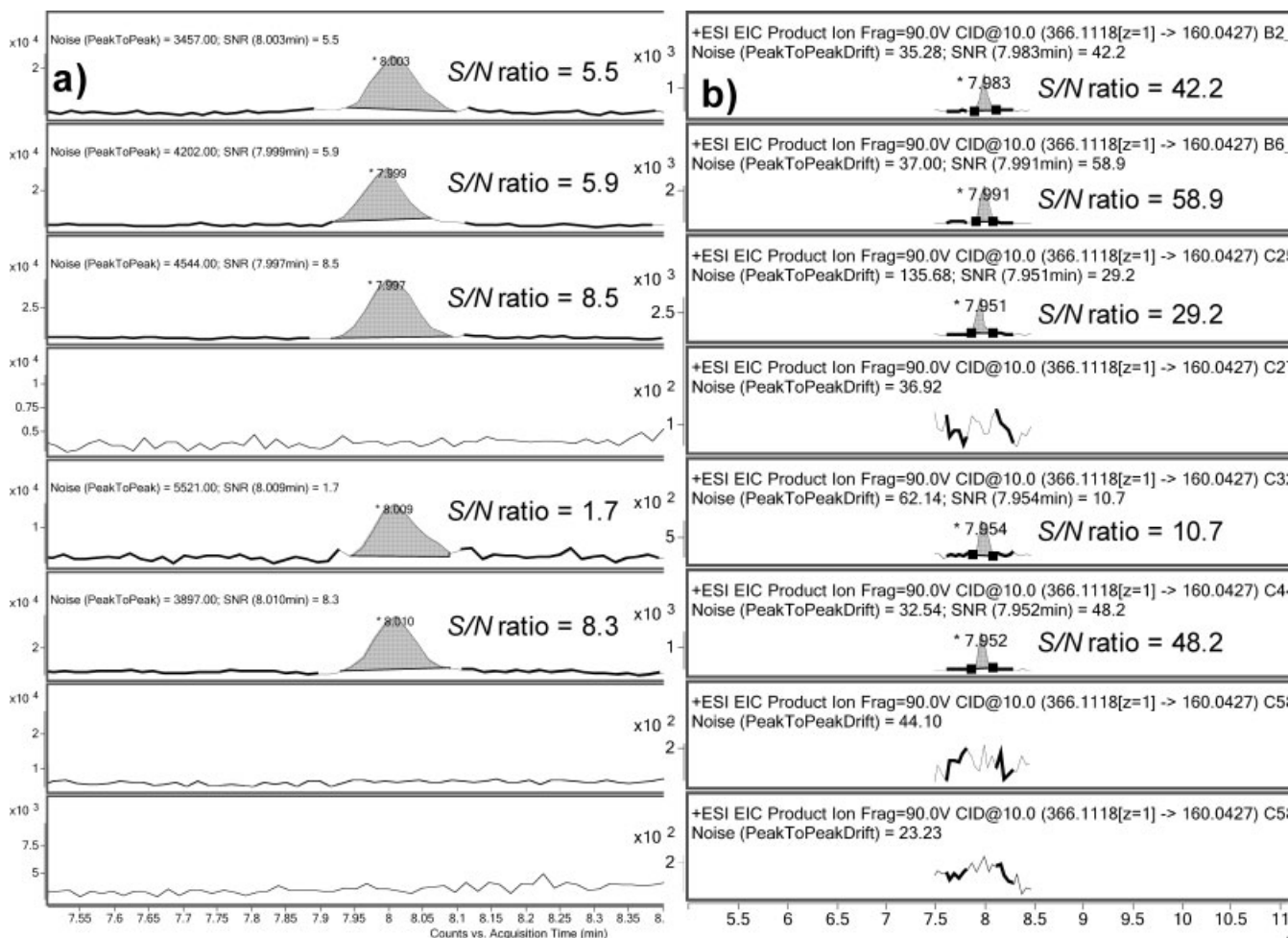


Figure 5. Screening of AMX TPs using the thiazolidine ring product ion (m/z 160). (a) XIC of in-source CID MS (fragmentor voltage 190 V) and (b) MS/MS XIC of the ion m/z 160 detecting (5*R*)-AMX-DPK in river water samples.

identification of the product ions was possible. At least two product ions were correctly identified with accepted mass errors in all samples which confirm the positive findings. Precursor ions of AMXOs were unnoticeable in two effluent samples at this collision energy. Furthermore, retention times for the identified degradation products and the peaks found in the positive samples were also compared presenting deviations <0.08%. Finally, the ion intensities were in the same order as the obtained references. Hence, the possibility to separate diastereomers and structurally elucidate these compounds against isobarics evidences the usefulness of LC coupled to accurate mass detection in the unequivocal identification of TPs in the environmental field. Although the goal of this study was not a quantitative investigation, a preliminary estimation was obtained to evaluate the effectiveness of wastewater treatment in removing AMXOs and AMX-DKPs. A comparison of influent peak areas and their

respective effluents was performed as shown in Fig. 4(b). In this sense, it was estimated an average of decrease of 54% for (5*S*)-AMXO, 56% for (5*R*)-AMXO, 16% for (5*R*)-AMX-DKP and 19% for (5*S*)-AMX-DKP. These results suggest that wastewater treatment does not efficiently remove identified AMX TPs and therefore it is expected that residues of these compounds would be released to surface waters.

In the same way, to perform an investigation of the occurrence of AMX TPs in river waters, eight samples from Madrid (Spain) were analyzed. In the XIC obtained in full scan MS acquisition mode only the presence of the stereoisomer (5*R*)-AMX-DKP (retention time 8.0 min, formula C₁₆H₂₀N₃O₅S; mean mass error: 3.56 ppm) was noticed. Confirmation was carried out using targeted accurate MS/MS at *m/z* 366 at the described retention times. Table 3 also shows the identification and confirmatory parameters in MS and MS/MS mode in river water samples. Similarly to the

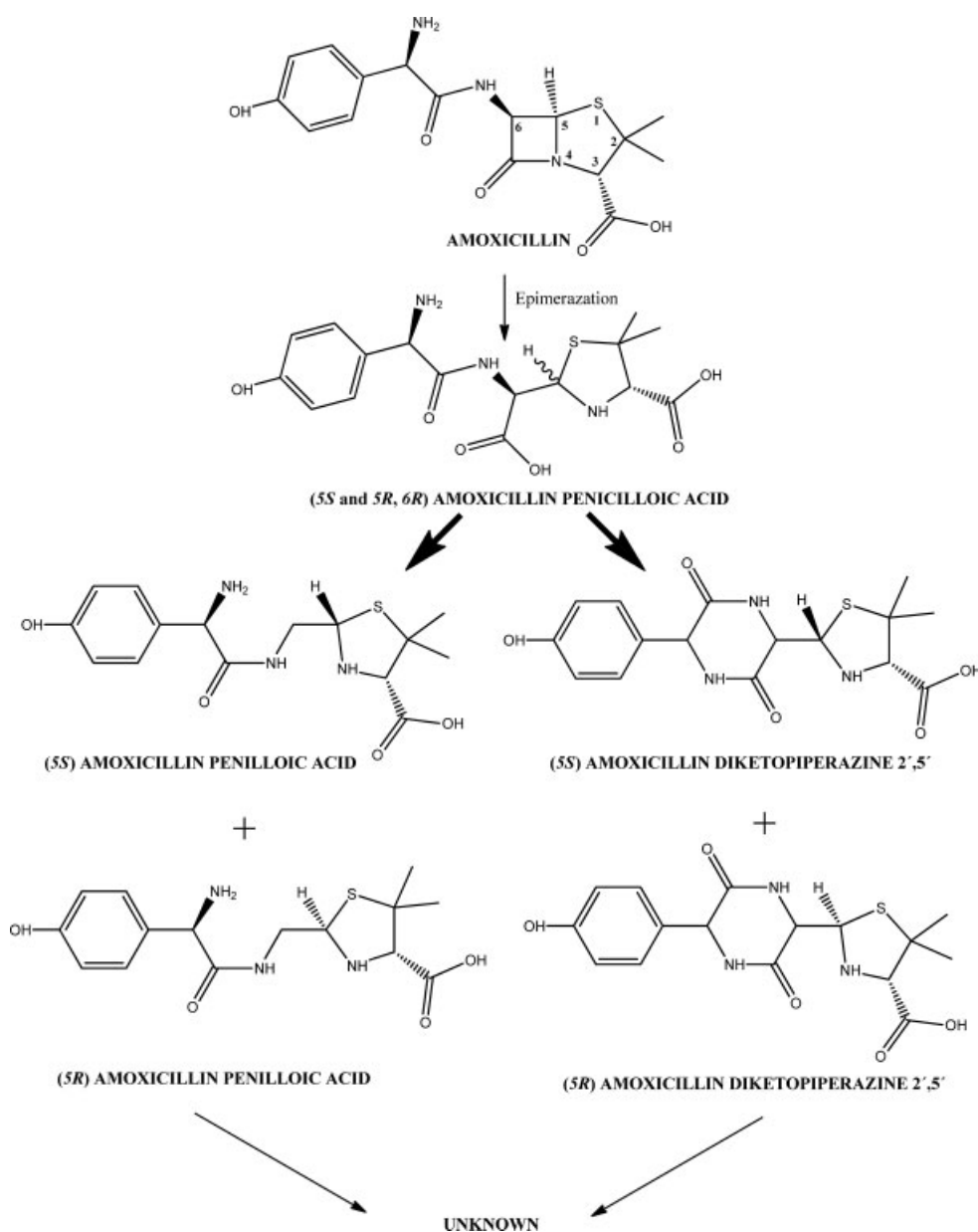


Figure 6. Suggested main transformation pathway for AMX.

procedure described previously, accurate MS/MS led to a feasible confirmation of (5*R*)-AMX-DKP residues in five river water samples. Mean mass errors for *m/z* 207 and 160 were 5.92 and 4.92 ppm, respectively, although high errors for *m/z* 113 were obtained (mean mass error 18.14 ppm). Retention times for the reference and the peaks found in the positive samples were also compared exhibiting a mean deviation of 0.04%. Figure 2(a) shows a comparison of obtained MS/MS spectra for the confirmation of (5*R*)-AMX-DKP together with the obtained reference, effluent and river water sample. It is worthwhile mentioning that although AMX TPs are structurally different, some fragment ions remain in common with the parent drug. This is the case of the thiazolidine ring fragment ion (*m/z* 160.0427) that is present in the AMX as well as in AMXC (amoxicilloic acid, data not shown), AMX-DKPs and AMXC-Me, so that it can be used as a diagnostic ion for general screening of AMX TPs. Figure 5(a) shows the XIC of *m/z* 160.0427 acquired by in-source CID for river water samples. The XIC from dedicated MS/MS experiments reveals increased sensitivity in positive findings as shown in Fig. 5(b), where the signal-to-noise ratio ranged from 10.7 to 58.9.

On the basis of the above results, it is suggested that the main transformation pathway is greatly favored through the formation of the penicilloic acid intermediates (AMXCs) due to the cleavage of the β -lactam ring. The prevalence of the β -lactam ring in other structurally related β -lactams anticipates that this behavior could be further extended to other penicillins. Moreover, through this step the chiral center located at position 5 suffers epimerization, leading to the exposed diastereomeric behavior.^[14,31,34] In order to study the contribution of hydrolysis in the range of pH found in the analyzed real samples, a stability study was carried out at pH 7 and 8 for 10 days. It was found that pH plays an exceptional role in AMX degradation in aqueous solution as during this period AMX was degraded almost twice as fast in weak alkaline media whereas AMX-DKP and AMXO diastereomers were produced almost four and two times faster, respectively. However, after this time, AMXCs diastereomer were the preferably produced form for AMX-related compounds at both pH values, suggesting that there are additional contributions involved during the environmental AMX transformation pathway. The absence of AMXC stereoisomers in all real samples (which also are the main metabolites of AMX^[35,36]) indicate its instability in environmental waters. An internal rearrangement that led to the formation of the diketopiperazine ring is the favored transformation while the (5*R*)-AMX-DKP stereoisomer was the only TP detected in surface waters. The proposed transformation pathway for AMX in the aquatic environment is shown in Fig. 6. It is suggested that AMX rapidly degrades to AMXCs gaining one water molecule. Consequently, there are two simultaneous pathways which can involve: (a) decarboxylation to give AMXOs or (b) internal rearrangement with the loss of water to give AMX-DKP diastereomers.

There is a new concern that these classes of TPs have the potential to cause allergic reactions.^[8,9] The gradual disappearance of these identified TPs is also evidenced in river water. Note though that both biotransformation and photolysis pathways could be also involved in the transformation pathways of AMX and need to be taken into account in further studies.

CONCLUSIONS

LC/QTOF-MS/MS is a powerful tool for the study of TPs of pharmaceuticals in the environment. For the first time we have described the structural elucidation of the TP AMXC-Me using MS/MS experiments with accurate mass measurements. AMX as such is transformed before wastewater treatment. The main transformation pathway is related to hydrolysis which involves the opening of the β -lactam ring. There are four major TPs of AMX that were identified using accurate MS and MS/MS measurements by LC/QTOF-MS/MS: (5*S*)-AMXO and (5*R*)-AMXO along with (5*S*)-AMX-DKP and (5*R*)-AMX-DKP. To the best of our knowledge this is the first time that AMXO has been detected in environmental matrices. Of major significance is the fact that the distereomer (5*R*)-AMX-DKP was repeatedly detected in surface waters. Actual data showed that, although AMX is not present as such, TPs of the parent drug are not efficiently removed during wastewater treatment in which the impact on the receiving waters is still unknown. Further studies might focus on the monitoring, quantitation and risk assessment of these TPs in the environment.

Acknowledgements

A.P.P. acknowledges Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía as supporter of Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP) for mobility scholarship and Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA Química, Montevideo, Uruguay) for economic support. The authors acknowledge funding from the Spanish Ministry of Education and Science (Project CSD-2006-00044, CONSOLIDER-TRAGUA Ref. CSD-2006-00044 entitled 'Treatment and reuse of wastewaters for a sustainable management').

REFERENCES

- [1] M. I. Bailón-Pérez, A. M. García-Campaña, C. Cruces-Blanco, M. O. Iruela. Trace determination of β -lactam antibiotics in environmental aqueous samples using off-line and on-line preconcentration in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1185*, 273.
- [2] J. Campos, M. Ferech, E. Lázaro, F. de Abajo, J. Oteo, P. Stephens, H. Goossens. Surveillance of outpatient antibiotic consumption in Spain according to sales data and reimbursement data. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 698.
- [3] J. M. Cha, S. Yang, K. H. Carlson. Trace determination of β -lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1115*, 46.
- [4] B. Li, T. Zhang, Z. Xu, H. Han, Fang. Ping. Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *645*, 64.
- [5] O. J. Pozo, C. Guerrero, J. V. Sancho, M. Ibañez, E. Pitarch, E. Hogendoorn, F. Hernández. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1103*, 83.
- [6] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K. L. Katz. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* **1999**, *225*, 109.

- [7] M. C. Moreno-Bondi, M. D. Marazuela, S. Herranz, E. Rodríguez. An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 921.
- [8] D. Li, M. Yang, J. Hu, Y. Zhang, H. Chang, F. Jin. Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Water Res.* **2008**, *42*, 307.
- [9] A. Lamm, I. Gozlan, A. Rotstein, D. Avisar. Detection of amoxicillin-diketopiperazine-2',5' in wastewater samples. *J. Environ. Sci. Health A* **2009**, *44*, 1512.
- [10] S. Castiglioni, R. Bagnatti, D. Calamari, R. Fanelli, E. Zucatto. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1092*, 206.
- [11] T. Christian, R. J. Schneider, H. A. Färber, D. Skutlarek, M. T. Meyerc, H. E. Goldbach. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **2003**, *31*, 36.
- [12] Amoxicillin Sodium Monograph. *European Pharmacopoeia*, Monograph 0577, (6th edn.), Council of Europe, Strasbourg, France, **2008**.
- [13] E. Nägele, R. Moritz. Structure elucidation of degradation products of the antibiotic amoxicillin with ion trap MSⁿ and accurate mass determination by ESI TOF. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1670.
- [14] L. Valvo, E. Ciranni, R. Alimenti, S. Alimonti, R. Draisci, L. Gianetti, L. Lucentini. Development of a simple liquid chromatographic method with UV and mass spectrometric detection for the separation of substances related to amoxicillin sodium. *J. Chromatogr. A* **1998**, *797*, 311.
- [15] I. Gozlan, A. Rotstein, D. Avisar. Investigation of an amoxicillin oxidative degradation product formed under controlled environmental conditions. *Environ. Chem.* **2010**, *7*, 435.
- [16] S. Grimalt, O. J. Pozo, J. V. Sancho, F. Hernández. Use of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry to investigate pesticide residues in fruits. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2833.
- [17] T. Portolés, M. Ibáñez, J. V. Sancho, F. J. López, F. Hernández. Combined use of GC-TOF MS and UHPLC-(Q)TOF MS to investigate the presence of nontarget pollutants and their metabolites in a case of honeybee poisoning. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4079.
- [18] M. J. Gómez, M. J. Martínez-Bueno, S. Lacorte, A. R. Fernández-Alba, A. Agüera. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* **2007**, *66*, 993.
- [19] M. J. Martínez-Bueno, M. D. Hernando, S. Herrera, M. J. Gómez, A. R. Fernández-Alba, I. Bustamante, E. García-Calvo. Pilot survey of chemical contaminants from industrial and human activities in river waters of Spain. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2010**, *90*, 321.
- [20] M. J. Martínez-Bueno, A. Agüera, M. J. Gómez, M. D. Hernando, J. F. García-Reyes, A. R. Fernández-Alba. Application of liquid chromatography quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9372.
- [21] A. D. Deshpande, K. G. Baheti, N. R. Chatterjee. Degradation of *b*-lactam antibiotics. *Curr. Sci.* **2004**, *87*, 1684.
- [22] A. G. Trovó, R. F. Pupo Nogueira, A. Agüera, A. R. Fernández-Alba, S. Malato. Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process: chemical and toxicological assessment. *Water Res.* **2011**, *45*, 1394.
- [23] S. Babić, D. Ašperger, D. Mutavdžić, A. J. M. Horvat, M. Kaštelan-Macan. Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta* **2006**, *70*, 732.
- [24] D. Mutavdžić Pavlović, S. Babić, D. Dolar, D. Ašperger, K. Košutić, A. J. M. Horvat, M. Kaštelan-Macan. Development and optimization of the SPE procedure for determination of pharmaceuticals in water samples by HPLC-diode array detection. *J. Sep. Sci.*, *33*, 258.
- [25] M. Petrović, M. Gros, D. Barceló. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1124*, 68.
- [26] M. Farré, M. Gros, B. Hernández, M. Petrović, P. Hancock, D. Barceló. Analysis of biologically active compounds in water by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 41.
- [27] C. Wu, A. L. Sponberg, J. D. Witter. Use of solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous determination of various pharmaceuticals in surface water. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2008**, *88*, 1033.
- [28] J. D. Cahill, E. T. Furlong, M. R. Burkhardt, D. Kolpin, L. G. Anderson. Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1041*, 171.
- [29] M. Gros, M. Petrović, D. Barceló. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* **2006**, *70*, 678.
- [30] K. L. Tyczkowska, R. D. Voyksner, A. L. Aronson. Solvent degradation of cloxacillin *in vitro*: Tentative identification of degradation products using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **1992**, *594*, 195.
- [31] L. Valvo, S. Alimonti, R. Alimenti, C. De Sena, E. Ciranni Signeretti, R. Draisci, L. Gianetti. Investigation of a new amoxicillin sodium impurity unstable in solution. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 487.
- [32] F. Bruno, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi. Method development for measuring trace levels of penicillins in aqueous environmental samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 1391.
- [33] S. Grujić, T. Vasiljević, M. Lausević, T. Ast. Study on the formation of an amoxicillin adduct with methanol using electrospray ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 67.
- [34] J. Haginaka, J. Wakai. Epimerization of amoxicillin piperazine-2,5-dione in acidic solutions. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2239.
- [35] S. De Baere, M. Cherlet, K. Baert, P. De Backer. Quantitative analysis of amoxicillin and its major metabolites in animal tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1393.
- [36] R. Fernández-Torres, M. Olías Consentino, M. A. Bello López, M. Callejon Mochon. Simultaneous determination of 11 antibiotics and their main metabolites from four different groups by reversed-phase high-performance liquid chromatography diode array-fluorescence (HPLC-DAD-FLD) in human urine samples. *Talanta* **2009**, *81*, 871.

Estudios de determinación de compuestos orgánicos a niveles traza en matrices complejas

Anexo 8



Use of an accurate-mass database for the systematic identification of transformation products of organic contaminants in wastewater effluents

María del Mar Gómez-Ramos^a, Andrés Pérez-Parada^{a,b}, Juan F. García-Reyes^c,
Amadeo R. Fernández-Alba^a, Ana Agüera^{a,*}

^a University of Almería, Department of Hydrogeology and Analytical Chemistry, Pesticide Residue Research Group, 04120 La Cañada de San Urbano, Almería, Spain

^b Universidad de la República, Farmacognosia y Productos Naturales, Facultad de Química, 1180 General Flores 2124, Montevideo, Uruguay

^c University of Jaén, Analytical Chemistry Research Group, 23071 Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2011

Received in revised form 30 August 2011

Accepted 2 September 2011

Available online 7 September 2011

Keywords:

QTOF-MS/MS

Accurate-mass database

Transformation products

Wastewater

ABSTRACT

In this article, a systematic approach is proposed to assist and simplify the identification of transformation products (TPs) of organic contaminants. This approach is based on the use of characteristic fragmentation undergone by organic contaminants during MS/MS fragmentation events, and the relationship and consistency with the transformations experimented by these chemicals in the environment or during water treatment processes. With this in mind, a database containing accurate-mass information of 147 compounds and their main fragments generated by CID MS/MS fragmentation experiments was created using an LC-QTOF-MS/MS system. The developed database was applied to the identification of tentative TPs and related unexpected compounds in eight wastewater effluent samples. The approach comprises basically three stages: (a) automatic screening, (b) identification of possible TPs and (c) confirmation by MS/MS analysis. Parameters related to the search of compounds in the database have been optimized and their dependence with the exhaustiveness of the study evaluated. Eight degradation products, from the pharmaceuticals acetaminophen, amoxicillin, carbamazepine, erythromycin and azithromycin and from the pesticide diazinon, were identified with a high grade of accuracy. Three of them were confirmed by analysis of the corresponding analytical standards.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the last years, a large number of compounds have been pointed out as possible environmental contaminants. These compounds usually named as emerging contaminants belong to different chemical groups and come from different uses [1]. Pharmaceuticals, personal care products, flame retardants, plasticizers, etc. have been and are currently investigated in natural and wastewater to gain knowledge about their presence, behaviour and fate in the environment [2] and, more importantly, about its possible impact on environmental quality [3,4]. Despite increasing information is available for these new contaminants, scarce information is often accessible with regards to their possible transformation products [5,6]. It is known that organic contaminants undergo transformations during passage through the wastewater treatment plants and even once they reach the aquatic environment [7,8]. Hydrolysis, photolysis and biotic transformations may lead to

the formation of unexpected transformation products (TPs), sometimes even more toxic and persistent than the parent compounds [9,10].

Nowadays, the studies concerning the identification of TPs result in a very complex task which includes dedicated studies performed under laboratory conditions. High-resolution mass spectrometry techniques (TOF-MS, QTOF-MS/MS, Orbitrap) are used to propose chemical structures, due to the ability of providing the elemental composition of compounds [11–14]. However, these studies are usually accomplished manually after a comprehensive visual inspection of the chromatograms that may take long time [15,16]. Additionally, the conditions in which the experiments are developed hardly adapt with those occurring in real processes [17]. However, studies under real conditions, which could provide a more realistic view of the problem, are hampered by the complexity of the matrices that make difficult the identification of non-target and a priori unknown compounds. Consequently, further advances and new tools are required to optimize and accelerate this kind of studies, assuring at the same time a high certainty in the results.

The potential of time-of-flight mass spectrometry systems (TOF and QTOF) for target and non-target/unknown analysis of organic contaminants (in their parent form) has been widely described in

* Corresponding author. Tel.: +34 950015034; fax: +34 950015483.

E-mail address: aaguera@ual.es (A. Agüera).

literature [18–21]. Target screening methods based on the use of accurate-mass databases have been recently developed and successfully applied in food and environmental samples allowing a rapid and automatic identification of target species [21–23]. On the other hand, previous works [24] have described the use of “fragmentation–degradation” relationships as a useful approach for identifying and structurally elucidating pesticide-transformation products in food. They state that, from a given parent specie, the fragmentation pattern occurred in-source (by collision induced dissociation) could be used as a reference to predict possible degradation products, suggesting that compounds are often transformed into degradation products in the same fashion that they are fragmented in the instrument. This hypothesis opens up a new dimension in the use of exact-mass databases not only for screening of target compounds but also for unknown transformation products when characteristic fragment ions are also included on them.

In this work, an analytical approach has been developed and evaluated to simplify and automate the identification of TPs of selected target contaminants directly in samples of environmental interest. The proposed strategy is based on: (i) the assumption that some TPs maintain a similar structure than the parent compound and therefore common fragment ions, and (ii) on the use of advanced LC–MS data processing (molecular feature extraction) software combined with an user-created accurate-mass database of target compounds, which includes information of accurate mass of the target compounds and their more significant and characteristic fragments. This procedure will enable to gain new insights into the formation and fate of TPs in environment.

2. Experimental

2.1. Chemical and reagents

The analytes studied comprise a group of 92 pharmaceutically active compounds belonging to different therapeutic groups and some of their relevant metabolites, 25 drugs of abuse and some of its main metabolites and 30 pesticides. The pharmaceuticals and drugs of abuse were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany), Cerilliant (Round Rock, TX) and Merck (Mollet del Vallés, Spain) at analytical grade (purity >90%). The pesticides included in this study were supplied by Dr. Ehrenstorfer GmbH. (Ausburg, Germany) at analytical grade (purity >97%). Individual stock standard solutions of the compounds were prepared in methanol, at a concentration between 1 and 2 mg/mL, and stored at -20°C . Working standard solutions, at different concentrations, were prepared by appropriate dilution of the stock solutions in MeOH:water, 10:90 (v/v). HPLC-grade acetonitrile and methanol were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid (purity, 98%) and water used for LC–MS analysis were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). SPE commercial cartridges packed with OasisTM HLB (divinylbenzene/N-vinylpyrrolidone copolymer, 200 mg, 6 mL) were purchased from Waters (Mildford, MA, USA).

2.2. Wastewater samples

Effluent samples of four sewage treatment plants (STPs) located in Spain were collected. The plants apply a pretreatment for solid removal, a primary treatment to eliminate suspended material, an activated sludge biological treatment and a final clarification. Integrated samples representative of 24-h of work treatment in the STP were taken at hourly intervals. Effluents samples were filtered through a $0.7\ \mu\text{m}$ glass fiber filter (Teknokroma, Barcelona, Spain) and extracted within 48 h in all the cases. A solid-phase extraction (SPE) procedure was applied to the wastewater samples using commercial Oasis HLB (divinylbenzene/N-vinylpyrrolidone

copolymer) cartridges (200 mg, 6 mL) from Waters (Mildford, MA, USA). An automated sample processor ASPEC XL fitted with an 817 switching valve and an external 306 LC pump from Gilson (Villiers-le-Bel, France) was used for this purpose. The Oasis HLB cartridges were preconditioned with 6 mL of MeOH and 5 mL of deionized water HPLC-grade (pH adjusted to 8 with 20% NH_4OH) at a flow rate of 1 mL/min. After the conditioning step, 200 mL aliquots of effluent wastewater (pH adjusted to 8, when necessary) were loaded into the cartridge. Samples were previously spiked with $10\ \mu\text{L}$ of 10 mg/L solution of the surrogate standard ^{13}C -caffeine. Samples were passed through the cartridges at a flow rate of 10 mL/min and then rinsed with 5 mL of deionized water prior to the elution. After that, the cartridges were dried by nitrogen stream for approximately 5 min to remove excess water and finally the analytes retained were eluted with $2 \times 4\ \text{mL}$ of MeOH at 1 mL/min. The extracts were evaporated until almost dryness using a Turbo-Vap from Zymark (Hopkinton, MA), with the water temperature at 35°C . The samples were then reconstituted with 1 mL of MeOH:water, 10:90 (v/v) and were then filtered directly into an analysis vial using a $0.45\ \mu\text{m}$ PTFE syringe filter (Millipore, USA).

2.3. Liquid chromatography–quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry

The method for the analysis of water samples was developed in a liquid chromatography–electrospray ionization–quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC–ESI–QTOF–MS) system operated in the positive ionization mode. The analytes were separated using a HPLC system (consisting of vacuum degasser, autosampler, and binary pump) (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies) equipped with a reversed-phase XDB-C18 analytical column of $4.6\ \text{mm} \times 50\ \text{mm}$ and $1.8\ \mu\text{m}$ particle size (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Gradient LC elution was performed with 0.1% formic acid and 5% MilliQ water in acetonitrile as mobile phase A and 0.1% formic acid in water (pH 3.5) as mobile phase B. The optimized chromatographic method held the initial mobile phase composition (10% A) constant for 3 min, followed by a linear gradient to 100% A up to 25 min, and kept for 3 min at 100% A. A 10 min post-run time back to the initial mobile phase composition was used after each analysis. The flow rate used was 0.5 mL/min.

The HPLC system was connected to a quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Agilent 6530 Series Accurate Mass QTOFMS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The instrument was operated in the 4 GHz high-resolution mode. Ions are generated using an electrospray ion source with Agilent Jet Stream Technology. Parameters for the source were the super-heated nitrogen sheath gas temperature (400°C) and flow rate (12 L/min). Electrospray conditions were the following: capillary, 4000 V; nebulizer, 60 psi; drying gas, 5 L/min; gas temperature, 250°C ; skimmer voltage, 65 V; octapole RF Peak, 750 V; fragmentor (in-source CID fragmentation), 90 V. The mass axis was calibrated using the mixture provided by the manufacturer over the m/z 70–3200 range. A sprayer with a reference solution was used as continuous calibration in positive ion using the following reference masses: 121.0509 and 922.0098 m/z (resolution: $19,500 \pm 500$ at 922.0098 m/z).

For this work, the QTOF–MS instrument was used as a TOF–MS system working in full-scan MS mode and also in MS/MS mode to register the maximum number of fragments for confirmation of possible TPs. The full-scan and MS/MS data recorded was processed with Agilent MassHunter Workstation Software (version B.03.01).

2.4. Construction of accurate-mass database of compounds and fragments

A group of contaminants, belonging to different families of compounds were selected for this study. These compounds were

divided into mixtures containing about 15 analytes each at a concentration of 100 ng/mL. The solutions were injected in the LC-QTOF-MS system in full scan and targeted MS/MS acquisition modes at four different collision energies (5, 10, 20 and 30V) to achieve the maximum number of characteristic fragments. The MS/MS spectra were carefully investigated and the retention time, theoretical accurate mass, elemental composition and name of compounds and their selected fragments (with relative abundance above 10%) were collected in an Excel sheet for elaboration of the database (Table S1, supplementary information). This file was put into csv format for use by Agilent QTOF automated data analysis software. The csv file is searched automatically by the instrument at the end of the sample run and a report is generated on compounds that were found in the database.

2.5. Search strategy using the database

Once the database was generated, a search strategy was developed to the identification of metabolites and TPs present in the influents or generated during the wastewater treatment. Fig. 1 shows the workflow followed in the search for unknown TPs. The approach comprises basically three stages: (a) automatic screening, (b) identification of possible TPs and (c) confirmation by MS/MS analysis.

(a) *Automatic screening.* The automatic screening was made with the Qualitative Mass Hunter Software and consisted of two steps:

(1) *Extraction of compounds using the “Molecular Feature Extraction (MFE)” algorithm.* In this first step, the software examines the entire chromatogram in order to search and group all the ions that can be logically associated with a real chromatographic peak and may represent a “feature” of a molecule. The MFE creates a compound list of all the peaks in the data file that represent real molecules. Search parameters must be adjusted according to the application. Complex matrices like wastewater effluents require the application of some filters to diminish the number of total extracted compounds that may result irrelevant to the analysis. For this application a peak filter ≥ 100 counts for the ion extraction (only includes peaks whose height is greater than the value entered) and a compound filter with an absolute abundance higher or equal to the height of 100,000 counts have been selected (the height of the compound must be at least the value entered). To increase the speed of the analysis and simplify the identification step, it is important to apply a mass filter. In this work a mass filter with a tolerance of 5 ppm has been selected. With this option, the MFE algorithm searches and extracts from the raw data only those compounds whose accurate masses matches with the masses included in the database.

(2) *Identification of compounds using “Search database”.* The resulting compounds list of molecular features is then matched with the csv Excel file created as a database, to identify compounds and/or fragments included on it. The defined search criteria were: (i) accurate mass, with a tolerance of 5 ppm widely accepted for the verification of elemental composition [25] and (ii) retention time for which a tolerance window of ± 0.3 min was fixed. Satisfactory results were obtained with the combination of both values.

(b) *Identification of tentative TPs.* The automatic screening described above generates a report with a list of compounds. Some of them are coincident with the database in both accurate mass and retention time. These compounds correspond with target analytes and their fragments present in the samples. In

addition, the report also includes compounds which yield a good match in accurate mass but present different retention time. These compounds are initially considered as potential TPs or fragments of potential TPs. Agreement with the database is assessed by use of a score parameter. The score is reported on a scale of 0–100 and is calculated taking into account the accurate mass match and the isotopic distribution (isotope abundance and isotope spacing) match. This is a useful parameter to discriminate between positive findings and false positives. Therefore the higher the value, more plausible is the elemental composition proposed by the software. In this study it has been established a threshold of 60. Therefore, compounds with values below 60 have not been considered for the study due to the high probability of being false positives.

(c) *Confirmation by MS/MS analysis.* Once the potential metabolites or TPs have been tentatively identified in the previous step, it is necessary to confirm their identity by obtaining additional structural information for an accurate structure proposal. This can be obtained by further MS/MS fragmentation of the selected compounds using the QTOF system. Once the structure is proposed, eventually unambiguous confirmation can be obtained by the analysis of analytical standards if they are commercially available.

3. Results and discussion

The developed strategy was applied to the identification of potential TPs and other unexpected compounds in eight wastewater effluents. Five of them were collected from the same STP on different dates, to check whether the TPs identified were frequently or only punctually present in the effluents. The other three samples were taken from different STPs in Spain to test if different compounds were detected as a function of the STP sampled. The methodology applied allowed to find and confirm up to eight TPs, listed in Table 1. Table 2 shows the frequency of detection of these compounds in the wastewater samples analyzed. Most of them were detected at least in two samples. The most frequently detected were erythromycin TP2, found in seven samples, and acetaminophen TP detected in three samples.

One of the main drawbacks in the application of this strategy, especially in complex matrices, is the high number of hits resulting from the automatic screening. Presence of isobaric compounds/fragments is usual and a detailed observation of the mass spectra is required to discard those ions with low probability to be potential TPs. Criteria, such as the score target, the peak filter or the compound filter, have to be set to reduce the number of findings. High values of these parameters reduce the number of results obtained in this first step but at the expense of losing comprehensiveness in the study. Values reported in this work were set intending to look for abundant intermediates, but a reprocessing of the data can be done if a more exhaustive study is required. Fig. 2 shows the number of confirmed TPs by MS/MS in comparison to the total hits included in the sample reports. In six samples the percentage of TPs confirmed was equal or higher than 10% of total hits and in two of these samples the percentage was over 20%, a reasonable high rate considering the complexity of the samples. Even though the elemental composition of the detected ions correspond with a real TP, confirmation of their structure by MS/MS is not always feasible. In many cases the fragmentation by MS/MS does not support the proposed structure or does not give enough information to elucidate the molecule structure with a reasonable degree of certainty. An example of the latter can be seen in Fig. 3 for a compound frequently detected in six of the analyzed samples. This compound has the same elemental composition as one of the main

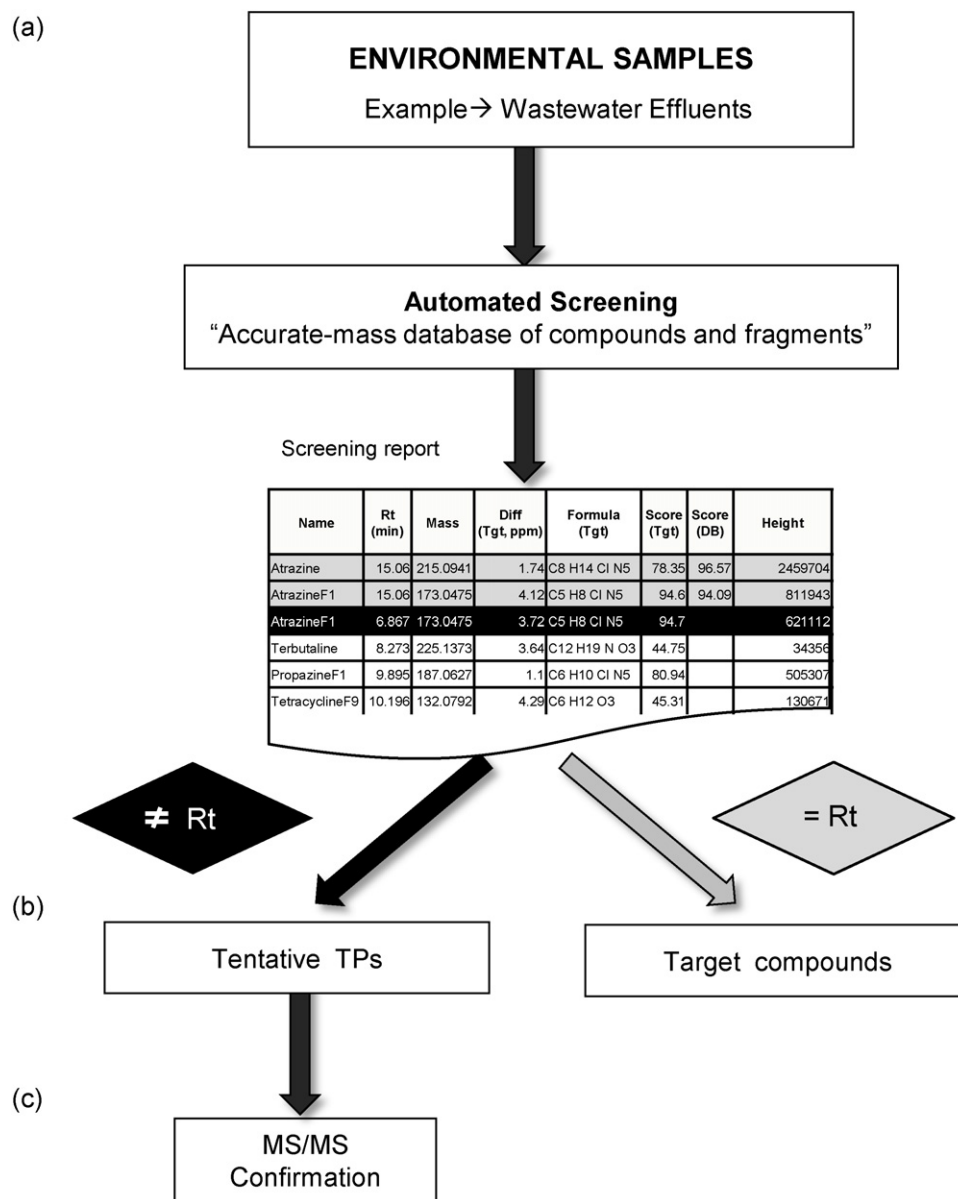


Fig. 1. Proposed workflow for the identification of transformation products by LC-QTOF-MS/MS. The approach comprises three steps: (a) automatic screening, (b) identification of possible TPs and (c) confirmation by MS/MS analysis.

fragments of metoprolol, corresponding to the loss of the hydroxyl group by the typical loss of a water molecule ($C_{15}H_{23}NO_2$), but elutes at a retention time (5.54 min) different from the target compound metoprolol (9.20 min), which is also found in the sample. The MS/MS analysis of the suspected TP at different collision energies only provided one useful fragment at m/z 58 (C_3H_8N). Although this fragment is also common to metoprolol and dehydroxylation reaction is probable, the accurate assignment of the structure with only one fragment is questionable and further research is required.

A positive identification was obtained for two TPs of the macrolide antibiotic erythromycin, appointed as erythromycin TP1 (m/z 540) and erythromycin TP2 (m/z 716), which were frequently identified in sewage effluents analyzed. As can be seen in Fig. 4, the automated screening report showed a compound (TP1) at m/z 540 with the same elemental composition than the erythromycin fragment $C_{29}H_{49}NO_8$ and a retention time (12.75 min) different than erythromycin (12.21 min). The elemental composition indicates that this compound might be erythralosamine, an hydrolysis product of erythromycin already described in the literature, which

results from the loss of the cladinose group [26,27]. The MS/MS spectrum of this compound justified the proposed structure presenting a similar fragmentation pattern than erythromycin, with common fragment ions at m/z 522, m/z 158 and m/z 116, common to both. To our knowledge, this is the first time that erythralosamine is found in wastewater. Erythromycin TP2 was identified as erythromycin anhydride, generated by internal dehydration of the original molecule. Its identity was confirmed by the acquisition and analysis of the commercial standard, which allowed the quantification of concentration levels in the effluent samples in the range from 27 to 159 ng/L.

Another example of the potential use of fragmentation–degradation relationships to detect TPs and to understand the fashion in which pharmaceuticals are degraded in the water is shown in Fig. 5 where the identification of a diazinon TP is shown. Diazinon ($C_{12}H_{21}N_2O_3PS$) is an organophosphorus pesticide widely used in urban and agricultural applications. It is usually found in surface water [28–30] and wastewater [31]. One of its fragments ($C_8H_{12}N_2O$, m/z 153) was detected in

Table 1
Elemental composition and fragmentation obtained by LC–QTOF-MS/MS of identified transformation products (TPs) and their parent compounds.

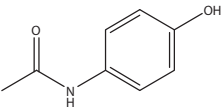
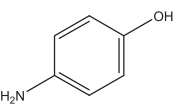
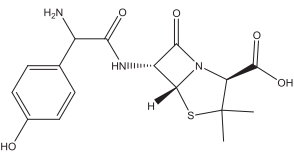
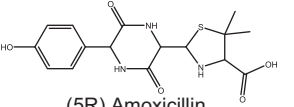
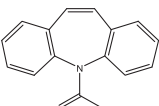
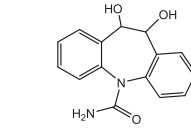
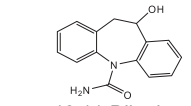
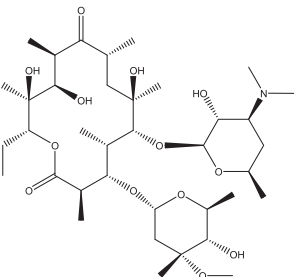
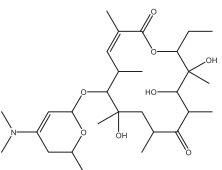
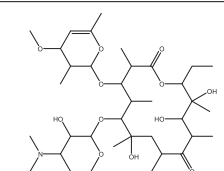
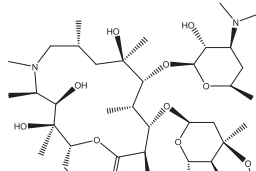
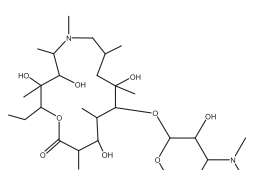
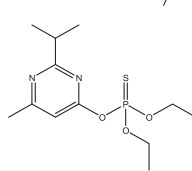
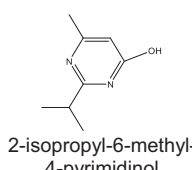
Retention time (min)	Compounds	Ion formula	Calculated (<i>m/z</i>)	Error (ppm)	DBE	Structure
2.8	Acetaminophen	C ₈ H ₁₀ NO ₂	152.0706	1.95	4.5	
		C ₆ H ₈ NO	110.06	−0.1	3.5	
		C ₆ H ₆ N	92.0495	−6.02	4.5	
1.37	Acetaminophen TP	C ₆ H ₈ NO	110.0601	1.35	3.5	 4- Aminophenol
		C ₆ H ₆ N	92.0495	−0.41	4.5	
1.89	Amoxicillin	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅ S	366.118	4.06	8.5	
		C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₅ S	349.083	8.86	9.5	
		C ₁₁ H ₈ NO ₃ S	234.029	11.57	8.5	
		C ₁₀ H ₁₀ NO ₂ S	208.047	0.16	8.5	
		C ₁₀ H ₈ NO ₃	190.049	−4.42	6.5	
		C ₆ H ₁₀ NO ₂ S	160.047	−4.44	7.5	
		C ₅ H ₈ NS	114.03	−1.71	2.5	
7.94	Amoxicillin TP	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅ S	366.1118	−4.4	8.5	 (5R) Amoxicillin diketopiperazine 2'.5'
		C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₃	207.0764	−1.64	6.5	
		C ₆ H ₁₀ NO ₂ S	160.0427	1.8	2.5	
13.75	Carbamazepine	C ₁₅ H ₁₃ N ₂ O	237.1022	2.03	10.5	
		C ₁₄ H ₁₂ N	194.0964	2.21	9.5	
		C ₁₅ H ₁₀ NO	220.0757	3.64	11.5	
9.97	Carbamazepine TP1	C ₁₅ H ₁₅ N ₂ O ₃	271.1077	−1.06	9.5	 10,11-Dihydro- 10-dihydroxycarbamazepine
		C ₁₅ H ₁₃ N ₂ O ₂	253.0792	−7.38	10.5	
		C ₁₅ H ₁₀ NO ₂	236.0706	3.25	11.5	
		C ₁₄ H ₁₂ NO	210.0913	7.80	9.5	
10.73	Carbamazepine TP2	C ₁₅ H ₁₅ N ₂ O ₂	255.1128	1.26	9.5	 10,11-Dihydro- 10-hydroxycarbamazepine
		C ₁₅ H ₁₃ N ₂ O	237.1022	3.12	10.5	
		C ₁₄ H ₁₂ N	194.0964	2.21	9.5	
		C ₁₄ H ₁₀ N	192.0808	−4.53	10.5	
12.21	Erythromycin	C ₃₇ H ₆₈ NO ₁₃	734.4685	−1.23	4.5	
		C ₃₇ H ₆₆ NO ₁₂	716.4580	0.33	5.5	
		C ₃₇ H ₆₄ NO ₁₁	698.4474	−4.74	6.5	
		C ₂₉ H ₅₄ NO ₁₀	576.3742	0.13	3.5	
		C ₂₉ H ₅₂ NO ₉	558.3637	2.14	4.5	
		C ₂₉ H ₅₀ NO ₈	540.3531	3.12	5.5	
		C ₂₉ H ₄₈ NO ₇	522.3425	1.09	6.5	
		C ₈ H ₁₆ NO ₂	158.1176	3.67	1.5	
		C ₇ H ₁₁ O ₂	127.0754	4.9	2.5	
		C ₆ H ₁₄ NO	116.1070	−3.65	0.5	
		C ₅ H ₇ O	83.0491	0.27	2.5	
12.75	Erythromycin TP1	C ₂₉ H ₅₀ NO ₈	540.3531	0.39	5.5	 Erythralosamine
		C ₂₉ H ₄₈ NO ₇	522.3425	4.01	6.5	
		C ₂₆ H ₄₄ NO ₇	482.3112	−1.71	5.5	
		C ₂₃ H ₃₈ NO ₅	408.2744	2.85	5.5	
		C ₈ H ₁₆ NO ₂	158.1176	0.51	1.5	
		C ₆ H ₁₄ NO	116.107	−8.26	0.5	

Table 1 (Continued)

Retention time (min)	Compounds	Ion formula	Calculated (<i>m/z</i>)	Error (ppm)	DBE	Structure
13.14	Erythromycin TP2	C ₃₇ H ₆₆ NO ₁₂	716.458	9.41	5.5	 Erythromycin anhydride
		C ₂₉ H ₅₂ NO ₉	558.3637	-1.14	4.5	
		C ₂₉ H ₅₀ NO ₈	540.3531	-5.04	5.5	
		C ₂₉ H ₄₈ NO ₇	522.3425	-4.17	6.5	
		C ₈ H ₁₆ NO ₂	158.1176	-1.28	1.5	
		C ₆ H ₁₄ NO	116.107	5.74	0.5	
10.2	Azithromycin	C ₃₈ H ₇₃ N ₂ O ₁₂	749.5158	0.69	3.5	
		C ₃₀ H ₅₉ N ₂ O ₉	591.4215	1.47	2.5	
		C ₃₀ H ₅₇ N ₂ O ₈	573.4109	0.14	3.5	
		C ₈ H ₁₆ NO ₂	158.1176	2.22	1.5	
		C ₆ H ₁₄ NO	116.107	0.66	0.5	
		C ₅ H ₇ O	83.0491	-7.64	2.5	
6.82	Azithromycin TP	C ₃₀ H ₅₉ N ₂ O ₉	591.4215	0.89	3	
		C ₂₂ H ₄₄ NO ₇	434.3112	2.03	1.5	
		C ₈ H ₁₆ NO ₂	158.1176	-4.72	1.5	
		C ₆ H ₁₄ NO	116.107	0.33	0.5	
		C ₄ H ₁₀ N	72.0808	-7.07	0.5	
21.53	Diazinon	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₃ PS	305.103	1.91	3.5	
		C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₃ PS	277.077	-2.75	3.5	
		C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₃ PS	249.047	-4.82	3.5	
		C ₉ H ₁₄ OP	169.077	-1.28	3.5	
		C ₈ H ₁₃ N ₂ O	153.102	6.36	3.5	
3.23	Diazinon TP	C ₈ H ₁₃ N ₂ O	153.1022	-3.62	4	 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol
		C ₄ H ₆ NO	84.0444	-4.78	2.5	
		C ₄ H ₈ N	70.0651	-0.19	1.5	

the screening report of a sewage sample at 3.22 min, together with diazinon (21.54 min). The fragmentation of the suspected TP by MS/MS provided two main fragment ions at *m/z* 84 and 70. Both fragments were common to the MS/MS fragmentation pattern of diazinon, supporting the fact that diazinon is the possible origin of this compound. A revision of the literature pointed out to 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol [32] as the probable TP of diazinon, which has been already reported in surface waters [33]. It is referenced as one of major degradation products of diazinon, with stronger genotoxic potential than the parent pesticide [34]. The acquisition and analysis of the pure standard of IMP allowed an unambiguous identification of this compound. Its presence was observed in two samples coming from two different STP at concentrations of 288 and 630 ng/L.

When the molecule of the parent compound has low molecular weight and the structure of the fragments is simple and common, the assignment of the TP to a particular compound is difficult to assure. This is the case of 4-aminophenol, which was identified in the wastewater samples by its coincidence with a fragment of acetaminophen. Even though confirmation of this compound was assessed by analysis of the corresponding analytical standard, it does not establish that its origin can be only attributed to the degradation of acetaminophen, since it can come from other parent molecules. However, this possibility is highly probable, since acetaminophen is the member of the analgesics/anti-inflammatories therapeutic group detected at higher concentration in wastewater influents (mean concentrations between 19.3 and 180.5 µg/L), as revealed by a monitoring study performed by our research group [Ref. in press]. Since

Table 2

Occurrence of identified transformation products (TPs) in the wastewater effluent samples analyzed.

TPs	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Total hits
Acetaminophen TP	×		×					×	3
Diazinon TP					×	×			2
Azithromycin TP		×			×		×		3
Amoxicillin TP	×								1
Carbamazepine TP1	×					×			2
Carbamazepine TP2	×			×					2
Erythromycin TP1	×		×						2
Erythromycin TP2	×		×	×	×	×	×	×	7

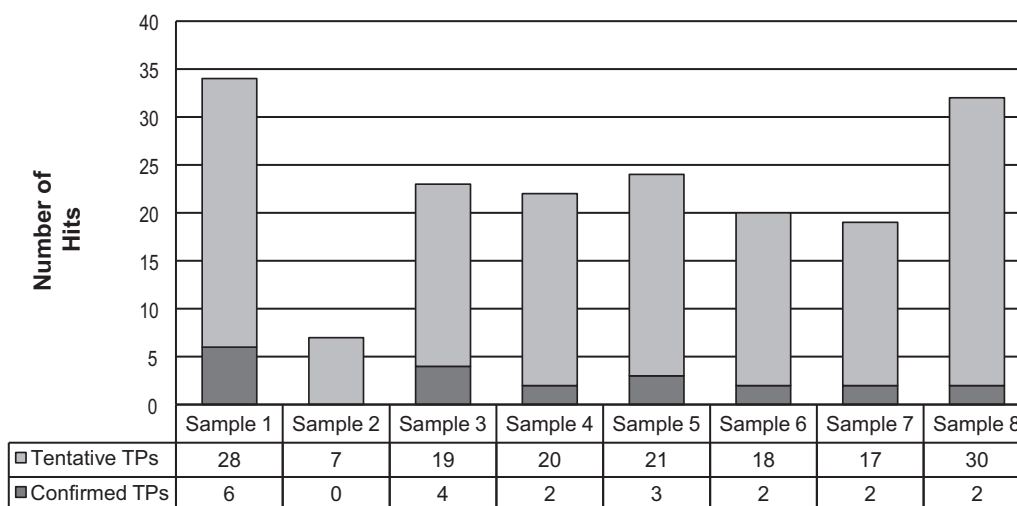


Fig. 2. Number of confirmed TPs by LC–QTOF-MS/MS in comparison to the total hits or potential TPs generated by automatic screening in each effluent wastewater samples.

this compound presented a high removal efficiency (99%) and 4-aminophenol was detected at high concentration, in the range of $\mu\text{g/L}$ in the effluents, it can be thought that the formation of this intermediate can represent a possible transformation route of acetaminophen. Additionally, 4-aminophenol had been also described as primary degradation product of paracetamol [25], thus explaining its presence in the influent. In any case, the evidence of the presence of 4-aminophenol is of interest

since this compound is described as very toxic to aquatic organisms and may cause long term adverse effects in the aquatic environment.

The identification of potential TPs can be facilitated not only by the presence of fragments but also by the detection of the accurate mass of the parent compound as shown in Fig. 6 for the identification of a TP of the antiepileptic drug carbamazepine. The screening report showed two ions at m/z 237 and with the same elemental

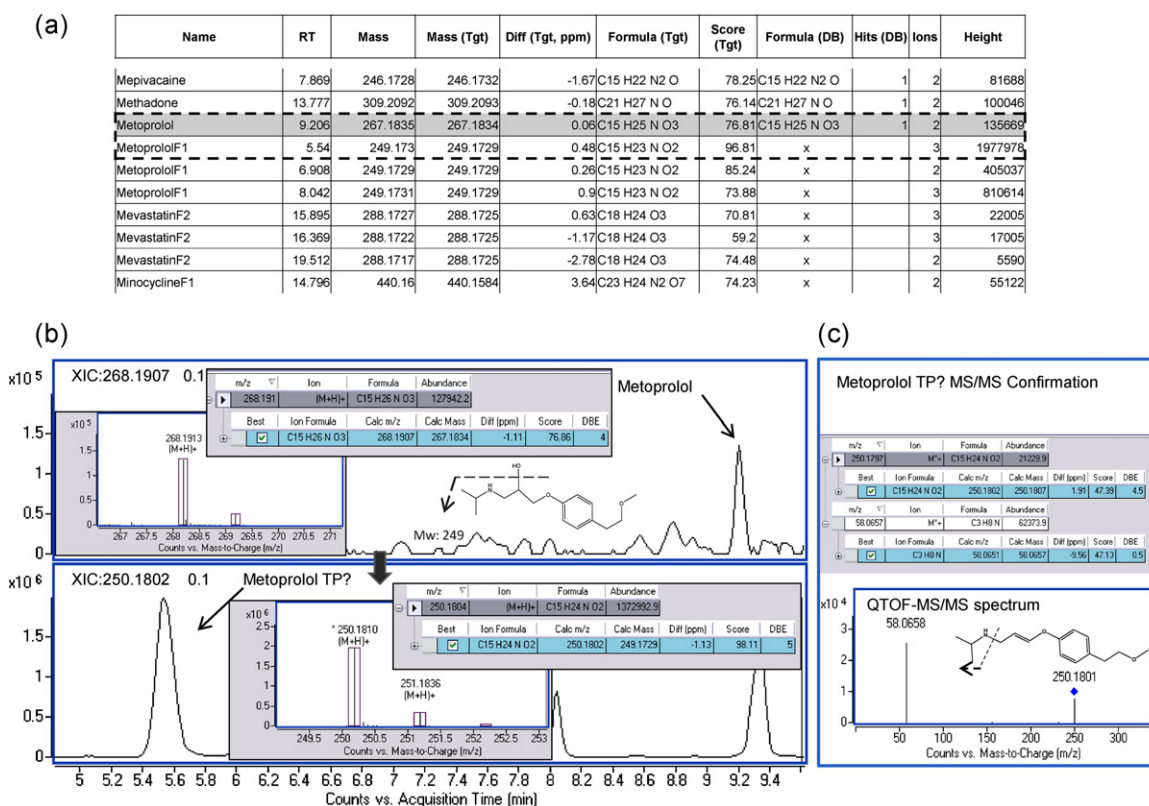


Fig. 3. Steps in the identification of carbamazepine TP2 in a wastewater sample by LC–QTOF-MS/MS: (a) extract of the report obtained by MFE. Compounds with no formula (DB) have no retention time matched with the target compounds included in the database (potential TP); (b) extracted ion chromatogram identification of the ion with m/z 268 (metoprolol) and ion at m/z 250 (metoprolol TP?); and (c) MS/MS spectrum of ion at m/z 250.

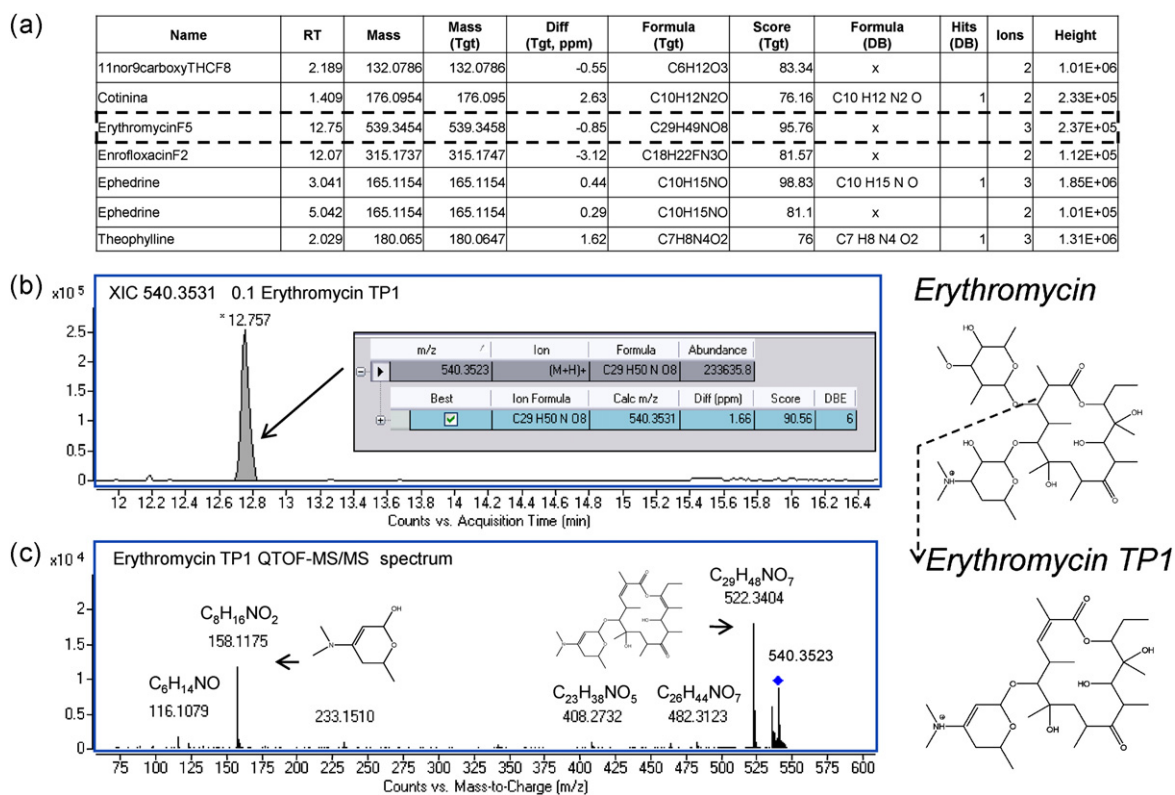


Fig. 4. Steps in the identification of erythromycin TP1 in a wastewater sample by LC-QTOF-MS/MS: (a) extract of the report obtained by MFE where erythromycin F1 is identified as a potential TP; (b) extracted ion chromatogram at m/z 540 and ion formula assignment; and (c) confirmation by MS/MS and structure assignment of erythromycin TP1.

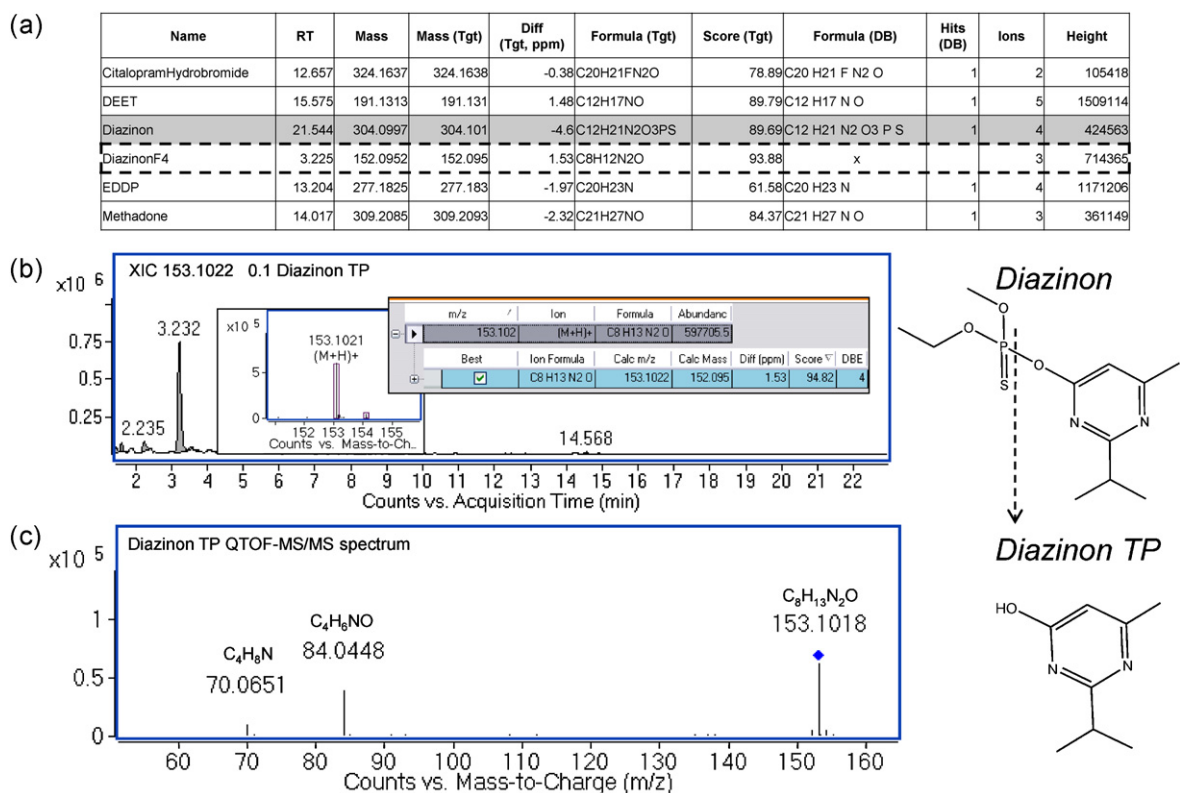


Fig. 5. Screening of an effluent wastewater sample using LC-QTOF-MS/MS: (a) extract of the report obtained by MFE. Compounds with no formula (DB) have no retention time matched with the target compounds included in the database (potential TPs); (b) extracted ion chromatogram identification of the ion with m/z 153 (diazinon TP); and (c) MS/MS spectrum and structure assignment of diazinon TP.

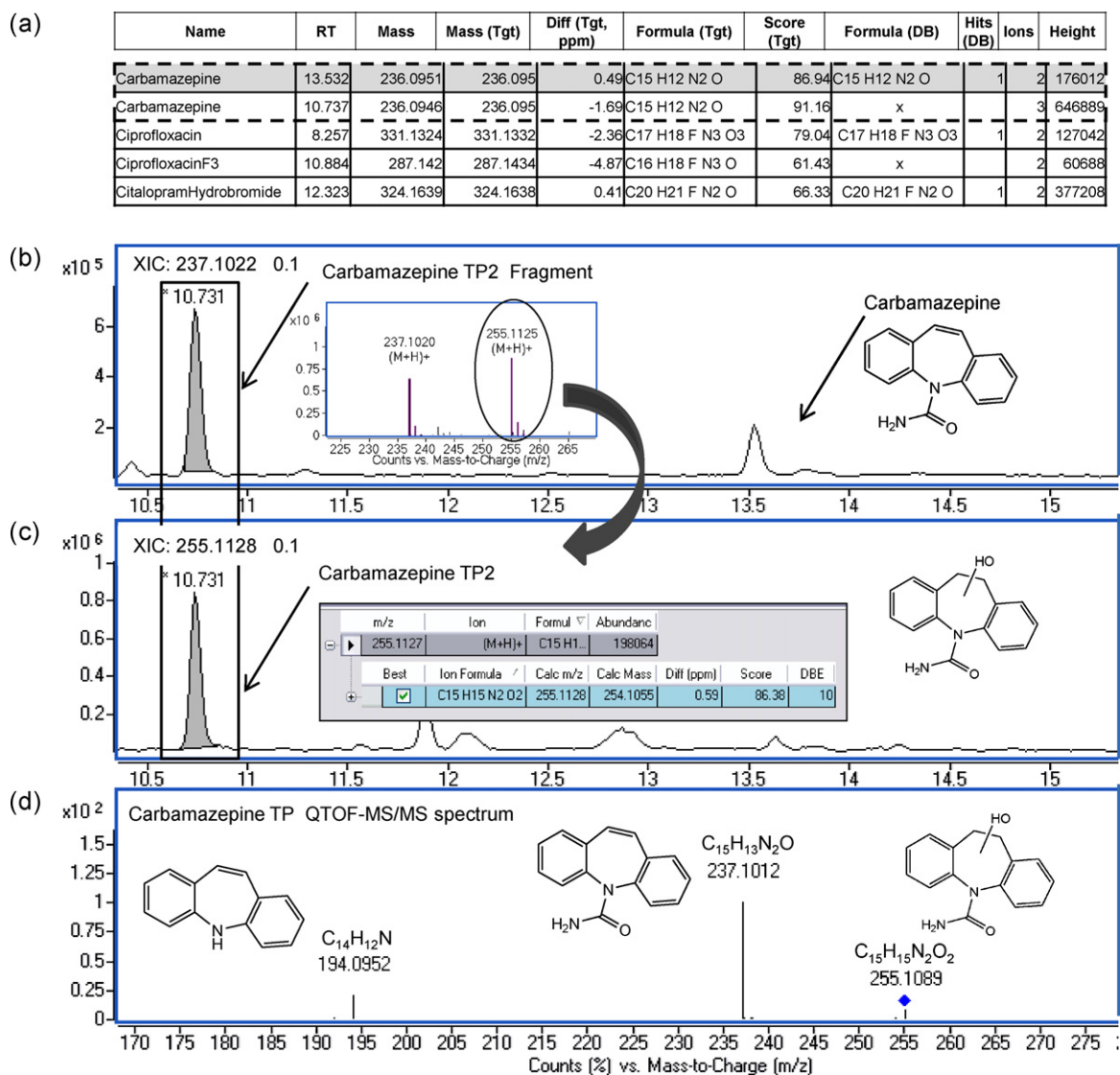


Fig. 6. Steps in the identification of carbamazepine TP2 in a wastewater sample by LC-QTOF-MS/MS: (a) extract of the report obtained by MFE where an ion corresponding with carbamazepine formula is identified at a wrong retention time; (b) extracted ion chromatogram (m/z 237) and mass spectrum of the suspected peak where the presence of an ion at higher mass is detected (m/z 255); (c) extracted ion chromatogram and identification of the ion with m/z 255 (carbamazepine TP2); and (d) confirmation by MS/MS and structure assignment of carbamazepine TP2.

composition than carbamazepine ($C_{15}H_{12}N_2O$). One of them corresponded to carbamazepine protonated molecule (13.53 min) but the other one eluted at a different retention time (10.73 min). A detailed examination of the spectrum revealed that this ion was in fact a fragment of another compound with higher molecular weight (m/z 255). The obtained elemental composition ($C_{15}H_{14}N_2O_2$) was confirmed with a very high mass accuracy (0.59 ppm error) and a score of 86% and corresponded to a possible hydroxylated derivative of carbamazepine proposed as 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine. The MS/MS spectrum yielded two main ions: m/z 237 (resulting of the loss of the hydroxyl group) and m/z 194 (which is common to carbamazepine and corresponded to neutral loss of isocyanic acid (CONH)). Presence of a dihydroxylated derivative (m/z 271) was also evidenced by detection of an ion fragment common to carbamazepine epoxide (m/z 253). Carbamazepine epoxide is a well-known metabolite of carbamazepine, frequently detected in wastewater effluents, which was initially included in the database. The TP detected presented a fragmentation pattern similar to the epoxide and the structure proposed is shown in Fig. 7. The position of the second hydroxyl group

cannot be confirmed by MS/MS data but a previous reference of the proposed structure in the literature reinforces this assignment [33].

The identification of amoxicillin TP was also made from the parent compound. As can be seen in Fig. S1 (supplementary information), amoxicillin TP has the same elemental composition as of amoxicillin, but the MS/MS spectrum yielded different fragmentation. Presence of the characteristic diagnostic ion (common to penicillins) $C_6H_9NO_2S$ (m/z 160), obtained by the cleavage of the five-membered thiazolidine ring [14], evidenced that this derivative belongs to this family of antibiotics. The fragment at m/z 207 confirmed the structure as (5R) amoxicillin diketopiperazine 2',5', one of the main transformation products of amoxicillin recently reported in wastewater and surface waters [14,35].

The accurate database of compounds and fragments can also be used to find isomeric compounds to those included in the database. These compounds have the same elemental composition and therefore the same accurate mass but elute at different retention time. In this study, as can be seen in Fig. S2 (supplementary information), a possible isomer of omeprazole, was identified. Omeprazole and its isomer compound have a similar

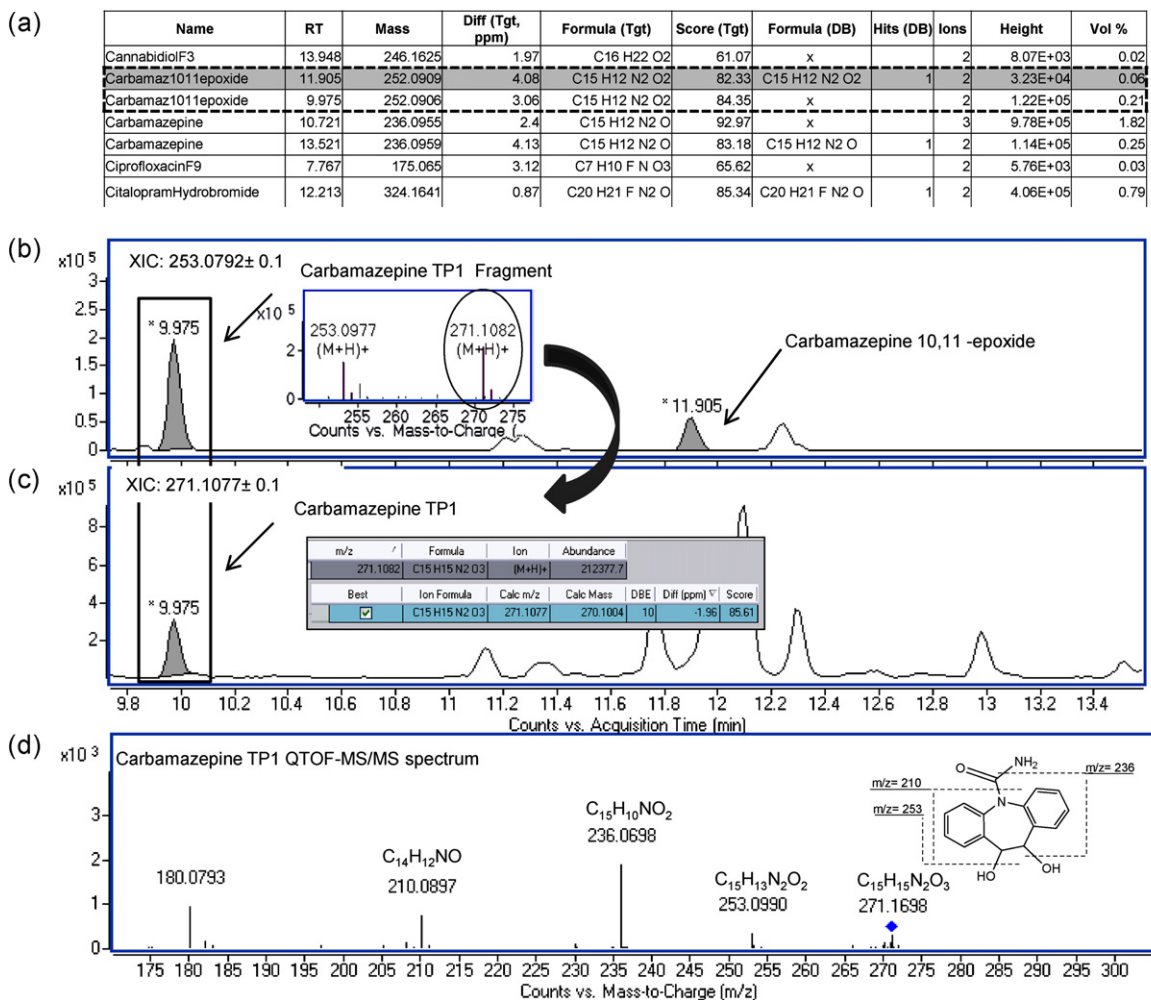


Fig. 7. Screening of an effluent wastewater sample using LC-QTOF-MS/MS: (a) extract of the report obtained by MFE. Compounds with no formula (DB) have no retention time matched with the target compounds included in the database (potential TPs); (b) extracted ion chromatogram of the ion with m/z 253 which correspond to a fragment of carbamazepine TP1 at 9.975 min and the target compound carbamazepine 10,11 epoxide at 11.905 min; (c) extracted ion chromatogram and identification of the ion with m/z 271 (carbamazepine TP1); and (d) MS/MS spectrum and structure assignment of carbamazepine TP1.

fragmentation pattern but no standard was available to confirm this tentative assignment.

4. Conclusions

Fragmentation pathways of selected contaminants by CID can be used to find out and accelerate identification of transformation products in wastewater samples. Thus, the use of databases including accurate-mass information of compounds and fragments represents a useful tool for identification of transformation products in a more realistic scenario. Despite the advantages of using the semi-automatic procedure described in this work, final confirmation of the TPs still represent a complex and time consuming task and requires experienced personnel to perform a critical review of the information generated. Although search parameters are closely related with the comprehensibility of the study, it is worth mentioning that this method is not comprehensive at all since not all the generated TPs have fragments common to the original compounds. Moreover, even though a possible TP has been identified, unequivocal confirmation in the absence of standards is not always feasible by MS/MS. However, the results obtained with the implementation of this strategy to wastewater samples confirm its usefulness and

represent a valuable starting point for future studies of degradation.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Spanish Ministry of Science and Innovation-Fondos FEDER (Project CTQ2010-20740-C03-03) and the Spanish Ministry of Education and Science (Program Consolider Ingenio 2010 Ref. CSD2006-00044 (TRAGUA)) for economical support. AP-P acknowledges ANII Uruguay, BE_POS_NAC_2010_1_1637.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chroma.2011.09.003.

References

- [1] S.D. Richardson, *Anal. Chem.* 81 (2009) 4645.
- [2] M.J. Gómez, M.J. Martínez Bueno, S. Lacorte, A.R. Fernández-Alba, A. Agüera, *Chemosphere* 66 (2007) 993.
- [3] L.H.M.L.M. Santos, A.N. Araújo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, M.C.B.S.M. Montenegro, *J. Hazard. Mater.* 175 (2010) 45.

- [4] T. Smil, in: D. Barcelo, M. Petrovic (Eds.), *Water Pollution, Handbook of Environmental Chemistry*, vol. 5, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, 2008, p. 105.
- [5] M.D. Celiz, J. Tso, D.S. Aga, *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (2009) 2473.
- [6] D.W. Kolpin, W.A. Battaglin, K.E. Conn, E.T. Furlong, S.T. Glassmeyer, S.J. Kalkhoff, M.T. Meyer, D.J. Schnoebelen, in: B.A. Boxall (Ed.), *Reactions and Processes, Handbook of Environmental Chemistry*, vol. 2, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, 2009, p. 83.
- [7] R. Andreozzi, M. Raffaele, P. Nicklas, *Chemosphere* 50 (2003) 1319.
- [8] A.L. Boreen, W.A. Arnold, K. McNeill, *Aquat. Sci.* 65 (2003) 320.
- [9] A.G. Trovó, R.F.P. Nogueira, A. Agüera, C. Sirtori, A.R. Fernández-Alba, *Chemosphere* 77 (2009) 1292.
- [10] M.J. Gómez, C. Sirtori, M. Mezcuca, A.R. Fernández-Alba, A. Agüera, *Water Res.* 42 (2008) 2698.
- [11] J. Radjenović, S. Pérez, M. Petrović, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1210 (2008) 142.
- [12] T. Kosjek, E. Heath, M. Petrovic, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 1076.
- [13] A.C. Hogenboom, J.A. van Leerdam, P. de Voegt, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 510.
- [14] A. Pérez-Parada, A. Agüera, M.M. Gómez-Ramos, J.F. García-Reyes, H. Heinzen, A.R. Fernández-Alba, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 731.
- [15] Y. Pico, M. Farre, C. Soler, D. Barcelo, *Anal. Chem.* 79 (2007) 9350.
- [16] A. Agüera, L.A. Perez Estrada, I. Ferrer, E.M. Thurman, S. Malato, A.R. Fernandez-Alba, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 908.
- [17] J. Skotnicka-Pitak, W.O. Khunjar, N.G. Love, D.S. Aga, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3549.
- [18] S. Ma, S.K. Chowdhury, K.B. Alton, *Curr. Drug Metab.* 7 (2006) 503.
- [19] I. Ferrer, M. Mezcuca, M.J. Gómez, E.M. Thurman, A. Agüera, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 443.
- [20] M.J. Martínez Bueno, A. Agüera, M.J. Gómez, M.D. Hernando, J.F. García-Reyes, A.R. Fernández-Alba, *Anal. Chem.* 79 (2007) 9372.
- [21] M.J. Gómez, M.M. Gómez-Ramos, O. Malato, M. Mezcuca, A.R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7038.
- [22] I. Ferrer, A. Fernandez-Alba, J.A. Zweigenbaum, E.M. Thurman, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 3659.
- [23] R. Díaz, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 355.
- [24] J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba, *Anal. Chem.* 79 (2007) 307.
- [25] M.S. Bloomfield, *Talanta* 58 (2002) 1301.
- [26] K. Tsuji, J.H. Robertson, *Anal. Chem.* 43 (1971) 818.
- [27] C. Pieper, D. Risse, B. Schmidt, B. Braun, U. Szewzyk, W. Rotard, *Water Res.* 44 (2010) 4559.
- [28] Thomatou, I. Zacharias, D. Hela, I. Konstantinou, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2011) 1.
- [29] J. Struger, T. Fletcher, *J. Great Lakes Res.* 33 (2007) 887.
- [30] I.K. Konstantinou, D.G. Hela, T.A. Albanis, *Environ. Pollut.* 141 (2006) 555.
- [31] M.J. Gómez, O. Malato, I. Ferrer, A. Agüera, A.R. Fernández-Alba, *J. Environ. Monit.* 9 (2007) 718.
- [32] V.N. Kouloumbos, D.F. Tsipi, A.E. Hiskia, D. Nikolic, R.B. van Breemen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003) 803.
- [33] S. Kern, K. Fenner, H.P. Singer, R.P. Schwarzenbach, J. Hollender, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 7039.
- [34] M. Colovic, D. Krstic, S. Petrovic, A. Leskovic, G. Joksic, J. Savic, M. Franko, P. Trebse, V. Vasic, *Toxicol. Lett.* 193 (2010) 9.
- [35] A. Lamm, I. Gozlan, A. Rotstein, D. Avisar, *J. Environ. Sci. Health A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 44 (2009) 1512.

Estudios de determinación de compuestos orgánicos a niveles traza en matrices complejas

Anexo 9

Table S1. Information incorporated in the accurate mass database including retention time (RT), elemental composition, calculated mass and ion fragments obtained by LC-QTOF-MS/MS for the selected compounds.

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
11nor9carboxyTHC	21.786	C21H28O4	344.1987
11nor9carboxyTHCF1	21.786	C21H26O3	326.1882
11nor9carboxyTHCF2	21.786	C20H26O2	298.1938
11nor9carboxyTHCF3	21.786	C17H20O2	256.1463
11nor9carboxyTHCF4	21.786	C12H16O2	192.115
11nor9carboxyTHCF5	21.786	C12H10O2	186.0681
11nor9carboxyTHCF6	21.786	C11H12O	160.0888
11nor9carboxyTHCF7	21.786	C12H16O2	192.115
11nor9carboxyTHCF8	21.786	C6H12O3	132.0786
3methylxanthine	1.53	C6H6N4O2	166.0491
3methylxanthineF1	1.53	C6H4N4O	140.9475
3methylxanthineF2	1.53	C5H5N4O	123.0432
3methylxanthineF3	1.53	C5H4N4	120.0436
4AA	2.468	C11H13N3O	203.1058
4AAF1	2.468	C11H12N2O	188.0806
4AAF10	2.468	C9H7N	129.0578
4AAF11	2.468	C9H6N	127.0422
4AAF12	2.468	C8H7N	117.0578
4AAF13	2.468	C5H6N2O	110.048
4AAF14	2.468	C7H5N	103.0422
4AAF2	2.468	C11H10N2O	186.0793
4AAF3	2.468	C10H8N2O	172.0636
4AAF4	2.468	C10H10N2	158.0844
4AAF5	2.468	C10H7NO	157.0527
4AAF6	2.468	C9H7NO	145.0527
4AAF7	2.468	C9H8N2	144.0687
4AAF8	2.468	C8H8N2	132.0687
4AAF9	2.468	C9H9N	131.0735
4AAA	5.651	C13H15N3O2	245.1164
4AAAF1	5.651	C13H13N3O	227.1058
4AAAF2	5.651	C11H13N3O	203.1058
4AAAF3	5.651	C11H10N2O	186.0793
4AAAF4	5.651	C10H8N2O	172.0636
4AAAF5	5.651	C10H10N2	158.0844
4AAAF6	5.651	C7H5N	103.0422
4DAA	2.5	C13H17N3O	231.1371
4DAAF1	2.5	C11H10N2O	186.0793
4DAAF2	2.5	C10H12N2O	176.0949

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
4DAAF3	2.5	C10H10N2	158.0844
4DAAF4	2.5	C7H10N2O	138.0793
4DAAF5	2.5	C6H12N2	112.1
4DAAF6	2.5	C6H10N2	110.0844
4DAAF7	2.5	C5H10N2	98.0844
4DAAF8	2.5	C4H7N3	97.064
4DAAF9	2.5	C5H8N2	96.0687
4FAA	5.635	C12H13N3O2	231.1008
4FAAF1	5.635	C12H11N3O	213.0902
4FAAF2	5.635	C11H13N3O	203.1058
4FAAF3	5.635	C11H10N2O	186.0793
4FAAF4	5.635	C10H8N2O	172.0636
4FAAF5	5.635	C10H10N2	158.0844
4FAAF6	5.635	C7H5N	103.0422
4FAAF7	5.635	C6H7N	93.0578
4MAA	2.291	C12H15N3O	217.1215
4MAAF1	2.291	C11H10N2O	186.0793
4MAAF2	2.291	C10H10N2	158.0844
4MAAF3	2.291	C6H8N2O	124.0636
4MAAF4	2.291	C5H8N2	96.0687
Acetaminophen	2.669	C8H9NO2	151.0633
AcetaminophenF1	2.669	C6H7NO	109.0528
AcetaminophenF2	2.669	C6H4O	92.0262
AcetaminophenF3	2.669	C6H5N	91.0422
Acetylmorphine	5.308	C19H21NO4	327.147
AcetylmorphineF1	5.308	C19H18O4	310.1205
AcetylmorphineF2	5.308	C17H19NO3	285.1365
AcetylmorphineF3	5.308	C17H17NO2	267.1259
AcetylmorphineF4	5.308	C16H10O	218.0731
AcetylmorphineF5	5.308	C14H10O2	210.0681
AcetylmorphineF6	5.308	C14H8O	192.0575
AcetylmorphineF7	5.308	C13H10O	182.0731
Ametryn	12.985	C9H17N5S	227.1204
AmetrynF1	12.985	C6H11N5S	185.0735
AmetrynF2	12.985	C5H9N3S	143.0517
AmetrynF3	12.985	C5H7N5	137.0701
AmetrynF4	12.985	C3H5N3S	115.0204
AmetrynF5	12.985	C4H5N3	95.0483
Amitriptyline	13.634	C20H23N	277.183
AmitriptylineF9	13.634	C16H12	204.0939
AmitriptylineF10	13.634	C18H16	232.1252

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
AmitriptylineF1	13.634	C5H9N	83.0735
AmitriptylineF2	13.634	C7H6	90.0469
AmitriptylineF3	13.634	C8H8	104.0628
AmitriptylineF4	13.634	C9H8	116.0628
AmitriptylineF5	13.634	C10H8	128.0626
AmitriptylineF6	13.634	C12H10	154.0782
AmitriptylineF7	13.634	C14H10	178.0782
AmitriptylineF8	13.634	C15H10	190.0782
Amoxicillin	1.89	C16H19N3O5S	365.1045
AmoxicillinF1	1.89	C16H16N2O5S	348.078
AmoxicillinF2	1.89	C11H7NO3S	233.0146
AmoxicillinF3	1.89	C10H9NO2S	207.0354
AmoxicillinF4	1.89	C10H7NO3	189.0426
AmoxicillinF5	1.89	C6H9NO2S	159.0354
AmoxicillinF6	1.89	C5H7NS	113.0299
Amphetamine	3.829	C9H13N	135.1048
AmphetamineF1	3.829	C9H10	118.0782
AmphetamineF2	3.829	C7H6	90.0469
Antipyrin	8.746	C11H12N2O	188.0949
AntipyrinF1	8.746	C11H11NO	173.084
AntipyrinF10	8.746	C5H7NO	97.0528
AntipyrinF11	8.746	C7H6	90.0469
AntipyrinF12	8.746	C5H4	64.0313
AntipyrinF2	8.746	C10H12N2	160.1
AntipyrinF3	8.746	C9H10N2	146.0849
AntipyrinF4	8.746	C10H9N	143.0735
AntipyrinF5	8.746	C9H7N	129.0578
AntipyrinF6	8.746	C8H9N	119.0735
AntipyrinF7	8.746	C8H7N	117.0578
AntipyrinF8	8.746	C7H7N	105.0578
AntipyrinF9	8.746	C7H5N	103.0422
Atenolol	1.804	C14H22N2O3	266.163
AtenololF1	1.804	C11H16N2O3	224.1161
AtenololF10	1.804	C6H11N	97.0891
AtenololF2	1.804	C11H13NO3	207.0895
AtenololF3	1.804	C11H11NO2	189.079
AtenololF4	1.804	C10H11NO2	177.079
AtenololF5	1.804	C9H9NO2	163.0633
AtenololF6	1.804	C10H8O	144.0575
AtenololF7	1.804	C8H6NO	132.0455
AtenololF8	1.804	C8H8O	120.0575

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
AtenololF9	1.804	C6H13NO	115.0997
Atrazine	15.083	C8H14ClN5	215.0937
AtrazineF1	15.083	C5H8ClN5	173.0468
AtrazineF2	15.083	C4H6ClN3	131.025
AtrazineF3	15.083	C6H9N3	123.0496
AtrazineF4	15.083	C4H5N3	95.0483
Azinphosethyl	20.044	C12H16N3O3PS2	345.0371
AzinphosethylF1	20.044	C9H9O3PS2	259.973
AzinphosethylF2	20.044	C7H5O3PS2	231.9417
AzinphosethylF3	20.044	CH3O2PS2	141.9312
AzinphosethylF4	20.044	C2H5O2PS	123.9748
Azinphosmethyl	17.846	C10H12N3O3PS2	317.0057
AzinphosmethylF1	17.846	C9H9O3PS2	259.973
AzinphosmethylF2	17.846	C2H5O2PS	123.9748
Azithromycin	10.242	C38H72N2O12	748.5085
AzithromycinF1	10.242	C30H56N2O8	572.4036
AzithromycinF2	10.242	C30H58N2O9	590.4142
AzithromycinF3	10.242	C8H15NO2	157.1103
AzithromycinF4	10.242	C6H13NO	115.0997
AzithromycinF5	10.242	C5H6O	82.0418
Benzoylcegonine	8.394	C16H19NO4	289.1314
BenzoylcegonineF1	8.394	C16H17NO3	271.1208
BenzoylcegonineF2	8.394	C9H13NO2	167.0946
BenzoylcegonineF3	8.394	C9H11NO	149.084
BenzoylcegonineF4	8.394	C8H6O	118.0418
BenzoylcegonineF5	8.394	C7H4O	104.0262
BenzoylcegonineF6	8.394	C7H6	90.0469
BenzoylcegonineF7	8.394	C5H7N	81.0578
Buturon	16.924	C12H13ClN2O	236.0716
ButuronF1	16.924	C8H7ClN2	166.0298
ButuronF2	16.924	C5H9N	83.0735
Caffeine	5.233	C8H10N4O2	194.0804
CaffeineF1	5.233	C9H12N4	176.1062
CaffeineF2	5.233	C6H7N3O	137.0589
CaffeineF3	5.233	C7H6O2	122.0368
CaffeineF4	5.233	C8H1N	111.0109
CaffeineF5	5.233	C5H7N3	109.064
CaffeineF6	5.233	C5H8O2	100.0524
CaffeineF7	5.233	C4H6N2	82.0531
Cannabidiol	24.036	C21H30O2	314.2246
CannabidiolF1	24.036	C18H24O2	272.1776

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
CannabidiolF10	24.036	C8H10	106.0782
CannabidiolF11	24.036	C6H8O	96.0575
CannabidiolF12	24.036	C7H8	92.0626
CannabidiolF2	24.036	C17H22O2	258.162
CannabidiolF3	24.036	C16H22O2	246.162
CannabidiolF4	24.036	C15H22O2	234.162
CannabidiolF5	24.036	C14H20O2	220.1463
CannabidiolF6	24.036	C12H16O2	192.115
CannabidiolF7	24.036	C12H10O	170.0431
CannabidiolF8	24.036	C10H14	134.1095
CannabidiolF9	24.036	C7H6O2	122.0366
Carbamaz1011epoxide	11.769	C15H12N2O2	252.0899
Carbamaz1011epoxideF1	11.769	C13H9N	179.0735
Carbamaz1011epoxideF2	11.769	C14H11NO	209.0841
Carbamaz1011epoxideF3	11.769	C15H9NO2	235.0633
Carbamazepine	13.554	C15H12N2O	236.095
CarbamazepineF1	13.554	C15H9NO	219.0684
CarbamazepineF2	13.554	C14H11N	193.0891
Cefotaxime	8.014	C16H17N5O7S2	455.0569
CefotaximeF1	8.014	C14H13N5O5S2	395.0358
CefotaximeF10	8.014	C4H3N3S	125.0047
CefotaximeF2	8.014	C14H17N5O4S	351.1001
CefotaximeF3	8.014	C15H9N5O2S	323.0477
CefotaximeF4	8.014	C5H12N4O3S2	240.0351
CefotaximeF5	8.014	C3H9N3O2S2	183.0136
CefotaximeF6	8.014	C7H6N2OS	166.0201
CefotaximeF7	8.014	C5H5N3OS	155.0074
CefotaximeF8	8.014	C6H6N2S	138.0251
CefotaximeF9	8.014	C6H6N2	106.0531
Chlorfenvinphos	20.322	C12H14Cl3O4P	357.9695
ChlorfenvinphosF1	20.322	C10H10Cl3O4P	329.9382
ChlorfenvinphosF2	20.322	C7H3Cl2OP	203.9298
ChlorfenvinphosF3	20.322	C4H11O4P	154.0395
ChlorfenvinphosF4	20.322	C2H7O4P	126.0082
Chlorotetraciline	9.42	C22H23ClN2O8	478.1143
ChlorotetracilineF1	9.42	C22H20ClNO8	461.0877
ChlorotetracilineF2	9.42	C22H18ClNO7	443.0772
ChlorotetracilineF3	9.42	C21H20ClNO7	433.0928
ChlorotetracilineF4	9.42	C11H13ClN2O7	320.0411
ChlorotetracilineF5	9.42	C19H7ClN2O	314.0247
ChlorotetracilineF6	9.42	C12H11ClN2O4	282.0413

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
ChlorotetracilineF7	9.42	C10H17N2O7	274.0801
ChlorotetracilineF8	9.42	C6H7NO2	125.0482
Chloroxuron	17.881	C15H15ClN2O2	290.0822
ChloroxuronF1	17.881	C12H8ClNO	217.0294
ChloroxuronF2	17.881	C3H5NO	71.0371
Chlorpyriphosmethyl	22.222	C7H7Cl3NO3PS	320.895
ChlorpyriphosmethylF1	22.222	C6H3Cl3NO2PS	288.8687
ChlorpyriphosmethylF2	22.222	C5H1O2P	123.9714
Chlortoluron	14.743	C10H13ClN2O	212.0716
ChlortoluronF1	14.743	C7H6ClN	139.0189
ChlortoluronF2	14.743	C3H5NO	71.0371
Ciprofloxacin	8.111	C17H18FN3O3	331.1332
CiprofloxacinF1	8.111	C17H16FN3O2	313.1226
CiprofloxacinF2	8.111	C17H15N3O2	293.1164
CiprofloxacinF3	8.111	C16H18FN3O	287.1434
CiprofloxacinF4	8.111	C13H18FN3O2	267.1371
CiprofloxacinF5	8.111	C17H12N2	244.0886
CiprofloxacinF6	8.111	C12H7FN2O2	230.0491
CiprofloxacinF7	8.111	C11H7FN2O	202.0542
CiprofloxacinF8	8.111	C10H5FN2O	188.0386
CiprofloxacinF9	8.111	C7H10FNO3	175.0644
CitalopramHydrobromide	12.267	C20H21FN2O	324.1638
CitalopramHydrobromideF1	12.267	C7H5F	108.0375
CitalopramHydrobromideF2	12.267	C8H5N	115.0422
CitalopramHydrobromideF3	12.267	C12H7N	165.0578
CitalopramHydrobromideF4	12.267	C16H8FN	233.0641
CitalopramHydrobromideF5	12.267	C18H12FN	261.0954
Clarithromycin	13.763	C38H69NO13	747.4769
ClarithromycinF1	13.763	C30H55NO10	589.3826
ClarithromycinF2	13.763	C29H51NO9	557.3564
ClarithromycinF3	13.763	C8H15NO2	157.1103
ClarithromycinF4	13.763	C6H13NO	115.0997
ClarithromycinF5	13.763	C5H6O	82.0418
Clembuterol	9.35	C12H18Cl2N2O	276.0796
ClembuterolF1	9.35	C12H16Cl2N2	258.069
ClembuterolF2	9.35	C8H8Cl2N2	202.0064
ClembuterolF3	9.35	C8H5NO	131.0371
Cloxacillin	15.76	C19H18ClN3O5S	435.0655
CloxacillinF1	15.76	C13H9ClN2O3	276.0301
CloxacillinF2	15.76	C11H8ClNO	205.0294
CloxacillinF3	15.76	C6H9NO2S	159.0354

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
CloxacillinF4	15.76	C5H7NS	113.0299
Cocaine	9.801	C17H21NO4	303.147
CocaineF1	9.801	C10H15NO2	181.1103
CocaineF2	9.801	C9H11NO	149.084
CocaineF3	9.801	C8H6O	118.0418
CocaineF4	9.801	C7H4O	104.0262
CocaineF5	9.801	C7H6	90.0469
Codeine	3.202	C18H21NO3	299.1521
CodeineF1	3.202	C15H14O3	242.0943
CodeineF2	3.202	C15H12O2	224.0837
CodeineF3	3.202	C14H14O2	214.0994
CodeineF4	3.202	C13H10O2	198.0681
CodeineF5	3.202	C12H10O2	186.0681
CodeineF6	3.202	C8H8O2	136.0524
Cotinine	1.431	C10H12N2O	176.095
CotinineF1	1.431	C5H5N	79.0422
CotinineF2	1.431	C5H7NO	97.0527
CotinineF3	1.431	C9H7NO	145.0527
CyclophosphamideMonoH	11.061	C7H15Cl2N2O2P	260.0248
CyclophosphamideMonoHF1	11.061	C3H8NOP	105.0343
CyclophosphamideMonoHF2	11.061	C3H6NO2P	119.0136
CyclophosphamideMonoHF3	11.061	C3H7ClNOP	138.9954
CyclophosphamideMonoHF4	11.061	C3H9ClNOP	141.011
CyclophosphamideMonoHF5	11.061	C5H11Cl2N2O2P	231.9935
Danofloxacin	8.87	C19H20FN3O3	357.1488
DanofloxacinF1	8.87	C19H18FN3O2	339.1383
DanofloxacinF2	8.87	C18H20FN3O	313.159
DanofloxacinF3	8.87	C17H15FN2O	282.1168
DanofloxacinF4	8.87	C14H7FN2O2	254.0491
DanofloxacinF5	8.87	C17H15FN2O	282.1168
DanofloxacinF6	8.87	C6H9N	95.0735
DEET	15.284	C12H17NO	191.131
DEETF1	15.284	C8H6O	118.0418
DEETF2	15.284	C7H6	90.0469
delta9THC	26.469	C21H30O2	314.2246
delta9THCF1	26.469	C17H22O2	258.162
delta9THCF2	26.469	C15H22O2	234.162
delta9THCF3	26.469	C15H20O2	232.1463
delta9THCF4	26.469	C14H20O2	220.1453
delta9THCF5	26.469	C12H16O2	192.115
delta9THCF6	26.469	C10H14	134.1095

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
delta9THCF7	26.469	C7H6O2	122.0368
delta9THCF8	26.469	C8H10	106.0782
delta9THCF9	26.469	C7H8	92.0626
Demechlocycline	9.33	C21H21ClN2O8	464.0986
DemechlocyclineF1	9.33	C21H18ClNO8	447.0721
DemechlocyclineF2	9.33	C21H16ClNO7	429.0615
DemechlocyclineF3	9.33	C14H9ClN2O3	288.0301
DemechlocyclineF4	9.33	C7H7NO3	153.0426
Deoxycycline	10.69	C22H24N2O8	444.1532
DesthylTerbutilazine	13.483	C7H12ClN5	201.078
DesthylTerbutilazineF1	13.483	C3H4ClN5	145.0155
DesthylTerbutilazineF2	13.483	C2H8ClN3	109.0384
DesthylTerbutilazineF3	13.483	C2H2ClN3	102.9937
Diazinon	21.531	C12H21N2O3PS	304.101
DiazinonF1	21.531	C10H17N2O3PS	276.0697
DiazinonF2	21.531	C8H13N2O3PS	248.0384
DiazinonF3	21.531	C9H13OP	168.0704
DiazinonF4	21.531	C8H12N2O	152.0949
Dichlorvos	13.459	C4H7Cl2O4P	219.9459
DichlorvosF1	13.459	C2H5O3P	107.9982
Dichloxacillin	16.89	C19H17Cl2N3O5S	469.0266
DichloxacillinF1	16.89	C13H8Cl2N2O3	309.9912
DichloxacillinF2	16.89	C11H7Cl2NO	238.9904
DichloxacillinF3	16.89	C6H9NO2S	159.0354
DichloxacillinF4	16.89	C5H7NS	113.0299
Dimethoate	10.477	C5H12NO3PS2	229.0002
DimethoateF1	10.477	C4H7O3PS2	197.9574
DimethoateF2	10.477	C3H7O2PS2	169.9625
DimethoateF3	10.477	C2H5O2PS	123.9748
Diuron	15.631	C9H10Cl2N2O	232.017
DiuronF1	15.631	C7H3Cl2NO	186.9591
DiuronF2	15.631	C3H5NO	71.0371
EDDP	12.478	C20H23N	277.183
EDDPF1	12.478	C18H18N	248.1439
EDDPF2	12.478	C17H15N	233.1194
EDDPF3	12.478	C14H17N	199.1361
EDDPF4	12.478	C13H15N	185.1204
Enoxacin	7.82	C15H17FN4O3	320.1284
EnoxacinF1	7.82	C15H15FN4O2	302.1172
EnoxacinF2	7.82	C14H17FN4O	276.145
EnoxacinF3	7.82	C13H11FN4O2	274.0866

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
EnoxacinF4	7.82	C12H12FN3O	233.0964
EnoxacinF5	7.82	C11H6FN3O2	231.0444
EnoxacinF6	7.82	C10H8FN3O	205.0651
Enrofloxacin	8.8	C19H22FN3O3	359.1645
EnrofloxacinF1	8.8	C19H18FN3O2	341.1539
EnrofloxacinF2	8.8	C18H22FN3O	315.1747
EnrofloxacinF3	8.8	C14H13FN2O	244.1012
EnrofloxacinF4	8.8	C12H10FNO	203.0746
Ephedrine	2.768	C10H15NO	165.1153
EphedrineF1	2.768	C10H13N	147.1048
EphedrineF2	2.768	C9H10N	132.0812
EphedrineF3	2.768	C9H9N	131.0735
EphedrineF4	2.768	C9H8	116.0625
EphedrineF5	2.768	C9H6	114.0472
EphedrineF6	2.768	C7H6	90.0469
Erythromycin	12.205	C37H67NO13	733.4612
ErythromycinF1	12.205	C37H65NO12	715.4507
ErythromycinF2	12.205	C37H63NO11	697.4401
ErythromycinF3	12.205	C29H53NO10	575.3669
ErythromycinF4	12.205	C29H51NO9	557.3564
ErythromycinF5	12.205	C29H49NO8	539.3458
ErythromycinF6	12.205	C29H47NO7	521.3352
ErythromycinF7	12.205	C8H15NO2	157.1103
ErythromycinF8	12.205	C7H10O2	126.0681
ErythromycinF9	12.205	C6H13NO	115.0997
Estrone	17.109	C18H22O2	270.162
Ethoxyquin	14.13	C14H19NO	217.1466
EthoxyquinF1	14.13	C13H15NO	201.1153
EthoxyquinF10	14.13	C7H7NO	121.0533
EthoxyquinF11	14.13	C7H5O	105.0578
EthoxyquinF2	14.13	C12H15NO	189.1153
EthoxyquinF3	14.13	C12H13NO	187.0997
EthoxyquinF4	14.13	C11H13NO	175.0997
EthoxyquinF5	14.13	C11H11NO	173.084
EthoxyquinF6	14.13	C10H11NO	161.084
EthoxyquinF7	14.13	C10H9NO	159.0684
EthoxyquinF8	14.13	C9H9NO	147.0784
EthoxyquinF9	14.13	C9H7NO	145.0527
Ethylamphetamine	6.771	C11H17N	163.1361
EthylamphetamineF1	6.771	C9H10	118.0782
EthylamphetamineF2	6.771	C7H6	90.0469

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
EthylamphetamineF3	6.771	C5H9N	83.0735
Ethylmorphine	7.156	C19H23NO3	313.1678
EthylmorphineF1	7.156	C19H21NO2	295.1572
EthylmorphineF2	7.156	C16H16O3	256.1099
EthylmorphineF3	7.156	C16H14O3	254.0943
EthylmorphineF4	7.156	C16H14O2	238.0994
EthylmorphineF5	7.156	C16H20O	228.1514
EthylmorphineF6	7.156	C14H12O2	212.0837
EthylmorphineF7	7.156	C13H12O2	200.0837
EthylmorphineF8	7.156	C13H10O	182.0731
Flumequine	14.076	C14H12FNO3	261.0801
FlumequineF1	14.076	C14H12FNO2	243.0683
FlumequineF2	14.076	C12H6FNO2	215.0382
FlumequineF3	14.076	C11H4FNO2	201.0226
FlumequineF4	14.076	C11H10FN	175.0797
FlumequineF5	14.076	C10H4FNO	173.0277
FlumequineF6	14.076	C9H6FN	147.0484
FlumequineF7	14.076	C9H4FN	145.0328
FlumequineF8	14.076	C9H3N	125.0265
Flumeturon	15.011	C10H11F3N2O	232.0823
FlumeturonF1	15.011	C7H4F3N	159.0296
FlumeturonF2	15.011	C3H5NO	71.0371
Fluoxetine	14.14	C17H18F3NO	309.134
FluoxetineF2	14.14	C10H14N	147.1048
Heroin(Diacetylmorphine)	9.584	C21H23NO5	369.1559
Heroin(Diacetylmorphine)F1	9.584	C19H21NO4	327.147
Heroin(Diacetylmorphine)F2	9.584	C19H19NO3	309.1365
Heroin(Diacetylmorphine)F3	9.584	C17H17NO2	267.1259
Heroin(Diacetylmorphine)F4	9.584	C16H12O2	236.0837
Heroin(Diacetylmorphine)F5	9.584	C14H10O2	210.0681
Heroin(Diacetylmorphine)F6	9.584	C6H12O5	164.0684
Ifosfamide	11.447	C7H15Cl2N2O2P	260.0248
IfosfamideF1	11.447	C5H11Cl2N2O2P	231.9935
IfosfamideF6	11.447	C4H10NOP	119.05
IfosfamideF5	11.447	CHCINO2P	124.9433
IfosfamideF4	11.447	C5H8NO2P	145.0292
IfosfamideF3	11.447	C3H5CINO2P	152.9746
IfosfamideF2	11.447	C5H9CINO2P	181.0059
Isoproturon	15.37	C12H18N2O	206.1419
IsoproturonF1	15.37	C9H12N2O	164.0949
IsoproturonF2	15.37	C9H11N	133.0891

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
Ketamine	7.896	C13H16ClNO	237.092
KetamineF1	7.896	C13H14ClN	219.0815
KetamineF2	7.896	C12H11ClO	206.0498
KetamineF3	7.896	C11H11Cl	178.0549
KetamineF4	7.896	C10H7Cl	162.0236
KetamineF5	7.896	C7H5Cl	124.008
Ketorolac	14.454	C15H13NO3	255.0895
KetorolacF1	14.454	C7H4O	104.0262
KetorolacF2	14.454	C7H7N	105.0578
KetorolacF3	14.454	C9H7NO3	177.0426
KetorolacF4	14.454	C14H11NO	209.084
Lincomycin	4.052	C18H34N2O6S	406.2138
LincomycinF1	4.052	C8H17N	125.1204
Linuron	17.825	C9H10Cl2N2O2	248.0119
LinuronF1	17.825	C8H6ClN2O	181.0164
LinuronF2	17.825	C9H1ClO	159.9716
LinuronF3	17.825	C6H3Cl2N	158.9648
LinuronF4	17.825	C5H2Cl2	131.9533
Lomefloxacin	8.43	C17H19F2N3O3	351.1394
LomefloxacinF1	8.43	C17H17F2N3O2	333.1289
LomefloxacinF2	8.43	C16H19F2N3O	307.1496
LomefloxacinF3	8.43	C14H14F2N2O	264.1078
LomefloxacinF4	8.43	C13H12F2N2O	250.0919
LomefloxacinF5	8.43	C12H10F2N2O	236.085
LomefloxacinF6	8.43	C11H8F2N2O	222.0604
Malathion	19.583	C10H19O6PS2	330.036
MalathionF1	19.583	C8H13O5PS2	283.9942
MalathionF2	19.583	C6H6O3	126.0317
MalathionF3	19.583	C2H5O2PS	123.9748
MDA	4.729	C10H13NO2	179.0946
MDAF1	4.729	C10H10O2	162.0681
MDAF2	4.729	C8H6O2	134.0368
MDAF3	4.729	C9H8O	132.0575
MDAF4	4.729	C8H8	104.0626
MDEA	7.43	C12H17NO2	207.1259
MDEAF1	7.43	C10H10O2	162.0681
MDEAF2	7.43	C8H6O2	134.0368
MDEAF3	7.43	C9H8O	132.0575
MDEAF4	7.43	C8H8	104.0626
MDMA	5.726	C11H15NO2	193.1103
MDMAF1	5.726	C10H10O2	162.0681

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
MDMAF2	5.726	C8H6O2	134.0368
MDMAF3	5.726	C9H8O	132.0575
MDMAF4	5.726	C8H8	104.0626
Mecarbam	20.469	C10H20NO5PS2	329.052
MecarbamF1	20.469	C6H11O3PS2	225.9887
MecarbamF2	20.469	C3H7O2PS2	169.9625
MecarbamF3	20.469	C4H9O2PS	152.0061
Mepivacaine	7.701	C15H22N2O	246.1732
MepivacaineF1	7.701	C4H7N	69.0578
MepivacaineF2	7.701	C6H11N	97.0891
MepivacaineF3	7.701	C9H11NO	149.084
Methadone	14.041	C21H27NO	309.2092
MethadoneF1	14.041	C19H20O	264.1514
MethadoneF2	14.041	C16H14O	222.1044
MethadoneF3	14.041	C16H10O	218.1089
MethadoneF4	14.041	C16H11	203.0866
MethadoneF5	14.041	C15H14	194.1095
MethadoneF6	14.041	C7H4O	104.0262
MethadoneF7	14.041	C7H6	90.0469
Methamphetamine	4.793	C10H15N	149.1204
MethamphetamineF1	4.793	C9H10	118.0782
MethamphetamineF2	4.793	C7H6	90.0469
Metoprolol	8.958	C15H25NO3	267.1834
MetoprololF1	8.958	C15H23NO2	249.1729
MetoprololF2	8.958	C12H19NO3	225.1365
MetoprololF3	8.958	C12H14O2	190.0994
MetoprololF4	8.958	C11H13NO	175.0997
MetoprololF5	8.958	C11H10O	158.0731
MetoprololF6	8.958	C9H8O	132.0575
MetoprololF7	8.958	C8H8O	120.0575
MetoprololF8	8.958	C6H13NO	115.0997
MetoprololF9	8.958	C6H11N	97.0891
Metoxuron	12.374	C10H13CIN2O2	228.0665
MetoxuronF1	12.374	C7H6CINO	155.0138
MetoxuronF2	12.374	C7H7NO	121.0533
MetoxuronF3	12.374	C6H3NO	105.0214
MetoxuronF4	12.374	C3H5NO	71.0371
Mevinphos	9.825	C7H13O6P	224.045
MevinphosF1	9.825	C6H9O5P	192.0187
MevinphosF2	9.825	C2H7O4P	126.0073
MevinphosF3	9.825	C2H5O3P	107.9993

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
Minocycline	5.17	C23H27N3O7	457.1849
MinocyclineF1	5.17	C23H24N2O7	440.1581
Monolinuron	15.565	C9H11CIN2O2	214.0509
MonolinuronF1	15.565	C8H7CIN2O	182.0247
MonolinuronF2	15.565	C8H7N2O	147.0564
MonolinuronF3	15.565	C6H4CIN	125.0032
MonolinuronF4	15.565	C5H3CI	97.9923
Monuron	13.055	C9H11CIN2O	198.056
MonuronF1	13.055	C7H4CINO	152.9981
MonuronF2	13.055	C6H4CIN	125.0032
MonuronF3	13.055	C3H5NO	71.0371
Morphine	1.514	C17H19NO3	285.1365
MorphineF1	1.514	C17H17NO2	267.1259
MorphineF2	1.514	C14H12O3	228.0786
MorphineF3	1.514	C14H10O2	210.0681
MorphineF4	1.514	C13H12O2	200.0837
MorphineF5	1.514	C11H8O2	172.0536
MorphineF6	1.514	C9H6O2	146.0368
Nadolol	6.406	C17H27NO4	309.194
NadololF1	6.406	C13H19NO4	253.1314
NadololF2	6.406	C13H17NO3	235.1208
NadololF3	6.406	C13H12O2	200.0837
NadololF4	6.406	C13H10O	182.0731
NadololF5	6.406	C11H10O	158.0731
Nalidixicacid	13.642	C12H12N2O3	232.0848
NalidixicacidF1	13.642	C12H10N2O2	214.0742
NalidixicacidF2	13.642	C10H6N2O2	186.0429
NalidixicacidF4	13.642	C9H6N2	142.0531
NalidixicacidF5	13.642	C8H6N2	130.0531
NalidixicacidF6	13.642	C7H5N	103.0422
Nicotine	1.385	C10H14N2	162.1157
NicotineF1	1.385	C9H9N	131.0735
NicotineF2	1.385	C9H7N	129.0578
NicotineF3	1.385	C7H7N	105.0578
NicotineF4	1.385	C8H6N	116.0505
Norfloxacin	7.854	C16H18FN3O3	319.1332
NorfloxacinF1	7.854	C16H16FN3O2	301.1226
NorfloxacinF2	7.854	C16H16N3O2	281.1175
NorfloxacinF3	7.854	C15H18FN3O	275.1422
NorfloxacinF4	7.854	C15H17N3O	255.1371
NorfloxacinF5	7.854	C13H13FN2O	232.1012

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
NorfloxacinF6	7.854	C12H7FN2O2	230.0491
NorfloxacinF7	7.854	C12H11FN2O	218.0855
NorfloxacinF8	7.854	C11H9FN2O	204.0699
Ofloxacin	7.886	C18H20FN3O4	361.1438
OfloxacinF1	7.886	C18H18FN3O3	343.1332
OfloxacinF10	7.886	C10H7FO2	178.043
OfloxacinF2	7.886	C17H20FN3O2	317.1525
OfloxacinF3	7.886	C17H19N3O2	297.1477
OfloxacinF4	7.886	C12H16FN3O3	269.1175
OfloxacinF5	7.886	C14H13FN3O2	260.0961
OfloxacinF6	7.886	C13H11FN2O2	246.0804
OfloxacinF7	7.886	C11H9FN2O2	220.0636
OfloxacinF8	7.886	C10H5FN2O2	204.0335
OfloxacinF9	7.886	C12H4N2O	192.0323
Omeprazole	10.145	C17H19N3O3S	345.1147
OmeprazoleF1	10.145	C8H9N2O	148.0636
OmeprazoleF2	10.145	C8H9NO	135.0684
OmeprazoleF3	10.145	C17H17N3O2S	327.1041
OmeprazoleF3	10.145	C9H11NO2S	197.051
Omethoate	2.394	C5H12NO4PS	213.0224
OmethoateF1	2.394	C5H10NO3PS	195.0119
OmethoateF2	2.394	C4H7O4PS	181.9802
OmethoateF3	2.394	C3H7O3PS	153.9853
OmethoateF4	2.394	C5H1O2P	123.9714
Oxacillin	14.97	C19H19N3O5S	401.1045
OxacillinF1	14.97	C13H10N2O3	242.0691
OxacillinF2	14.97	C6H7N3O4	185.0436
OxacillinF3	14.97	C6H9NO2S	159.0354
OxacillinF4	14.97	C9H5NO	143.0371
OxacillinF5	14.97	C5H7NS	113.0299
Oxolonicacid	11.75	C13H11NO5	261.0637
OxolonicacidF1	11.75	C13H9NO4	243.0531
OxolonicacidF2	11.75	C11H5NO4	215.0218
OxolonicacidF3	11.75	C9H5NO2	159.032
OxolonicacidF4	11.75	C9H7N	129.0578
Oxytetracycline	7.71	C22H24N2O9	460.1482
OxytetracyclineF1	7.71	C22H21NO9	443.11859
OxytetracyclineF2	7.71	C22H22N2O8	442.1332
OxytetracyclineF3	7.71	C22H19NO8	425.1112
OxytetracyclineF4	7.71	C20H12O8	380.0532
OxytetracyclineF5	7.71	C16H16N2O8	348.003

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
OxytetracyclineF6	7.71	C14H10N2O8	323.8838
OxytetracyclineF7	7.71	C12H8O3	200.0473
Paraxanthine	2.805	C7H7N5O2	180.0647
ParaxanthineF1	2.805	C5H5N3O2	139.0382
ParaxanthineF2	2.805	C5H5N3O	123.0432
ParaxanthineF3	2.805	C4H4N2	80.0374
Paroxetine	13.2	C19H20FNO3	329.1427
Paroxetine F6	13.2	C7H5F	108.0375
Paroxetine F5	13.2	C8H7F	122.0532
Paroxetine F4	13.2	C8H6O3	150.0317
Paroxetine F3	13.2	C11H11F	162.0845
Paroxetine F2	13.2	C11H12FN	177.0954
Paroxetine F1	13.2	C12H14FN	191.111
PenicillinG	13.387	C16H18N2O4S	334.0987
PenicillinGF1	13.387	C12H12S	188.0659
PenicillinGF2	13.387	C10H9NO2	175.0633
PenicillinGF3	13.387	C6H9NO2S	159.0354
PenicillinGF4	13.387	C9H9NO	147.0684
PenicillinGF5	13.387	C5H7NS	113.0299
PenicillinV	14.332	C16H18N2O5S	350.0936
PenicillinVF1	14.332	C10H9NO3	191.0582
PenicillinVF2	14.332	C6H9NO2S	159.0354
PenicillinVF3	14.332	C5H7NS	113.0299
Phenylephrine	1.4	C9H13NO2	167.0946
PhenylephrineF1	1.4	C9H11NO	149.084
PhenylephrineF2	1.4	C8H7NO	133.0527
PhenylephrineF3	1.4	C7H8O	108.0575
PhenylephrineF4	1.4	C7H6	90.0469
PhenylephrineF5	1.4	C4H8O2	88.0524
Pindolol	6.32	C14H20N2O2	248.1525
PindololF1	6.32	C11H9NO	171.0684
PindololF2	6.32	C9H7NO	145.0527
PindololF3	6.32	C10H9N	143.0735
PindololF4	6.32	C8H7NO	133.0527
PindololF5	6.32	C6H13NO	115.0997
PindololF6	6.32	C6H11N	97.0891
Pipemidicacid	4.95	C14H17N5O3	303.1331
PipemidicacidF1	4.95	C14H15N5O2	285.1226
PipemidicacidF2	4.95	C13H17N5O	259.1433
PipemidicacidF3	4.95	C11H12N4O	216.0647
PipemidicacidF4	4.95	C10H6N4O2	214.0491

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
PipemidicacidF5	4.95	C10H5N3O2	199.0382
PipemidicacidF6	4.95	C9H8N4O	188.0698
PipemidicacidF7	4.95	C9H5N3O	171.0432
PipemidicacidF8	4.95	C7H6N4O	162.0541
PipemidicacidF9	4.95	C7H5N3O	147.0432
Prometyn	14.858	C10H19N5S	241.1361
PrometynF1	14.858	C7H13N5S	199.0891
PrometynF2	14.858	C4H7N5S	157.0422
PrometynF3	14.858	C3H5N3S	115.0204
PrometynF4	14.858	C5H2N2	90.0218
Propazine	16.994	C9H16CIN5	229.1094
PropazineF1	16.994	C6H10CIN5	187.0624
PropazineF2	16.994	C3H4CIN5	145.0155
PropazineF3	16.994	C2H2CIN3	102.9937
Propranolol	11.273	C16H21NO2	259.1572
PropranololF1	11.273	C13H15NO2	217.1103
PropranololF2	11.273	C13H10O	182.0731
PropranololF3	11.273	C11H8O	156.0575
PropranololF4	11.273	C6H13NO	115.0997
PropranololF5	11.273	C6H11N	97.0891
PropranololF6	11.273	C5H11N	85.0891
Propyphenazone	14.325	C14H18N2O	230.1419
PropyphenazoneF1	14.325	C3H5N	55.0422
PropyphenazoneF2	14.325	C11H12N2O	188.0949
PropyphenazoneF3	14.325	C12H12N2O	200.0949
Salbutamol	1.68	C13H21NO3	239.1521
SalbutamolF1	1.68	C13H19NO2	221.1416
SalbutamolF10	1.68	C8H7N	117.0578
SalbutamolF2	1.68	C13H17NO	203.131
SalbutamolF3	1.68	C9H11NO2	165.079
SalbutamolF4	1.68	C9H9NO	147.0684
SalbutamolF5	1.68	C9H8O	132.0575
SalbutamolF6	1.68	C9H6O	130.0418
SalbutamolF7	1.68	C9H7N	129.0578
SalbutamolF8	1.68	C8H8O	120.0575
SalbutamolF9	1.68	C8H9N	119.0735
Sarafloxacin	9.72	C20H17F2N3O3	385.1238
SarafloxacinF1	9.72	C20H15F2N3O2	367.114
SarafloxacinF2	9.72	C19H17F2N3O	341.139
SarafloxacinF3	9.72	C16H17F2N3O2	321.1289
SarafloxacinF4	9.72	C17H12F2N2O	298.0555

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
SarafloxacinF5	9.72	C16H10F2N2O	284.0806
SarafloxacinF6	9.72	C15H12FN3O	269.0964
Simazine	12.96	C7H12CIN5	201.078
SimazineF1	12.96	C5H8CIN5	173.0468
SimazineF2	12.96	C4H6CIN3	131.025
SimazineF3	12.96	C6H9N3	123.0496
SimazineF4	12.96	C4H5N3	95.0483
Sotalol	1.997	C12H20N2O3S	272.1195
SotalolF1	1.997	C12H18N2O2S	254.1094
SotalolF3	1.997	C9H12N2O2S	212.0619
SotalolF4	1.997	C8H8N2	132.0687
SotalolF5	1.997	C8H5N	115.0417
SotalolF6	1.997	C7H7N	105.0578
Sulfachloropyridazine	10.21	C10H9CIN4O2S	284.0135
SulfachloropyridazineF1	10.21	C6H5NO2S	155.0041
SulfachloropyridazineF2	10.21	C4H4CIN3	129.0094
SulfachloropyridazineF3	10.21	C6H5NO	107.0371
SulfachloropyridazineF4	10.21	C6H5N	91.0422
Sulfadiazine	4.054	C10H10N4O2S	250.0524
SulfadiazineF1	4.054	C10H8N4OS	232.0419
SulfadiazineF2	4.054	C10H10N4	186.0905
SulfadiazineF3	4.054	C10H8N4	184.0749
SulfadiazineF4	4.054	C6H5NO2S	155.0041
SulfadiazineF5	4.054	C6H5NO	107.0371
SulfadiazineF6	4.054	C4H5N3	95.0483
SulfadiazineF7	4.054	C6H7N	93.0578
SulfadiazineF8	4.054	C6H5N	91.0422
Sulfadimethoxin	12.49	C12H14N4O4S	310.0736
SulfadimethoxinF1	12.49	C12H12N4O2	244.096
SulfadimethoxinF2	12.49	C6H7N3O4S	217.0157
SulfadimethoxinF3	12.49	C6H9N3O2	155.0695
SulfadimethoxinF4	12.49	C6H5NO2S	155.0041
SulfadimethoxinF5	12.49	C6H5NO	107.0371
SulfadimethoxinF6	12.49	C6H5N	91.0422
Sulfamerazine	6.21	C11H12N4O2S	264.0681
SulfamerazineF1	6.21	C8H14N4S	198.0939
SulfamerazineF2	6.21	C5H5N3O2S	171.0102
SulfamerazineF3	6.21	C6H5NO2S	155.0041
SulfamerazineF4	6.21	C5H7N3	109.064
SulfamerazineF5	6.21	C6H5NO	107.0371
SulfamerazineF6	6.21	C6H5N	91.0422

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
Sulfamethazine	8	C12H14N4O2S	278.0837
SulfamethazineF1	8	C12H12N4	212.1062
SulfamethazineF2	8	C6H7N3O2S	185.0259
SulfamethazineF3	8	C6H5NO2S	155.0041
SulfamethazineF4	8	C6H9N3	123.0796
SulfamethazineF5	8	C6H5NO	107.0371
SulfamethazineF6	8	C6H5N	91.0422
Sulfamethizole	8.75	C9H10N4O2S2	270.0245
SulfamethizoleF1	8.75	C6H5NO2S	155.0041
SulfamethizoleF2	8.75	C6H5NO	107.0371
SulfamethizoleF3	8.75	C6H5N	91.0422
Sulfamethoxazole	10.871	C10H11N3O3S	253.0521
SulfamethoxazoleF1	10.871	C10H9N3O2S	235.0415
SulfamethoxazoleF2	10.871	C10H9N3O	187.0745
SulfamethoxazoleF3	10.871	C9H9N3	159.0796
SulfamethoxazoleF4	10.871	C6H5NO2S	155.0041
SulfamethoxazoleF5	10.871	C6H5NO	107.0371
SulfamethoxazoleF6	10.871	C4H6N2O	98.048
SulfamethoxazoleF7	10.871	C6H5N	91.0422
Sulfanilamide	1.88	C6H8N2O2S	172.0306
SulfanilamideF1	1.88	C6H5NO2S	155.0041
SulfanilamideF2	1.88	C6H5NO	107.0371
SulfanilamideF3	1.88	C6H5N	91.0422
Sulfapyridine	5.373	C11H11N3O2S	249.0572
SulfapyridineF1	5.373	C11H9N3	183.0796
SulfapyridineF2	5.373	C11H8N2	168.0687
SulfapyridineF3	5.373	C6H5NO2S	155.0041
SulfapyridineF4	5.373	C6H5NO	107.0371
SulfapyridineF5	5.373	C5H6N2	94.0531
SulfapyridineF6	5.373	C6H5N	91.0422
Sulfathiazole	5.18	C9H9N3O2S2	255.0136
SulfathiazoleF1	5.18	C6H5NO2S	155.0041
SulfathiazoleF2	5.18	C6H5NO	107.0371
SulfathiazoleF3	5.18	C3H4N2S	100.0095
SulfathiazoleF4	5.18	C6H5N	91.0422
Tamoxifen	16.643	C26H29NO	371.2266
TamoxifenF1	16.643	C7H6	90.0469
TamoxifenF2	16.643	C4H9N	71.0735
Terbumeton	11.961	C10H19N5O	225.1589
TerbumetonF1	11.961	C6H11N5O	169.0963
TerbumetonF2	11.961	C4H7N5O	141.065

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
TerbumetonF3	11.961	C4H7N3O	113.0589
TerbumetonF4	11.961	C3H5N3O	99.0432
Terbutaline	1.728	C12H19NO3	225.1365
TerbutalineF2	1.728	C12H17NO2	207.1259
TerbutalineF3	1.728	C8H11NO3	169.0739
TerbutalineF4	1.728	C8H9NO2	151.0633
TerbutalineF5	1.728	C8H6O2	134.0368
TerbutalineF6	1.728	C7H8O2	124.0524
Terbutylazine	17.487	C9H16CIN5	229.1093
TerbutylazineF1	17.487	C5H8CIN5	173.0468
TerbutylazineF2	17.487	C3H4CIN5	145.0155
TerbutylazineF3	17.487	C4H6CIN3	131.025
TerbutylazineF4	17.487	C2H2CIN3	102.9937
Famotidine	1.817	C8H15N7O2S3	337.0449
FamotidineF1	1.817	C5H8N4S2	188.019
FamotidineF2	1.817	C8H14N6S2	258.0721
Fenofibrate	24.326	C20H21ClO4	360.1128
FenofibrateF1	24.326	C13H9ClO2	232.0291
Tetracycline	8.287	C22H24N2O8	444.1532
TetracyclineF1	8.287	C22H21NO8	427.1267
TetracyclineF10	8.287	C6H7NO2	125.0482
TetracyclineF11	8.287	C6H2O3	122.0004
TetracyclineF12	8.287	C5H7NO	97.0528
TetracyclineF2	8.287	C22H22N2O7	426.1427
TetracyclineF3	8.287	C22H19NO7	409.1161
TetracyclineF4	8.287	C7H8O8	340.0219
TetracyclineF5	8.287	C14H12N2O8	336.0593
TetracyclineF6	8.287	C19H12O5	320.0684
TetracyclineF7	8.287	C11H12N2O6	268.0701
TetracyclineF8	8.287	C7H7NO3	153.0426
TetracyclineF9	8.287	C6H12O3	132.0786
Isoproturon	15.37	C12H18N2O	206.1419
IsoproturonF1	15.37	C9H12N2O	164.095
Ketoprofen	16.174	C16H14O3	254.0943
KetoprofenF1	16.174	C15H12O	208.0888
Theobromine	2.001	C7H8N4O2	180.0647
TheobromineF1	2.001	C7H6N4O	162.0541
TheobromineF2	2.001	C6H7N3O	137.0589
TheobromineF3	2.001	C7H6O2	122.0368
TheobromineF4	2.001	C7H7NO	121.0533
TheobromineF5	2.001	C5H7N3	109.064

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
TheobromineF6	2.001	C5H5N3	107.0488
TheobromineF7	2.001	C4H5N3	95.0483
Lansoprazole	11.946	C16H14F3N3O2S	369.0759
LansoprazoleF1	11.946	C9H8F3NO2S	251.0228
MefenamicAc	20.306	C15H15NO2	241.1103
MefenamicAcF1	20.306	C15H13NO	223.0997
Theophylline	2.805	C7H8N4O2	180.0647
TheophyllineF1	2.805	C5H5N3O2	139.0382
TheophyllineF2	2.805	C6H8N4	136.0749
TheophyllineF3	2.805	C5H5N3O	123.0432
TheophyllineF4	2.805	C4H5N3	95.0483
Metronidazole	2.83	C6H9N3O3	171.0644
MetronidazoleF1	2.83	C4H5N3O2	127.0382
Mevastatin	20.66	C23H34O5	390.2406
MevastatinF1	20.66	C18H22O2	270.162
MevastatinF2	20.66	C18H24O3	288.1725
Naproxen	16.2	C14H14O3	230.0943
NaproxenF1	16.2	C13H12O	184.0888
Pirimidone	9.052	C12H14N2O2	218.1055
PirimidoneF1	9.052	C10H11NO	161.0841
Timolol	8.73	C13H24N4O3S	316.1569
TimololF1	8.73	C9H16N4O3S	260.0931
TimololF2	8.73	C9H13N3O3S	243.0677
TimololF3	8.73	C6H9N3O2S	187.0415
TimololF4	8.73	C4H5N3OS	143.0145
TimololF5	8.73	C5H8N2O	112.0636
Ranitidine	2.106	C13H22N4O3S	314.1413
RanitidineF1	2.106	C5H9N3O2S	175.0415
RanitidineF2	2.106	C11H15N3O3S	269.0834
Simvastatin	22.927	C25H38O5	418.2719
SimvastatinF1	22.927	C19H24O2	284.1776
SimvastatinF2	22.927	C19H26O3	302.1882
Tributylphosphate	21.225	C12H27O4P	266.1647
TributylphosphateF1	21.225	C8H19O4P	210.1021
TributylphosphateF2	21.225	C4H11O4P	154.0395
Venlafaxine	10.66	C17H27NO2	277.2042
VenlafaxineF1	10.66	C17H25NO	259.1936
Triethylphosphate	11.256	C6H15O4P	182.0708
TriethylphosphateF1	11.256	C4H11O4P	154.0395
TriethylphosphateF2	11.256	C2H7O4P	126.0082
Trimethoprim	6.544	C14H18N4O3	290.1379

Compound Name	RT (min)	Elemental composition	Calculated Mass
TrimethoprimF1	6.544	C5H6N4	122.0592
TrimethoprimF2	6.544	C14H15NO2	229.1103
TrimethoprimF3	6.544	C12H12N4O3	260.0909
TrimethoprimF4	6.544	C13H14N4O3	274.1066
Urbason	13.505	C22H30O5	374.2093
UrbasonF1	13.505	C22H26O3	338.1882
UrbasonF2	13.505	C22H28O4	356.1988

Estudios de determinación de compuestos orgánicos a niveles traza en matrices complejas

Anexo 10

	Modificación del compuesto (transformación)	Afectación de masa exacta	Modificación formula
1	Conjugación con GSH	305,0682	-C10H15N3O6S
2	Deshidroxilacion y desglucuronidación	-192,027	-C6H8O7
3	Desglucurunidación	-176,0321	-C6H8O6
4	Desconjugación con glucosa	-162,0528	-C6H10O5
5	Metilación y desglucuronidación	-162,0164	-C5H6O6
6	Acetilación y desglucuronidación	-134,0215	-C4H6O5
7	Oxidación y descarboxilación y desaminación	-89,0113	O-C2O4NH3
8	Desulfonación	-79,9568	-SO3
9	Descarboxilación y desaminación	-61,0164	-NH3-CO2
10	Perdida de Dimetoxilo	-60,0211	-C2H4O2
11	Descarboxilación	-43,9898	-CO2
12	Hidratación y (perdida de amina y carbonilo)	-43,0058	-NHCO
13	Desacetilación	-42,0106	-C2H2O
14	Perdida de methoxilo	-32,0264	-CH4O
15	Bi reducción de sulfoxido (-2O), birreducción	-31,9898	-2O
16	Nitroreducción	-29,9742	-O2+H2
17	Bi desmetilación, Desetilación	-28,0313	-CH2CH2
18	Deshidratación	-18,0106	-H2O
19	Declorinación oxidativa	-17,9661	-Cl+OH
20	Desaminación	-17,0265	-NH3
21	Deshidrogenación y desmetilación	-16,0313	-CH4
22	1-DesHidroxilación, N-reduction, Reducción de sulfoxido (-O), Acido carboxílico a aldehído	-15,9949	-O
23	Desulfuración oxidativa	-15,9772	-S+O
24	Perdida de metanol y ganancia de amine	-14,9997	-CH3O+NH2
25	Desmetilación	-14,0157	-CH2
26	Acido carboxílico a alcohol	-13,9792	-O+2H

27	Desetilación e hidroxilación	-12,0364	-C2H3+O
28	Hidratación y descarbonilación	-9,9843	H2O-CO
29	Deshidrogenación	-2,0157	-H2
30	Alcohol a cetona	-2,0157	-2H
31	Deshidroxilación y metilación	-1,9793	-O+CH2
32	Aminación y reducción	-1,0316	NH3-O
33	Didesmetilación y ester formico	-0,0365	-CH4+O
34	Metileno a cetona	0,0208	O-CR
35	Amina a alcohol	0,9841	-NH+O
36	Desaminación	1,0316	-NH3+O
37	Desmetilación y oxidación	1,9792	-CH2+O
38	Hidroxilación y desmetilación	1,9793	O-CH2
39	Cetona a alcohol, aldehído a alcohol, Hidrogenación	2,0157	2H
40	Didesmetilación y Ester acetilo	13,9792	-H2+O
41	Metilación, Metoxilo por hidroxilo	14,0157	CH2
42	Adición de metanol y desaminación	14,9997	CH3O-NH2
43	Sulfuración reductiva	15,9772	S-O
44	Metileno a epoxido,1-hidroxilación,N-oxidación,Oxidación	15,9949	O
45	Hidrogenación y metilación	16,0313	CH4
46	Hidratación	18,0106	H2O
47	Dimetilación, Etilación	28,0313	CH2CH2
48	Nitrooxidación	29,9742	O2-H2
49	2-Hidroxlación, Sulfoxido(2O),Bioxidación	31,9898	2O
50	Adición de Metoxilo	32,0264	CH4O
51	Metileno a diol, Metileno a ácido carboxílico	34,0055	H2O2
52	Acetilación	42,0106	C2H2O
53	Deshidratación, aminación y carbonilo	43,0058	NHCO
54	Carboxilación	43,9898	CO2

55	3-Hidroxilación	47,9847	3O
56	Adición de dimetoxilo	60,0211	C2H4O2
57	Carboxilación y amina	61,0164	NH3+CO2
58	4-Hidroxilación	63,9796	4O
59	Sulfonación, Alcohol a sulfato	79,9568	SO3
60	5-Hidroxilación	79,9745	5O
61	Reducción, carboxilación y adición de amine	89,0113	-O+C2O4NH3
62	Desacetilación y glucuronidación	134,0215	C4H6O5
63	Desmetilación y glucuronidación	162,0164	C5H6O6
64	Conjugación con glucose	162,0528	C6H10O5
65	Glucuronidación	176,0321	C6H8O6
66	Hidroxilación y glucuronidación	192,027	C6H8O7

Anexo 11

Analytical improvements of hybrid LC-MS/MS techniques for the efficient evaluation of emerging contaminants in river waters: a case study of the Henares River (Madrid, Spain)

Andrés Pérez-Parada · María del Mar Gómez-Ramos ·
María Jesús Martínez Bueno · Samanta Uclés ·
Ana Uclés · Amadeo R. Fernández-Alba

Received: 17 February 2011 / Accepted: 27 July 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract

Purpose Instrumental capabilities and software tools of modern hybrid mass spectrometry (MS) instruments such as high-resolution mass spectrometry (HRMS), quadrupole time-of-flight (QTOF), and quadrupole linear ion trap (QLIT) were experimentally investigated for the study of emerging contaminants in Henares River water samples. **Methods** Automated screening and confirmatory capabilities of QTOF working in full-scan MS and tandem MS (MS/MS) were explored when dealing with real samples. Investigations on the effect of sensitivity and resolution

power influence on mass accuracy were studied for the correct assignment of the amoxicillin transformation product 5(R) amoxicillin-diketopiperazine-2',5' as an example of a nontarget compound. On the other hand, a comparison of quantitative and qualitative strategies based on direct injection analysis and off-line solid-phase extraction sample treatment were assayed using two different QLIT instruments for a selected group of emerging contaminants when operating in selected reaction monitoring (SRM) and information-dependent acquisition (IDA) modes.

Results and discussion Software-aided screening usually needs a further confirmatory step. Resolving power and MS/MS feature of QTOF showed to confirm/reject most findings in river water, although sensitivity-related limitations are usually found. Superior sensitivity of modern QLIT-MS/MS offered the possibility of direct injection analysis for proper quantitative study of a variety of contaminants, while it simultaneously reduced the matrix effect and increased the reliability of the results. Confirmation of ethylamphetamine, which lacks on a second SRM transition, was accomplished by using the IDA feature.

Conclusion Hybrid MS instruments equipped with high resolution and high sensitivity contributes to enlarge the scope of targeted analytes in river waters. However, in the tested instruments, there is a margin of improvement principally in required sensitivity and data treatment software tools devoted to reliable confirmation and improved automated data processing.

Responsible editor: Philippe Garrigues

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11356-011-0585-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Pérez-Parada · M. M. Gómez-Ramos · M. J. Martínez Bueno ·
S. Uclés · A. Uclés · A. R. Fernández-Alba
Pesticide Residue Research Group, Department of Hydrogeology
and Analytical Chemistry, University of Almeria,
04120 La Cañada de San Urbano,
Almeria, Spain

A. Pérez-Parada
Organic Trace Analysis Group, Organic Chemistry Department,
Universidad de la República,
1180 General Flores 2124,
Montevideo, Uruguay

M. J. Martínez Bueno · A. R. Fernández-Alba (✉)
Fundación IMDEA-Agua, Parque Científico Tecnológico de la
Universidad de Alcalá,
C/Punto Net 4, 2ª planta, Edificio ZYE,
28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain
e-mail: amadeo@ual.es

Keywords Emerging contaminants · Mass spectrometry · High resolution · Mass accuracy · Sensitivity · LC-MS/MS · QTOF-MS/MS · QLIT-MS/MS

1 Introduction

The awareness in water pollution in the European Union has recently been extended from priority contaminants as stated in the Water Framework Directive (Commission Decision 2000/60/EC23) to the so-called emerging contaminants which are frequently detected in wastewater and surface waters (Gómez et al. 2010; Martínez Bueno et al. 2007; Pérez and Barceló 2007). Organic trace contaminants in water resources such as pharmaceuticals, drugs of abuse, pesticides, surfactants, etc. along with their metabolites and transformation products (TPs) are continually being introduced in the aquatic environment (Radjenović et al. 2007). These findings have raised concern about the potential adverse or unknown effects as well as their current ubiquity in the environment. Studies dealing with occurrence, fate, and risk assessment of emerging contaminants in the modern era are urgently needed. The inherent high-quality data required to study the behavior and incidence of biologically active compounds at trace level in the environment has been driving the development and application of more sophisticated mass spectrometry (MS) and tandem MS (MS/MS) instruments which, coupled to chromatographic systems, are currently considered the default choice for qualitative and quantitative analysis (Petrovic et al. 2010). Technological capabilities of mass spectrometric instruments have significantly advanced over the last years particularly in terms of selectivity, sensitivity, and specificity. Because of its sensitivity and robustness, the triple quadrupole (QqQ) analyzer is the most reported technique for target analysis of emerging contaminants in environmental water and wastewater. Several analytical features are provided, ranging from excellent performance for quantitative analysis when working in the selected reaction monitoring (SRM) mode allowing the selection of two specific SRM transitions with subsequent accurate confirmation of the analyte in the sample (Huerta-Fontela et al. 2008; Petrovic et al. 2010). However, analytical features of classical target compound monitoring of contaminants by nominal MS techniques are often insufficient for the comprehensive assessment of environmentally relevant emerging contaminants (Gómez et al. 2010; Kosjek et al. 2007). To meet the challenge, modern MS techniques are intended to be equipped with high mass resolution and high sensitivity. These features are complemented with additional capabilities derived from new operational modes and software tools which provide additional structural information for proper and unambiguous analysis of trace compounds.

Moreover, search for xenobiotics in river water is even more challenging than in wastewater principally because of lower concentration levels of the contaminants. Several MS strategies are currently used in the study of wastewaters and

surface waters, ranging from conventional MS to innovative tandem MS configurations and high-resolution mass spectrometry (HRMS) techniques. Nevertheless, new advantages are available in new generation instruments which offer increased capabilities derived from developments in more efficient ionization and separation processes along with electronics, optics, analyzer design, and associated software tools. The current trend is to include several capabilities offered by contemporary MS analyzers into one single instrument.

Recently developed hybrid mass spectrometers can enhance the individual potential of particular analyzers by combining methods into the same instrument, improving the quality and reliability of the provided information. There are several hybrid instruments available (i.e., quadrupole time-of-flight (QTOF), quadrupole linear ion trap (QLIT)) that nowadays can be considered a good combination for environmental laboratories dealing with advanced survey of liquid chromatography (LC)-amenable contaminants. The usefulness of HRMS using TOF and hybrid QTOF-MS (Krauss et al. 2010; Lacorte and Fernández-Alba 2006; Sancho et al. 2006) as well as QLIT-MS (Kosjek et al. 2007; Pérez and Barceló 2007; Radjenović et al. 2007) instruments applied to residue analysis in water has been widely overviewed. However, new workflows are becoming available since the latest improvements and overcome challenges.

Different investigations were recently carried out by our group to determine the environmental quality of the Henares River using hybrid MS instrumentation (Gómez et al. 2010; Martínez Bueno et al. 2010, 2011a, b; Pérez-Parada et al. 2011). In this work, we experimentally highlight the use of modern hybrid MS for the comprehensive analysis of emerging organic contaminants in river water, presenting and discussing improvements and limitations of these techniques as well as new available strategies.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

All analytes included in this study were selected on the basis of our previous experience (Gómez et al. 2010; Martínez Bueno et al. 2011a, b; Pérez-Parada et al. 2011). Primary standards of pharmaceuticals and drugs of abuse of analytical grade (purity $\geq 98\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Individual stock standard solutions were prepared at a concentration of 2 mg/mL in methanol (MeOH). Amoxicillin solution was prepared in acetonitrile (MeCN). Mixtures of all chemicals were prepared at different concentration levels for the preparation

of calibration standards and spiking samples by appropriate dilution of the individual stock solutions in MeCN or MeCN/water (1:9; v/v) for injection. All the standard and working solutions were stored at -20°C .

MeOH and MeCN high-performance liquid chromatography (HPLC) grade were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Water used for LC-MS analysis was generated from a Direct-Q™ 5 Ultrapure Water System from Millipore (Bedford, MA, USA) with a specific resistance of $18.2\text{ M}\Omega\text{ cm}$ and formic acid (FA, 98% purity), HCl (37% purity), and NH_4OH were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland).

2.2 Sample collection

The river samples analyzed were collected from the Henares River, located in the center of Spain (Community of Madrid). This densely inhabited area is located near cities such as Torrejón de Ardoz ($>115,000$ inhabitants), Alcalá de Henares ($>200,000$ inhabitants), or Guadalajara ($>83,000$ inhabitants), together with heavy industrial activity and several wastewater treatment plants (WWTPs) along the river. Henares River was sampled at two points: points 1 and 2 that are located 6 km upstream and 20 m downstream, respectively, from the discharging point of treated effluents from an important WWTP in Alcalá de Henares according to Martínez Bueno et al. (2011a). Grab samples (2 L) were collected from both sites described above during a sampling campaign carried out in May 2010.

All samples were collected using prerinsed amber glass bottles and were sent in boxes packed with ice to the laboratory for posterior analysis. Upon reception, samples were filtered through a $0.7\text{-}\mu\text{m}$ glass fiber filter from Teknokroma (Barcelona, Spain) prior to analysis, in order to remove particulate material. Subsequently, samples were adjusted to pH 3 with HCl and stored at -20°C in the dark prior to analysis in order to prevent degradation of analytes during storage.

2.3 Sample preparation and extraction method

Direct injection (on LC column injection of water) and solid-phase extraction (SPE) were the tested sample treatment procedures. Sample preparation in direct injection only consists in sample ($900\text{ }\mu\text{L}$) dilution with nicotine- d_3 standard in MeCN ($100\text{ }\mu\text{L}$) prior to filtration in $0.45\text{ }\mu\text{m}$ polytetrafluoroethylene (PTFE) filter.

Prior to sample treatment using the SPE method, all samples were spiked with $0.1\text{ }\mu\text{g}$ of surrogate standard ^{13}C -phenacetin and adjusted to pH 8 using NH_4OH solutions. Oasis™ hydrophilic-lipophilic balanced (HLB) cartridges (60 mg , 3 cc , divinylbenzene/*N*-vinylpyrrolidone copoly-

mer) from Waters (Mildford, MA, USA) were used. A vacuum manifold from Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA) connected to an external 306 LC pump from Gilson (Villiers-le-Bel, France) was used for sample preparation. According to previous experience (Gómez et al. 2010; Martínez Bueno et al. 2007, 2010; Pérez-Parada et al. 2011), HLB cartridges were preconditioned with 6 mL of MeOH and 5 mL of deionized water HPLC grade (pH adjusted to 8 employing NH_4OH solution) at a flow rate of 3 mL/min. After the conditioning step, aliquots of the sample were loaded into the cartridge. The samples were passed through at a flow rate of 10 mL/min. The loaded river water sample volume was 400 mL. Elution was performed by $2\times 4\text{-mL}$ portions of MeOH at a flow of 3 mL/min. The extracts were evaporated until near dryness under gentle nitrogen stream using a Turbo-Vap from Zymark (Hopkinton, MA, USA) using the water bath temperature at 35°C . Before analysis, the samples were reconstituted with 1 mL of MeCN/water, 1:9, and finally were directly filtered into a vial using a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ PTFE syringe filter.

2.4 Instrumental

2.4.1 LC-QTOF-MS/MS

A LC-QTOF-MS/MS system equipped with electrospray ionization (ESI) Jet Stream ion source operating in the positive mode was used throughout the study. Separation was performed by an HPLC system (Agilent Series 1200, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a reversed-phase XDB- C_{18} analytical column of $4.6\text{ mm ID}\times 50\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$ particle size (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Mobile phase A was MeCN with 0.1% FA and 5% Milli-Q water. Mobile phase B was Milli-Q water with 0.1% FA. The elution gradient started from 10% A (3 min isocratic) to 100% A in 22 min and kept for 3 min at 100% A. The flow rate was 0.5 mL/min and the injection volume $20\text{ }\mu\text{L}$. The HPLC system was connected to a hybrid QTOF mass spectrometer (Agilent 6530 Series Accurate Mass QTOF-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Operation conditions were as follows: superheated nitrogen sheath gas temperature, 400°C at a flow rate of 12 L/min; capillary voltage, 4 kV; nebulizer pressure, 60 psi; drying gas, 5 L/min; gas temperature, 250°C ; skimmer voltage, 65 V; octapole RF peak, 750 V; fragmentor voltage, 90 V. The m/z axis was calibrated using the reference mixture provided by the manufacturer over the range 40–950 m/z . A second sprayer with a reference solution was used as continuous calibration in positive mode using the masses of purine (m/z 121.0509) and HP-921 (m/z 922.0098). The instrument was operated in both -1 GHz —low-resolution mode and -4 GHz —high-

resolution mode. MS/MS spectra were acquired over the 40–950 m/z range at a scan rate of 0.5 s per spectrum. MS/MS spectra were obtained in the profile algorithm using 5 to 20 eV collision energy (CE). Acquired data were processed with MassHunter Workstation Software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Automatic screening was performed using the Molecular Feature Extraction (MFE) of Qualitative Analysis software tool (version B.03.01). Hits were obtained under the centroiding algorithm extraction data format and using 1,000 counts absolute height threshold, 100 counts chromatographic peak height threshold, and 5 ppm mass filter. Samples analyzed in this instrument were processed under the SPE method as described above. Further experiments were performed using the 1:1 dilution approach (extract: (MeCN:H₂O, 1:9)) of the obtained extract.

2.4.2 LC-QLIT-MS/MS

Two different hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer (QqQLIT-MS/MS) systems were used in this study:

- (a) 3200 QLIT-MS/MS system (Applied Biosystems, Concord, Canada) connected to an HPLC binary solvent delivery system (Agilent Series 1100) equipped with a reversed-phase ZORBAX Eclipse XDB-C₈ analytical column of 150 mm length × 4.6 mm ID and 5 μm particle size (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). In this instrument was applied the SPE-based sample treatment strategy (strategy A).
- (b) 5500 QLIT-MS/MS (AB Sciex Instruments, Foster City, CA, USA) was used for the analysis of the target compounds. The LC equipment was an HPLC binary solvent delivery system (Agilent Series 1200) equipped with a reversed-phase ZORBAX Eclipse XDB-C₈ analytical column of 150 mm length × 4.6 mm ID and 5 μm particle size (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). In this instrument was applied the direct injection strategy (strategy B).

In both instruments, chromatographic separation was performed using as mobile phases A and B, MeCN and HPLC-grade water containing 0.1% FA, respectively. The flow rate was kept constant at 0.5 mL/min. A linear gradient was set from 10% A to 100% A in 5 min and then maintained at 100% A for 5 min. The re-equilibration time was 5 min. The injection volume in all 3200 QLIT experiments was 20 μL, whereas in 5500 QLIT was 10 μL. The Turbo ion spray source operating in positive ionization mode settings were ion spray voltage, 5,500 V; source temperature, 500°C; curtain gas, 20 (arbitrary units); collision gas, medium; ion source gas (GS1 and GS2) at

55 psi. Nitrogen was used as the nebulizer gas, curtain gas, and collision gas. In order to obtain maximum sensitivity for the identification and detection of the target compounds, a careful optimization of all MS parameters—declustering potential (DP), entrance potential for precursor ions, CE, and collision cell exit potential (CXP) for product ions—was performed by flow injection analysis in the spectrometer at the conditions we recently described (Martínez Bueno et al. 2011a, b). The MS/MS was operated in SRM mode under time-scheduled conditions. The scheduled SRM enables optimized cycle time and maximized dwell times to be used during acquisition to provide higher multiplexing with good analytical precision. The quadrupoles Q1 and Q3 were set at low and unit resolution, respectively.

The most intense SRM transition was selected for quantitation purposes (SRM₁). The data acquisition and processing were carried out using commercial software (Analyst 1.5.1, Applied Biosystems/MDS SCIEX, Foster City, CA, USA).

3 Results and discussion

3.1 Improvements in recognition capability by high-resolution mass spectrometry

Since manual or by eye screening approaches lacks on practicability, remarkable improvements on data treatment software have made the screening task faster. Computer-assisted recognition of target analytes by TOF techniques is performed through the development of an in-house accurate mass database of contaminants including retention time, theoretical exact mass (that is not based on ion m/z), and elemental composition of both molecular and fragment ions for pharmaceuticals and pesticides as published by our group (Gómez et al. 2010; Mezcua et al. 2009). This strategy was successfully applied in target as well as nontarget identification based on the fragmentation–degradation relationships of structurally related TPs found when using ESI sources and accurate masses obtained by TOF analyzers (García-Reyes et al. 2007a, b). Database is constantly being expanded including data from fragment ions provided by in-source collision-induced dissociation (CID) fragmentation (normally using 190 V fragmentor voltage for good product ion spectra). This automatic procedure for target and nontarget screening of a variety of emerging contaminants applied to environmental waters was described in detail by Gómez et al. (2010). In contrast to target analysis, there is little data available on the identification of TPs and environmental transformation pathways. However, QTOF-based screening approaches increases the potential and reliability of TOF data where

real MS/MS experiments isolating a precursor ion cannot be accomplished, so that the only fragmentation information that can be used is that from the in-source CID experiments, being the fragmentation information heavily depending on the complexity of the matrix and the intrinsic nature of the targeted species. These limitations can be overcome by the use of LC-QTOF-MS/MS due to its ability to perform dedicated MS/MS experiments by selecting precursor ions and obtaining accurate full-scan product ion spectra (MS/MS). This enables the effective screening and feasible identification of a large number of species along with related metabolites and TPs even without the need of standards.

3.1.1 Investigation on rapid identification strategies

River water samples were analyzed using full-scan MS acquisition. Automatic search of the compounds in data files was performed by the association of the database with the MFE software tool which consequently gave a list of potentially positive findings. The resulting list of tentatively identified compounds (or hits) is based on the widely accepted tolerance criteria for small organic molecules (<5 ppm mass error) of parent and product ions, retention time, and isotopic pattern matching which are used to selectively reduce the number of findings, tentatively identified isobaric compounds, and structurally related TPs or metabolites. In addition, score values which are used to rank database searching results are also calculated. These score values are calculated on the basis of measured accurate mass, abundance, and spacing of the ions to those predicted by the software tool (Gómez et al. 2010). Confirmation of targeted species could be performed simultaneously to this tentative identification step by the correct and unambiguous matching of accurate mass and isotopic pattern for parent and at least one fragment ion at the proper retention time to that reported in the database.

Figure 1a shows a positive finding through the proposed automated screening strategy of the target metabolite carbamazepine 10,11-epoxide in river water. Identification and confirmation by full-scan MS were simultaneously accomplished through the accurate detection of the parent ion (ion formula $C_{15}H_{13}N_2O_2$, theoretical m/z 253.0972) and two product ions (ion formula $C_{14}H_{12}NO$, theoretical m/z 210.0913; ion formula $C_{13}H_{10}N$, theoretical m/z 180.0808) at the corresponding database retention time within the accepted deviation tolerance (± 0.5 min).

It is worth mentioning that hits with scores below the defined relevance threshold—we have experimentally established as 60—should be checked manually or with the aid of accurate MS/MS spectra offered by QTOF. As seen in Fig. 1a, reported score values of carbamazepine 10,11-epoxide findings belong to this situation (provided

score values <58). Full-scan MS and MS/MS spectrum of carbamazepine 10,11-epoxide in river water is shown in Fig. 1b. HRMS spectra of QTOF-MS/MS is by far more selective than full-scan MS since product ions are derived only from the precursor ion thus facilitating the retrospective analysis and providing confirmation without the need of carbamazepine 10,11-epoxide standard.

A major limitation of the proposed strategy when working in full-scan MS was related to the number of false positives and negatives obtained for lack of sensitivity of searched ions as well as related to the need of more accurate ions with confirmatory capability.

To avoid this situation, different strategies were investigated, such as subsequent analysis at different in-source CID conditions (i.e., varying fragmentor voltage from low (90 V) to higher (230 V) values) for better product ion spectra or the use of CID MS/MS experiments by QTOF. On the other hand, the preselection of more permissive ion count threshold for presentation of the hits were taken as a compromise of the signals derived from the matrix background and the number of presented hits. Consequently, the proposed workflow for comprehensive screening of contaminants is generally extended to a further confirmation analysis of those tentatively identified compounds in the automated step by the use of further MS/MS experiments. Hybrid QTOF systems offer the additional possibility of performing dedicated MS/MS experiments through the selection of mass windows by the quadrupole mass filter and subsequent CID fragmentation of the precursor ion. Increased selectivity and structural elucidation is offered since the precursor ion is isolated from the coeluted matrix, whereas product ions are accurately measured. In order to confirm positive findings, samples are suggested to be reanalyzed, while protonated molecules of these identified compounds are typically selected as precursor ions for CID MS/MS at their corresponding retention times. A common situation is that a compound is automatically found with only one accurate ion plus correct retention time. According to the current official criteria (Commission Decision 2002/657/EC), the number of identification points is not enough for an unambiguous report; therefore, hybrid QTOF-MS/MS may help in the proposed workflow. Figure 2a shows the MS spectra of a tentatively identified hit in the target screening strategy of the histamine H_2 -receptor antagonist ranitidine (ion formula $C_{13}H_{23}N_4O_3S$; theoretical m/z 315.1485) and its unambiguous confirmation by further MS/MS in river water. Hence, confirmatory information of the compounds via accurate mass measurements of product ions through MS/MS was obtained.

Isotopic ratios are described as of paramount importance when atoms containing highly abundant isotopes are present (i.e., ^{37}Cl and ^{81}Br) such as for organohalogen contaminants and most pesticides. Nevertheless, when

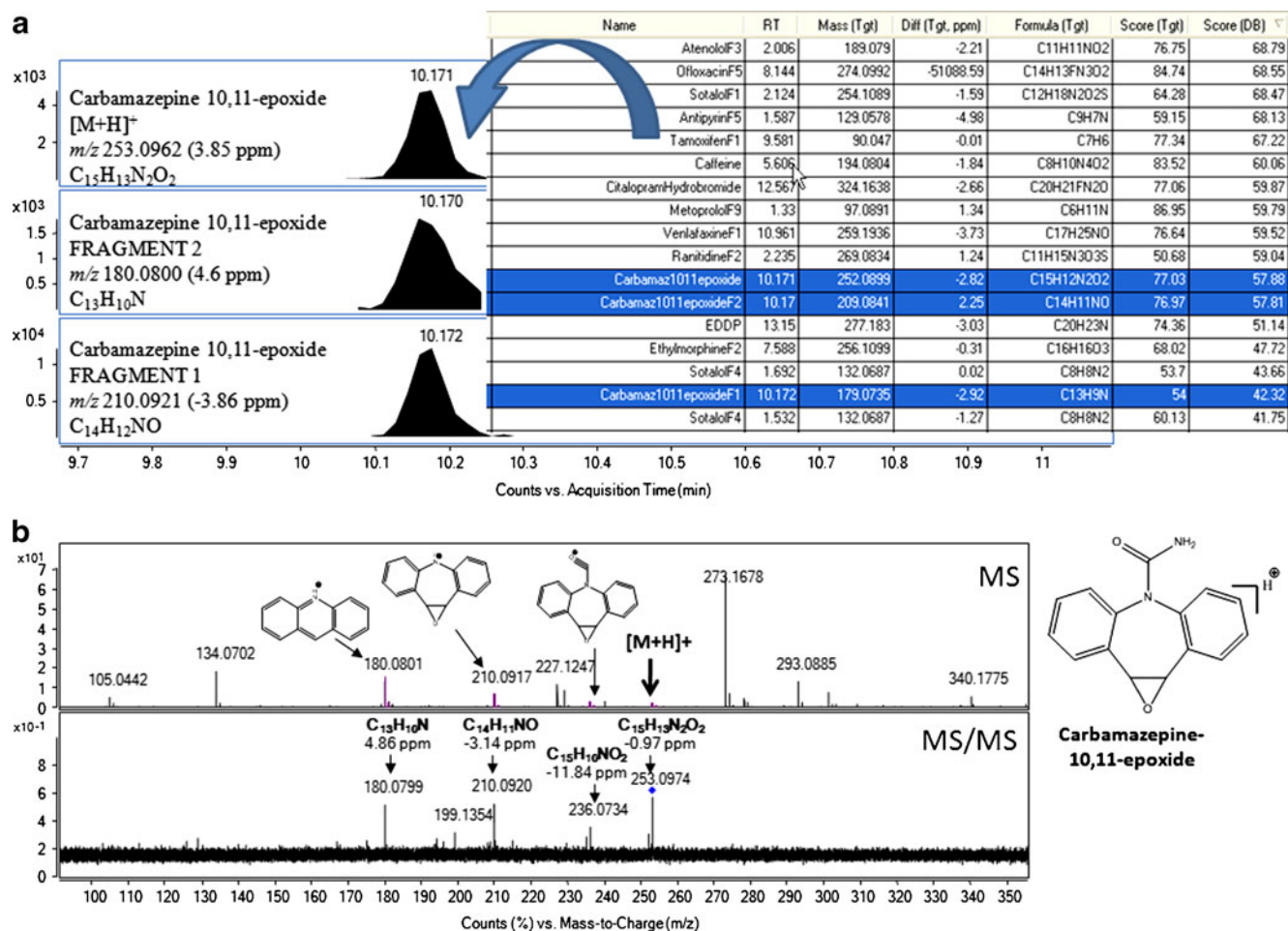


Fig. 1 Automated screening. **a** Simultaneous identification and confirmation of carbamazepine 10,11-epoxide using the automated screening strategy. **b** Comparison of QTOF-MS (fragmentor voltage

190 V) and MS/MS (fragmentor voltage 90 V and CE 10 eV) spectra of carbamazepine 10,11-epoxide findings in river water

dealing with real matrices, limited applicability is usually found in molecules only containing C, H, N, O, and S (such as for most pharmaceuticals and organic emerging contaminants) because of poor isotopic fingerprinting features which are not fully resolved from the interfering isobaric matrix or fine isobaric isotopes (i.e., $A+1$: ^{13}C , ^{15}N , and ^{33}S) and might lead to inaccurate elemental compositions. Moreover, limited capability of isotopic identification approaches by QTOF-MS/MS experiments was found since isolation of the precursor ion from the coeluted matrix is preferably performed in narrow m/z windows ($\Delta 1.3 m/z$) to achieve better sensitivity and noncontaminated product ion spectra. Therefore, isotopic signatures are discriminated or excluded from the product ion spectrum which derives from loss of selectivity because of the increased number of plausible elemental compositions for each monoisotopic ion (as seen for the ranitidine MS/MS confirmation experiment in Fig. 2b).

Unfortunately, target and nontarget screening strategies based on database searching are exposed to numerous false

negatives and false positives that need to be clarified in the confirmatory step. An example of this statement is shown in Fig. S1a for the false-positive hit of the database input metoprolol fragment 1 (ion formula $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}_2$; m/z 250.1802, retention time 7.1 min). QTOF-MS/MS spectra for this hit is shown in Fig. S1b, whereas the metoprolol reference MS/MS spectra at the same conditions is shown in Fig. S1c, evidencing the usefulness of QTOF for correct rejection of false positives. At the moment, confirmation/rejection steps should be preferably performed by experienced and trained MS analysts.

Using this automated scheme, a full width at half medium (FWHM) $\sim 20,000$ resolving power offered by TOF analyzers is generally sufficient to obtain a mass assignment in the range of 5 ng/L for most emerging contaminants as we reported previously (Gómez et al. 2010). It was observed that matrix effect plays an important role in the mass accuracy of target analytes when analyzing different river water samples. The approach of reanalyzing the samples using a 1:1 dilution (extract: (MeCN:H₂O,

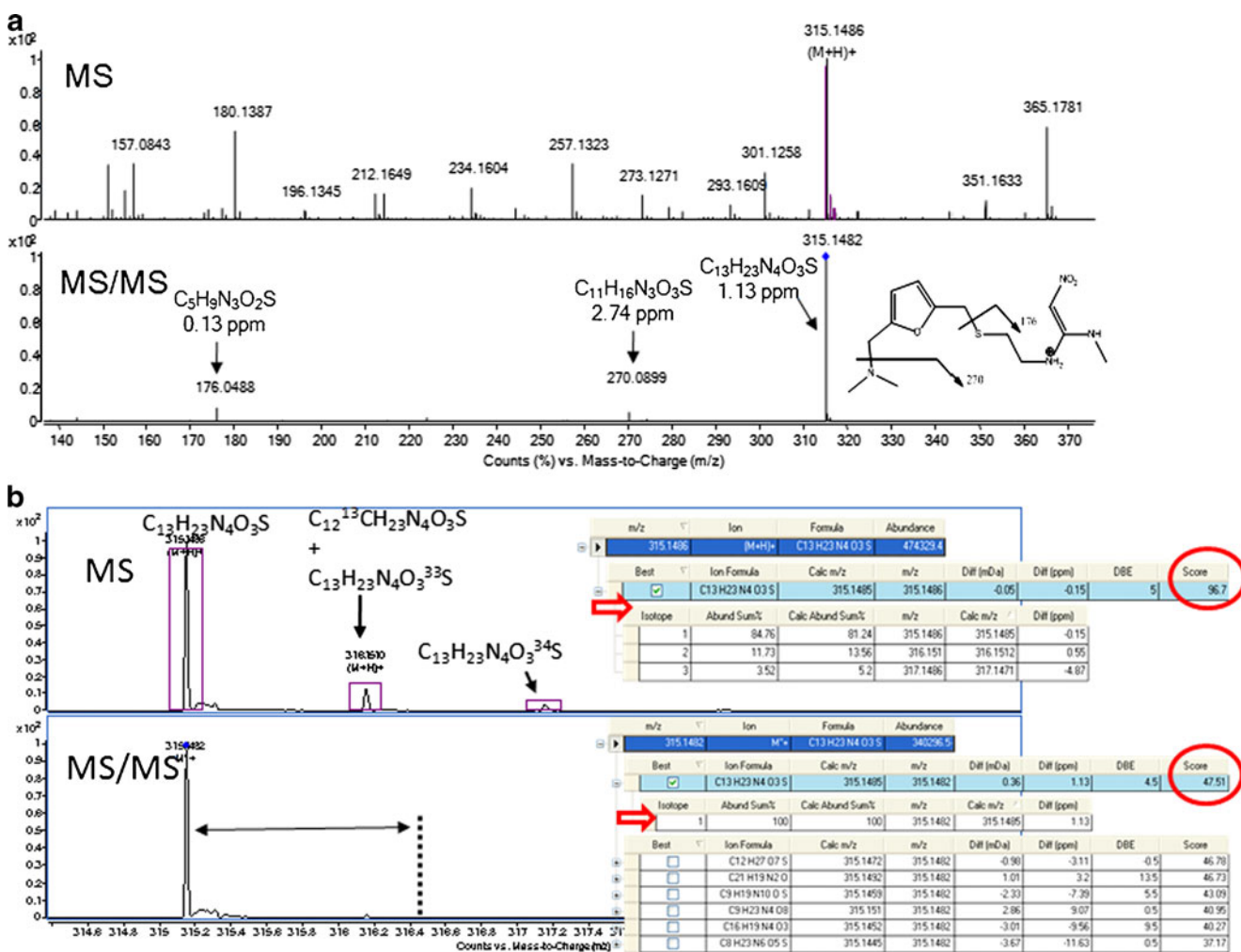


Fig. 2 Target screening and confirmation of ranitidine by QTOF. **a** In-source CID MS and CID MS/MS spectra of the positive finding of ranitidine in river water. **b** Ranitidine [M+H]⁺ (ion formula C₁₃H₂₃N₄O₃S; theoretical m/z 315.1485) isotopic pattern by MS and

discriminated isotopes by MS/MS when using narrow window (1.3 m/z). Restricted elemental composition (minimum and maximum number of atoms): C [0–60]; H [0–120]; O [0–30]; N [0–30]; S [0–2

1:9)) was performed. Table 1 shows an investigation on the screening of accurate masses when using this strategy for a group of 17 contaminants present in a river water sample. Under the selected MFE and database matching software parameters (counts threshold, mass deviation filter, and retention time tolerance), it was found that automatic screening performance was similar to that attained without sample dilution in spite of theophylline, metronidazole, erythromycin, and diazepam exceptions. Larger mass deviations than 5 ppm were obtained for these compounds when dilution was performed, suggesting that the reporting of false negatives because of inaccurately measured ions when working at low ion counts (mainly due to low concentration of analytes) is significant.

In this case, when enough sensitivity was obtained, sample dilution was found to simultaneously reduce the ion suppression and mass uncertainty for some affected compounds (as seen in Table 1 for cotinine and caffeine) but

also improving the recognition capability in automatic screening by reducing the number of hits. In addition, we have noticed variations in score values depending on the retention time of the analytes. The effect of retention time tolerance for hits production using accurate mass database was investigated for this sample, as seen in Fig. S2. Varying the retention time (0.25, 0.5, and 1.0 min) tolerance parameter in the software tool for hits presentation, it was deduced that, along the chromatogram, three distinctive zones were obtained. It was observed that those target inputs at the beginning of the chromatogram (0–3 min) are particularly subjected to the high influence of the chromatographic drift for the presentation of database hits, followed by a second zone which combines high and medium influence (3–15 min) and a null one (15–27 min). Moreover, according to our developed database (Gómez et al. 2010), most target accurate mass inputs belong to the second zone, so this variability in retention time to detect

Table 1 Comparison of findings in automated screening using the 400-fold SPE concentration (without dilution) and one half sample dilution strategy in a river water sample

Compound	R_T (min)	Formula	Mass	With sample dilution		Without sample dilution	
				Error (ppm)	Counts	Error (ppm)	Counts
Nicotine	1.4	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	162.1157	-3.96	2,849	-4.51	1,288
Cotinine	1.4	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	176.095	1.04	2,884	<i>7.41</i>	<i>1,524</i>
Atenolol	1.8	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	266.163	-0.2	965,819	0.97	1,456,241
Sotalol	2.0	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	272.1195	1.36	36,470	2.24	52,256
Theophylline	2.8	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180.0647	5.9	<i>8,621</i>	2.56	14,529
Metronidazole	3.0	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	171.0644	<i>5.69</i>	<i>9,947</i>	1.21	17,481
Codeine	3.2	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299.1521	1.24	31,253	2.1	48,252
Caffeine	5.2	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.0804	2.06	7,468	<i>-6.19</i>	<i>9,124</i>
4-AAA	5.6	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₂	245.1164	1.16	1,202,994	2.1	48,252
Benzoylcegonine	8.4	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	289.1314	1.93	34,181	2.71	47,849
Erythromycin	12.2	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733.4612	<i>-5.61</i>	<i>3,157</i>	0.42	12,142
EDDP	12.5	C ₂₀ H ₂₃ N	277.183	2.04	38,239	1.42	79,047
Simazine	13.0	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201.078	0.46	10,899	0.82	14,081
Carbamazepine	13.5	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236.095	0.38	40,059	0.98	57,344
Methadone	14.1	C ₂₁ H ₂₇ NO	309.2092	0.59	13,540	1.54	26,699
DEET	15.3	C ₁₂ H ₁₇ NO	191.131	0.77	385,171	1.11	589,150
Diazepam	16.8	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284.0716	7.37	<i>4,140</i>	0.14	6,952

Results in italics indicate false negatives if selecting <5 ppm deviation tolerance. Sample was analyzed in full scan at 190 V fragmentor using the database reported by Gómez et al. (2010). Automated hits were obtained using up to 10 ppm mass filter and 1,000 counts threshold

compounds through score values is not actually represented when performing automated identification.

Since the set of extraction parameters is constant during the whole time range and the existence of defined ion suppression regions and retention time drift zones, the modification of extraction conditions for identification is strongly recommended. Therefore, the selection of software restrictions when working near the detection limit using automated TOF screening (i.e., 5 ppm mass deviation filter and retention time relevance) need to be taken consciously. The retention time variability produces concomitant reduction of reliability for scores values, which cannot be considered with the same relevance during the whole chromatogram and need to be taken into account in future software developments. It has been shown that such loss of confidence modify the presentation of hits obtaining false positives and negatives when using the automated library searching.

Scarce sensitivity is expected to be associated to poor statistic ions (i.e., low ion counts, weak sensitivity, and highly fragmented ions) at default conditions, the effect of the matrix on mass accuracy at low ion counts, or concentration levels approaching the limits of detection (Calbiani et al. 2006). Consequently, in spite of its great helpfulness, automated identification was found to fail because of the preselection of inadequate identification

conditions by the analyst, the lack of sensitivity, as well as the influence of the matrix in the mass accuracy. Last but not least, the effect of isobaric interferences leads to loss in elemental composition recognition by increased uncertainty in accurate mass measurements or even strong overlapping with isotopic signatures. The resolving power attained with the TOF analyzer was found still limited for some findings, mainly related to the low concentrations of the analytes, lack of sensitivity, and strong matrix effect. This required resolving power shows to be a function of the complexity of different injected samples and the achieved sensitivity for the targeted analyte. Unfortunately, capabilities of modern MS cannot be considered independent from the associated software tool. The need for software capable of deconvolution algorithms was previously stated (Kaufmann 2006; Kaufmann et al. 2011). Despite improvements in recognition offered by HRMS of commercially available TOF analyzers and data treatment tools, some false positives and false negatives obtained are related to data treatment software. The introduction of deconvolution-based engines could enhance the potential of computer-aided detection by reducing the number of false hits. Deconvolution algorithms of software tools make available deconvoluted mass spectra, which not only permits the removal of background masses but also the grouping of mass signals from the target peaks and merge signals. On

the other hand, lack of practicability in comprehensive searching using a large database was experienced if working in the time-consuming profile algorithm. For that reason, centroiding algorithm is being selected in computer-aided detection by improving the processing speed, although a loss of data quality is attained.

On the other hand, the advent of new instruments equipped with increased resolutions in full-scan MS such as Orbitrap analyzer has successfully improved the recognition capability of elemental composition of the ions which fits well for screening strategies in complex samples (Kaufmann et al. 2011; Kellman et al. 2009). Furthermore, hybrid linear ion trap/Orbitrap (LTQ-Orbitrap) technology can be considered the next generation HRMS which has particularly shown excellent detection and identification features for environmental applications, although it is basically unaffordable for most laboratories (Kern et al. 2009).

3.1.2 Investigation on sensitivity and resolution power effects on mass accuracy

In order to improve the sensitivity and resolution provided by LC-HRMS, different strategies were made in the last years ranging from the development of new analyzers, enhanced optics, improved ionization efficiency, and the coupling with superior chromatographic resolution. However, the trend of pushing the detection limits towards lower values has kept the interest in improved linear dynamic range of the instrument and ionization process which have contributed to the wider acceptability of TOF and QTOF-MS for environmental analysis. Nowadays, the linearity of modern TOF analyzers (up to three orders of magnitude) approaches that attainable with QqQ instruments (Fernández-Alba and García-Reyes 2008).

Resolving power of TOF analyzers have significantly increased over the last years, and consequently, it has gained acceptance by offering resolutions FWHM \sim 20,000. The correct examination of accurate mass spectral data for elucidation of unknowns by ESI-HRMS is based in the heuristic assignment and interpretation of ions, neutral losses, and fragmentation pathways. Elemental composition of both parent and product ions plus double bond and ring equivalents are usually employed with this aim. TOF resolution was explored in the correct interpretation of an almost unstudied TP 5(R) amoxicillin-diketopiperazine-2',5' (5(R)-AMX-DKP) diastereomer which is being frequently identified in Henares River water (Pérez-Parada et al. 2011). Figure 3 shows the investigation in the HRMS proficiency in accurate measurement of the $[M+H]^+$ ion for two different river water samples containing (5R)-AMX-DKP by LC-QTOF. These samples were analyzed by varying the operational modes such as resolution power

and acquisition (full-scan MS or MS/MS) modes. Calculated signal-to-noise ratios (S/N) from extracted ion chromatograms of the theoretical m/z 366.1118 in the profile algorithm are also depicted, revealing that sample 1 contained higher $[M+H]^+$ abundance (S/N ranging from 7.8 to 343.2) than sample 2 (S/N ranging from 5.3 to 37.9).

Accurate mass analysis for sample 1 (see Fig. 3a–d) shows the importance to operate in HRMS mode for correct and unambiguous identification of the compounds. Lower-resolution operation (\sim 6,500 FWHM) gave inadequate mass errors which produced incorrect elemental formulas when working in both full-scan MS and MS/MS modes. However, when working in the higher-resolution mode (\sim 19,000 FWHM for m/z 322.0481), narrow mass distribution was obtained, while correct identification of the $[M+H]^+$ ion ($C_{16}H_{20}N_3O_5S$; theoretical m/z 366.1118) was performed in both full-scan MS (Fig. 3b) and MS/MS (Fig. 3d). In addition, it was found that sensitivity increases when resolution increases, as revealed not only by the calculated S/N but also the by selective feature of MS/MS experiments performed. Based on the information depicted in Fig. 3e–h for sample 2, the evident limitations of HRMS, when insufficient sensitivity derived from weak ion abundances are involved (i.e., low concentration, strong ion suppression, or low ionization process), are stated. As can be seen in Fig. 3f, high resolution power provided by contemporary TOF is not enough for the correct identification of (5R)-AMX-DKP when working in the full-scan MS mode which conduct to a false negative. Furthermore, as also depicted in Fig. 3g, 6,500 FWHM resolutions operating in MS/MS is easily influenced by isobaric interferences of the matrix which conduct to mass overlapping while representing a major drawback for environmental applications. Figure 3h shows that, when working simultaneously under \sim 19,000 FWHM mode and MS/MS, identification through accurate mass measurements of the parent ion is still feasible (m/z 366.1117, mass error 0.35 ppm) because of the increased sensitivity provided (S/N=37.9) by the combined technique (HRMS and MS/MS modes). Shortly, uncertainty of HRMS generally increases when working near the limit of detection (LOD) being a major limitation for contaminant monitoring in the aquatic environment using this technique. The use of complementary tools (i.e., hybrid MS such as QTOF, increased chromatographic separation, or enhanced ionization efficiency), which additionally provides enhanced sensitivity, is undoubtedly required to overcome accurate mass limitations using TOF-based instruments. In this example, the ability to perform MS/MS was observed to increase S/N by both enhanced signal and reduced noise. Therefore, the combined sensitivity and mass accuracy of HRMS instruments is found to be of paramount importance for comprehensive analytical applications in river water

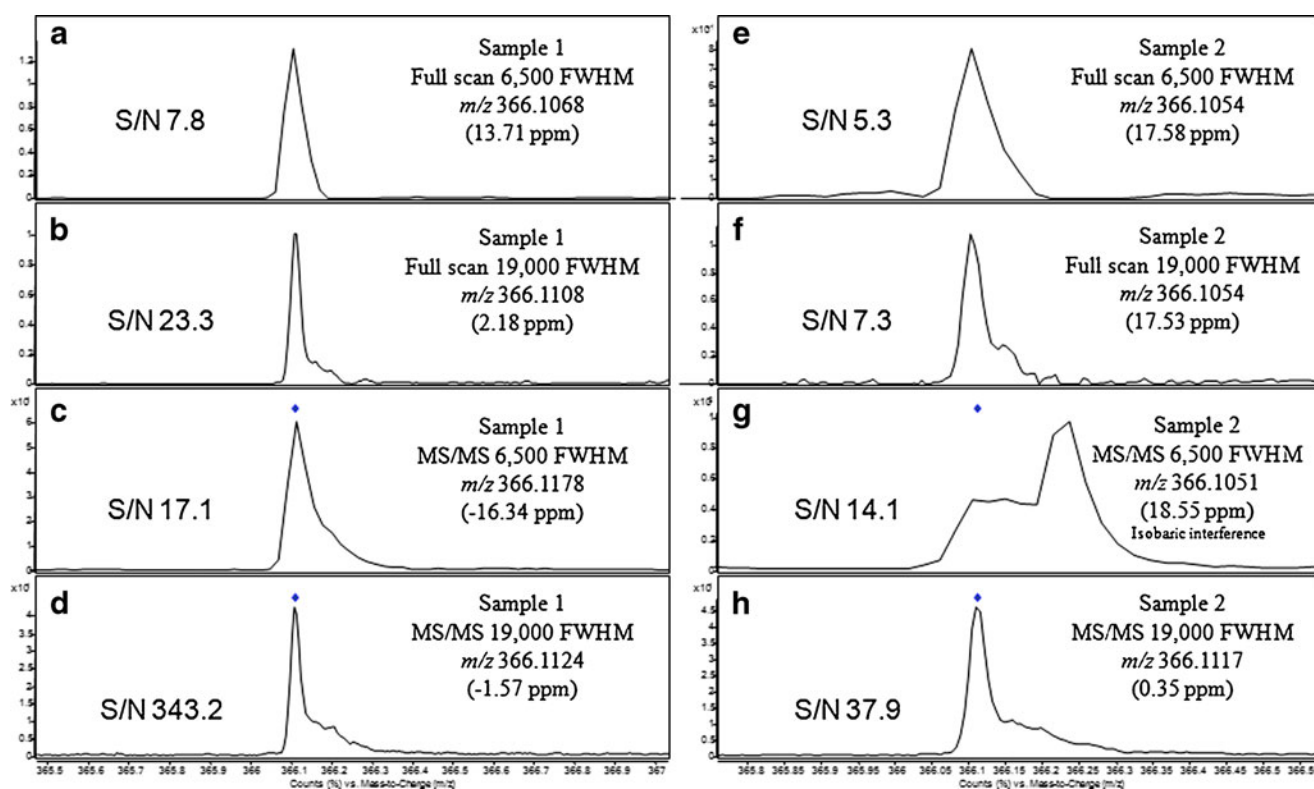


Fig. 3 Comparison of LC-HRMS analysis in two different samples containing the TP 5(*R*)-AMX-DKP; formula, $C_{16}H_{20}N_3O_5S$; theoretical m/z , 366.1118. Resolutions (R) FWHM by QTOF at three different calibration masses and different resolutions: 1 GHz: m/z 118.0863 ($R=4,068$), m/z 322.0481 ($R=6,478$), m/z 622.0289 ($R=8701$); 4 GHz: m/z 118.0863 ($R=11,773$), m/z 322.0481 ($R=18,733$), m/z 622.0289 ($R=$

20,979). Sample 1: **a–d**. Sample 2: **e–h**. Operation mode (full-scan MS or MS/MS), R mode, experimental m/z , mass error, and calculated chromatographic S/N are displayed in the figure. Full-scan MS fragmentor voltage 90 V, MS/MS fragmentor voltage 90 V, CE 5 eV, precursor selection using narrow mass window ($\Delta 1.3 m/z$)

samples. Even when using more powerful HRMS than TOF analyzers such as the Orbitrap, the attainable sensitivity which was not yet paired with the relative increase in resolution becomes a limitation in the correct assignment of elemental compositions (Kaufmann et al. 2011).

3.2 Sensitivity improvements in LC-MS/MS techniques

Hybrid QLIT (or QTRAP) systems can be seen as a combined QqQ scanning functionality with a sensitive linear ion trap (LIT). This is possible because of their singular configuration based on QqQ design where the third quadrupole (Q3) can be closed by repulsive DC voltages and eventually used as a LIT with axial ion ejection, making new scan modes available. Working in the LIT mode, the hybrid QLIT provides improved performance, higher versatility, as well as enhanced sensitivity, both in full-scan MS (EMS) and product ion (enhanced product ion (EPI)) scan modes (Martínez Bueno et al. 2007). Additionally, the instrument can also operate under all QqQ scans including SRM mode as well as precursor and neutral loss scanning. Selectivity achieved by the Q mass filter is

complemented by the sensitivity of the LIT mass analyzer. An interesting choice of this hybrid system suggests the possibility of combining in the same run SRM and EPI scans by the built-in information-dependent acquisition (IDA) software, thus obtaining at the same time accurate quantification and additional structural information (Martínez Bueno et al. 2007, 2009). Major technological improvements in QLIT equipment were focused on enhanced sensitivity; consequently, new applications have appeared using their impressive low instrumental detection limits provided for proper trace quantitative and qualitative target analysis.

As discussed previously, the advent of new strategies for enhanced sensitivity has taken improved advantage of the potential of MS techniques. When dealing with complex matrices, the sensitivity of MS is highly dependent on the obtained chromatographic separation. With this aim, combined features of chromatographic resolution power, enhanced ionization, and sensitive MS are the top choice for challenging studies. Trend addresses the employment of fast LC methods which use columns packed with sub-2- μm particles (Petrovic et al. 2010), enhanced sensitivity through

new designs for improved efficiency in the ionization process as represented by the Jet Stream technology (Gómez et al. 2010), and highly sensitive hybrid MS/MS techniques (Martínez Bueno et al. 2011a).

3.2.1 Towards direct injection analysis by LC-MS/MS

The need for sample treatment step in LC-MS determination of environmental waters encompasses the undesired effects of interferents on analytical performance to requested LODs for proper trace analysis of emerging contaminants. Moreover, atmospheric pressure ionization interfaces such as ESI sources are widely described to suffer ion suppression and enhancement effects, leading to questionable or inadequate qualitative or quantitative results. Alternatively to the use of sample preparation techniques, direct injection of large volumes of surface waters in LC-MS (100–5,000 µL) to determine emerging contaminants was previously assayed to avoid conventional sample treatments (Berset et al. 2010; Chiaia et al. 2008). However, in this approach, the sample amount introduced in the ESI source would cause an increase of the matrix effect along with introduction of dirt into the instrument with more maintenance of the equipment along with loss of reliability of the results. Modern highly sensitive QLIT-MS/MS instruments push for a significant reduction of the volume injected into the system (5–20 µL) without significant evidence in reducing sensitivity. Application of this instrument is still rare due to the unaffordable cost for most environmental laboratories but its exceptional features have allowed us even sample dilution in order to reduce the matrix load into the system with decrease of the ion enhancement/suppression effect.

In order to investigate actual sensitivity, Table 2 shows a comparison of the analytical performance regarding the matrix effect and method detection limits (MDLs) of two different approaches using QLIT-MS/MS for a selected

group of contaminants in river water. As described in the experimental section, strategy A was based on SPE sample treatment with further LC-QLIT-MS/MS, whereas strategy B was based on direct injection analysis on a modern QLIT-MS/MS instrument. For strategy A, responses without significant matrix effect ($\leq 20\%$) for most compounds can be inferred; medium ($20\text{--}50\%$) matrix effect for nicotine, citalopram, and primidone and strong matrix effect ($\geq 50\%$) for carbamazepine when using approach A. On the other hand, only carbamazepine (37%) and ofloxacin (33%) responses were found to be influenced with medium matrix effect when using direct injection analysis in strategy B. Nevertheless, lower MDLs were obtained when using approach A with a 400-fold concentration required to detect these target compounds in river water at the typical concentration found in Henares River water (Martínez Bueno et al. 2010).

Concerning quantitation, an investigation was performed for two different samples containing different levels of contaminants (6 km upstream and 20 m downstream of the discharging point). A realistic picture of quantitative results for these samples using approaches A and B is shown in Fig. 4.

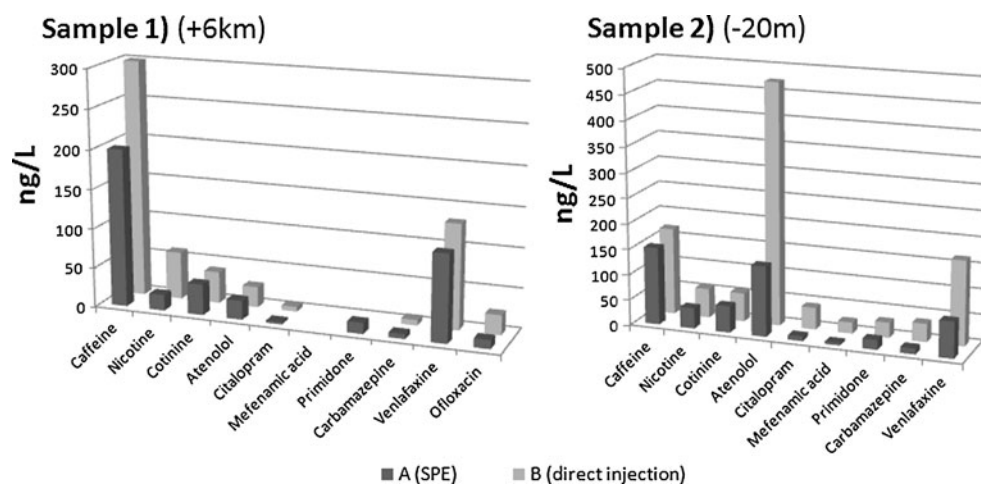
As can be seen, comparative quantitative results were acquired in most cases, although sample enrichment leads to underestimation because of the experimented ion suppression for most compounds (principally for atenolol, caffeine, nicotine, and venlafaxine). Sample preconcentration gives more complex extracts, thus the reduction or compensation of the matrix effect is compulsory. To illustrate this statement, Fig. S3 shows the total ion chromatogram (TIC) obtained by both analytical strategies for the same river water sample. Several strategies are usually required to reduce the matrix effect such as the use of matrix-matched calibration, isotopically labeled surrogate compounds, or internal standard addition.

Table 2 Comparison of matrix effect (in percent) and MDLs for a selected group of emerging contaminants in river water by two different QLIT-MS/MS instruments in SRM mode

Compound	Matrix effect (%)		MDLs (ng/L)	
	Strategy A	Strategy B	Strategy A	Strategy B
Caffeine	-12	-6	1.0	46
Nicotine	-33	-12	1.0	10
Cotinine	-13	-20	1.0	34
Atenolol	5	15	0.3	7
Citalopram	-29	-16	0.2	1
Mefenamic acid	9	6	0.6	2
Primidone	-21	-11	2.0	111
Carbamazepine	57	37	0.3	1
Venlafaxine	3	10	0.2	28
Ofloxacin	-16	33	1.0	5

For details of the optimized conditions for the analysis of this compounds (DP, in volts; CE, in electronvolts; CXP, in volts; retention times; and qualifier ions), see Martínez Bueno et al. (2010) and (2011b)

Fig. 4 Quantitative comparison of a selected group of emerging contaminants in different samples of Henares River using strategies A and B. *Sample 1* 6 km upstream of emissary, *Sample 2* 20 m downstream of emissary. In sample 2, ofloxacin residues were not included because of its high concentration. Results are shown using matrix-matched calibration



In general, lower ion suppression or enhancement was obtained when applying direct injection due to the lower amount of coinjected interferences, which leads to more accurate results for quantitative analysis. Consequently, increased reliability is obtained when applying direct injection being then useful for the investigation of unstudied or difficult to analyze (i.e., acidic, basic, or ionic) species which cannot be included in multiresidue sample preparation methods. Direct injection showed better proficiency for the analysis of trigonelline and nicotinic acid than SPE-based procedures. These compounds showed to be weakly recovered using multiresidue methods (Martínez Bueno et al. 2011b). Figure S4 shows a comparison of the chromatographic quantitative transition obtained when pre-concentrating the sample and the direct injection approach. For these compounds, improved selectivity for quantitative analysis without loss of sensitivity when using the direct injection approach can be inferred.

Valuable advantages are presented using this strategy, such as the reduction of sample handling and increased reproducibility, which are attractive features for high sample throughput analysis. Recovery studies and use of organic solvent are avoided, which can be considered to be in the same line with environmentally friendly trends of current analytical chemistry (Farré et al. 2010).

However, in spite of its deduced advantages, direct injection analysis was found to have a major drawback associated to the detection of those less concentrated or weakly sensitive compounds since there is the possibility of getting false negatives when the concentration is below the MDLs as seen for primidone (see Fig. 4, sample 1).

3.2.2 Confirmatory advances by LC-MS/MS

Despite of its controversies, different strategies are being used since the definition of official criteria (Commission Decision 2002/657/EC) for unambiguous identification and

confirmation by LC-MS/MS (Kaufmann et al. 2010). A widespread confirmatory criteria by LC-MS/MS (typically referred to as QqQ analyzers) involves precursor monitoring along with acquisition of two SRM transitions for each compound, retention time matching, and monitoring of the SRM ratio (defined as the relationship between the abundances of selected transitions for identification and quantification purposes; SRM_2/SRM_1). The main disadvantage of this strategy is related to those compounds with poor product ion spectra as well as influenced by the matrix and analyte concentration. Therefore, combinatory approaches of multiple MS techniques (mainly QqQ plus TOF) are often required for advanced monitoring of river basins (López-Roldán et al. 2010; Martínez Bueno et al. 2010).

Accordingly to the versatility provided by QLIT instruments, confirmation by IDA scan is an innovative aspect in trace research, as we have previously explained in detail (Martínez Bueno et al. 2009). This software mode combines SRM as the survey scan along with two analyses in full scan by using the triggered EPI operational mode (at different CEs) as the dependant scan, all within the same chromatographic run. Since EPI scans can be obtained at very low sensitivity levels, reliable confirmation is simultaneously given at quantitation levels. An exceptional feature of this approach is the maintenance of the quantitative performance of the SRM methods while also providing additional product ion spectra which is mandatory for confirmation of residues.

Confirmation using IDA feature was assayed in a tentative finding to be confirmed. Figure 5 shows the schematic example of ethylamphetamine confirmation in a river water sample using SRM and IDA methods by direct injection. As seen in the SRM method, it was not possible to get suitable identification of ethylamphetamine because of the lack of a second transition (164→119). However, the IDA-based method allowed its confirmation in the sample

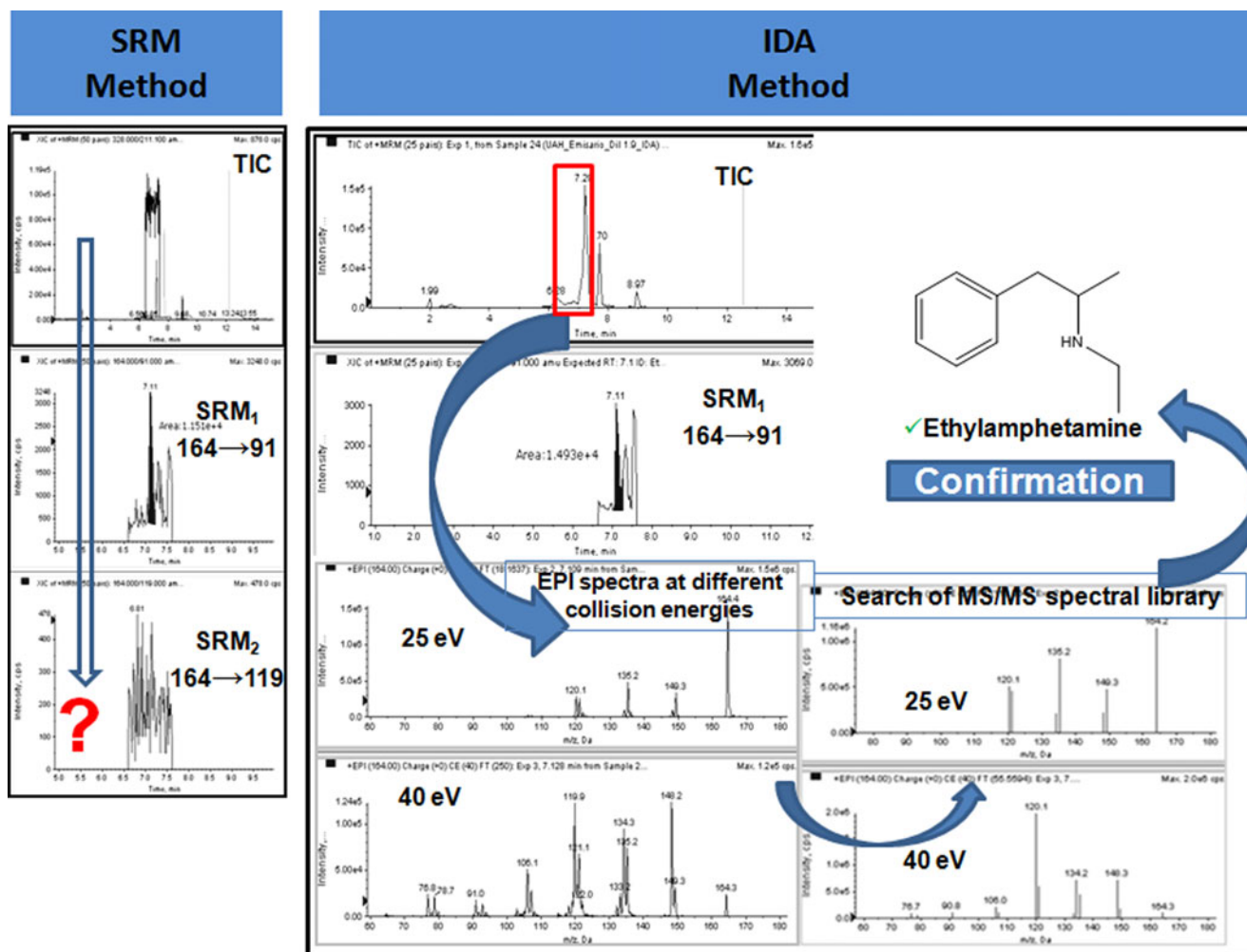


Fig. 5 Identification of ethylamphetamine in river water by the SRM and IDA methods

through the comparison of an in-house EPI spectra library at two different CEs (25 and 40 eV), avoiding the report of a false negative by using the same instrument.

4 Conclusions

The high-quality information needed for emerging contaminants research has demanded technological improvements. As described, two main features are the pillar of advanced MS, (1) high resolution and mass accuracy and (2) high sensitivity, which can be found when combining modern MS analyzers. Efforts were made in the development of hybrid MS such as QTOF and QLIT-MS/MS, which have considerably increased the sensitivity and selectivity of LC-MS/MS techniques over the last 5 years. Efficient evaluation of emerging contaminants in river water approaches the state-of-the-art of MS techniques. Hybrid MS and associated software tools have been shown to contribute to the field of targeted and nontargeted environmental analysis by offering unique features that are

proper for challenging studies such as computer-aided screening and confirmation tools, structural elucidation, and quantitative direct injection analysis. Dynamic methodologies are needed when dealing with river water monitoring; therefore, the ability to perform MS/MS to detect, elucidate, confirm, and quantify compounds by hybrid MS is leading to an increase in the scope of target analytes while improving knowledge on the occurrence and fate of emerging contaminants. However, there is a high margin of improvement in the provided sensitivity but principally on new possibilities of software tools devoted to reliable confirmation and improved automated data processing which are expected to be developed in the near future.

Acknowledgements The authors wish to acknowledge funding from the Spanish Ministry of Education and Science (Programme CONSOLIDER-TRAGUA 2010, CE-CSD2006-00044). A.P.P. also acknowledges the Facultad de Química (UdelAR, Uruguay), Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA Química, Montevideo, Uruguay), and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay, POSNAC-2010-2637) for the economic assistance.

References

- Berset J-D, Brenneisen R, Mathieu C (2010) Analysis of licit and illicit drugs in waste, surface and lake water samples using large volume direct injection high performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Chemosphere* 81:859–866
- Calbani F, Careri M, Elvirio L, Mangia A, Zagnoni I (2006) Matrix effects on accurate mass measurements of low-molecular weight compounds using liquid chromatography–electrospray–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 41:289–294
- Chiaia AC, Banta-Green C, Field J (2008) Eliminating solid phase extraction with large-volume injection LC/MS/MS analysis of illicit and legal drugs and human urine indicators in US wastewaters. *Environ Sci Technol* 42:8841–8848
- Commission Decision 2000/60/EC23. Establishing a framework for community action in the field of water policy. Official Journal of the European Union, pp 1–72
- 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 the European Union L221, 8–36
- Farré M, Pérez S, Gonçalves C, Alpendurada MF, Barceló D (2010) Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. *TrAC—Trends in Analytical Chemistry* 29:1347–1362
- Fernández-Alba AR, García-Reyes JF (2008) Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 27:973–990
- García-Reyes JF, Hernando MD, Molina-Díaz A, Fernández-Alba AR (2007a) Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *TrAC—Trends in Analytical Chemistry* 26:828–841
- García-Reyes JF, Molina-Díaz A, Fernández-Alba AR (2007b) Identification of pesticide transformation products in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry via “fragmentation–degradation” relationships. *Anal Chem* 79:307–321
- Gómez MJ, Gómez-Ramos MM, Malato O, Mezcua M, Fernández-Alba AR (2010) Rapid automated screening, identification and quantification of organic micro-contaminants and their main transformation products in wastewater and river waters using liquid chromatography–quadrupole-time-of-flight mass spectrometry with an accurate-mass database. *Journal of Chromatography A* 1217:7038–7054
- Huerta-Fontela M, Galceran MT, Martín-Alonso J, Ventura F (2008) Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain. *Sci Total Environ* 397:31–40
- Kaufmann A (2006) Strategies to avoid false negative findings in residue analysis using liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20:3566–3572
- Kaufmann A, Butcher P, Maden K, Walker S, Widmer M (2010) Comprehensive comparison of liquid chromatography selectivity as provided by two types of liquid chromatography detectors (high resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry): “Where is the crossover point?”. *Analytica Chimica Acta* 673:60–72
- Kaufmann A, Butcher P, Maden K, Walker S, Widmer M (2011) Semi-targeted residue screening in complex matrices with liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: current possibilities and limitations. *Analyst* 25:979–992
- Kellman M, Muenster H, Zomer P, Mol H (2009) Full scan MS in comprehensive qualitative and quantitative residue analysis in food and feed matrices: how much resolving power is required? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20:1464–1476
- Kern S, Fenner K, Singer HP, Schwarzenbach RP, Hollender J (2009) Identification of transformation products of organic contaminants in natural waters by computer-aided prediction and high-resolution mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 43:7039–7046
- Kosjek T, Heath E, Petrović M, Barceló D (2007) Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. *TrAC—Trends in Analytical Chemistry* 26:1076–1085
- Krauss M, Singer H, Hollender J (2010) LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Anal Bioanal Chem* 397:943–951
- Lacorte S, Fernández-Alba AR (2006) Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrometry Reviews* 25:866–880
- López-Roldán R, de Alda ML, Gros M, Petrovic M, Martín-Alonso J, Barceló D (2010) Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography–triple quadrupole–tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography–time of flight–mass spectrometry. *Chemosphere* 80:1337–1344
- Martínez Bueno MJ, Agüera A, Gómez MJ, Hernando MD, García-Reyes JF, Fernández-Alba AR (2007) Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Anal Chem* 79:9372–9384
- Martínez Bueno MJ, Agüera A, Hernando MD, Gómez MJ, Fernández-Alba AR (2009) Evaluation of various liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap–mass spectrometry operation modes applied to the analysis of organic pollutants in wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1216:5995–6002
- Martínez Bueno MJ, Hernando MD, Herrera S, Gómez MJ, Fernández-Alba AR, Bustamante I, García-Calvo E (2010) Pilot survey of chemical contaminants from industrial and human activities in river waters of Spain. *Int J Environ Anal Chem* 90:321–343
- Martínez Bueno MJ, Uclés S, Hernando MD, Dávoli E, Fernández-Alba AR (2011a) Evaluation of selected ubiquitous contaminants in the aquatic environment and their transformation products. A pilot study of their removal from a sewage treatment plant. *Water Research* 45:2331–2341
- Martínez Bueno MJ, Uclés S, Hernando MD, Fernández-Alba AR (2011b) Development of a solvent-free method for the simultaneous identification/quantification of drugs and their metabolites in environmental water by LC-MS/MS. *Talanta* 85:157–166
- Mezcua M, Malato O, García-Reyes JF, Molina-Díaz A, Fernández-Alba AR (2009) Accurate-mass databases for comprehensive screening of pesticide residues in food by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 81:913–929
- Pérez S, Barceló D (2007) Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. *TrAC—Trends in Analytical Chemistry* 26:494–514
- Pérez-Parada A, Agüera A, Gomez-Ramos MM, García-Reyes JF, Heinzen H, Fernández-Alba AR (2011) Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main

- transformation products by liquid chromatography–electrospray quadrupole time of flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25:731–742
- Petrovic M, Farré M, de Alda ML, Perez 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
- Radjenović J, Petrović M, Barceló D (2007) Advanced mass spectrometric methods applied to the study of fate and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment. *TrAC—Trends in Analytical Chemistry* 26:1132–1144
- Sancho JV, Pozo ÓJ, Ibáñez M, Hernández F (2006) Potential of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the determination of pesticides and transformation products in water. *Anal Bioanal Chem* 386:987–997

Estudios de determinación de compuestos orgánicos a niveles traza en matrices complejas

Montevideo, 10 de octubre de 2012

