

**DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA
PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE
CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN AGUAS Y
VEGETALES MEDIANTE LC-MS/MS CON
ANALIZADOR DE TRIPLE CUADRUPOLO**

Tesis Doctoral

JOSE MANUEL MARÍN RAMOS



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

**DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE CONTAMINANTES
ORGÁNICOS EN AGUAS Y VEGETALES MEDIANTE LC-MS/MS
CON ANALIZADOR DE TRIPLE CUADRUPOLO**

Tesis Doctoral
JOSE MANUEL MARÍN RAMOS
2010

Los Dres. **Félix Hernández Hernández** y **Francisco López Benet**, Catedráticos de Química Analítica de la Universitat Jaume I de Castelló,

Certifican: que la Tesis Doctoral "Desarrollo de metodología analítica para la determinación de residuos de contaminantes orgánicos en aguas y vegetales mediante LC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo" ha sido desarrollada bajo su dirección, en el Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas, Departamento de Química Física i Analítica de la Universitat Jaume I de Castelló, por **Jose Manuel Marín Ramos**.

Lo que certificamos para los efectos oportunos en Castelló de la Plana, a 12 de Abril de 2010.

Fdo. Dr. Félix Hernández Hernández

Fdo. Dr. Francisco López Benet

Esta Tesis ha sido realizada, y consecuentemente será defendida para la obtención del título de Doctorado en Química Analítica de la Universitat Jaume I.

Previamente a la defensa de la Tesis Doctoral, este trabajo ha sido evaluado por tres censores independientes directamente relacionados con el área de investigación, Dra. Rosa María Alonso Rojas (Catedrática del Departamento de Química Analítica de la Univesidad del País Vasco UPV/EHU), Dr. Francesc Borrull Ballarín (Catedrático del Departamento de Química Analítica y Química Orgánica de la Univesitat Rovira i Virgili de Tarragona) y Dra. Encarna Moyano Morcillo (Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Univesitat de Barcelona).

Agraïments

En primer lloc m'agradaria donar les gràcies als meus directors de Tesi, els Drs. Félix Hernández i Francisco López, per la confiança que durant aquests anys han dipositat en mi, donant-me la possibilitat de compaginar la investigació amb el treball que duc a terme al LARP. Realment és una sort, que personalment valore molt, el poder haver-me format en aquest grup d'investigació, no tan sols per l'envejable instrumentació que en ell disposem sinó sobretot per la qualitat científica tant dels meus tutors com de companys com els Drs. Óscar Pozo i Juanvi Sancho que, amb els seus consells i ensenyaments, han estat claus per a que jo puga dur a terme el treball que açi es presenta.

De tot cor voldria també compartir amb Ángela, tots els mèrits que puga tindre aquesta Tesi ja que, com sempre i de manera incondicional, m'ha donat els anims i suports necessaris sense els quals tot haguera estat molt més difícil. També voldria fer una menció especial als meus pares als qui vull agrair l'educació que he rebut per la seua part i els esforços que han realitzat per a que jo, en aquest moment, puga estar presentant aquesta Tesi Doctoral. Tampoc puc oblidar-me de Víctor, el meu germà, a qui també vull dedicar-li una part d'aquest treball.

Molt sincerament he de dir que ha estat un plaer compartir amb qui són o han estat companys meus del IUPA durant tantes hores i hores de feina, aprenentatge continu i també, perquè no dir-ho, diversió. Per això, mil gràcies a Elena P., Robert, Carlos, María, Tania, Emma, Susana, Mercedes, Arantxa, Elena S., Àngel, Edu, Carmen, Ximo, Toni, Roque, Jaime, Cristina, Inés, Miguel Ángel, Sandra, Ana Cabanes, Macarena, Elisa, Mari Carmen, Vima, Federica, Silvia, Sonia E., Sonia F., Ohiana, Clara, Laura O., Laura C., Carmen V., Cru, Tati, Ana María i Cecilia.

Finalment, no m'oblide dels meus amics Jose Carlos, Jose T., Laura, Laura S., David, Sonia, Rubén,..... ni dels meus companys de la facultat (i també amics) Mikele, Juan, Luís, amb qui he gaudit de molts bons moments que m'han servit per a "desconnectar".

En definitiva, gràcies a tots vosaltres.

Jose



Resumen

En esta Tesis se investiga el potencial analítico y la aplicabilidad del acoplamiento instrumental cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem con analizador de triple cuadrupolo (LC-MS/MS), para la determinación de contaminantes orgánicos en muestras de aguas y vegetales. Para ello, se han seleccionando compuestos cuya determinación analítica presenta dificultades, bien por su elevada polaridad o por problemas en su ionización, así como contaminantes prioritarios desde el punto de vista medioambiental. Toda la metodología analítica incluida en la Tesis se ha desarrollado teniendo en cuenta la legislación europea vigente, tanto en lo relativo a la sensibilidad requerida en los métodos analíticos según los niveles máximos de residuos permitidos, como a los parámetros de calidad relacionados con la instrumentación analítica y los métodos empleados. En consecuencia, los resultados que se presentan pueden ser considerados satisfactorios y fiables, desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo. La excelente sensibilidad y selectividad alcanzadas, así como la rapidez y robustez de los métodos desarrollados hace factible su aplicación en análisis rutinarios de muestras.

La Tesis se estructura en dos grandes bloques. En el primero de ellos se incluye el desarrollo, validación y aplicación de métodos multiresiduales por LC(UHPLC)-MS/MS, para la determinación de plaguicidas y productos de transformación (TPs) en aguas, tanto medioambientales (superficiales y subterráneas) como procedentes de los lixiviados de una planta de residuos sólidos urbanos. En el segundo bloque se describen métodos individuales para compuestos de especial interés analítico y/o medioambiental, cuya determinación a nivel de residuos, tanto en aguas como en vegetales, requiere metodologías avanzadas sensibles y selectivas.

En cuanto a metodología multiresidual, en el primero de los trabajos se propone una aproximación, basada en una preconcentración SPE "on-line" previa a la determinación por LC-ESI-MS/MS, para la determinación de plaguicidas ampliamente usados en la Comunidad Valenciana junto a varios de sus TPs en aguas. La inyección directa de la muestra en presencia de ácido heptafluorobutírico o de

ácido fórmico en el sistema SPE, permite la retención satisfactoria de compuestos básicos o ácidos, respectivamente, consiguiendo de este modo un elevado grado de multiresidualidad. Mediante la adquisición de dos transiciones SRM por compuesto se puede cuantificar y confirmar 18 plaguicidas, mayoritariamente polares, y nueve de sus TPs más importantes al nivel del límite de cuantificación (LOQ) objetivo (0.025 µg/L). Además, la elevada sensibilidad de los métodos desarrollados da lugar a límites de detección (LOD) inferiores a 0.005 µg/L en la mayoría de los casos. La validación se llevó a cabo en aguas superficiales y subterráneas a dos niveles de fortificación (0.025 y 0.1 µg/L), obteniendo recuperaciones entre 70 y 110%.

En el segundo de los trabajos, se presenta un estudio sobre los niveles de contaminación por plaguicidas y TPs en aguas subterráneas de zonas agrícolas de la Comunidad Valenciana. Para ello, se aplicó la metodología analítica descrita anteriormente, así como otro método publicado con anterioridad por nuestro grupo de investigación. Del análisis de más de 150 muestras, se dedujo que los herbicidas (mayoritariamente triazínicos) y sus TPs fueron los compuestos más frecuentemente detectados. Esto puede explicarse por el amplio uso de herbicidas en la agricultura, junto con su aplicación directa al suelo lo que junto a su elevada polaridad hace que alcancen los acuíferos con más facilidad. Además, los datos obtenidos tanto en aguas subterráneas como superficiales (más de 200 muestras analizadas) demuestran la importancia que tiene la inclusión de TPs en los métodos multiresiduales, ya que son detectados de manera habitual en las aguas y, en numerosas ocasiones, a concentraciones superiores a sus plaguicidas precursores.

El siguiente trabajo se centra en el desarrollo de metodología multiresidual para la determinación, en aguas procedentes de una planta de residuos sólidos urbanos, de varios contaminantes orgánicos incluidos, en su mayoría, en el Anexo X de la Directiva Marco 2000/60/CE referente a sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas de la UE. Cabe destacar el estudio que realizado sobre el efecto matriz, para diversos tipos de aguas (superficiales, subterráneas y procedentes de una depuradora). Gracias a la buena sensibilidad obtenida para todos los analitos se puede, mediante una simple dilución (x4) de las muestras, corregir satisfactoriamente

el efecto matriz en todos los casos, asegurando una correcta cuantificación, independientemente del tipo de agua analizada. La adquisición de varias transiciones por compuesto permite, en una sola inyección, examinar el cumplimiento de los Q/q ratios, llevar a cabo la identificación fiable de los positivos encontrados. El método se validó a dos niveles de concentración (0.05 y 0.5 µg/L) obteniéndose recuperaciones entre un 70-110% para todos los compuestos, excepto para la atrazina. El método desarrollado se ha aplicado a 31 muestras de agua (lixiviadas brutas y depuradas), habiéndose encontrado numerosos positivos a concentraciones que, mayoritariamente, no excedieron 0.1 µg/L, en el caso de las aguas depuradas, mientras que las aguas de lixiviado sí superaron este valor ampliamente.

El primer bloque de la Tesis finaliza con un trabajo en el que se exploran las posibilidades de la técnica reciente UHPLC en la determinación multiresidual de 37 plaguicidas de amplio uso en diferentes tipos de agua. El procedimiento desarrollado incluye una etapa previa de preconcentración de las muestras de agua por SPE con cartuchos Oasis HLB. La configuración UHPLC-MS/MS empleada permite, en un tiempo de análisis de 10 minutos, adquirir hasta tres transiciones SRM por compuesto, con lo que el método presenta una elevada fiabilidad en el proceso de identificación, al tiempo que no sacrifica sensibilidad. El método se validó en cuatro tipos de aguas (superficial, subterránea, de consumo, y tratada en una planta de residuos sólidos urbanos) a dos niveles de concentración (0.025 y 0.1 µg/L), obteniéndose buenas recuperaciones (entre 70 y 120%) y precisiones (RSD<15%) para la mayoría de los analitos. Se incluye un estudio detallado del efecto de la matriz en nueve aguas de diferente origen, evaluándose el uso de analitos marcados isotópicamente como patrones internos para compensar la supresión de la señal que se observa en la casi totalidad de los compuestos estudiados, sobretodo en el caso de las aguas brutas de lixiviado. El método se ha aplicado a 41 muestras de distinto tipo, habiéndose encontrado la mayoría de los compuestos seleccionados en las aguas brutas de lixiviado a concentraciones habitualmente elevadas, que disminuyen drásticamente tras el proceso de depuración por ósmosis inversa. Tanto en las muestras de aguas superficiales como subterráneas los compuestos más frecuentemente detectados fueron herbicidas, en su mayoría pertenecientes a la familia de las triazinas.

El segundo bloque se inicia con la determinación de acrilamida en aguas, estudiándose la aplicabilidad de las interfases APCI, APCI Sabre y ESI. Debido a la elevada polaridad y bajo peso molecular de la acrilamida se requiere una cuidadosa optimización de la cromatografía, así como de la ionización y detección en el espectrómetro de masas. Además, con objeto de poder alcanzar el nivel de concentración requerido en la legislación europea en materia de aguas de consumo (0.1 µg/L), tras descartar una etapa previa de preconcentración por las dificultades encontradas, se implementa la inyección de grandes volúmenes (LVI) mediante el uso de un auto inyector externo acoplado al sistema LC-MS/MS. Con esta opción, además de acortar los tiempos de análisis, disminuye el uso de disolventes así como el volumen de muestra. El método se validó en distintos tipos de aguas (superficial, subterránea, potable y de depuradora) a tres niveles de concentración (0.1, 1 y 10 µg/L). Los mejores resultados se obtuvieron con la interfase APCI Sabre que permite la determinación muy sensible de acrilamida (LOD 0.03 µg/L) sin apenas efecto matriz. Con dicha interfase se consigue minimizar la supresión en la ionización debida a la matriz y mejorar ostensiblemente la relación señal/ruido respecto la APCI convencional, lo que permite poder cuantificar la acrilamida al nivel de 0.1 µg/L y confirmar su identidad con la segunda transición al nivel de 0.2 µg/L.

El siguiente estudio se centra en el desarrollo y validación de un método innovador, por su rapidez, sensibilidad y selectividad, para la determinación directa de residuos del regulador de crecimiento etefón en diversos productos vegetales (manzanas, cerezas y tomates) por debajo de los LMRs establecidos. Cabe señalar que apenas existen métodos descritos para la determinación de etefón, basándose la mayoría en medidas indirectas de etileno o en la realización de derivatizaciones. El procedimiento optimizado consiste en una sencilla extracción líquido-líquido con agua acidificada y diclorometano (dada la baja estabilidad del etefón a pH>4) y la posterior determinación mediante cromatografía de pares iónicos (debido al carácter aniónico de la molécula de etefón) utilizando como reactivo formador del par iónico acetato de tetrabutilamonio (TBA). La adición del TBA directamente en el vial, evitando su uso en la fase móvil, junto con la aplicación de un "solvent delay", impide

la caída progresiva de la señal analítica, típica con el uso de este tipo de reactivos en detectores de masas. Además, la detección MS/MS permite la adquisición simultánea de hasta cinco transiciones SRM que, siguiendo estrictos criterios de confirmación, aseguran la inequívoca confirmación del etefón detectado en las muestras.

Finalmente, en el último trabajo presentado se aborda la determinación, por separado o simultáneamente, de dos de los insecticidas de origen natural más utilizados en el cultivo de naranjas, la azadiractina y la abamectina. Estos plaguicidas son macromoléculas difícilmente ionizables por lo que es clave el uso de diversos reactivos (NH_4Ac , NaAc), cuya adición a la fase móvil y a los extractos se ha estudiado, para poder optimizar tanto las condiciones de ionización como de detección por MS. De este modo, mediante la inyección directa de los extractos se obtiene la sensibilidad adecuada para la vigilancia de los límites máximos de residuos permitidos en la legislación vigente.

ÍNDICE GENERAL

Objetivos, metodología y plan de trabajo.....	1
--	----------

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1	Introducción.....	9
1.2	Preparación de muestra.....	14
1.3	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.....	21
1.3.1	Cromatografía líquida.....	22
1.3.2	Interfases.....	23
1.3.3	Espectrometría de masas.....	28
1.3.4	Principales características de los métodos basados en LC- MS/MS con analizador QqQ: puntos fuertes y débiles.....	32
1.3.5	Campos de aplicación de la LC-MS/MS.....	36
1.4	Bibliografía.....	37

CAPÍTULO 2. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS Y PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN EN AGUAS MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM (LC-MS/MS)

2.1	Introducción general.....	43
2.2	Cuantificación y confirmación de plaguicidas y productos de transformación en aguas medioambientales mediante extracción en fase sólida en línea con LC-ESI-MS/MS.....	53
2.2.1	Introducción.....	55

2.2.2	Artículo científico 1.....	57
	Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry J. Chromatogr. A, 1133 (2006) 204-214	
2.2.3	Discusión de los resultados del artículo científico 1.....	81
2.3	Estudio de la presencia de residuos de plaguicidas y productos de transformación en aguas de la Comunidad Valenciana.....	85
2.3.1	Introducción.....	87
2.3.2	Artículo científico 2.....	91
	Pesticide residues and transformation products in groundwater from a Spanish agricultural region on the Mediterranean Coast Int. J. Environ. Anal. Chem, 88 (2008) 409-424	
2.3.3	Discusión de los resultados del artículo científico 2.....	113
2.4	Determinación de contaminantes orgánicos prioritarios en aguas procedentes de una planta de residuos sólidos urbanos mediante extracción en fase sólida en línea con LC-ESI-MS/MS.....	119
2.4.1	Introducción.....	121
2.4.2	Artículo científico 3.....	125
	Quantification and confirmation of priority organic micropollutants in water by LC-tandem mass spectrometry Int. J. Environ. Anal. Chem, 87 (2007) 237-248	
2.4.3	Discusión de los resultados del artículo científico 3.....	141
2.5	Determinación multiresidual de plaguicidas de diversa naturaleza	

en aguas residuales y medioambientales mediante la aplicación de UHPLC-MS/MS. Estudio y corrección del efecto matriz en el proceso de cuantificación.....	145
2.5.1 Introducción.....	147
2.5.2 Artículo científico 4.....	151
Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples. Study of matrix effects J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 1410-1420	
2.5.3 Discusión de los resultados del artículo científico 4.....	177
2.6 Bibliografía.....	185

CAPÍTULO 3. DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA EN AGUAS POR LC-MS/MS. ESTUDIO DE DIFERENTES INTERFASES A PRESIÓN ATMOSFÉRICA

3.1 Introducción.....	199
3.2 Artículo científico.....	203
3.2.1 Artículo científico 5.....	205
Study of different atmospheric-pressure interfaces for LC-MS/MS determination of acrylamide in water at sub-ppb levels J. Mass Spectrom, 41 (2006) 1041-1048	
3.2.2 Discusión de los resultados del artículo científico 5.....	225
3.3 Bibliografía.....	229

CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE MÉTODOS LC-MS/MS PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS DE MAYOR DIFICULTAD ANALÍTICA EN MUESTRAS VEGETALES

4.1	Introducción.....	233
4.2	Artículos científicos 6 y 7.....	241
4.2.1	Artículo científico 6.....	243
	An ion pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of ethephon residues in vegetables Rapid Commun. Mass Spectrom., 20 (2006) 419-426	
4.2.2	Artículo científico 7.....	259
	Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry J. Chromatogr. A, 992 (2003) 133-140	
4.2.3	Discusión de los resultados de los artículos científicos 6 y 7....	275
4.3	Bibliografía.....	281
	CAPITULO 5. CONCLUSIONES GENERALES.....	287
	Artículos científicos relacionados con la Tesis.....	291

Índice de acrónimos

API	<i>Interfase a Presión Atmosférica</i>
APCI	<i>Interfase de Ionización Química a Presion Atmosférica</i>
APPI	<i>Interfase de Fotoionización a Presion Atmosférica</i>
BPL	<i>Buenas Prácticas de Laboratorio</i>
C-1	<i>Primera Columna en cromatografía líquida bidimensional</i>
C-2	<i>Segunda Columna en cromatografía líquida bidimensional</i>
CI	<i>Ionización química</i>
CID	<i>Disociación Inducida por Colisión</i>
COC	<i>Comité independiente del Reino Unido sobre carcinogenicidad de productos químicos en alimentos, productos de consumo y medio ambiente</i>
DAD	<i>Detector de Haz de Diodos</i>
DC	<i>Corriente Continua</i>
DDT	<i>Dicloro-difenil-tricloroetano</i>
DIA	<i>Desisopropilatrazina</i>
ECD	<i>Detector de Captura de Electrones</i>
EEUU	<i>Estados Unidos</i>
EPA	<i>Agencia Estatal de Protección de Medioambiente de los Estados Unidos</i>
EI	<i>Impacto Electrónico</i>
ELL	<i>Extracción Líquido-Líquido</i>
ESI	<i>Interfase Electrospray</i>
EU	<i>Unión Europea</i>
FAO	<i>Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación</i>
FD	<i>Detector de Fluorescencia</i>
FPD	<i>Detector Fotométrico de Llama</i>
FT	<i>Transformada de Fourier</i>
GC	<i>Cromatografía de Gases</i>
GUS	<i>Groundwater Ubiquity Score</i>
HFBA	<i>Ácido Heptafluorobutírico</i>

HPLC	<i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución</i>
HPTLC	<i>Cromatografía Líquida de Capa Fina de Alta Resolución</i>
IARC	<i>Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer</i>
ICR	<i>Resonancia Iónica Ciclotrónica</i>
IPs	<i>Puntos de Identificación</i>
IT	<i>Trampa Iónica</i>
LC	<i>Cromatografía Líquida</i>
LC-LC	<i>Cromatografía Líquida de columnas acopladas</i>
LC-MS	<i>Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas</i>
LC-MS/MS	<i>Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem</i>
LIT	<i>Trampa de Iones Lineal</i>
LOD	<i>Límite de detección</i>
LOQ	<i>Límite de cuantificación</i>
LMRs	<i>Límites Máximos de Residuos</i>
LVI	<i>Inyección de Grandes Volúmenes</i>
MS	<i>Espectrometría de Masas</i>
MS/MS	<i>Espectrometría de Masas en tandem</i>
m/z	<i>Relación masa/carga</i>
NFA	<i>Administración Nacional Sueca para los alimentos</i>
NFFHA	<i>Ácido Nonafluoropentanoico</i>
NOAEL	<i>Nivel de ausencia de efectos adversos</i>
NPD	<i>Detector Nitrógeno-Fósforo</i>
OCs	<i>Organoclorados</i>
OMS	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
OPs	<i>Organofosforados</i>
PAH	<i>Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos</i>
PCB	<i>Bifenilos Policlorados</i>
Ppb	<i>Partes por billón</i>
Q	<i>Analizador Cuadrupolar</i>
Q1	<i>Primer Analizador Cuadrupolar</i>
Q2	<i>Celda de Colisión</i>
Q3	<i>Segundo Analizador Cuadrupolar</i>

QqQ	<i>Analizador de Triple Cuadrupolo</i>
QTOF	<i>Analizador híbrido Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo</i>
RMN	<i>Resonancia Magnética Nuclear</i>
RF	<i>Radiofrecuencia</i>
RSD	<i>Desviación Estándar Relativa</i>
RSU	<i>Residuos Sólidos Urbanos</i>
SIM	<i>Monitorización del Ion Seleccionado</i>
S/N	<i>Relación Señal/Ruido</i>
SPE	<i>Extracción en Fase Sólida</i>
SPME	<i>Microextracción en Fase Sólida</i>
SRM	<i>Monitorización de la Transición Seleccionada</i>
TBA	<i>Acetato de tetrabutilamonio</i>
TDFHA	<i>Ácido Tridecafluoroheptanoico</i>
TOF	<i>Analizador de Tiempo de Vuelo</i>
TP	<i>Producto de Transformación</i>
UHPLC	<i>Cromatografía líquida de ultra presión</i>
UV	<i>Detección Ultravioleta</i>

OBJETIVOS, METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

Objetivos

El **principal objetivo** de esta Tesis Doctoral es el desarrollo, validación y aplicación de nuevos métodos analíticos para la determinación de residuos de contaminantes orgánicos en diversas matrices ambientales haciendo uso del acoplamiento cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo.

Se ha investigado el potencial de LC-MS/MS en cuanto a sensibilidad, selectividad y rapidez, afrontando la determinación de diversos compuestos de especial dificultad analítica, debido principalmente a su elevada polaridad (productos de transformación de plaguicidas, acrilamida, etefón,...) o dificultad de ionización en la interfase de acoplamiento (abamectina y azadiractina). Con los métodos desarrollados se pretende minimizar el tratamiento de muestra, priorizando la inyección directa de la misma (aguas) o de sus extractos (vegetales) con el fin de disminuir los errores analíticos y aumentar el número de muestras analizadas por unidad de tiempo para facilitar su aplicación en análisis de rutina. Dichos métodos se han aplicado a muestras reales, realizando en la medida de lo posible programas de vigilancia e investigación de residuos de plaguicidas y sus principales productos de transformación (TPs). Las distintas metodologías desarrolladas se han validado de acuerdo a los criterios establecidos en las guías europeas en materia de residuos de plaguicidas y de control de calidad en los análisis, con el fin de que los datos reportados sean útiles y fiables.

Con la finalidad de alcanzar el objetivo general indicado, se han establecido los objetivos específicos que se indican a continuación:

1. Desarrollo de métodos multiresiduales para la determinación de plaguicidas ampliamente usados en la Comunidad Valenciana y sus principales TPs en aguas (superficiales, subterráneas) y en lixiviados procedentes de una planta de residuos sólidos urbanos con tal de

caracterizar del modo más realista y completo posible la presencia de estos compuestos, en su mayoría, contaminantes del medio acuático.

2. Aplicación de etapas de preconcentración de los analitos basadas en la extracción en fase sólida, preferentemente en modo on-line, con el fin de minimizar la manipulación de la muestra, así como reducir los volúmenes tanto de muestra como de disolventes.
3. Aplicación de la cromatografía líquida de ultra presión (UHPLC) con tal de mejorar la resolución cromatográfica y reducir el tiempo de análisis, al tiempo que se pueden obtener picos cromatográficos más estrechos y de mayor altura con el consecuente aumento de la sensibilidad.
4. Estudio del efecto matriz en diversos tipos de muestras con el fin de seleccionar las mejores aproximaciones para su corrección y poder conseguir cuantificaciones adecuadas sin comprometer el tiempo total del análisis ni aumentar en exceso el tratamiento de muestra.
5. Aplicación de los métodos multiresiduales desarrollados a muestras de aguas subterráneas y superficiales de la Comunidad Valenciana, con el fin de obtener una visión más realista sobre el grado de contaminación por plaguicidas y contribuir a un mayor conocimiento de esta problemática, lo cual permitirá, en caso necesario, tomar medidas adecuadas para prevenir dicha contaminación.
6. Introducción directa de muestras acuosas en el sistema LC-MS/MS mediante inyección de grandes volúmenes (LVI) con tal de aumentar la sensibilidad sin comprometer el tiempo de análisis ni aumentar la manipulación de las muestras.
7. Comparación de la ionización mediante las interfases electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI) en el caso de compuestos

de especial dificultad analítica, con el fin de obtener las condiciones óptimas para su determinación a los bajos niveles requeridos.

8. Utilización de cromatografía de pares iónicos en columnas de fase inversa con objeto de retener analitos de naturaleza iónica, cuya determinación resulta muy dificultosa a niveles de residuos. Utilización de reactivos formadores de pares iónicos capaces de retener al analito en la fase estacionaria C₁₈, que al mismo tiempo sean compatibles con el sistema MS, lo que requerirá un compromiso cromatografía-detección.
9. Estudio de la formación de aductos (sodiados y amoniados) buscando las condiciones adecuadas para favorecer la ionización de analitos seleccionados cuyas estructuras se caracterizan por la ausencia de centros que faciliten la ionización en ESI.
10. Validación de todos los métodos desarrollados siguiendo las guías europeas relativas a análisis de residuos y criterios de calidad, con el fin de que los resultados de los análisis sean fiables desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo. Para ello, se prestará especial atención al número y tipo de transiciones SRM adquiridas, así como a los criterios de confirmación aplicados.

Metodología y plan de trabajo

La **metodología** general de trabajo seguida para el desarrollo de los métodos analíticos que conforman la presente Tesis puede resumirse del siguiente modo:

1. Selección de posibles analitos y revisión bibliográfica respecto a las metodologías existentes para su determinación, especialmente en aguas, prestando especial atención a las técnicas instrumentales utilizadas. Búsqueda de información referente a compuestos similares determinados por LC-MS/MS.
2. Optimización de las condiciones de MS y MS/MS para los compuestos seleccionados mediante infusión individual de sus patrones analíticos en disolución.
 - Adquisición de sus espectros MS en modo barrido (scan) estableciendo el modo de ionización y el voltaje de cono para el ion precursor.
 - Se procura favorecer la formación del ión molecular protonado (modo positivo) o desprotonado (modo negativo) mediante la adición de aditivos compatibles con el sistema (tipo ácido fórmico) cuando sea necesario.
 - Tras aislar el ión precursor, se optimiza la energía de colisión para generar el mayor número de iones producto facilitando la adquisición de diversas transiciones.
 - Selección de las transiciones en modo SRM para la correcta cuantificación e identificación del analito teniendo en cuenta la sensibilidad alcanzada (abundancia del ión producto) y muy particularmente la selectividad (especificidad de la transición), evitando aquellas transiciones derivadas de pérdidas comunes, como agua, CO, etc...

3. Estudio de las condiciones óptimas de separación cromatográfica mediante la inyección de patrones en disolución. Elección de la fase móvil así como del gradiente para poder obtener buenos picos cromatográficos y adecuada resolución. En determinadas ocasiones, el uso de aditivos en las fases móviles deberá ser cuidadosamente controlado para llegar a un compromiso cromatografía-detección, evitando introducir sustancias que puedan perjudicar la ionización.
4. Inyección de extractos de muestras blanco, fortificados al nivel de concentración objetivo, así como de patrones en disolución a la misma concentración para estudiar el efecto matriz. En caso de observar supresiones o exaltaciones importantes en la señal obtenida, búsqueda de soluciones adecuadas para corregir el efecto matriz y poder llevar a cabo una cuantificación correcta sin comprometer excesivamente el tiempo total del análisis, ni aumentar la manipulación de muestra.
5. Aumento de la sensibilidad del método, en caso necesario, incrementando el volumen de muestra inyectada en el sistema LC-MS/MS, o bien incluyendo una etapa de preconcentración mediante SPE.
6. Una vez desarrollado el método analítico, siguiendo la metodología descrita, validación del método, estudiando los parámetros de linealidad, especificidad, exactitud y precisión mediante ensayos de recuperación a varios niveles de concentración, definiendo el más bajo validado como límite de cuantificación objetivo (LOQ).
7. Aplicación de la metodología desarrollada al análisis de muestras reales y establecimiento de conclusiones a partir de los datos obtenidos.
8. El trabajo experimental se realiza siguiendo las directrices marcadas por diferentes guías y directivas europeas, en materia de validación de la metodología analítica (SANCO), límites máximos de residuos permitidos en

vegetales (LMRs), en aguas (Directivas 98/83/CE, 2000/60/CE, 2006/118/CE) o identificación/confirmación de los analitos mediante LC-MS/MS (Directiva 2002/657/CE).

El **plan de trabajo** seguido se detalla a continuación:

1. Selección de los contaminantes orgánicos a estudiar, mayoritariamente de carácter polar, en función de parámetros como su grado de utilización; toxicidad y/o peligrosidad (tanto para el medioambiente como para el ser humano), previsible presencia en las muestras por haberse detectado en análisis anteriores o por ser TPs de compuestos ya detectados y carencia de métodos rápidos, sensibles y selectivos para su determinación.
2. Revisión bibliográfica sobre los métodos de análisis existentes para estos compuestos y específicamente en lo relativo al uso de la técnica LC-MS/MS.
3. Desarrollo de un método multiresidual para la determinación de plaguicidas en aguas incluyendo un amplio espectro de compuestos de diferentes características físico-químicas, con una elevada presencia de TPs, cuya alta polaridad requiere una cuidadosa estrategia analítica a la hora de aplicar etapas de preconcentración y retención, tanto en el cartucho de SPE como en la columna cromatográfica.
4. Aplicación del método desarrollado a muestras de agua subterránea y superficial, recogidas en puntos de la Comunidad Valenciana seleccionados por su alto interés ecológico y/o por su posible vulnerabilidad a la contaminación por plaguicidas.
5. Desarrollo y validación de metodología multiresidual para sustancias contaminantes prioritarias incluidas en el Anexo X de la Directiva Marco del Agua 2000/60/CE de la Unión Europea. Estudio del efecto de la matriz y corrección del mismo.

6. Aplicación del método anterior para evaluar la eficacia del proceso de depuración de aguas de lixiviado procedentes de una planta de residuos sólidos urbanos (RSU).
7. Explorar los avances aportados por la técnica UHPLC en la determinación multiresidual de plaguicidas en aguas medioambientales y procedentes del lixiviado de una planta de RSU. Estudio detallado del efecto de la matriz en diversos tipos de aguas con objeto de proceder a su corrección, permitiendo la correcta cuantificación de los plaguicidas. Aplicación a muestras reales de aguas de diferente tipo y procedencia.
8. Estudio comparado de las interfases ESI, APCI e Ion Sabre™ APCI para la determinación sensible y selectiva de acrilamida en aguas a niveles de sub-ppb, tal como exige la legislación europea. Validación del método desarrollado.
9. Desarrollo y validación de un método sensible y selectivo para la determinación rápida del regulador de crecimiento etefón en diversas matrices vegetales a nivel de residuos, evitando etapas previas de derivatización. Aplicación de cromatografía líquida previa formación de pares iónicos con analizadores de MS para la determinación de residuos de contaminantes presentes en forma iónica.
10. Desarrollo y validación de metodología analítica para la determinación individual y conjunta de los insecticidas naturales abamectina y azadiractina, compuestos problemáticos por la falta de centros en su estructura química que sean fácilmente ionizables mediante la interfase ESI.
11. Establecimiento de las principales conclusiones derivadas de las investigaciones realizadas en esta Tesis.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Introducción

1.2 Preparación de muestra

1.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS)

1.3.1 Cromatografía líquida (LC)

1.3.2 Interfases

1.3.3 Espectrometría de masas (MS)

1.3.4 Principales características de los métodos basados en LC-MS/MS con analizador QqQ: puntos fuertes y débiles

1.3.5 Campos de aplicación de la LC-MS/MS

1.4. Bibliografía

1.1 Introducción

Entre los muchos contaminantes orgánicos que pueden originar efectos nocivos sobre el medio ambiente y la salud humana, los plaguicidas constituyen uno de los grupos más importantes.

La Agencia Estatal de Protección del Medioambiente de los Estados Unidos (EPA) define los plaguicidas como cualquier sustancia o mezcla de sustancias químicas, de origen natural o sintético, destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados como plagas. Dentro de la denominación plaga se incluyen insectos, hierbas, pájaros, mamíferos, peces y microbios, que compiten con los seres humanos para conseguir alimento, destruyendo las siembras y propagando enfermedades. Los plaguicidas pueden agruparse dependiendo del tipo de plaga al que están destinados, diferenciándose de este modo los insecticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, desinfectantes y reguladores del crecimiento, entre otros. También es posible clasificar a los plaguicidas en función de su estructura química.

Los plaguicidas raramente son empleados sobre los cultivos como productos químicos puros, sino que suelen utilizarse como principios activos disueltos en formulados sólidos o líquidos junto a disolventes, diluyentes y coadyuvantes que facilitan su aplicación y mejoran su acción frente a las plagas.

En la actualidad, el término plaguicida ha adquirido ciertas connotaciones negativas a consecuencia de sus efectos nocivos para la salud humana, fauna, flora y medioambiente en general, provocados por su toxicidad, aguda o crónica, junto al

uso masivo y poco controlado llevado a cabo durante décadas. A pesar de ello, no se debería menospreciar el papel tan importante que han desempeñado estas sustancias, facilitando el estado de bienestar de la especie humana con innumerables contribuciones. Así, entre los beneficios asociados al uso de plaguicidas se encuentra la protección de los cultivos, procurando producciones mayores y más seguras con el fin de abastecer, tanto en cantidad como en calidad, un mercado cada día mayor y a la vez más exigente. Además, su uso puede ayudar a optimizar la explotación de los suelos destinados a campos de cultivo, sin necesidad de abarcar territorios colindantes con fines agrícolas, preservando el hábitat y la biodiversidad. En el campo de la salud pública, el uso de determinados plaguicidas es imprescindible para combatir plagas peligrosas de roedores y mosquitos, los cuales son capaces de transmitir enfermedades que pueden llegar a ser letales (hantavirus, dengue, malaria,...). Otros son usados como desinfectantes en lugares críticos para la salud, como los hospitales, para prevenir la aparición de organismos patógenos, como la bacteria causante de la legionela (*Staphylococcus*). Muchos herbicidas son aplicados para controlar la aparición de vegetación en carreteras y vías de tren con el fin de aumentar la seguridad de sus usuarios. Determinados fungicidas se aplican en los depósitos de combustible de los aviones con tal de evitar la aparición de moho y hongos que pudieran perjudicar su correcto funcionamiento. En definitiva, podríamos encontrar multitud de ejemplos, ya que los plaguicidas tienen infinidad de campos de aplicación, siendo en la mayoría de ocasiones difícilmente sustituibles por otras sustancias o metodologías.

Aún siendo conocedores de las numerosas aplicaciones beneficiosas de los plaguicidas en la mejora de nuestra calidad de vida, no hay que perder de vista que muchos de ellos pueden tener efectos perniciosos sobre la salud y el medioambiente. Además, estos efectos se ven reforzados con las malas praxis llevadas a cabo durante su aplicación, obviándose en muchas ocasiones las buenas prácticas agrícolas y haciendo uso de sustancias inadecuadas, o aplicando dosis mayores a las necesarias. Actualmente, hay pruebas abrumadoras de importantes contaminaciones medioambientales en aguas, sedimentos, mamíferos, peces, aves,... así como graves efectos para la salud, tales como afecciones del sistema nervioso, trastornos

reproductivos y del desarrollo, cáncer, problemas genéticos,.... a causa del uso actual o pasado de plaguicidas, tanto en el ámbito agrícola como en otros campos de aplicación. Gracias a los esfuerzos investigadores destinados al desarrollo de nuevos plaguicidas, se ha conseguido sustituir muchos de los productos altamente tóxicos, persistentes y bioacumulativos (en su mayoría compuestos organoclorados prohibidos en los países desarrollados desde hace años) por plaguicidas que se degradan más rápidamente en el medio ambiente y menos tóxicos para los organismos a los que no están destinados. Pese a ello, en los países en vías de desarrollo, algunos de los productos fitosanitarios más antiguos continúan siendo los más baratos de producir y, para algunos fines, continúan siendo muy eficaces (p.e. DDT para la lucha contra la malaria), por lo que no se han llegado a prohibir. La disyuntiva entre coste/eficacia e impacto ecológico, incluidos los efectos a larga distancia debidos al transporte atmosférico y el acceso a las formulaciones con materias activas más modernas a bajo precio, constituye un problema de alcance mundial. Es muy importante a la hora de evaluar los efectos sobre el medio ambiente considerar no sólo los que se producen en los países de aplicación, sino también los que se ocasionan en lugares alejados. En este sentido, algunos plaguicidas prohibidos desde hace tiempo en los países desarrollados (DDT, clordano, toxafeno, etc.) se encuentran con frecuencia en regiones tan remotas como la zona ártica.

La mayor concienciación social lograda a través del conocimiento de los potenciales peligros asociados al combinar uso masivo y toxicidad, junto con la disponibilidad de cada vez más datos sobre su presencia en muestras, tanto ambientales como biológicas, hace que el control de estas sustancias empiece a cobrar la importancia que merece tanto para la comunidad científica como para los gobiernos. En este sentido, se han publicado durante las últimas tres décadas miles de artículos científicos relacionados con los plaguicidas, tanto relativos a su presencia en todo tipo de muestras como a sus riesgos y efectos sobre el medioambiente y la salud. Además, tanto en la pasada década como en ésta, se ha legislado mucho tanto a nivel estatal como europeo con objeto de establecer parámetros restrictivos en cuanto a concentraciones máximas permisibles (p.e LMRs en vegetales, niveles

máximos en aguas de consumo,...), así como guías sobre calidad de los análisis (Directiva 2002/657/CE, SANCO/10684/2009).

Para la determinación de plaguicidas, así como de otros tipos de contaminantes orgánicos, en matrices de distinta naturaleza satisfaciendo las estrictas restricciones establecidas en la legislación, son necesarios métodos analíticos altamente sensibles y específicos capaces de reportar de manera fiable valores de concentraciones a niveles de ppb ó sub-ppb. Con el fin de poder ser utilizados en programas de control, estos métodos deben ser rápidos para poder analizar el mayor número de muestras consumiendo el menor tiempo posible. Es muy importante también la aplicación de métodos multiresiduales, en los que se incluyan una gran diversidad de compuestos de interés ambiental, evitando en la medida de lo posible la inclusión de analitos "de relleno", faltos de interés por su nula aplicación o incluidos tan solo por su fácil determinación con la metodología empleada. Sin embargo, algunos plaguicidas, a consecuencia de sus propiedades físico-químicas particulares, difícilmente pueden ser incluidos en métodos multiresiduales, por lo que su determinación ha de ser abordada de manera individual mediante metodologías más específicas.

Por otro lado, cabe señalar que los plaguicidas están sometidos desde su aplicación a diferentes condiciones ambientales por las que pueden descomponerse, generando otras sustancias que pueden ser inócuas, o por el contrario, ser potencialmente peligrosas. Por ello, en los programas de control de contaminación por plaguicidas deben ser considerados también sus productos de transformación (TPs). Pese a la importancia que tiene la inclusión de estos compuestos, ésta dependerá de muchos factores. Así, al tratarse de sustancias poco estudiadas, y en muchos casos poco conocidas, puede haber cierta falta de disponibilidad comercial de patrones de referencia, lo que dificulta enormemente los análisis. Además, estos compuestos suelen ser más polares que sus predecesores, incrementándose la dificultad para su determinación analítica, siendo complicada muchas veces su inclusión en métodos multiresiduales.

Junto a los plaguicidas y sus TPs, existen otros muchos contaminantes orgánicos que por diferentes vías son capaces de producir efectos negativos sobre el medio ambiente y la salud humana. Algunos de estos compuestos son especialmente problemáticos ya que, además de su potencial toxicidad, poseen ciertas características físico-químicas que convierten su determinación en un reto analítico. Por ejemplo, uno de los contaminantes orgánicos que más ha preocupado en la última década es la acrilamida. Este compuesto, considerado cancerígeno, posee una estructura química que le confiere elevada polaridad y bajo peso molecular, lo que dificulta tanto su retención en el sistema cromatográfico como su detección.

En la presente Tesis se han seleccionado compuestos por los que existe preocupación ambiental por su posible presencia en aguas, o que resultan especialmente complicados desde el punto de vista analítico, lo que se traduce en una ausencia casi total de metodología rápida, específica y suficientemente sensible, que sea capaz de determinar los bajos niveles de concentración exigidos por la legislación vigente. Por otro lado, también se afrontan problemáticas analíticas de interés, relativas a la determinación de residuos de plaguicidas en muestras vegetales.

Después de esta breve introducción, en el presente capítulo, se exponen sucintamente las principales características de las técnicas utilizadas, y se comentan las etapas de preparación de muestra y medida de los analitos.

1.2 Preparación de muestra

La preparación de la muestra para la determinación de residuos de plaguicidas, u otros tipos de contaminantes orgánicos, incluye habitualmente una o varias etapas para la extracción de los analitos de la matriz, la purificación del extracto, con el fin de eliminar interferentes y, en muchos casos, la preconcentración de los compuestos objeto de análisis con tal de alcanzar límites de determinación adecuados.

La aplicación de distintas etapas de preparación de muestra está en función de los analitos (características y número), de la matriz analizada (aguas, sedimentos, suelos, alimentos,...), de la técnica cromatográfica (LC o GC) y del sistema de detección empleado (UV, FD, NPD, MS,...). Además del equipamiento disponible, los requisitos en cuanto a sensibilidad, selectividad y rapidez serán también determinantes a la hora de seleccionar las etapas de tratamiento.

Analitos

Las características físico-químicas de los analitos juegan un papel crucial tanto en la elección de la técnica de medida como de las etapas previas de tratamiento de muestra. La estructura química del analito determina su polaridad y volatilidad (según la presencia o ausencia de determinados grupos funcionales, del peso molecular,...), lo que permite seleccionar la técnica más adecuada para su separación cromatográfica (LC para polaridades medio-altas o GC para polaridades bajas), así como el disolvente más apropiado para la extracción. En el caso de analitos más apolares, la extracción se puede llevar a cabo usando hexano, acetato de etilo o acetona, mientras que para los más polares, las extracciones suelen realizarse con metanol, acetonitrilo o agua. A partir de la estructura del analito y de los grupos químicos que están presentes, se puede valorar su capacidad de respuesta en sistemas de detección convencionales tipo nitrógeno-fósforo (NPD), fotométricos de llama (FPD), fluorescencia (FD) y ultra-violeta (UV). Con el uso de estos detectores, que presentan baja selectividad y sensibilidad, suele ser necesario un mayor esfuerzo

preparativo para la extracción, purificación y/o preconcentración en comparación con otras técnicas de detección más poderosas como la espectrometría de masas. La mayor manipulación de la muestra aumenta las posibilidades de cometer errores, asociados a pérdidas de analito o contaminaciones durante el proceso.

Otro factor determinante en la elección y aplicación del tratamiento de muestra lo constituye el número de compuestos a analizar. A medida que aumenta la cantidad de compuestos a determinar en un único análisis, la optimización de las etapas de tratamiento de muestra será más complicada, siendo cada vez más difícil encontrar un procedimiento ideal que funcione satisfactoriamente para todos los compuestos. En la mayoría de ocasiones es necesario llegar a una situación de compromiso para todos los analitos, manteniendo en el método alguno/s de ellos aún sabiendo que los resultados obtenidos serían mejorables con otro procedimiento dirigido hacia estos analitos más problemáticos.

Matriz

Las técnicas de extracción empleadas dependerán en gran medida de la matriz y naturaleza de la muestra. La mayoría de los métodos desarrollados en la determinación de residuos y contaminantes orgánicos emplean extracciones sólido-líquido (en matrices sólidas como alimentos, suelos, sedimentos, vegetales,.....), líquido-líquido (ELL) (en matrices líquidas como agua, leche, aceites,.....) y extracciones SPE (matrices líquidas). La aplicación de etapas de purificación mediante SPE es muy habitual en matrices complejas tales como aguas residuales, orina, plasma sanguíneo, suelos,.... con el objeto de facilitar la cromatografía y la detección/identificación de los analitos. Los aspectos teóricos relacionados con los tipos de extracción aplicables como las etapas de purificación, son estudiados en profundidad en diversas monografías¹⁻² quedándose fuera de los objetivos perseguidos en esta Tesis.

Técnica cromatográfica

La disponibilidad de una u otra técnica cromatográfica (GC, LC) para la determinación del analito puede condicionar la etapa de preparación de la muestra. A modo de ejemplo, se pueden mencionar algunos casos típicos relacionados con la determinación de contaminantes orgánicos. Así, la incompatibilidad de la GC con la inyección directa de muestras acuosas implica la realización de ELL o SPE, con la finalidad no sólo de preconcentrar sino también de realizar un cambio de disolvente que permita la inyección de la muestra en el cromatógrafo. Otro ejemplo lo constituye la determinación de analitos polares cuando se emplea la técnica de GC, donde es habitual la inclusión de etapas de derivatización con tal de transformar el analito en otra molécula compatible con GC. De este modo, la necesidad de realizar etapas preparativas para compatibilizar analito y matriz con el sistema cromatográfico afecta directamente a la aplicabilidad de la metodología desarrollada, impidiendo en muchos casos su uso en métodos multiresiduo o con fines de control.

Sistema de detección

Cuanto menos sensible y selectiva sea la técnica de detección utilizada, más tratamiento de muestra será necesario realizar, con las desventajas que ello implica. Así, en detectores como FD o UV serán habituales las etapas de preconcentración, empleando grandes volúmenes de muestra, además de derivatizaciones con el fin de dotar a la molécula del analito de las propiedades necesarias para originar respuestas en estos detectores. El empleo de métodos con este tipo de detectores supone una fuerte limitación por su escasa capacidad multiresidual así como por su baja selectividad y escasa información aportada sobre la identidad del analito, pudiendo dar lugar a falsos positivos.

La universalidad de la espectrometría de masas, así como su mayor sensibilidad y selectividad, facilita, en la mayoría de los casos, la reducción de las etapas de tratamiento de muestra. Todos los analitos poseen una masa molecular propia, lo que

implica una respuesta en el detector más segura y menos compartida por otros compuestos. En los raros casos de analitos/interferentes con masas similares, sus diferentes fragmentaciones y/o masas exactas hacen que las posibilidades de reportar falsos positivos y/o negativos sean menores. La disminución del ruido químico de fondo que provoca la falta de respuesta del resto de componentes de la matriz al seleccionar las masas características del analito, hace que en muchas ocasiones no sean necesarias etapas de preconcentración ni de purificación, pudiendo ser las muestras o los extractos directamente inyectados en el sistema cromatográfico. Esto ocurre especialmente cuando se utilizan equipos de MS en tándem o equipos de MS de alta resolución.

La mayoría de los plaguicidas, TPs y contaminantes orgánicos incluidos tanto en los métodos multiresiduales como en los individuales que forman parte de esta Tesis, son de polaridades medio-altas, ajustándose de manera satisfactoria a la técnica cromatográfica empleada (LC) sin necesidad de etapas previas de derivatización o cambios de disolventes. Además, al acoplar LC con MS en tándem (MS/MS) se consigue combinar las ventajas de ambas técnicas, obteniéndose métodos altamente sensibles (permitiendo la inyección directa de los extractos o incluso de la muestra acuosa), selectivos (con la adquisición de un mínimo de dos transiciones se consigue identificar de manera altamente fiable a los analitos) y rápidos (inyecciones directas). Por otro lado, la rapidez de los análisis se ve mejorada con el empleo de la cromatografía líquida de ultra presión (UHPLC).

A pesar de las bonanzas analíticas derivadas de la rapidez, sensibilidad y selectividad intrínsecas a las determinaciones por LC-MS/MS, la alta multiresidualidad requerida en el análisis de aguas (Capítulo 2) junto con los bajos niveles de concentración exigidos por la legislación vigente para aguas de consumo ($< 0.1 \mu\text{g/L}$), hace necesaria una etapa de preconcentración, en nuestro caso basada en la SPE. Esta técnica, respecto a otras como LLE, es más fácilmente automatizada y puede abarcar analitos con amplios rangos de polaridades, disminuyendo notablemente el consumo de disolventes. La SPE puede realizarse en dos modos: "off-line" y "on-line". En la modalidad "off-line", se lleva a cabo la recolección de la fracción de elución

procedente de un cartucho, habitualmente desechable, que tras una etapa de evaporación y reconstitución se inyecta en el sistema LC-MS, en donde tiene lugar la separación cromatográfica. La modalidad "on-line" consiste en un proceso automatizado mediante válvulas de alta presión, típicamente de seis vías, y forma parte de la aproximación conocida como "cromatografía con columnas acopladas" (en este caso, SPE-LC). Normalmente la primera de ellas (C-1) es un cartucho/precolumna, capaz de soportar elevados flujos y volúmenes de muestra, cuyo relleno puede estar constituido por diversos tipos de fases estacionarias (C₁₈, polimérico, de intercambio iónico,...). La segunda (C-2) es la columna analítica, cuyo mecanismo de separación puede ser distinto (heteromodal) o similar (homomodal) al de C-1. Es muy importante no sobrepasar el volumen de ruptura (breakthrough) ya que a partir de éste se supera la capacidad de la primera columna para retener a los analitos, lo que provoca pérdidas traducidas en bajas recuperaciones.

La modalidad de SPE "on-line", presenta una serie de ventajas relacionadas con el mayor rendimiento en el proceso de transferencia de los analitos de la primera a la segunda columna (siempre que su diámetro interno sea igual), junto a la posibilidad de automatización (menor consumo de tiempo de análisis, aumentando el "sample throughput" ó número de muestras que pueden ser procesadas por día y disminuyendo a su vez las posibles pérdidas y errores relacionados con la manipulación de la muestra). En acoplamientos SPE-LC se suelen inyectar grandes volúmenes de muestra (desde 1 mL hasta 100-200 mL). Se pretende que los analitos queden retenidos en una pequeña porción de la cabeza de C-1 en el sentido del flujo de la carga para, tras realizar una etapa de lavado (con objeto de eliminar posibles interferentes), proceder a la transferencia de los mismos hacia la columna analítica, donde son separados y posteriormente eluidos hacia el detector. El proceso de transferencia de C-1 a C-2 se lleva a cabo con la misma fase móvil, por lo que tanto las fases estacionarias como las dimensiones de C-1 y C-2 deben ser compatibles en las condiciones de trabajo. La fase móvil encargada de realizar la transferencia se hace pasar por C-1 en sentido contrario al de la carga de los analitos ("backflush"), minimizando de esta manera el desplazamiento de los analitos por C-1 durante este proceso y evitando posibles ensanchamientos de los picos cromatográficos. Por ello, la

longitud de la precolumna C-1 debe ser la menor posible. Además, hay que considerar el tamaño de las partículas que conforman el relleno ya que éste limitará el flujo de trabajo afectando directamente al tiempo total del análisis. Así, a modo de ejemplo, con precolumnas con particulado de 5 μm el flujo óptimo se establece entre 1-2 mL/min. Si se pretendiera inyectar grandes volúmenes de muestra (>10 mL), el tiempo empleado en el proceso de inyección de la muestra y su carga en el cartucho sería excesivo respecto al requerido para el análisis cromatográfico, alargando en demasía el tiempo de análisis total.

Una ventaja significativa de SPE-LC es el importante aumento de sensibilidad derivado de los grandes volúmenes de muestra inyectados y del hecho de que todo el eluato se introduce en el sistema LC y no sólo una fracción del mismo como ocurre en SPE "off-line".

En la Figura 1.1, se presenta un esquema del acoplamiento SPE-LC utilizado en esta Tesis con objeto de poder conseguir la rapidez y sensibilidad necesarias para la determinación de plaguicidas y TPs en análisis de aguas.

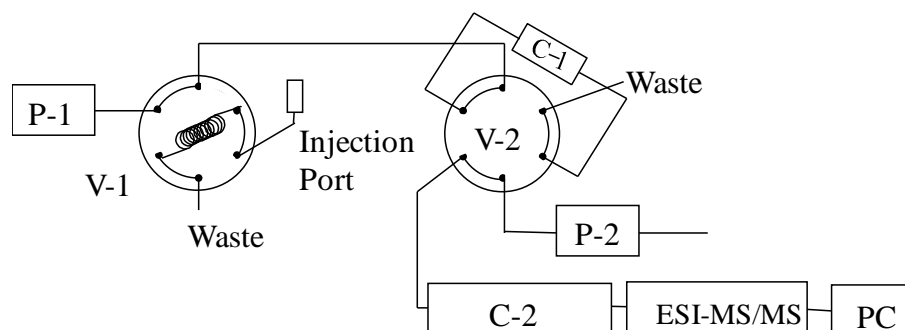


Figura 1.1 Acoplamiento SPE-LC utilizado en los métodos desarrollados para la determinación de plaguicidas y TPs en aguas descritos en el Capítulo 2.

P1 y P2: Bombas HPLC, V-1 y V-2: válvulas de seis vías, C-1: cartucho, C-2: columna analítica

Aunque en el Capítulo 2 se tratará con más profundidad, cabe señalar que hoy en día todavía existen limitaciones instrumentales que impiden el acoplamiento satisfactorio, en términos de rapidez, de la SPE en modo "on-line" con UHPLC. Esto se debe a que los sistemas desarrollados para la inyección de grandes volúmenes de muestra y preconcentración de los analitos han sido diseñados para su acoplamiento con HPLC. La menor capacidad resolutiva de HPLC frente a UHPLC conduce a mayores tiempos de análisis cromatográficos para los cuales el tiempo consumido durante la etapa de SPE "on-line" es asumible. Sin embargo, en UHPLC este tiempo cobra demasiada importancia, aumentando en demasía el tiempo total del análisis. Por este motivo, en el método multiresidual desarrollado para el control de plaguicidas en aguas mediante la aplicación de UHPLC, presentado en el Capítulo 2, se hace uso de la SPE en modo "off-line", a la espera de la implantación de un sistema "on-line" adecuado.

1.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS)

Aunque desde principios de los 70 el acoplamiento LC-MS ya estaba en el punto de mira de diferentes grupos de investigación inspirándose en los excelentes resultados obtenidos al combinar GC capilar con MS (GC-MS), no fue hasta la década de los 80 cuando los primeros instrumentos LC-MS se empezaron a comercializar. Al igual que en GC-MS, el acoplamiento de LC con MS reúne en una sola técnica instrumental propiedades analíticas claves en materia identificativa, como son el alto poder de separación proveniente de la HPLC, junto con la universalidad, sensibilidad y selectividad que aporta el uso de MS como técnica de detección. Además, con el desarrollo de LC-MS, se posibilita abordar analitos que por su termolabilidad, falta de volatilidad y/o alta polaridad resultan más problemáticas en su análisis mediante GC-MS.

La tardía aparición del acoplamiento LC-MS está ligada a la resolución de algunos problemas de compatibilidad entre ambas técnicas. En este sentido, se ha tenido que solventar la manera de introducir elevados flujos de fase móvil, típicamente de 1 mL/min en LC convencional, en un sistema de detección que requiere alto vacío. Además de los elevados flujos, también se ha tenido que superar la barrera que supone la falta de afinidad entre un detector de MS con fases móviles no volátiles frecuentemente empleadas en LC, así como resolver las dificultades para ionizar analitos no volátiles o lábiles térmicamente, ya que los detectores de MS miden relaciones masa-carga (m/z). Tras diferentes aproximaciones intentando encontrar una interfase capaz de remediar las incompatibilidades mencionadas, no fue hasta principios de los 90 cuando las interfases a presión atmosférica (APIs) (electrospray (ESI) e ionización química (APCI)) se impusieron sobre las demás, siendo actualmente las más utilizadas. Sus principales características, funcionamiento y aplicaciones se describirán en el apartado 1.3.2.

1.3.1 Cromatografía líquida (LC)

En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido constituido, normalmente, por una mezcla de disolventes de distinta fuerza eluotrópica que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria. El proceso cromatográfico consiste en una repetición de etapas de absorción/desorción, que tiene lugar durante el movimiento de los analitos a través de la fase estacionaria en función de sus afinidades. Con el objeto de aumentar la eficacia en las separaciones, el tamaño de partícula de la fase estacionaria se ha ido disminuyendo hasta unas pocas micras, lo que ha obligado a utilizar sistemas capaces de soportar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil a través de la columna análtica. De esta manera, dependiendo del tamaño del particulado que componga la fase estacionaria, se puede considerar la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con partículas de hasta 3.5 μm , o la cromatografía líquida de ultra presión (UHPLC), con partículas <2 μm .

En función de la fase estacionaria utilizada existen diferentes mecanismos de separación de los analitos. De igual modo, la fase móvil también juega un papel crítico en la obtención de resultados idóneos durante la cromatografía. Pese a la importancia en su elección, la discusión teórica al respecto escapa de los objetivos de la presente Tesis, pudiéndose consultar diversas monografías en las cuales se trata de manera detallada este aspecto³⁻⁴. Cabe señalar que todos los trabajos que se presentan en los siguientes capítulos están basados en cromatografía en fase inversa, fundamentada en la mayor polaridad de la fase móvil (agua, metanol, acetonitrilo) frente a la fase estacionaria (largas cadenas hidrocarbonadas, generalmente compuestas por 18 átomos de carbono).

1.3.2. Interfases

Los primeros esfuerzos reseñables con objeto de conseguir acoplar LC a detectores MS se remontan a finales de los 60 cuando el científico ruso Tal'roze y sus colaboradores desarrollaron una interfase inspirada en las usadas en GC-MS, dotadas de ionización electrónica (EI)⁵. Esta interfase se basaba en la introducción directa del líquido procedente de LC a flujos muy bajos, de alrededor de 1 μ L/min. Unos años después, McLafferty propuso lo que actualmente se considera como punto de partida de las actuales APIs: la posibilidad de hacer uso de los disolventes orgánicos con tal de facilitar la reacción química de ionización⁶. Paralelamente a estas aportaciones, se desarrollaron dos interfases más, la "moving wire" y "moving belt", cuyo mecanismo de funcionamiento consistía en la eliminación del disolvente previa a la ionización de los analitos⁷⁻⁸. A pesar de su popularidad inicial, estas interfases fueron descartadas debido a su complejidad y a las limitaciones relacionadas con el uso de disolventes adecuados. Una de las interfases que alcanzó mayor fama durante la década de los 80 fue la "thermospray", desarrollada por M.L. Vestal, ya que permitía trabajar con mayores flujos cromatográficos y, además, posibilitaba la determinación de compuestos termolábiles⁹. Pese a ello, tanto su efectividad como la selección de condiciones óptimas de rendimiento dependían excesivamente del tipo de muestra a analizar, por lo que la aplicación de esta interfase quedó limitada. Por último, otra interfase con muy buena aceptación dentro del grupo de las basadas en la eliminación del disolvente previa a la llegada de las moléculas de analito a la fuente de ionización fue la "particle beam", cuya aplicación se asocia generalmente al uso de fuentes de tipo EI o de ionización química (CI)¹⁰.

Pese a que las primeras aproximaciones datan de los años 70, no fue hasta la década de los 80 cuando las APIs empezaron a destacar sobre las demás interfases debido a su capacidad de determinar compuestos de elevado peso molecular y a su robustez al permitir ionizar un amplio abanico de analitos en matrices de diversa naturaleza. Su implementación fue generalizada en la década de los 90. Estas interfases se caracterizan por la formación de los iones a presión atmosférica fuera de la zona de alto vacío, evitándo los problemas técnicos relacionados con la

incompatibilidad líquido/alto vacío. Actualmente, las interfases de ionización por electrospray (ESI)¹¹ y por ionización química (APCI)¹² son las más utilizadas en los instrumentos LC-MS, habiendo contribuido determinantemente al rápido progreso tecnológico de la espectrometría de masas con el consecuente aumento de sus aplicaciones. En el año 2002, el científico norteamericano John B. Fenn fue galardonado con el premio Nobel de química por su contribución al desarrollo de la interfase ESI para su aplicación en métodos de identificación y de análisis estructural de macromoléculas biológicas¹³.

Cuando el acoplamiento LC-MS se lleva a cabo mediante una interfase ESI, los analitos disueltos en la fase móvil pasan al detector MS a través de un capilar de acero inoxidable a presión atmosférica sometido a un alto voltaje (del orden de 3-5 kV). La corriente de líquido, al fluir a través del capilar, se dispersa y las moléculas de los analitos y del disolvente forman un spray de pequeñas gotas cargadas en un proceso de nebulización. La mayor parte de las moléculas de disolvente se evaporan (desolvatación) al atravesar la región a presión atmosférica de la fuente del espectrómetro de masas (a unos 120°C). Dicha desolvatación es asistida además por una corriente de nitrógeno (a unos 350°C). A medida que se evapora el disolvente, las gotas se hacen cada vez más pequeñas hasta que las fuerzas repulsivas entre cargas en la superficie son capaces de superar las fuerzas cohesivas de tensión superficial y se produce la ruptura final de la gota originando iones en fase gaseosa (explosión de Coulomb). Dichos iones se transfieren a través de lentes focalizadoras al espectrómetro de masas.

En la interfase APCI, el mecanismo se basa en un proceso de ionización química en el que las moléculas de la fase móvil actúan como gas reactivo, una vez ionizadas por una descarga de electrones. De este modo, el flujo proveniente de LC se nebuliza en un tubo vaporizador de sílice fundida caliente donde el disolvente se evapora casi por completo. La mezcla gas-vapor entra en la fuente a presión atmosférica donde se produce la ionización química mediante los electrones que se generan en una aguja. Entre las moléculas del analito y las de la fase móvil tienen lugar reacciones de transferencia protónica en fase vapor y como resultado, tal como

ocurre en ESI, se pueden obtener moléculas de analito protonadas, desprotonadas y también aductos con moléculas de solvente de la propia fase móvil o con modificadores añadidos en ella o en el vial, siendo muy comunes los aductos sodiados y amoniados. Los aductos formados con moléculas de solvente (H_3O^+ , CH_3OH_2^+ , $\text{CH}_3\text{CNH}^+\dots$) se suelen convertir en $[\text{M}+\text{H}]^+$ cuando aumenta el voltaje de cono, ya que la primera fragmentación que sufren (fragmentación de cono) es la pérdida de la molécula de solvente. Mientras que la formación de aductos en ESI puede darse sin necesidad de incorporar modificadores, en APCI su adición suele ser necesaria. Generalmente, los aductos de sodio y potasio suelen descartarse como iones precursores debido a su baja fragmentación y poca reproducibilidad, prefiriéndose trabajar con el ion molecular protonado o en su defecto con el aducto amoniado, ya que éstos suelen requerir aditivos más volátiles y más compatibles con MS, como el ácido fórmico o acetato de amonio.

Una de las principales diferencias entre ambas interfases se encuentra en el estado de las moléculas de analito durante el proceso de ionización, en disolución en el caso de ESI y en fase gas en APCI. Otra diferencia es el flujo de fase móvil óptimo. En ESI, gracias a la incorporación de la corriente de nitrógeno a alta temperatura, se puede llegar a trabajar con flujos del orden de $\mu\text{L}/\text{min}$, existiendo de manera puntual alguna aplicación actual capaz de llegar a $1 \text{ mL}/\text{min}$. Sin embargo, en APCI el máximo rendimiento se obtiene a flujos más elevados, habitualmente de mL/min .

Uno de los puntos fuertes de las interfases ESI, que la han convertido en técnica de ionización de referencia en la mayoría de laboratorios, es la posibilidad de generar iones policargados con el aumento de posibles aplicaciones que ello conlleva, sobretodo relacionadas con la industria farmacéutica, proteómica,.... De este modo, mientras que con APCI tan sólo se pueden afrontar moléculas de bajo peso molecular (hasta aprox. 600) no termolábiles, con ESI el abanico de posibilidades abarca sustancias de bajos hasta elevados pesos moleculares y termolábiles, pudiéndose extender el rango de masas del instrumento en un factor equivalente al número de cargas de la molécula del analito.

En lo referente a los analitos, la interfase ESI suele ser más apropiada para compuestos muy polares o incluso iónicos, mientras que para los menos polares se ajustaría mejor la APCI. Pese a ello, hay un rango de masas muy amplio en el que ambas pueden trabajar sin problemas dependiendo su elección de las características físico-químicas de la molécula a analizar, de la sensibilidad alcanzada para el analito y de la matriz involucrada en el análisis.

En cuanto a la sensibilidad, generalmente parece ser que hay una mayor generación de iones cuando se utiliza ESI, por lo que las respuestas obtenidas para moléculas de polaridad media-alta en los detectores MS suelen ser mayores en ESI que en APCI, mientras que para las menos polares sucede a la inversa¹⁴. Pese a ello, hay un amplio rango de polaridades en el que ambas pueden trabajar indistintamente. Con tal de mejorar la sensibilidad para analitos polares, se han desarrollado nuevos diseños de interfases APCI, como la Ion Sabre (Waters). Por otra parte, pese a que históricamente se ha dado por hecho que la ionización de los analitos se ve más afectada por el resto de componentes de la matriz (produciéndose indeseables inhibiciones o exaltaciones de la señal) usando interfases ESI que cuando se usa APCI¹⁵, algunos autores indican que estas dos técnicas se consideran prácticamente afectadas de modo semejante¹⁶.

Aunque parezca que con estas dos interfases se puede afrontar la determinación de todo tipo de compuestos, todavía existen limitaciones para abordar compuestos apolares como los bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) u organoclorados (OCs). En la línea de solventar los problemas de ionización de estos compuestos, se están desarrollando nuevas interfases como la introducida por Syrage y Evans, conocida como interfase de fotoionización a presión atmosférica (APPI)¹⁷. En esta interfase la ionización se produce por la absorción de un fotón generado por una descarga producida en una lámpara ultravioleta. Con la fotoabsorción se produce una expulsión de electrones generando un catión que corresponde al radical molecular $[M^{\cdot+}]$. Este proceso de fotoionización puede afectar también a las moléculas de vapor de agua u otros disolventes próticos presentes en la región de ionización, promoviéndose la formación de la molécula protonada $[M+H]^+$.

En el acoplamiento de LC a MS, con objeto de alcanzar las condiciones más adecuadas en cada análisis, se deben considerar una serie de parámetros generales relacionados con la elección de la fase móvil, la columna o el flujo de trabajo. Así, las disoluciones reguladoras de pH y aditivos empleados deben ser volátiles (acetato de amonio, formiato de amonio, trietilamina, ácido acético, ácido fórmico) e introducidos a concentraciones relativamente bajas y controladas. Los disolventes orgánicos utilizados deben ser polares, tales como el acetonitrilo y el metanol, favoreciendo así la ionización de los analitos en las interfases. En las columnas empleadas, los rellenos pueden ser similares a los empleados en LC convencional (generalmente en fase inversa) teniendo que adecuar el diámetro de la columna al flujo de trabajo adecuado. Así, para las columnas "narrowbore" de 2 mm de diámetro interno (típicas en acoplamientos LC-MS con interfase ESI) el rango de trabajo puede oscilar desde 0.2 a 0.5 mL/min, mientras que las columnas convencionales de 4.6 mm de diámetro interno (típicas de acoplamientos con interfases APCI) el flujo ideal oscila entre 1 y 2 mL/min. Las partículas que componen la fase estacionaria también pueden variar de tamaño dependiendo del tipo de cromatografía empleada, siendo común el uso de particulado de 5 µm en HPLC y 1.7 µm en UHPLC.

A lo largo de esta Tesis, debido a la gran variedad de analitos estudiados, con distintos rangos de polaridad y termolabilidad, y a su compatibilidad con las distintas condiciones usadas en HPLC, la interfase seleccionada mayoritariamente ha sido ESI, típicamente con columnas "narrowbore" a flujos entre 0.2 y 0.3 mL/min.

1.3.3. Espectrometría de masas

La principal distinción entre los diversos espectrómetros de masas se encuentra en el tipo de analizador utilizado. El analizador es la parte del instrumento que permite separar, trabajando a muy bajas presiones, los iones en fase gaseosa que se han formado en la fuente de ionización, en función de su relación masa/carga (m/z). Los cinco analizadores de mayor relevancia que se pueden encontrar actualmente son el cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF), trampa de iones (IT, LIT), sector magnético y resonancia ciclotrónica con transformada de Fourier (FT-ICRMS).

Como la totalidad de los trabajos realizados en la presente Tesis se basa en el uso de analizadores de triple cuadrupolo (QqQ), este apartado se centra en este tipo de analizadores exclusivamente (funcionamiento, ventajas, inconvenientes...) ya que el resto se encuentra descrito ampliamente en la bibliografía^{18,19}.

Cuadrupolo (Q)

Un analizador cuadrupolar consiste en cuatro barras o polos de sección cilíndrica o hiperbólica, alineadas paralelamente entre sí, equidistantes a un eje central imaginario situado sobre el eje z. Mediante la aplicación de voltajes variables de corriente continua (DC) y de radiofrecuencia (RF) a cada pareja de barras opuestas, se consigue que los iones de una relación m/z determinada pasen por el túnel formado por las 4 barras siguiendo trayectorias oscilantes estables que conducen al detector mientras que el resto de los iones se desvía (ecuaciones de movimiento de Mathieu). Variando rápidamente el voltaje aplicado, se pueden seleccionar los iones de diferentes masas que llegan al detector. De este modo, el cuadrupolo actúa como un filtro de iones, discriminándolos en función de su relación m/z . Los cuadrupolos, junto a las trampas de iones, son los analizadores más usados para estudios cuantitativos de compuestos "target" (diana), es decir, de compuestos previamente seleccionados, que son los que se quiere determinar.

Uno de los parámetros instrumentales de mayor relevancia en analizadores MS es su resolución ($m/\Delta m$), es decir, su capacidad de separar iones de masas

adyacentes. La resolución está íntimamente ligada a la sensibilidad, de manera que cuando se trabaja con mucha resolución la sensibilidad que se obtiene suele ser deficiente, y viceversa. Esto se debe a que tanto la resolución como la sensibilidad dependen del número de iones que atraviesa el cuadrupolo y llega al detector, es decir, del número de trayectorias estabilizadas al aplicar voltajes variables de DC y RF. Cuantas menos trayectorias se estabilizan, y por tanto menos iones llegan al detector, resultará más fácil diferenciar iones de masas muy parecidas (aumentando la resolución), pero repercutirá inevitablemente de manera negativa en la respuesta obtenida en el detector (disminución de la sensibilidad). Debido a ello, se hace necesario llegar a un compromiso resolución/sensibilidad. Con en este tipo de analizadores, pese a poder alcanzar resoluciones de 0.1 Da, se suele trabajar a resolución unidad (se consigue discernir entre iones cuyas relaciones m/z difieren entre sí 1 Da), facilitando de este modo la obtención de buenas sensibilidades, adecuadas para la determinación de analitos a niveles de concentración muy bajos en un rangos de masas de hasta 4000 m/z .

Una de las principales limitaciones del cuadrupolo, pese a la rápida velocidad de barrido (unas 4000 $umas/s$) y alta transmisión de iones, es su baja sensibilidad en la modalidad de trabajo "full-scan" o barrido completo de iones, ya que no todos los iones generados en la interfase de una misma m/z alcanzarán el detector, haciéndose dicho efecto más acusado a medida que se amplía el rango de masas. Debido a ello y a las mediciones de masa nominal, como consecuencia de su baja resolución, este analizador no se suele utilizar en la búsqueda de desconocidos o en elucidación estructural.

Los modos de trabajo típicos cuando se dispone de un analizador cuadrupolar son: "full-scan" o barrido total, en el que se realiza un espectro de masas continuo en un rango definido, cuya aplicabilidad suele tener finalidades cualitativas (aunque con limitaciones, como se acaba de indicar); "SIM" (selected ion monitoring), en donde se selecciona uno o más iones específicos y sólo se miden estos, habitualmente con fines cuantitativos.

Triple cuadrupolo (QqQ)

En las técnicas de ionización suaves, como ocurre en las interfases electrospray utilizadas en LC-MS, los espectros obtenidos suelen estar dominados por la molécula protonada $[M+H]^+$ (ESI positivo). Al no haber apenas fragmentación, se obtiene información útil sobre la masa del compuesto, pero existe una carencia de información estructural necesaria para asegurar que el pico obtenido corresponde a un cierto analito y no a otro compuesto isobárico que podría contener la muestra analizada. Para obtener dicha información y aumentar la especificidad de las determinaciones cuantitativas, se pueden combinar varios analizadores, en el tiempo o en el espacio, dando lugar a la espectrometría de masas en tandem (MS/MS). Este apartado, debido a su uso en la totalidad de los trabajos presentados en esta Tesis, se centra en el acoplamiento en el espacio de dos analizadores cuadrupolares, separados entre sí por un hexapolo u octapolo que actúa como celda de colisión (QqQ ó QhQ), lugar donde se puede producir la fragmentación del ion seleccionado (ion precursor) al chocar sus moléculas con las de un gas inerte (argón). Este proceso se conoce como disociación inducida por colisión (CID) y está basado en la conversión de la energía translacional del ion precursor en energía interna, tras colisionar con las moléculas del gas inerte, utilizándose dicha energía para fragmentarlo en varios iones conocidos como iones producto.

La metodología general de trabajo en análisis cuantitativo incluye la optimización de la respuesta del ion precursor haciendo uso tan sólo del primer cuadrupolo (Q1) en la modalidad "full-scan" dejando pasar todos los iones de un rango de masas determinado hasta el detector. Seguidamente, se selecciona el ion precursor en Q1 (SIM), haciendo llegar a la celda de colisión (Q2) el haz de iones focalizado correspondiente a la relación m/z seleccionada. En la celda de colisión, el ion se fragmentará al chocar contra las moléculas de gas inerte en función de su estructura química. La configuración hexapolar u octapolar de Q2 juega un papel muy importante para la obtención de una óptima transmisión de los iones producto generados hasta el segundo analizador cuadrupolar (Q3). De este modo, se utiliza el término de "triple cuadrupolo" pese a que uno de ellos sea comúnmente un hexapolo

y no cumpla funciones de analizador. Por último, se realiza en Q3 un barrido completo en un rango de masas inferior al del ion precursor con tal de determinar los iones producto generados, optimizando su respuesta variando la energía de colisión (eV) y seleccionando prioritariamente aquellos iones producto con los que se obtenga mayor selectividad y sensibilidad.

Con analizadores QqQ, además de trabajar en modo "full-scan" y "SIM", como con un sólo analizador cuadrupolar, también se pueden hacer búsquedas de iones precursores trabajando en modo SIM en Q3 y en "full-scan" en Q1, barridos de iones producto trabajando en SIM en Q1 y "full-scan" en Q3, búsquedas de pérdidas neutras mediante barridos completos tanto en Q1 como en Q3. Por último, con finalidades cuantitativas se puede utilizar el QqQ para monitorizar una transición concreta (SRM, "selected reaction monitoring"), es decir, trabajar en SIM en Q1 (ion precursor) y Q3 (ion producto) utilizando la Q2 como celda de colisión. Con este último modo de trabajo, utilizado en los trabajos de esta Tesis, se consigue aumentar de manera significativa la relación S/N al disminuir considerablemente el ruido químico repercutiendo en un notable aumento de la sensibilidad. Además, trabajar con transiciones específicas se traduce en métodos altamente selectivos, pudiendo utilizarse el análisis con finalidad confirmatoria.

1.3.4 Principales características de los métodos basados en LC-MS/MS con analizador QqQ: puntos fuertes y débiles.

Como ya se ha comentado anteriormente, mediante el uso de LC-MS/MS se consigue aumentar tanto la sensibilidad como la selectividad de los métodos de análisis, aumentando la seguridad de que el compuesto determinado, incluso a muy bajos niveles de concentración, es el analito buscado y no otro componente de la matriz. La gran selectividad que proporciona la técnica evita, en general, tener que realizar separaciones cromatográficas exhaustivas, incluso en compuestos de polaridades muy similares que coeluyen entre sí. Así, en LC-MS/MS podemos obtener una "doble separación", una producida en la columna cromatográfica y la otra en el analizador. De este modo, se pueden diferenciar analitos con idéntico tiempo de retención pero con distintas transiciones y viceversa. A pesar de ello, no debe menospreciarse el papel que juega la cromatografía en la disminución del efecto matriz y en las posibles interferencias que podrían afectar a alguna de las transiciones adquiridas.

Otra de las grandes aplicaciones de la LC-MS/MS es la posibilidad que ofrece para la inyección directa de extractos acuosos tales como aguas, orina, suero,.... sin necesidad de tratamientos de muestra que pueden llevar a cometer errores analíticos, siempre y cuando la sensibilidad sea suficiente para los objetivos perseguidos.

A pesar de la elevada selectividad de la técnica, existe un hándicap en los métodos basados en LC-MS/MS como es la exaltación o supresión de la señal analítica como consecuencia del efecto que tienen interferentes presentes en la matriz en el proceso de ionización del analito. Este hecho puede afectar directamente a la calidad de los resultados provocando que se reporten datos cuantitativamente incorrectos cuando se utilizan patrones preparados en ausencia de matriz. Este "efecto matriz" depende de factores como la interfase utilizada, la matriz objeto del análisis, las características físico-químicas del analito y, sobre todo, de los interferentes que eluyen al mismo tiempo de retención que él. Con tal de eliminar o reducir al

máximo este indeseable efecto matriz, existen diversas aproximaciones cuya aplicabilidad variará en función de los analitos estudiados, las matrices involucradas, los niveles de concentración objetivo, el coste de los análisis, el número de muestras a analizar,.....

La corrección preferida del efecto matriz es, sin duda, la utilización de patrones internos, ya que no requiere ninguna etapa adicional de tratamiento de muestra y, generalmente, su correcta elección permite cuantificaciones satisfactorias²⁰⁻²². Para que una sustancia pueda ser usada como patrón interno, su ionización debe verse afectada del mismo modo y por los mismos interferentes que el analito. Para que esto suceda, las estructuras químicas y los tiempos de retención de ambos deben tener cierta similitud. De este modo, el patrón interno ideal es el mismo analito, pero con algunos elementos químicos de su estructura marcados isotópicamente, para que no se encuentre presente en la naturaleza. Por ello, son preferibles los marcajes con ^{13}C ó ^2H que con ^{37}Cl o ^{34}S . Aún así, existen ciertas limitaciones a la hora de seleccionar la molécula marcada de manera adecuada. Cuando se usan moléculas deuteradas, el posicionamiento de los ^2H en la estructura debe ser aquel que impida o dificulte en mayor grado su intercambio con ^1H del medio para evitar irreproducibilidades en la señal del patrón interno. En el caso de optar por marcados con ^{13}C , debido a que su abundancia isotópica natural es del 1%, una muestra que contenga el analito sin marcar también aportará ese porcentaje de su concentración a la añadida de patrón interno, en el caso de que tuvieramos una molécula marcada en un solo átomo. Debido a ello, se aconseja que el número de átomos marcados en la molécula de patrón interno sea superior a la unidad, sin que tampoco sea muy elevado ya que podríamos encontrarnos en ese caso demasiadas diferencias estructurales entre las moléculas de analito y su marcado, lo que llevaría a correcciones insatisfactorias. Así, el número habitual de átomos marcados suele ser entre 2 y 5, aunque esto dependerá mucho del analito en cuestión.

Las principales limitaciones que presenta el uso de patrones internos son la ausencia de disponibilidad comercial de ciertos compuestos marcados y su elevado coste, incrementándose ambas limitaciones a medida que crece la multiresdualidad

del método. Por ello, hay muchos autores que presentan alternativas al propio analito marcado, usando otras sustancias (marcadas o no) cuya probabilidad de encontrarse en la muestra a analizar es muy baja o nula, y que comparten ciertas características con los analitos que les hacen comportarse de manera similar en el proceso de ionización²³⁻²⁵. Utilizando esta aproximación se tiene que ser consciente de que cualquier variación en la matriz o en la señal instrumental puede provocar disparidades entre el comportamiento de estas sustancias y del analito pudiendo llevar a correcciones insatisfactorias^{24,26}. Además, compuestos con cierta semejanza estructural pueden comportarse de manera muy diferente frente a la ionización y verse afectados de modo distinto por el efecto matriz, llevando a correcciones poco satisfactorias²⁷.

Una de las soluciones más sencillas que se puede adoptar frente al efecto matriz es la dilución de las muestras o de los extractos de éstas con el disolvente en el que se encuentran preparados los patrones. Con esta aproximación se consigue disminuir la carga de matriz y, en consecuencia, los interferentes causantes de las inhibiciones o exaltaciones de la señal de los analitos, asemejándose el comportamiento al de los patrones usados para su cuantificación^{22,28}. Para la aplicación de esta aproximación deberemos disponer de sensibilidad suficiente para que, tras la dilución, se puedan todavía alcanzar los límites de detección y cuantificación objetivo.

En el análisis de muestras vegetales o biológicas, una de las medidas más adoptadas es el uso de calibrado en matriz^{25,29}. De esta manera, se consigue que la señal de patrones y muestras se vea afectada de manera similar por los interferentes de la matriz. Así, se consigue corregir el efecto matriz (no eliminarlo) con una probable pérdida de sensibilidad. La aplicación de esta técnica se limita a aquellas muestras en las que es factible la consecución de un blanco homogéneo de características similares a las de las muestras. Este hecho es prácticamente imposible de conseguir cuando las muestras son muy heterogéneas entre sí, como ocurre con la mayoría de muestras medioambientales que, pese a pertenecer a un mismo tipo, pueden diferenciarse mucho en su composición (p.e. aguas superficiales tomadas en distintos

puntos pueden tener diferentes matrices que afecten de manera desigual a los analitos).

Otra posibilidad, aunque menos utilizada, es la aplicación de adiciones estándar, es decir, añadir cantidades crecientes del analito de interés a una cantidad fija de muestra³⁰. Las principales limitaciones son básicamente dos: un aumento considerable del tiempo de análisis, ya que se necesitarán varias inyecciones por muestra y la necesidad de prever el nivel esperado de residuo para proceder a realizar las adiciones correctas.

Por último, se puede optar por añadir una etapa de pretratamiento de muestra con el fin de purificarla para eliminar los interferentes³¹. Actualmente, esta etapa suele consistir en una extracción en fase sólida (SPE) en la que, a la vez que se consigue eliminar interferentes, puede realizarse una preconcentración de los analitos mejorando la sensibilidad del método. Dicha aproximación tiene la principal desventaja del aumento del tiempo de análisis y de manipulación de la muestra, junto a la posibilidad de preconcentración de ciertos interferentes estructuralmente semejantes al analito generando el efecto contrario al buscado. En ocasiones se procede a la automatización del proceso mediante la aplicación de la técnica de columnas acopladas (SPE-LC, LC-LC) en las que, tanto patrones en solvente como muestras, se someten al mismo procedimiento automatizado, disminuyendo considerablemente el tiempo de análisis respecto de las técnicas de purificación convencionales (ELL, SPE "off-line").

Finalmente, un inconveniente de LC-MS/MS es la ausencia de librerías espectrales comerciales, reproducibles en cualquier instrumento, como las existentes en GC-MS por EI. Asimismo, es necesario indicar que ciertos métodos desarrollados previamente para otros detectores no son siempre transferibles a LC-MS por la incompatibilidad de algunas fases móviles, reactivos o modificadores con el sistema MS utilizado.

1.3.5 Campos de aplicación de la LC-MS/MS

Los instrumentos LC-MS/MS proporcionan una herramienta adecuada para la determinación de moléculas orgánicas polares a niveles de concentración muy bajos, siendo especialmente utilizada en aplicaciones donde se necesita una sensibilidad elevada como en el campo ambiental (p.e plaguicidas, fármacos y otros contaminantes en aguas³²⁻⁴⁰ y alimentos³⁹⁻⁴³), farmacológico (p.e estudio de la dosificación y metabolismo de los medicamentos⁴⁴⁻⁴⁶) o en el control biológico de exposición (p.e. niveles de contaminantes orgánicos en contacto con seres humanos en sus distintos fluidos corporales^{22,47-49}). Además, aprovechando también la elevada especificidad de la técnica, tiene su aplicación en campos en los que se necesita una confirmación inequívoca de la presencia de analito en las muestras, como es el caso del control de alimentos (p.e presencia de una determinada toxina en un producto de consumo^{43,50-51}) o el control antidoping (p.e presencia de una sustancia prohibida en la sangre u orina de un atleta^{49,52-53}). Además, gracias a la ionización aportada por la interfase ESI, se pueden abordar el estudio de moléculas de elevado peso molecular (p.e en estudios para la identificación y elucidación estructural de proteínas^{54,55}).

En resumen, el uso del acoplamiento LC-MS/MS permite la determinación selectiva (información estructural inherente en la transición), sensible (eliminación casi completa del ruido químico aumentando la relación S/N) y rápida (minimización de la etapa de preparación de muestra) de moléculas orgánicas, si se corrige el efecto matriz.

1.4 Bibliografía

1. J.D. Winefordner, *Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications, Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, Vol. 162, Ed. Somenath Mitra, New Jersey Inst. Technol., 2003.
2. J.R. Dean, *Extraction Techniques in Analytical Sciences*, Vol. 1, Ed. Wiley & Sons, Northumbria University, 2009.
3. C.F. Poole. *The Essence of Chromatography*, Ed. Elsevier, 2003.
4. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*, Ed. Wiley & Sons, 2009.
5. V.L. Tal'roze, V.E. Skurat, G.V. Karpov, *Use of mass spectrometer with a capillary system for admitting the sample as a liquid chromatograph detector*, *Zh. Fiz. Chim.*, **43**, 1969, 241.
6. M.A. Baldwin, F.W. McLafferty, *The direct introduction of liquid solutions into a chemical ionization mass spectrometer*, *Org. Mass Spectrom.*, **7**, 1973, 1111-1112.
7. R.P.W. Scott, C.G. Scott, M. Munroe, J.Hess, *Interface for on-line liquid chromatography-mass spectroscopy analysis*, *J. Chromatogr. A*, **99C**, 1974, 395-405.
8. W.H. McFadden, H.L. Schwartz, S. Evans, *Direct analysis of liquid chromatographic effluents*, *J. Chromatogr. A*, **122C**, 1976, 389-396.
9. C.R. Blakley, M.L. Vestal, *Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry*, *Anal. Chem.*, **55**, 1983, 750-754.
10. R.C. Willoughby, R.F. Browner, *Monodisperse aerosol generation interface for combining liquid chromatography with mass spectroscopy*, *Anal. Chem.*, **56**, 1984, 2626-2631.
11. J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Electrospray ionization-principles and practice*, *Mass Spectrom. Rev.*, **9**, 1990, 37-70.
12. D.M. García, S.K. Huang, W.F. Stansbury, *Characterization of the atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography mass spectrometry interface*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **7**, 1996, 59-65.
13. J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*, *Science*, **246**, 1989, 64-71.

14. E.M. Thurman, I. Ferrer, D. Barceló, *Choosing between atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides*, *Anal. Chem.*, **73**, 2001, 5441-5449.
15. K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Matrix Effect in Quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids: A Method for Determination of Finasteride in Human Plasma at Picogram Per Milliliter Concentrations*, *Anal. Chem.*, **70**, 1998, 882-889.
16. J.P. Antignac, K. de Wasch, F. Monteau, H. De Brabander, F. Andre, B. Le Bizec, *The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis*, *Anal. Chim. Acta*, **529**, 2005, 129-136.
17. D.B. Robb, T.R. Covey, A.P. Bruins, *Atmospheric pressure photoionization: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry*, *Anal. Chem.* **72**, 2000, 3653-3659.
18. W.M.A. Niessen, *Chromatographic Science Series: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, Ed. Marcel Dekker, vol. 79, 2nd Edition, Leiden Hyphen MassSpec Consultancy, 1999.
19. C. Dass, *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, Ed. Wiley & Sons, University of Memphis, 2007.
20. A.O. Olsson, S.E. Baker, J.V. Nguyen, L.C. Romanoff, S.O. Udunka, R.D. Walker, K.L. Flemmen, D.B. Barr, *A Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Multiresidue Method for Quantification of Specific Metabolites of Organophosphorus Pesticides, Synthetic Pyrethroids, Selected Herbicides, and DEET in Human Urine*, *Anal. Chem.*, **76**, 2004, 2453-2461.
21. B.J. Vanderford, S.A. Snyder, *Analysis of pharmaceuticals in water by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 2006, 7312-7320.
22. F. Hernández, J.V. Sancho, O.J. Pozo, *Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **382**, 2005, 934-946.
23. A. L. Batt, M. S. Kostich, J. M. Lazorchak, *Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC-MS/MS*, *Anal. Chem.*, **80**, 2008, 5021-5030.

24. B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, *The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry*, *Talanta*, **74**, 2008, 1299-1312.
25. J. Wang, D. Leung, *Determination of 142 Pesticides in Fruit- and Vegetable-Based Infant Foods by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry and Estimation of Measurement Uncertainty*, *J. AOAC Int.*, **92**, 2009, 279-301.
26. F.M. Lagerwerf, W.D. Van Dongen, R.J.J.M. Steenvooren, M. Honing, J.H.G. Jonkman, *Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative LC-MS-MS*, *Anal. Chem.*, **19**, 2000, 418-427.
27. J.V. Sancho, O.J. Pozo, F.J. López, F. Hernández, *Different quantitation approaches for xenobiotics in human urine samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 2002, 639-645.
28. M.J. Gómez, M. Petrovic, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló, *Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters*, *J. Chromatogr. A*, **1114**, 2006, 224-233.
29. F. Hernández, O.J. Pozo, J.V. Sancho, L. Bijlsma, M. Barreda, E. Pitarch, *Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities*, *J. Chromatogr. A*, **1109**, 2006, 242-252.
30. S. Ito, K. Tsukada, *Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins*, *J. Chromatogr. A*, **943**, 2002, 39-46.
31. C.R. Powley, S.W. George, T.W. Ryan, R.C. Buck, *Matrix effect-free analytical methods for determination of perfluorinated carboxylic acids in environmental matrixes*, *Anal. Chem.*, **77**, 2005, 6353-6358.
32. R.B. Geerdink, W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, *Trace-level determination of pesticides in water by means of liquid and gas chromatography*, *J. Chromatogr. A*, **970**, 2002, 65-93.

33. C. Zwiener, F.H. Frimmel, *LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment – a critical review. Part II: Applications for emerging contaminants and related pollutants, microorganisms and humic acids*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 2004, 862-874.
34. M. Petrovic, M.D. Hernando, M.S. Diaz-Cruz, D. Barceló, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review*, *J. Chromatogr. A*, **1067**, 2005, 1-14.
35. M. Gros, M. Petrovic, D. Barceló, *Multi-residue analytical methods using LC- tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 2006, 941-952.
36. R. Rosen, *Mass spectrometry for monitoring micropollutants in water*, *Current Opinion in Biotechnol.*, **18**, 2007, 246-251.
37. M. Kuster, M. López de Alda, D. Barceló, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated water*, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 2009, 520-529.
38. S.D. Richardson, *Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues*, *Anal. Chem.*, **81**, 2009, 4645-4677.
39. Y. Picó, C. Blasco, G. Font, *Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview*, *Mass Spectrom. Rev.*, **23**, 2004, 45-85.
40. L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, B. Vieth, *Residue Analysis of 500 high priority pesticides by GC-MS or LC-MS/MS?*, *Mass Spectrom. Rev.*, **25**, 2006, 838-865.
41. C. Soler, Y. Picó, *Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food*, *Trends in Anal. Chem.*, **26**, 2007, 103-115.
42. A.A.M. Stolker, U.A.Th. Brinkman, *Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - A review*, *J. Chromatogr. A*, **1067**, 2005, 15-53.
43. S. Sforza, C. Dall'Asta, R. Marchelli, *Recent advances in micotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry*, *Mass Spectrom. Rev.*, **25**, 2006, 54-76.

44. N.J. Clarke, D. Rindgen, W.A. Korfmacher, K.A. Cox, *Systematic LC/MS metabolite identification in drug discovery*, *Anal. Chem.*, **73**, 2001, 430A-439A.
45. R. Kostianen, T. Kotiaho, T. Kuuranne, S. Auriola, *Liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies*, *J. Mass Spectrom.*, **38**, 2003, 357-372.
46. A. Kamel, C. Prakash, *High performance liquid chromatography/atmospheric pressure ionization/tandem mass spectrometry (HPLC/API/MS/MS) in drug metabolism and toxicology*, *Curr. Drug Metab.*, **7**, 2006, 837-852.
47. M. Laloup, M.D.M. Ramírez-Fernández, M. Wood, V. Maes, G. De Boeck, Y. Vanbeckevoort, N. Samyn, *Detection of diazepam in urine, hair and preserved oral fluid samples with LC-MS-MS after single and repeated administration of Myolastan® and Valium®*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 2007, 1545-1556.
48. H.H. Maurer, *Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 2007, 1315-1325.
49. M. Thevis, W. Schänzer, *Current role of LC-MS(/MS) in doping control*, **388**, 2007, 1351-1358.
50. O. Nuñez, E. Moyano, M.T. Galcerán, *LC-MS/MS analysis of organic toxics in food*, *Trens Anal. Chem.*, **24**, 2005, 687-703.
51. A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products*, *Trens Anal. Chem.*, **24**, 2005, 622-634.
52. G.J. Murray, J.P. Danaceau, *Simultaneous extraction and screening of diuretics, beta-blockers, selected stimulants and steroids in human urine by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS*, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.*, **877**, 2009, 3867-3864.
53. L.D. Bowers, *The analytical chemistry of drug monitoring in athletes*, *Annual Rev. Anal. Chem.*, **2**, 2009, 485-507.
54. M. Sharon, C.V. Robinson, *The role of mass spectrometry in structure elucidation of dynamic protein complexes*, *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 2007, 167-193.
55. J.R. Yates III, *Mass spectrometry and the age of the proteome*, *J. Mass Spectrom.*, **33**, 1998, 1-19.

CAPÍTULO 2

DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS Y PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN EN AGUAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM (LC-MS/MS)

2.1 Introducción general

2.2 Cuantificación y confirmación de plaguicidas y productos de transformación en aguas medioambientales mediante extracción en fase sólida en línea con LC-ESI-MS/MS

2.2.1. Introducción

2.2.2 Artículo científico 1

Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry
J. Chromatogr. A, 1133 (2006) 204-214

2.2.3 Discusión de los resultados del artículo científico 1

2.3 Estudio de la presencia de residuos de plaguicidas y productos de transformación en aguas de la Comunidad Valenciana

2.3.1. Introducción

2.3.2 Artículo científico 2

Pesticide residues and transformation products in groundwater from a Spanish agricultural region on the Mediterranean Coast
Int. J. Environ. Anal. Chem, 88 (2008) 409-424

2.3.3 Discusión de los resultados del artículo científico 2

2.4 Determinación de contaminantes orgánicos prioritarios en aguas procedentes de una planta de residuos sólidos urbanos mediante extracción en fase sólida en línea con LC-ESI-MS/MS

2.4.1. Introducción

2.4.2 Artículo científico 3

Quantification and confirmation of priority organic micropollutants in water by LC-tandem mass spectrometry
Int. J. Environ. Anal. Chem, 87 (2007) 237-248

2.4.3 Discusión de los resultados del artículo científico 3

2.5 Determinación multiresidual de plaguicidas de diversa naturaleza en aguas residuales y medioambientales mediante la aplicación de UHPLC-MS/MS. Estudio y corrección del efecto matriz en el proceso de cuantificación

2.5.1. Introducción

2.5.2 Artículo científico 4

Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples. Study of matrix effects
J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 1410-1420

2.5.3 Discusión de los resultados del artículo científico 4

2.6 Bibliografía

2.1 Introducción general

La importancia del agua en el ciclo de la vida de cualquier especie de nuestro planeta, tanto animal como vegetal, hace que la presencia, puntual o continuada, de cualquier tipo de contaminante, sea objeto de numerosos estudios, tanto a nivel público como privado, con el fin de conocer, controlar y evitar en la medida de lo posible las fuentes de polución.

Los plaguicidas, desde que se hiciera extensivo su uso tras la segunda guerra mundial, sobretudo en los países occidentales, son considerados como uno de los principales contaminantes de las aguas^{1,2}. Sus efectos tóxicos, o incluso cancerígenos, han sido ampliamente estudiados³⁻⁸. Para evaluar su presencia y distribución, así como sus efectos, deben considerarse tanto sus aplicaciones actuales como las realizadas en el pasado, dada la elevada persistencia asociada a algunos de estos compuestos^{9,10}. El número total de materias activas utilizadas ha permanecido prácticamente constante a lo largo de las últimas dos décadas, en las que se han ido introduciendo sustancias cada vez más eficaces a dosis menores. A pesar de ello, la cantidad de plaguicidas usados sigue siendo muy elevada. Así, la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los EEUU (EPA) cifró en más de 2 billones de Kg por año¹¹ el total de plaguicidas usados en el mundo. Además, es muy importante considerar las múltiples vías de entrada de los plaguicidas en las aguas, como consecuencia de sus numerosos campos de aplicación, tanto en prácticas agrícolas como no agrícolas (campos de golf, parques, jardines, salud pública, control de vegetación en carreteras, industrias,...)¹². Con estas dos premisas, aplicación masiva y diversidad de

fuentes de emisión, resulta necesario el estudio de la presencia y evolución de estos compuestos en el medio ambiente, y más concretamente en las aguas¹³.

La contaminación de las aguas por plaguicidas depende de una gran variedad de factores entre los que destacan la geología y biota del lugar, los métodos de aplicación, la climatología y las propiedades físico-químicas particulares de cada plaguicida. Además, pese a que muchos plaguicidas sufren procesos de degradación y transformación, total o parcial, dando lugar a compuestos inocuos para el medio ambiente (agua, dióxido de carbono,...), existen productos de transformación (TPs) que pueden ser, incluso, más móviles, persistentes y peligrosos que sus precursores, por lo que deben ser también considerados en los programas de control¹⁴⁻¹⁶.

El comportamiento de los plaguicidas en el medio ambiente, desde que se aplican hasta que alcanzan las aguas, es altamente complejo y desigual, pudiendo provocar diferentes tipos de contaminaciones, desde inmediatas y puntuales hasta persistentes y tardías. En el estudio del comportamiento de estos productos se deben considerar muchos factores relacionados entre sí, como la posible adsorción en el particulado del suelo o de los vegetales tras su aplicación, los distintos mecanismos de transferencia (volatilización, escorrentía, lixiviado,...) o los diferentes tipos de degradación que pueden sufrir (microbiana, química,...)¹⁷.

En los procesos de adsorción se debe tener en cuenta las características de los plaguicidas, las propiedades de los suelos que interactúan con ellos y los factores medio ambientales (temperatura, pluviometría, cubierta vegetal). Los plaguicidas que suelen tener mayor tendencia a quedar retenidos son los que tienen pesos moleculares elevados, los compuestos apolares tipo organoclorados, o los que presentan en su estructura grupos químicos afines por la superficie del suelo. Los suelos más ricos en coloides, normalmente arcillosos o con altos contenidos de materia orgánica, adsorben más fuertemente los plaguicidas, ya que la fracción coloidal de los suelos es la más activa en los procesos de adsorción. Sobre estas interacciones influye la humedad, temperatura, pH y contenidos de minerales y materia orgánica del suelo.

Además, los suelos con altos contenidos en agua adsorben peor, ya que las moléculas de agua compiten con los plaguicidas por las zonas de adsorción.

Muchos plaguicidas, sobretodo los herbicidas, para ser efectivos deben tener cierta movilidad para alcanzar el foco contra el que van destinados, p.e. las raíces de las malas hierbas. Sin embargo, puede que, además de cumplir con el objetivo de su aplicación, lleguen a contaminar a otras especies, animales o vegetales, así como las aguas, tanto superficiales como subterráneas. El transporte ambiental de los plaguicidas puede producirse mediante escorrentía, afectando principalmente a las aguas superficiales¹⁸⁻²⁰, por lixiviación a través del suelo hasta llegar a los acuíferos contaminando las aguas subterráneas²¹⁻²³, y por volatilización, pudiéndose alcanzar por acción del viento o de las lluvias, zonas muy distantes del foco de la aplicación^{24,26}.

En el campo, a consecuencia de los cambios de pendiente, existen aguas de escorrentía normalmente producidas por episodios de lluvia y riego. Estas aguas pueden llevar consigo plaguicidas, tanto solubilizados en ellas como unidos al particulado del suelo arrastrado por la erosión. Dependiendo de las características de los plaguicidas, la presencia de vegetación tiende a disminuir la contaminación, tanto de las aguas como de los suelos, pudiendo ser absorbidos por las plantas, por sus raíces o por el suelo que las rodea²⁷.

Los plaguicidas también pueden lixiviar, es decir, pueden moverse a través del suelo hacia el acuífero. Este fenómeno depende tanto de las características de los plaguicidas como de las propiedades del suelo. Así, cuanto menor sea la adsorción en el suelo y cuanto mayor sea su solubilidad en agua y más lenta su degradación, más facilidades tendrá un plaguicida para lixiviar. Dicho proceso también se favorece cuando mayor es la permeabilidad de los suelos, mayor la presencia y tamaño de poros y menor el contenido en materia orgánica. Otros parámetros que pueden contribuir al lixiviado son el pH, la humedad y la temperatura. Existen diversos indicadores, basados en aproximaciones empíricas, que clasifican a los plaguicidas según su grado de lixiviación. El más conocido es el índice GUS (Ground Water Ubiquity Score), basado en la aplicación de una función matemática en la que se tiene en

cuenta el coeficiente de adsorción de carbono orgánico (K_{oc}) del plaguicida (referido a su tendencia a ser adsorbido por la materia orgánica y la arcilla presentes en el suelo o sedimento) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) (tiempo requerido para que la mitad del plaguicida, tras la aplicación, se descomponga en productos de degradación)²⁸. Así, se consideran lixiviables aquellos cuyo GUS es mayor a 2.8, no lixiviables con GUS menor de 1.8 y de lixiviación intermedia los comprendidos entre estos dos valores.

Otra posible vía de transporte de los plaguicidas es por volatilización, la cual viene determinada por la tendencia del plaguicida a pasar a fase gas. Tras volatilizarse, el plaguicida puede ser arrastrado por el viento y/o transportado a la atmósfera para ser depositado con posterioridad, incluso en zonas muy lejanas a las de su aplicación. La tendencia de un plaguicida a volatilizarse se mide a partir de la constante de Henry (H), la cual depende de la presión de vapor en estado líquido (p_v) y de la solubilidad en agua (s). Cuanto mayor sea p_v y menor s, la volatilidad del compuesto aumentará. La volatilidad del compuesto se incrementa con temperaturas elevadas (al aumentar la p_v), con valores de humedad bajos y con el viento²⁹.

Todo plaguicida, durante un periodo limitado de tiempo desde su emisión hasta su degradación, mantiene sus propiedades físicas, químicas y funcionales en el medio en el que se transporta o distribuye. A este periodo se le conoce como persistencia, pudiéndose encontrar desde productos que se degradan en las horas siguientes a su aplicación (poco persistentes) hasta los que se mantienen durante décadas sin descomponerse ni degradarse (muy persistentes). Pese a que el uso de estos últimos se ha ido eliminando en los países desarrollados, todavía algunos son empleados en algunos países para combatir plagas a consecuencia de su gran efectividad³⁰. Este es el caso del insecticida DDT, de conocida persistencia y toxicidad, el cual se sigue empleando para combatir la malaria transmitida por ciertas especies de mosquito³¹.

Todos los fenómenos descritos con anterioridad están supeditados al grado de degradación que sufre cada plaguicida en las condiciones en las que se utiliza. Las reacciones de degradación son muy variadas (oxidaciones, reducciones, hidrólisis,

sustituciones, eliminación de grupos funcionales, etc....) pudiendo estar producidas tanto por agentes orgánicos como inorgánicos. Los principales tipos de degradación que suelen afectar a los plaguicidas son la degradación microbiana³², la química³³ y la fotodegradación³⁴. En la primera, los plaguicidas se descomponen por la acción de ciertos hongos, bacterias u otros microorganismos que los utilizan como nutrientes. La segunda engloba todos aquellos procesos de degradación en los que no intervienen organismos vivos (temperatura, pH, humedad,...) cuya acción está supeditada a las propiedades físico-químicas de cada plaguicida. Por último, la fotodegradación se produce por acción de la luz, normalmente solar, pudiendo descomponer o transformar a los plaguicidas presentes en la superficie de los vegetales, suelos, aguas e incluso en el aire.

La mayoría de los procesos físico-químicos descritos se han intentado reproducir a pequeña escala en ambientes controlados de laboratorio. Pese a que estos estudios contribuyen a entender mejor el comportamiento de estos compuestos en el medio ambiente, sólo deberían ser considerados como aproximaciones más o menos certeras, ya que existen multitud de factores impredecibles e incontrolables que suceden en los escenarios reales que difícilmente pueden ser reproducidos en el laboratorio³⁵.

La contaminación de las aguas, tanto subterráneas como superficiales, por plaguicidas en zonas con intensa actividad agrícola es un hecho de sobra conocido y descrito en la literatura científica. Con el objetivo de minimizar el contacto de la población con aguas contaminadas por estos compuestos, además de los sistemas físico-químicos empleados en las plantas de depuración, se han decretado normativas legales que regulan los niveles máximos permitidos para aguas de consumo. Así, la Unión Europea, en su Directiva Marco 98/83/EC³⁶, estableció el límite máximo permitido en aguas potables por plaguicida individual en 0.1 µg/L, siendo de 0.5 µg/L para la suma de todos los plaguicidas. Además de los plaguicidas, estos niveles también aplican a los compuestos referidos en la Directiva como "productos relacionados" entre los que pese a no especificarse, se incluyen los TPs más o menos tóxicos. En EEUU,

la EPA, con un criterio menos restrictivo, establece un nivel distinto para cada plaguicida según su riesgo toxicológico³⁷. De esta forma, para la determinación de muchos compuestos, los menos peligrosos, no sería necesaria la utilización de métodos analíticos sofisticados y altamente sensibles, normalmente basados en detectores avanzados de espectrometría de masas.

En los últimos años, la implantación de programas de control de las aguas para conocer el grado de contaminación por plaguicidas y TPs, se está haciendo extensivo sobretodo en países pertenecientes a la UE^{23,38-49} y en EEUU^{22,50-58}, así como en otros países⁵⁹⁻⁶¹. En estos estudios se precisan, como consecuencia de los niveles tan bajos y estrictos establecidos en la legislación y la gran variedad de plaguicidas utilizados, métodos analíticos multiresiduales altamente sensibles y selectivos. Además, estos métodos también deben ser fiables desde el punto de vista de la identificación, es decir, los positivos reportados deben ser confirmados de manera inequívoca. Actualmente, las técnicas que llevan a cabo este tipo de análisis, cumpliendo los requisitos de multiresidualidad, sensibilidad, selectividad y confirmación, son la GC y la LC acopladas a espectrometría de masas.

Hasta hace aproximadamente una década, el análisis de residuos de plaguicidas en aguas fue predominantemente llevado a cabo con métodos basados en GC. Esta técnica de separación, altamente versátil, permite abordar de manera óptima la determinación de compuestos volátiles, no termolábiles y generalmente apolares. Los primeros métodos desarrollados hacían uso de diversos detectores de capacidad identificativa limitada, tales como los de captura electrónica (ECD)⁶², fotométricos de llama (FPD)⁶³ y nitrógeno-fósforo (NPD)⁶⁴, hasta que se generalizó el uso de los detectores de espectrometría de masas (MS)⁶⁵⁻⁶⁷, con los que se obtiene información estructural de los analitos detectados mediante la cual se posibilita su identificación. A consecuencia de la incompatibilidad de las muestras acuosas para ser introducidas de manera directa en los sistemas basados en GC y la necesidad de preconcentrar los analitos para poder alcanzar buenos LODs, se hacen necesarias diversas etapas de tratamiento de muestra (ELL⁶⁸, SPE⁶⁹) en las que, además del

cambio de disolvente, se reduce el volumen de la muestra a unos pocos μL , que pueden ser inyectados directamente. Con el fin de reducir el tratamiento de muestra para evitar errores en los análisis y disminuir el consumo de disolventes, se están popularizando técnicas como la SPME⁷⁰ y la inyección de grandes volúmenes⁷¹ pero, sobre todo, con el acoplamiento de espectrómetros de masas en tándem (GC-MS/MS)⁷² se han podido alcanzar dichos objetivos mejorando la sensibilidad y selectividad necesarias en estos análisis con menor manipulación de la muestra.

Pese a los avances realizados en la técnica de GC⁷³, la LC ha ido recortando distancias, tanto en usos como en posibles aplicaciones, llegando a ser considerada actualmente como la técnica de separación de referencia en el análisis de residuos de plaguicidas⁷⁴. Este hecho viene propiciado principalmente por la tendencia iniciada a mediados de los 70 en la que se impone el uso de plaguicidas de menor toxicidad y persistencia, cuyas propiedades físico-químicas hacen que su determinación directa sea más accesible mediante LC, al tratarse de compuestos de baja estabilidad térmica (fácilmente degradables), y en muchos casos de baja volatilidad, polares y/o termolábiles. Estas propiedades son compartidas por muchos de sus TPs, cuya inclusión en programas de control también se está generalizando, resultando su determinación directa por GC mucho más compleja, ya que requieren habitualmente etapas de derivatización. Además, la LC cuenta con la ventaja de poder inyectar en el sistema directamente las muestras acuosas, evitándose etapas de tratamiento de muestra (cambio de disolvente) que conllevan errores en la determinación de los analitos. Pese a ello, la LC permaneció durante muchos años en un segundo plano respecto a la GC en este tipo de determinaciones analíticas ya que los detectores empleados, principalmente DAD UV⁷⁵ y FD⁷⁶, carecían de la sensibilidad y selectividad suficientes en comparación con los detectores de MS implementados comúnmente en los cromatógrafos de gases. Tras el desarrollo de las interfases a presión atmosférica (ESI, APCI) se facilitó el acoplamiento de detectores de MS a LC⁷⁷, complementando las ventajas de la separación por LC en fase inversa de plaguicidas de polaridades medio-altas con la elevada sensibilidad y selectividad intrínsecas a los detectores de MS⁷⁸. De este modo, a finales de la década de los 90 y principios de

ésta, se empezaron a desarrollar numerosos métodos basados en el uso de LC-MS, inicialmente con analizadores de simple cuadrupolo, para la determinación de residuos de contaminantes orgánicos polares y plaguicidas^{79,80}. En la actualidad, se ha impuesto con claridad el uso de analizadores de espectrometría de masas en tándem, como los de triple cuadrupolo (QqQ), que mejoran tanto la sensibilidad (disminución del ruido de fondo) como el aspecto confirmatorio (adquisición de varias transiciones por compuesto), derivados del uso de LC-MS/MS⁸¹⁻⁸⁹. Pese a que la elevada sensibilidad aportada por estos detectores permite alcanzar, en ocasiones, la situación ideal en la que la muestra de agua se inyecta y analiza directamente sin ningún tratamiento de muestra previo⁹⁰⁻⁹¹, en análisis multiresiduales, debido al diferente comportamiento de los analitos a la hora de ionizarse, fragmentarse o, en definitiva, verse afectados por todos los factores que engloba su determinación instrumental, es común el empleo de técnicas de preconcentración off-line^{40,88,92} u on-line⁹³⁻⁹⁶, con el fin de poder determinar todos los compuestos por debajo de 0.1 µg/L.

Pese a que la LC acoplada a detectores de MS ha dado excelentes resultados en la determinación de numerosos plaguicidas polares, medio-polares e incluso de cierta apolaridad, todavía existen compuestos como son la mayoría de plaguicidas organoclorados y piretroides, para los que la GC sigue siendo la técnica más idónea y por ello, la más empleada⁹⁷. Por tanto, se trata de dos técnicas complementarias con las que se puede abordar con éxito la determinación de todos los plaguicidas usados actualmente.

A día de hoy, con los resultados obtenidos en los numerosos programas de control de las aguas medioambientales, sería interesante establecer una gran base de datos que ofreciera una visión real y actual del estado de las aguas para poder tomar las medidas necesarias con tal de regenerar aquellas zonas contaminadas y/o evitar la polución de las otras. A pesar de ello, sería aventurado llegar a conclusiones definitivas en materia de contaminación de aguas por plaguicidas. Este hecho se debe, principalmente, a que no existe la seguridad de que los plaguicidas mayoritariamente detectados sean realmente los más abundantes, o si tan solo son los más investigados.

De entre las cerca de 1000 sustancias activas empleadas en el mundo, cabe la posibilidad de que existan plaguicidas o TPs potencialmente contaminantes, con mayor o menor grado de toxicidad, cuya presencia en aguas sea prácticamente desconocida, simplemente porque no se dispone de datos al no estar incluidos en los métodos multiresiduales de control. Este hecho se debe principalmente a las dificultades analíticas que conlleva el aumento de la multiresidualidad de los métodos, debido a la gran variedad de propiedades físico-químicas de estos compuestos, además de las particularidades de algunos analitos para los que la obtención de LOQs adecuados, acordes con la legislación vigente, puede requerir de una metodología o instrumentación más específica.

En este capítulo, se presenta nuestra contribución a la determinación de plaguicidas y TPs en distintos tipos de muestras de agua (superficiales, subterráneas y procedentes de lixiviados de una planta de residuos sólidos urbanos, antes y después de ser depuradas), mediante el desarrollo de metodología analítica basada en LC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo. Se ha prestado especial atención a los plaguicidas de mayor uso en la Comunidad Valenciana, así como a los productos de transformación más relevantes. Se presentan, así mismo, datos sobre los niveles de plaguicidas en aguas superficiales y subterráneas de diversas zonas citrícolas de la Comunidad Valenciana, así como su evolución a lo largo del tiempo.

2.2 Cuantificación y confirmación de plaguicidas y productos de transformación en aguas medioambientales mediante extracción en fase sólida en línea con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem

2.2.1. Introducción

En el presente trabajo se muestra el desarrollo, validación y aplicación de dos métodos analíticos complementarios basados en el acoplamiento de SPE "on-line" con LC-MS/MS para la determinación de herbicidas y TPs, tanto para aguas superficiales como subterráneas.

Uno de los puntos fuertes y diferenciales de este trabajo lo establece la inclusión de un elevado número de TPs entre los analitos seleccionados, ya que la mayoría de los métodos multiresiduales existentes se centran tan solo en los plaguicidas, sin considerar sus TPs, pese a que éstos pueden ser incluso más peligrosos en cuanto a movilidad y toxicidad que sus propios precursores, pudiendo contaminar tanto los acuíferos como las aguas superficiales con mayor facilidad¹⁰⁰⁻¹⁰². Como ya se apuntó en la introducción general (Capítulo 1), el principal motivo de la no inclusión de TPs en métodos multiresiduales suele ser la elevada dificultad analítica asociada a sus altas polaridades, en comparación con sus plaguicidas precursores, dificultando la aplicación de etapas de preconcentración y cromatografía convencionales. Además, el desconocimiento de muchos de estos TPs, así como la falta de disponibilidad comercial de patrones también contribuyen a la carencia de metodología analítica desarrollada hasta el momento.

Otro de los aspectos importantes del presente estudio radica en el hecho de que mediante un único análisis se obtienen datos fiables en cuanto a la cuantificación e identificación de los analitos. Para ello, se siguió el criterio de identificación establecido para espectrómetros de masas de baja resolución por la Unión Europea en la Directiva 2002/657/EC⁹⁸. Siguiendo este criterio, que requiere de un mínimo de tres puntos de identificación (IPs) por compuesto para poder asegurar su presencia en una muestra, se adquieren dos transiciones específicas por analito, comprobando que se cumpla la relación de intensidad ("ion ratios") entre ellas. De este modo, se alcanzan 4 IPs en los casos de tener el mismo ion precursor y 5 IPs cuando los iones precursores son distintos (compuestos que presentan patrón de distribución isotópica). El hecho de adquirir transiciones adicionales en análisis multiresiduales requiere,

normalmente, en analizadores de triple cuadrupolo (QqQ) convencionales (caso del Quattro LC empleado en este trabajo) disminuir el tiempo de adquisición por transición ("dwell time") para poder conservar un número adecuado de puntos por pico cromatográfico. Esta reducción de los "dwell times" conlleva pérdidas de sensibilidad, por lo que para obtener LODs y LOQs acordes con los niveles tan restrictivos impuestos en la legislación europea³⁶, el número de compuestos a determinar en el análisis queda limitado. Así, como el objetivo del trabajo era confirmar todos los analitos al nivel de 0.025 µg/L (LOQ), se decidió dividir los compuestos en función de su polaridad para poder optimizar más eficazmente su determinación.

Basándonos en la experiencia de nuestro grupo de investigación en trabajos publicados con anterioridad^{96,99}, así como en la de otros grupos de investigación¹⁰³⁻¹⁰⁵, el estudio se focalizó mayoritariamente en la determinación de herbicidas (en su mayoría, triazinas) y sus TPs, ya que éstos son los plaguicidas con más tendencia a contaminar las aguas, tanto superficiales como subterráneas, debido a propiedades físico-químicas como la elevada polaridad y solubilidad en agua, además de ser aplicados directamente sobre el suelo. Finalmente, en la elección definitiva de los analitos se consideró, además de los positivos encontrados en estudios anteriores en la zona, las materias activas que estaban, en ese momento, siendo más aplicadas en el campo.

A continuación se presenta el **artículo científico 1**

2.2.2 Artículo científico 1

“Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry”

José M. Marín, Juan V. Sancho, Óscar J. Pozo, Francisco J. López y Félix Hernández.

Journal of Chromatography A, 1133 (2006) 204–214.



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Chromatography A, 1133 (2006) 204–214

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

José M. Marín, Juan V. Sancho, Oscar J. Pozo, Francisco J. López, Félix Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n, E-12071 Castellón, Spain

Received 6 March 2006; received in revised form 1 August 2006; accepted 10 August 2006

Available online 12 September 2006

Abstract

Two on-line SPE-LC-ESI-MS/MS methods have been developed for the rapid determination and confirmation of 18 polar pesticides and nine transformation products (TPs) in water samples. Given the very different physico-chemical characteristics of the analytes, it was not feasible the simultaneous determination of all selected compounds in only one method. Thus, it was necessary to use heptfluorobutyric acid and formic acid in order to obtain good retention in the SPE cartridge for basic and acidic analytes, respectively. The developed analytical methodology based on the direct injection of 2 mL of water sample in the system allowed the quantification of all analytes at the 25 ng/L level (LOQ) with limits of detection normally lower than 5 ng/L. Satisfactory recoveries (70–110%) were obtained for most compounds in ground and surface water samples. Some exceptions were found mainly in surface water, due to the ion suppression produced by the higher amount of matrix interferences in these samples. The acquisition of two MS/MS transitions for each compound allowed the reliable confirmation of positive findings even at the LOQ level. The developed methodology was applied to real ground and surface water samples showing the interest of including TPs in monitoring methods, as several of them were found at concentrations higher than that of parent compounds.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Pesticides; Water analysis; LC-MS/MS; Transformation products; Confirmation; Solid phase extraction

1. Introduction

Monitoring of pesticides in water, both in groundwater and surface water, has become a major issue nowadays. This requires the application of sensitive and multiclass analytical methods due to the high number of pesticides used, with quite different physico-chemical characteristics, and to the strict environmental and legal requirements for quality of water [1].

Traditionally, GC-MS or LC with UV or fluorescence detection have been used for the determination of organic pollutants in water, although LC-MS has been gradually implemented for this purpose in the last decade [2–5]. The use of tandem mass spectrometry (MS/MS) increases the sensitivity and specificity of the methods, and for this reason, the number of applications

using LC-MS/MS has drastically increased in the last years [6–16].

In the field of pesticides, the majority of methods applied until now are focused mainly on the determination of unchanged (parent) compounds; however, when monitoring environmental waters, the occurrence of pesticide transformation products (TPs) can be often higher than of unchanged pesticides [17–19]. Although not frequently, TPs can be even more toxic than the parent compound [20], and in fact TPs are also included within the legislation on public drinking water [1]. Additionally, due to their mobility in the soil-water environment, TPs can reach groundwater more easily than parent compounds. Therefore, the most relevant TPs should have to be gradually incorporated to the analytical methods in order to have a wider knowledge of the water quality regarding pesticide contamination.

The inclusion of TPs in multiresidue methods is an analytical challenge for several reasons: many of these compounds

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; fax: +34 964 387368.
E-mail address: bernandf@exp.uji.es (F. Hernández).

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

J. Chromatogr. A 2006; **41**: 1041–1048

Received: 6 March 2006; Accepted: 10 August 2006; Published online 12 September 2006 in ScienceDirect
(www.sciencedirect.com) DOI: 10.1016/j.chroma.2006.08.055

Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry

José M. Marín, , Juan V. Sancho, Óscar J. Pozo, Francisco J. López, Félix Hernández

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n E-12071 Castellón, Spain

ABSTRACT

Two on-line SPE–LC–ESI–MS/MS methods have been developed for the rapid determination and confirmation of 18 polar pesticides and nine transformation products (TPs) in water samples. Given the very different physico-chemical characteristics of the analytes, it was not feasible the simultaneous determination of all selected compounds in only one method. Thus, it was necessary to use heptafluorobutyric acid and formic acid in order to obtain good retention in the SPE cartridge for basic and acidic analytes, respectively. The developed analytical methodology based on the direct injection of 2 mL of water sample in the system allowed the quantification of all analytes at the 25 ng/L level (LOQ) with limits of detection normally lower than 5 ng/L. Satisfactory recoveries (70–110%) were obtained for most compounds in ground and surface water samples. Some exceptions were found mainly in surface water, due to the ion suppression produced by the higher amount of matrix interferences in these samples. The acquisition of two MS/MS transitions for each compound allowed the reliable confirmation of positive findings even at the LOQ level. The developed methodology was applied to real ground and surface water samples showing the interest of including TPs in monitoring methods, as several of them were found at concentrations higher than that of parent compounds.

KEYWORDS

Pesticides; Water analysis; LC–MS/MS; Transformation products; Confirmation; Solid phase extraction

*Correspondence to Félix Hernández, Jaume I. E-mail: hernandf@exp.uji.es

1. INTRODUCTION

Monitoring of pesticides in water, both in groundwater and surface water, has become a major issue nowadays. This requires the application of sensitive and multiclass analytical methods due to the high number of pesticides used, with quite different physico-chemical characteristics, and to the strict environmental and legal requirements for quality of water. Traditionally, GC-MS or LC with UV or fluorescence detection have been used for the determination of organic pollutants in water, although LC-MS has been gradually implemented for this purpose in the last decade [2-5]. The use of tandem mass spectrometry (MS/MS) increases the sensitivity and specificity of the methods, and for this reason, the number of applications using LC-MS/MS has drastically increased in the last years [6-16].

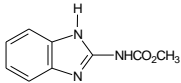
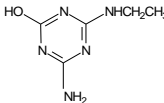
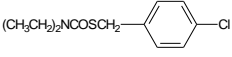
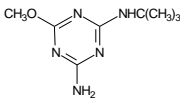
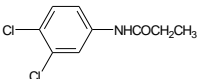
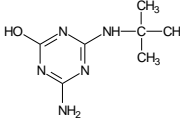
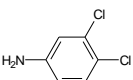
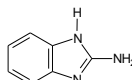
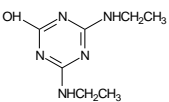
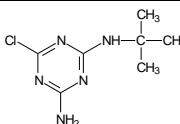
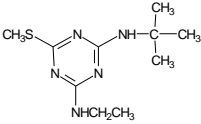
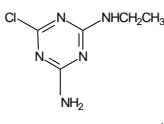
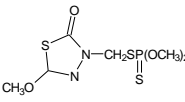
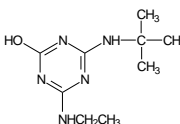
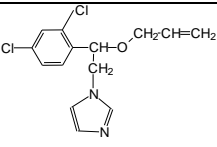
In the field of pesticides, the majority of methods applied until now are focused mainly on the determination of unchanged (parent) compounds; however, when monitoring environmental waters, the occurrence of pesticide transformation products (TPs) can be often higher than of unchanged pesticides [17-19]. Although not frequently, TPs can be even more toxic than the parent compound [20], and in fact TPs are also included within the legislation on public drinking water [1]. Additionally, due to their mobility in the soil-water environment, TPs can reach groundwater more easily than parent compounds. Therefore, the most relevant TPs should have to be gradually incorporated to the analytical methods in order to have a wider knowledge of the water quality regarding pesticide contamination.

The inclusion of TPs in multiresidue methods is an analytical challenge for several reasons: many of these compounds are still not well known; the number of potential analytes to be investigated in water would increase drastically; they are usually more polar than the parent compounds and their extraction (isolation from the water matrix)/preconcentration is more difficult; the commercial availability of reference standards is rather limited. Additionally, adding more compounds in triple-quadrupole based methods would lead to an increase in the number of the monitored transitions which would produce either a decrease in sensitivity or lower peak definition. Moreover, a wide variability in the physico-chemical properties would complicate the optimisation of experimental conditions for the simultaneous determination of all analytes. In fact, one of the main problems in the development of quantitative methods for TPs is their higher polarity in relation to the parent compound, which makes troublesome the preconcentration step by the usual SPE or LLE approaches [21].

Although the use of LC–MS/MS for residue determination notably increases the selectivity of the method, it may be overestimated. In some occasions, the complexity of the sample can exceed the selectivity of MS detection resulting in false positive findings [2]. In order to reduce this risk, a recent European decision on confirmation of residues in food of animal origin proposes the confirmation of positive findings by earning at least three identification points (IPs) [22]. Regarding MS/MS determination with low resolution instruments, a minimum of two transitions should be monitored for a safe positive finding, together with the measurement of the ion ratio between both recorded transitions. This approach has been satisfactorily applied in the determination of pesticides in environmental waters [21,23]. However, a notable number of published LC–MS/MS methods are based on the acquisition of only one SRM transition (MS/MS), or even one ion (MS), for each target compound. For this reason some positive findings previously reported in the literature could be considered questionable [2], unless an additional confirmation is performed.

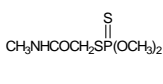
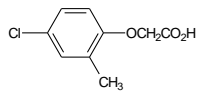
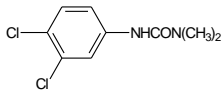
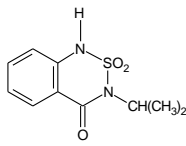
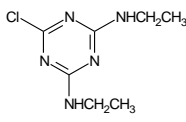
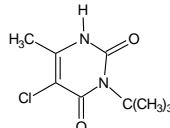
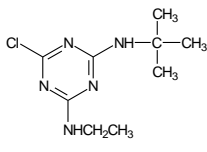
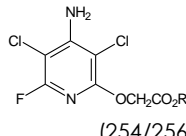
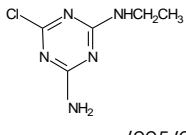
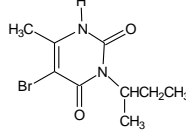
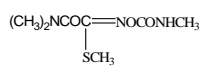
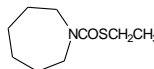
In a previous paper [12], we developed a LC–MS/MS method for the rapid determination of 47 pesticides and TPs. Only one transition was included for each compound in that method, and therefore, a second injection had to be performed in order to confirm positive samples. After applying the method to around 140 water samples, herbicides, concretely triazines, were the most frequently detected compounds, meanwhile less polar analytes were almost undetected. The method applied only included one TP from triazines (desisopropylatrazine, DIA).

The goal of this paper is to develop rapid and sensitive analytical methodology for the determination (quantification and confirmation) of 18 selected pesticides commonly used in the Mediterranean coast of Spain, and also for several TPs, the majority from triazine herbicides, which structures are shown in Fig. 1. Several of the less-polar analytes, seldomly detected in previous monitorings, have been removed from the list of target analytes of our previous method [12], and thus emphasis is made in only polar compounds. In order to obtain a confirmatory method, two transitions are acquired to simultaneously detect, quantify and confirm positive samples.

Compound (Abbreviation)	Chemical Structure (MW) ^a	Compound (Abbreviation)	Chemical Structure (MW) ^a
Carbendazim^b	 (191)	Desisopropyl-2-hydroxy-atrazine (2-OH-DIA) <i>triazine TP</i>	 (155)
Thiobencarb^b	 (257/259)	Desethylterbumeton <i>triazine TP</i>	 (197)
Propanil^b	 (217/219/221)	Desethyl-2-hydroxy-terbutylazine (Desethyl-2-OH-tbza) <i>triazine TP</i>	 (183)
3,4-Dichloroaniline^b <i>diuron TP</i>	 (161/163/165)	2-Amino benzimidazole (2-ABZ) <i>carbendazim TP</i>	 (133)
2-Hydroxy-simazine^b (2-OH-simazine) <i>triazine TP</i>	 (183)	Desethylterbutylazine (Desethyltbza) <i>triazine TP</i>	 (201/203)
Terbutryn^b	 (241)	Desisopropylatrazine (DIA) <i>triazine TP</i>	 (173/175)
Methidathion^b	 (302)	2-hydroxy-terbutylazine^b (2-OH-tbza) <i>triazine TP</i>	 (211)
Imazalil^b	 (296/298/300)		

1

Method 1.

Compound (Abbreviation)	Chemical Structure (MW) ^a	Compound	Chemical Structure (MW) ^a
Dimethoate ^b	 (229)	MCPA	 (200/202)
Diuron ^b	 (232/234/236)	Bentazone	 (240)
Simazine ^b	 (201/203)	Terbacil	 (216/218)
Terbutylazine ^b (Tbza)	 (229/231)	Fluroxypir	 (254/256/258)
Terbumeton ^b	 (225/227)	Bromacil	 (260/262)
Oxamyl ^b	 (219)	Molinate ^b	 (187)

Method 2

Fig. 1. Chemical structures of compounds analyzed by methods 1 and 2. Method 1: ^aMW, monoisotopic molecular weigh; ^bpresent as neutral compound at the working conditions. Italic letter shows the pesticide transformation products selected. Method 2: ^aMW, monoisotopic molecular weigh; ^bpresent as neutral compound at the working conditions.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents and chemicals

Pesticides and TPs reference standards, shown in Fig. 1, were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), Riedel de Haën (Seelze, Germany) and Sigma (St. Louis, MO, USA). HPLC-grade acetonitrile and methanol were purchased from ScharLab (Barcelona, Spain). LC-grade water was obtained by purification of demineralised water in a Nanopure II system (Barnstead Newton, MA, USA). Formic acid (HCOOH, content >98%), heptafluorobutyric acid (HFBA) and tridecafluoroheptanoic acid (TDFHA) were supplied by Fluka (Buchs, Switzerland).

Stock standard solutions of pesticides were prepared dissolving 50 mg, accurately weighted, in 100 mL of HPLC-grade acetonitrile obtaining a final concentration of 500 mg/L. For LC-MS analysis, the stock solutions were mixed and diluted with acetonitrile until 5 mg/L and subsequently with HPLC-grade water to obtain working solutions of pesticides mixtures.

2.2. Liquid chromatography

A triple quadrupole mass spectrometer was interfaced to a HPLC system based on a 233XL autosampler with a loop of 2.2 mL (Gilson, Villiers-le-Bel, France) and two pumps: an Agilent 1100 (Agilent, Waldbron, Germany) binary pump used to condition and wash the SPE cartridge (P-1) and a Waters Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, USA) quaternary pump used for the chromatographic separation (P-2). The experimental setup can be found elsewhere . The SPE preconcentration was performed with a polymeric phase Hamilton PRP-1 using a small cartridge, 10 mm × 2 mm, 10 µm (Teknokroma, Barcelona, Spain) as C-1. For the LC separation, a 80 mm × 2mm column packed with Kromasil C18, 5 µm, from ScharLab was used.

For the determination of basic and neutral pesticides (method 1), mobile phases consisting in mixtures 1 mM aqueous HFBA:acetonitrile and water:acetonitrile were used for P-1 and P-2, respectively. Regarding the determination of acidic and some other neutral analytes (method 2), 1 mM aqueous HCOOH:acetonitrile was used in P1 and 0.01% aqueous HCOOH:acetonitrile in P2.

2.3. Mass spectrometry

A Quattro LC (quadrupole–hexapole–quadrupole) mass spectrometer with an orthogonal Z-spray-electrospray interface (Micromass, Manchester, UK) was used. Drying gas as well as nebulising gas was nitrogen generated from pressurized air in a NG-7 nitrogen generator (Aquilo, Effen-Leur, NL). The nebuliser gas flow was set to approximately 80 L/h and the desolvation gas flow to 800–900 L/h. Infusion experiments were performed using a Model 11 single syringe pump (Harvard Instruments, Holliston, MA, USA), directly connected to the interface.

For operation in MS/MS mode, collision gas was Argon 99.995% (Carbueros Metalicos, Valencia, Spain) with a pressure of 5×10^{-4} mbar in the collision cell. Capillary voltages of –3 and 3.5 kV were used in negative and positive ionization mode, respectively. The interface temperature was set to 350°C and the source temperature to 120°C. Dwell times of 0.1 s/scan were selected.

Masslynx NT v 4.0 (Micromass, Manchester, UK) software was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from water samples.

2.4. Recommended procedure

Water samples (around 20 mL) were centrifuged at 3500 rpm for 10 min (only in presence of suspended particulate matter) and divided in two aliquots. One of them was acidified up to 0.5% with formic acid to perform the determination of acidic and neutral pesticides, and the other with HFBA 25 mM for the determination of basic and the rest of neutral analytes. The acidified samples were loaded into the loop and directly injected into the SPE-LC–(ESI)–MS/MS system.

The conditioning of the PRP-1 cartridge was performed as described elsewhere [12] adding the corresponding modifier (1 mM HFBA for method 1 or 1 mM HCOOH for method 2) into the aqueous solvent in P-1 and using a 2.2 mL loop.

The chromatographic gradient was common for both methods and it was performed changing the organic modifier as follows: 0 min; 5%, 2 min; 5%, 7 min; 50%, 17 min; 90%, 18 min; 90%, 19 min; 5%, 25 min; 5%, at a flow rate of 200 μ L/min. In order to obtain more reliable results, every batch of samples was firstly analysed by the method 1 and subsequently by method 2. Five

HPLC water injections were performed after changing the method to equilibrate the column with the new chromatographic conditions.

Quantification was performed by external calibration with standards prepared in HPLC-grade water and subjected to the overall SPE-LC-MS/MS procedure.

The final determination was carried out by MS/MS under the optimised conditions shown in Table 1.

2.5. Validation study

The linearity of the methods was studied by analyzing standard solutions in triplicate at six concentration values ranging from 0.01 to 0.5 µg/L. Satisfactory linearity was assumed when the correlation coefficient (r) was higher than 0.99 based on analyte peak areas measurements.

Accuracy (expressed as recovery, in %) and precision (repeatability expressed as relative standard deviation, in %) were evaluated by analyzing ground and surface water samples spiked at two concentration levels each (0.025 and 0.1 µg/L). All experiments were performed in quintuplicate ($n=5$).

The limit of quantification (LOQ) objective was established as the lowest concentration level that was fully validated, from spiked samples subjected to the overall analytical procedure, with satisfactory recovery (between 70 and 120%) and precision (RSD <15%). The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration that the analytical process can reliably differentiate from background levels, was estimated for a signal-to-noise ratio of three from the chromatograms of samples spiked at the lowest analyte concentration tested, i.e. 0.025 µg/L.

Table 1. MS/MS optimized conditions for selected compounds

Compound ^a	Polarity	t _R (min)	Precursor ^c ion (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)	Product ion (m/z) [*]	Ion ratio	Compound ^b	Polarity	t _R (min)	Precursor ^c ion (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)	Product ion (m/z)	Ion ratio
2-OH-DIA	ES+	4.5	156.1	30	15	86.1	1.1	Oxaryl	ES+	6.4	242.0 ^d	25	15	72.0	2.4
					25	69.0							15	121.0	
Desethyl-2OH-fbza	ES+	6.7	184.1	30	15	128.0	3.8	Dimethoate	ES+	13.0	229.9	20	20	125.0	1.3
					25	86.1							10	199.0	
2-ABZ	ES+	6.9	134.1	45	25	92.1	1.2	Terbumeton	ES+	14.4	226.1	35	20	170.2	7.0
					35	65.1							30	114.1	
2-OH-simazine	ES+	7.6	184.2	35	20	114.1	2.7	Bromacil	ES-	14.8	259.0	40	20	203.0	1.0
					30	69.0							20	205.0	
DIA	ES+	9.5	174.1	35	10	96.1	1.4	Simazine	ES+	15.0	202.1	30	20	132.1	1.5
					15	68.0							20	124.2	
Carbendazim	ES+	12.2	192.0	25	15	160	4.4	Terbacil	ES-	15.1	215.1	25	15	159.1	3.2
					30	132							15	161.1	
2-OH-fbza	ES+	12.2	212.1	30	15	156.2	5.6	Fluoroxipyr	ES-	15.1	253.0	20	10	195.0	1.5
					30	86.1							10	197.0	
Desethylterbumeton	ES+	13.8	198.2	30	15	142.1	4.3	Bentazone	ES-	16.3	238.9	40	30	132.0	2.2
					25	86.1							20	197.0	
Desethylfbza	ES+	15.3	202.1	25	15	146.1	3.2	Diuron	ES+	16.8	232.9	30	15	72.1	2.6
					15	148.1							15	46.1	
Imazalil	ES+	15.6	296.9	35	25	158.9	2.6	MCPA	ES-	16.9	198.9	25	10	141.0	2.3
					25	41.1							10	143.0	
Proparyl	ES+	18.1	218.0	35	15	162.0	1.2	Tbza	ES+	18.4	230.1	30	15	174.1	3.2
					25	127.1							15	176.1	
3,4-dichloroaniline	ES+	18.1	161.8	40	20	127.0	3.1	Malinate	ES+	19.3	188.1	25	15	126.2	1.7
					20	129.0							25	55.1	
Methidathion	ES+	18.6	302.9	20	10	145.1	2.2	a. Method 1 (Addition of HFBA)							
					25	85.1		b. Method 2 (Addition of HCOOH)							
Terbutryn	ES+	19.4	242.1	30	20	186.2	6.3	c. The first transition (top) was used for quantification and the second (bottom) was used for confirmation.							
					35	71.1		d. Sodium adduct							
Thiobencarb	ES+	21.7	258.0	25	15	125.1	10.5								
					25	41.1									

2.6. Application to real samples

A number of around 150 water (ground and surface) samples were collected from the Valencian Mediterranean area. Samples were stored in plastic (high density polyethylene) containers (ca. 60 mL) from different sampling locations. Before collecting the samples, the plastic containers were rinsed repeatedly with the water to be collected. Sampling was performed in duplicate (labeled as A and B) from each sampling point. The samples were stored in the dark at $<-18^{\circ}\text{C}$ until required for residue analysis. Sample A was used for the initial analysis whilst the duplicate (sample B) was stored at $\leq-18^{\circ}\text{C}$ in order to allow a repeated analysis if necessary.

In every sequence of analysis, the samples were injected between two calibration curves (from 0.01 to 0.5 $\mu\text{g/L}$) and additionally two quality controls (QCs) were analysed together with each batch of samples. QCs consisted of a blank water (previously analyzed) fortified at two different levels: LOQ (groundwater) and 4 \times LOQ (surface water). QC recoveries for every analyte were considered satisfactory if they were in the range 70–120%.

Confirmation of positive samples was carried out by quantifying the analyte with the calibration standards included in every sample sequence, using both the quantification (Q) and the confirmation (q) transitions, and calculating the concentration ratio obtained. A finding was considered positive when the concentration ratio was in the range 0.8–1.2 (i.e. maximum deviation of $\pm 20\%$), as the analyte concentration should be the same independently of using one or the other MS/MS transition. This approach was selected as the software used in the LC–MS instrument made it easier to work with Q/q concentration ratios, rather than with Q/q intensity ratios.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. MS optimization

The full-scan mass spectra and the MS/MS spectra were obtained from infusion of 5 mg/L acetonitrile:water 50:50 individual solutions of each compound, at a flow rate of 10 μ L/min. The majority of the analytes were determined by positive ionization mode including within this group the triazine-related compounds, both parents and TPs, meanwhile only five analytes (terbacil, bromacil, MCPA, bentazone and fluroxypyr) presented more abundant ionization in negative mode.

All compounds presented an abundant $[M+H]^+$ or $[M-H]^-$ ion, which led to a main product ion by fragmentation in the collision cell. Thus, $[M+H]^+$ or $[M-H]^-$ were selected as precursor ions, the only exception being oxamyl that showed an abundant $[M+Na]^+$ ion with good fragmentation and therefore it was selected as precursor ion.

The development of confirmative methods made necessary the acquisition of, at least, two specific transitions for each compound. Non-specific transitions, e.g. loss of water, were avoided in order to decrease the possibilities for occurrences of false positives or false negatives. In some cases, the analyte fragmentation was favoured through a specific pathway, leading to a product ion much more abundant than the rest. Thus, for some compounds, the most important fragment was found to be up to 10-fold more abundant than the rest. This situation would hamper the confirmation of the identity of the analyte at low concentration levels, as the detection by acquiring the confirmative transition would only be possible at concentrations above or around $10\times$ LOD. This was the case of terbuthylazine or terbumeton where the loss of the terbuthyl group was highly predominant ($230\rightarrow 174$ terbuthylazine; $226\rightarrow 170$ terbumeton) leading to excellent LOD's (0.2 ng/L) using this transition, but making unfeasible the confirmation at such a low level. In the case of terbuthylazine, this effect could be minimised by a favourable isotopic pattern. The presence of one chlorine atom in its structure allowed us to use two different precursor ions (m/z 230 and 232, corresponding to the ^{35}Cl and ^{37}Cl isotopes, respectively), which produced abundant product ions due to the loss of the terbuthyl group (see Fig. 2). Thus, the confirmation of terbuthylazine using the qualitative transition $232\rightarrow 176$ was feasible at the $3\times$ LOD concentration level. This approach was also used for other halogenated compounds such as bromacil, fluroxypyr, terbacil or MCPA (Table 1) although it was not possible for terbumeton due to the absence of halogens in this analyte. Therefore, terbumeton confirmation was only reliable

at $\geq 7 \times \text{LOD}$ level as a consequence of the intensity ion ratio for the two transitions monitored (see Table 1).

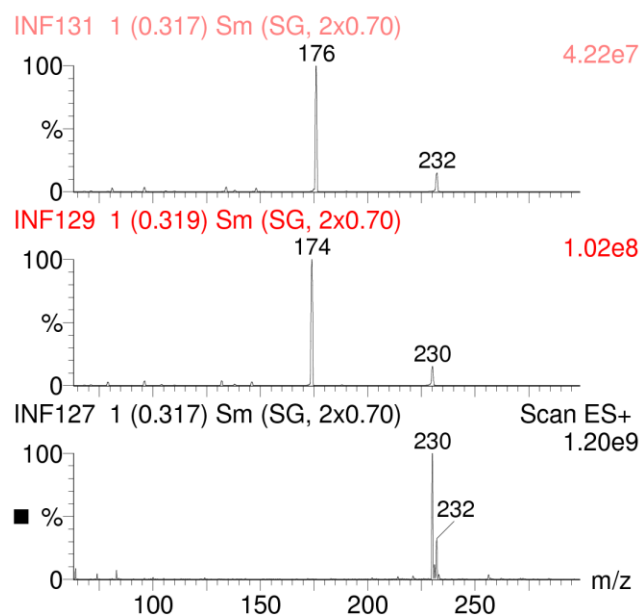


Fig. 2. (a) The positive ion electrospray full scan mass spectrum for terbuthylazine at 30 V, (b) product ion spectra at 15 eV for 230 m/z and (c) product ion spectra at 15 eV for 232 m/z .

The mass spectrometry parameters selected, as precursor and product ions, cone voltage, and collision cell energy for each analyte are shown in Table 1. The ion intensity ratios for the selected MS/MS transitions are also shown to illustrate the different sensitivity attainable by the quantitative and confirmative transitions.

3.2. LC optimization

The wide spectrum of physico-chemical characteristics for selected pesticides and TPs made advisable to find a compromise regarding SPE/chromatographic retention and MS response. In this way, the presence of acid was necessary in order to protonate acidic compounds such as MCPA or fluroxypyr, favouring the retention in the SPE cartridge. However, this acid content protonated also basic analytes, such as most of triazine metabolites, hampering their retention. Additionally, the ion-pairing reagent (a long-chain carboxylic acid) needed for the retention of cationic TPs produced strong ion suppression for compounds monitored in negative ionization mode. We studied in depth this subject in a previous paper [21], concluding that the best option was to develop two complementary methods: one performing the preconcentration of cationic compounds using HFBA as ion-pairing reagent, and the other using HCOOH for the preconcentration and determination of acidic compounds. Non ionic compounds were distributed between both methods depending on their retention time trying to minimise the number of compounds at the same retention window. This allowed monitoring the maximum number of transitions without remarkable losses in sensitivity. In summary, every water sample was divided in two aliquots: one was treated with HFBA and the other with HCOOH. With this approach, two transitions for each compound could be monitored simultaneously and therefore the quantification and confirmation were simultaneously performed in the same injection.

3.3. Method validation

Linearity of both methods was studied in the range from 0.01 to 0.5 µg/L for all selected compounds, showing good results (Table 2). Residuals were always below 30% and correlation coefficients obtained were, with a few exceptions, greater than 0.99.

The precision and accuracy of the overall analytical procedure were evaluated for a ground and a surface water sample, both spiked at 0.025 and 0.1 µg/L, by analyzing them in quintuplicate. Prior to the validation study, both samples were analyzed to confirm the absence of the analytes investigated.

As Table 2 shows, the recoveries in groundwater were satisfactory (between 70 and 120%) for all compounds at both fortification levels, with the exception of desisopropyl-2-hydroxy-atrazine and bromacil (only at the lowest spiking level), which presented recoveries around 60%.

Both methods presented satisfactory precision (RSD<15%) and only terbutryn, 3,4-dichloroaniline, at the low spiking level, and thiobencarb presented RSD between 15 and 20%.

Table 2. Method validation for ground water (GW) and surface water (SW)

Compound	LODs (ng/L)		Recovery (RSD)			
			25 ng/L		100 ng/L	
			GW	SW	GW	SW
Method 1 (HFBA)						
2-OH-DIA	23	18	56 (19)	46 (17)	61 (14)	59 (11)
Desethyl-2-OH-tbza	2	4	74 (5)	74 (7)	82 (8)	74 (10)
2-ABZ	4	10	84 (7)	58 (11)	81 (11)	53 (7)
2-OH-simazine	1	1	82 (10)	75 (11)	85 (10)	78 (11)
DIA	25	25	91 (14)	84 (15)	87 (10)	75 (4)
Carbendazim	0.5	1	95 (4)	83 (7)	105 (10)	75 (11)
2-OH-tbza	0.2	0.7	107 (2)	105 (7)	110 (5)	114 (9)
Desethylterbumeton	0.1	0.8	91 (7)	86 (18)	94 (5)	84 (12)
Desethyltbza	0.1	0.6	87 (9)	73 (11)	93 (12)	86 (17)
Imazalil	9	8	103 (7)	69 (11)	80 (13)	87 (18)
Propanyl	3	3	87 (12)	74 (12)	86 (16)	76 (16)
3,4-dichloroaniline	4	3	91 (17)	69 (19)	68 (9)	64 (27)
Methidathion	4	4	85 (9)	83 (14)	83 (13)	82 (7)
Terbutryn	0.5	2	92 (16)	65 (7)	98 (18)	73 (15)
Thiobencarb	1	2	97 (20)	50 (13)	75 (18)	57 (13)
Method 2(HCOOH)						
Oxamyl	2	6	85 (5)	25 (11)	82 (9)	25 (10)
Dimethoate	2	2	114 (6)	93 (15)	108 (5)	103 (6)
Terbumeton	0.2	0.3	88 (8)	86 (8)	96 (4)	89 (6)
Bromacil	5	8	65 (12)	62 (20)	91 (7)	68 (18)
Simazine	0.8	0.8	88 (7)	78 (5)	97 (4)	87 (10)
Terbacil	2	3	100 (6)	72 (13)	101 (4)	75 (8)
Fluroxypyr	7	6	99 (9)	83 (13)	106 (4)	83 (6)
Bentazone	1	0.9	109 (6)	108 (11)	118 (5)	105 (8)
Diuron	2	1	115 (11)	106 (7)	105 (6)	106 (8)
MCPA	2	1	101 (5)	98 (8)	99 (5)	91 (8)
Tbza	0.2	0.3	104 (8)	65 (23)	95 (7)	97 (9)
Molinate	9	2	106 (13)	100 (17)	108 (10)	110 (13)

Recovery (%) and relative standard deviation (RSD, %) for five replicates and limits of detection. Abbreviations: see Fig. 1.

In the case of surface water, recoveries and precision were satisfactory for 20 compounds out of 27 analyzed. Three compounds (desisopropyl-2-hidroxy-atrazine, 2-aminobenzimidazol and thiobencarb) showed recoveries around 50% but with good precision (<15%). For 3,4-dichloroaniline, terbuthylazine and bromacil, recoveries around 70% were obtained, but with RSD greater than 18%. Finally, poor recovery was only obtained for oxamyl (25%) at both fortification levels, though with a precision better than 11%. The reason of the low oxamyl recoveries might be related to the use of its sodium adduct as precursor ion. Then, the sodium content in the water sample might affect the oxamyl ionization behaviour, making the selection of sodium adducts troublesome for this type of samples. In fact, the recoveries for oxamyl in groundwater (with lower sodium content in comparison to the surface water) were satisfactory (see Table 2).

As an example, Fig. 3 shows selected chromatograms for a blank, a standard and a groundwater spiked at the LOQ level (0.025 µg/L). As can be seen, the high sensitivity of the two developed methods allowed to correctly quantify all selected pesticides and transformation products at this low level independently on their class (cationic, anionic or neutral). Additionally, both methods were found to be highly specific as no relevant signal was observed in the blank. A small shift in the chromatographic retention time was observed only for the two early eluting compounds.

No relevant matrix effects seemed to occur in the sample types tested in the light of the recoveries obtained with only a few exceptions where recoveries were lower than 70%, mainly in surface water (see Table 2). Therefore, the use of an external calibration using solvent-matched standards was considered as the most useful and practical approach for quantification. Certainly, this approach assumes that all samples would produce similar matrix effect, underestimating the high matrix variability that can be found in the environmental field, but other possibilities, like matrix-matched calibration or the use of labelled internal standards, were not easily applicable in this work. Thus, one specific labelled internal standard (IS) is normally needed to correct the quantification of each compound because the use of only one labelled standard of one chemical class does not assure a correct quantification for the entire range of compounds of the same class, as can be found repeatedly in the recent literature [28]. Although the use of the labelled analyte as IS is the best option to correct for matrix effects, in many cases it is impractical due to the non-availability of reference standards, this being a drawback of some multiresidue LC-MS methods when applied to the environmental field where the use of matrix-matched calibration (other effective alternative for correction of matrix effects) is not easily applied due to the high variability of environmental water samples. The latter makes, in most of

cases, unfeasible to find a representative sample blank to prepare the matrix-matched calibration.

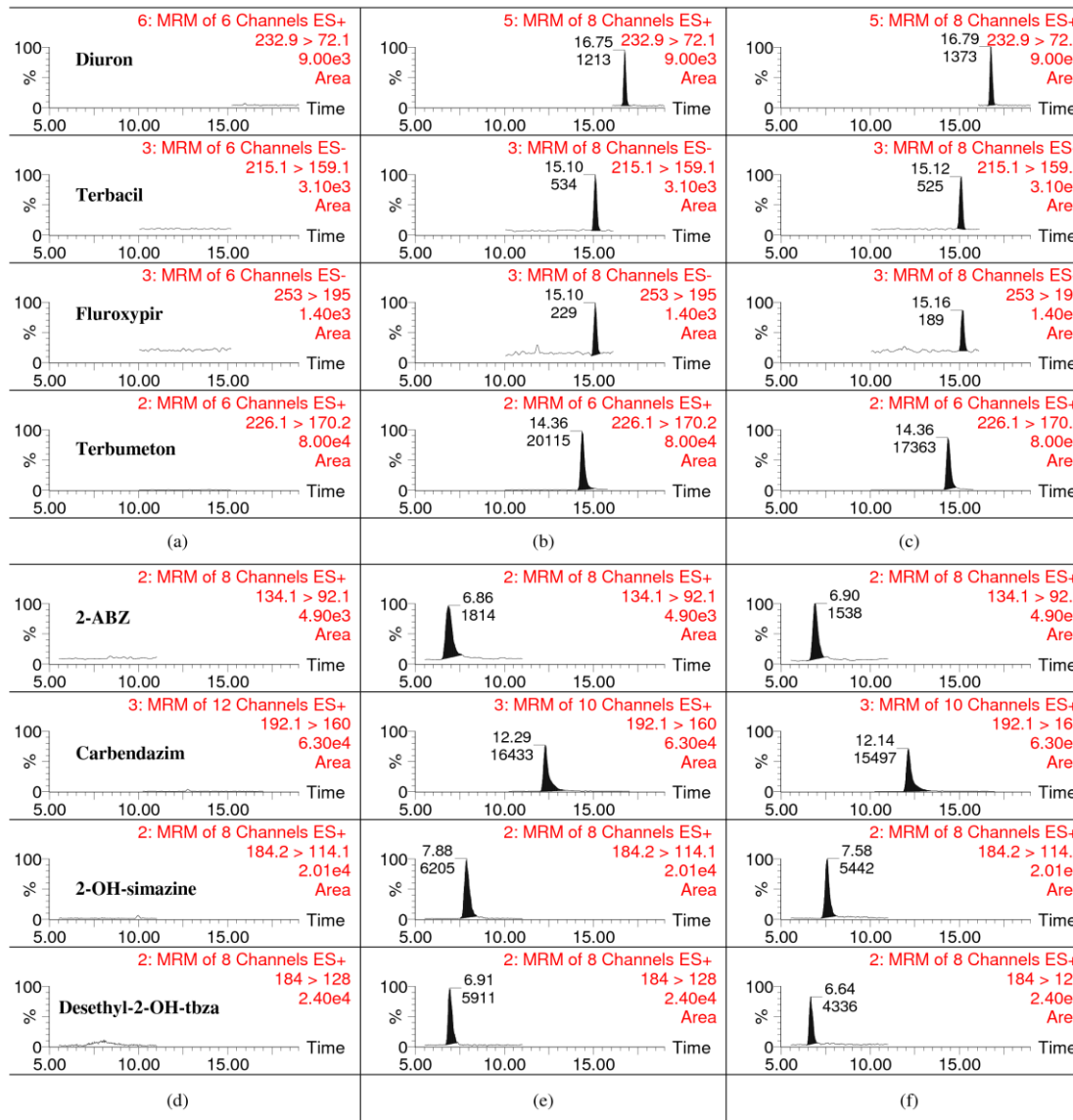


Fig. 3. Selected LC–MS/MS chromatograms corresponding to: (a) blank groundwater analyzed by the method 2 (b) standard at 25 ng/L analyzed by the method 2, (c) groundwater spiked at 25 ng/L analyzed by the method 2, (d) blank groundwater analyzed by the method 1 (e) standard at 25 ng/L analyzed by the method 1 and (f) groundwater spiked at 25 ng/L analyzed by the method 1.

3.4. Monitoring of pesticides in environmental waters

A number of 147 water samples (61 surface and 86 groundwater) were analyzed by the two developed methods. The results of analysis are summarized in Table 3.

Table 3. Summary of the results obtained along the monitoring of pesticides in ground and surface water from the Mediterranean Valencian area of Spain (total number of samples analyzed 147)

Analyte	% Positive findings	% Samples > 0.1 µg/L	Maximum level (µg/L)	Quality Control Samples (QC)		
				Average ^{a,b} recovery (%)	Outliers ^c	RSD ^b (%)
Simazine	67	4	0.52 ^d	95	1	16
2-OH-simazine	9	1	0.15	89	1	14
2-OH-DIA	3	0	0.04	86	2	17
DIA	24	5	0.25	90	0	12
Tbza	49	5	0.46	97	0	10
2-OH-tbza	76	10	0.16	106	4	16
Desethyl-2-OH-tbza	73	11	0.21	93	0	13
Desethyltbza	59	7	0.66 ^d	95	2	17
Terbumeton	28	5	1.07 ^d	98	0	9
Desethylterbumeton	69	9	1.62 ^d	100	1	11
Terbutryn	15	0	0.10	102	1	11
Carbendazim	40	1	0.37	110	2	28
2-ABZ	1	0	0.01	91	1	16
Diuron	38	3	0.37	99	1	11
3,4-dichloroaniline	5	3	9.92 ^d	91	10	38
Propanyl	0	0	n.d.	86	3	22
Imazalil	9	3	0.25	103	3	17
Methidathion	1	0	0.03	91	0	15
Thiobencarb	0	0	n.d.	89	6	25
Oxamyl	0	0	n.d.	78	5	18
Dimethoate	4	0	0.06	106	4	20
Molinate	1	0	0.01	86	5	38
Terbacil	7	1	0.13	86	3	16
MCPA	7	3	0.96 ^d	101	1	10
Bentazone	10	3	0.42	99	0	12
Fluroxypyr	0	0	n.d.	96	2	17
Bromacil	29	17	0.57 ^d	83	4	22

Abbreviations: see Fig. 1. ^a Average value corresponding to 20 QCs by compound analyzed along 10 months. ^b Calculated including outliers. ^c Recoveries out of 70–120%. ^d Samples were previously diluted to fit to the linearity range of the method

Most of selected compounds were detected at least once, and some of them, as simazine, 2-hydroxy-terbutylazine, desethyl-2-hydroxy-terbutylazine and desethylterbumeton, were detected in more than 60% of samples. Triazines, their related TPs and bromacil were often found at high concentrations (higher than 0.1 µg/L), with bromacil being the most frequently detected at these levels. An interesting fact can be pointed out when comparing positive findings for unchanged triazines with those obtained for their TPs. Around 75% of triazines detections at concentrations higher than 0.1 µg/L corresponded to TPs meanwhile only 25% of positive findings came from parent triazines.

In order to assure the quality of the analysis, several QCs were included within every sequence of analysis. The average of QC recoveries along a period of time of 10 months for all selected analytes were from 78 to 110% with RSD normally lower than 20% showing the robustness of the methods. Additionally, the percentage of outliers for these QCs was normally lower than 15% (three out of 20) as can be seen in Table 3.

All positive samples were simultaneously quantified and confirmed by the acquisition of two transitions for each compound. Most of positive findings obtained by the quantification transition were confirmed with the second one, measuring ion ratios deviations lower than 20%. However, in 5% of cases (mainly related with the presence of dimethoate and 2-hydroxy-terbutylazine) false positives would have been reported if only one transition was acquired.

Fig. 4 shows the LC-MS/MS chromatograms for a surface water sample. This sample was found positive for terbutylazine, terbumeton, desethylterbutylazine and desethylterbumeton. The high sensitivity of both methods allowed the determination of these compounds even at the extremely low levels found for terbutylazine (0.008 µg/L) and terbumeton (0.009 µg/L). This high sensitivity also allowed the reliable confirmation of positive finding even at very low concentrations levels. It is interesting to emphasize the lower concentrations found in this sample for parents (terbutylazine and terbumeton) in comparison to their transformation products (desethylterbutylazine (0.042 µg/L) and desethylterbumeton (0.086 µg/L)). This fact, also observed for other samples, illustrate the interest of including TPs in multiresidue methods in order to have a realistic overview of the water quality in agricultural environments.

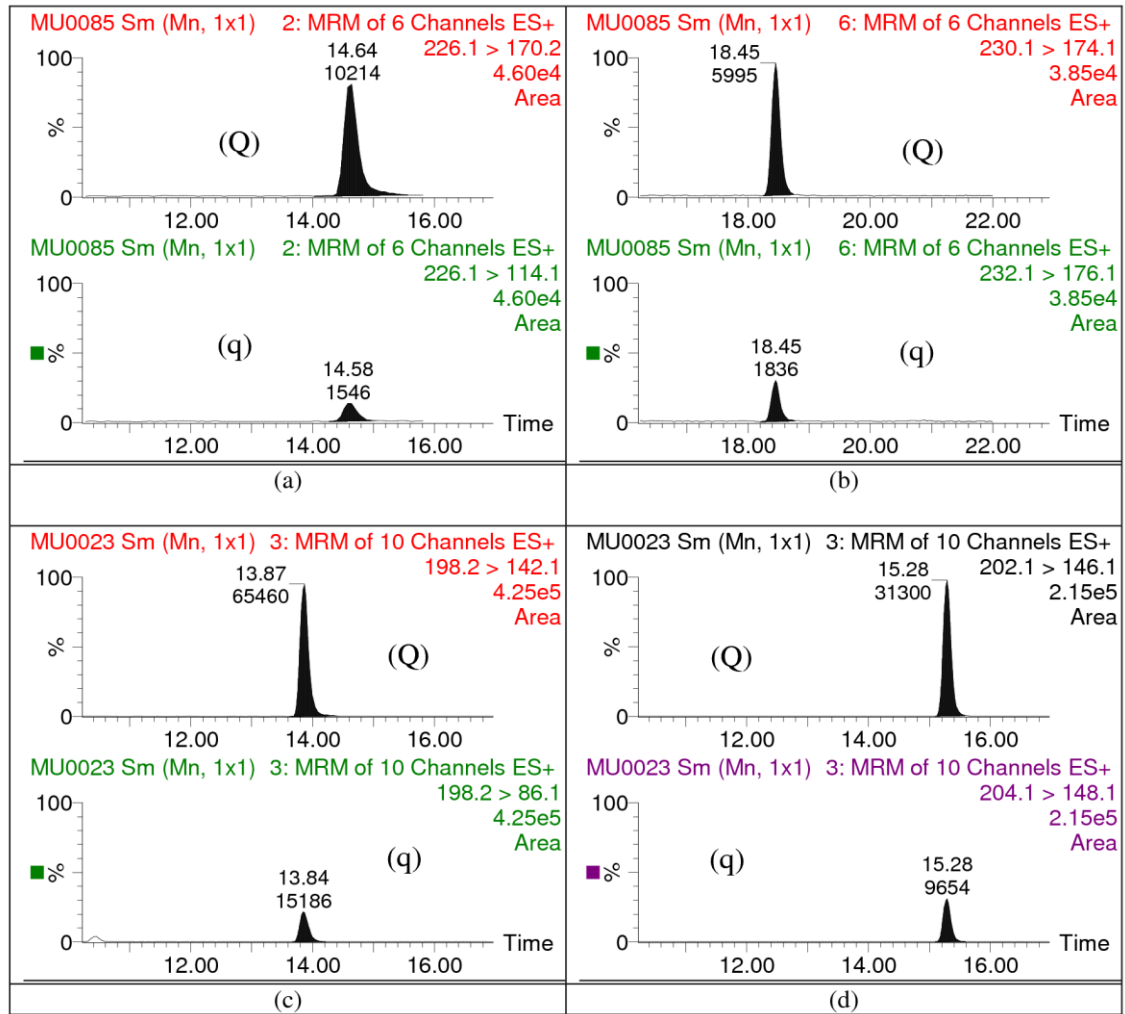


Fig. 4. LC-MS/MS chromatograms for a surface water sample collected from Riu Verd (Massalaves, Valencia, Spain): (a) terbumeton 9 ng/L, (b) terbutylazine 8 ng/L, (c) desethylterbumeton 86 ng/L and (d) desethylterbutylazine 42 ng/L. Q, quantification transition; q, confirmation transition.

4. CONCLUSION

The development of analytical methodology based on the use of two complementary SPE-LC-MS/MS methods allows the simultaneous quantification and confirmation of 27 pesticides and TPs in surface and groundwater samples. After injection of 2.2 mL of sample with the only treatment of previous acidification (either with HFBA or HCOOH), quantitative recoveries were obtained in both types of samples, at 0.025 and 0.1 µg/L levels, with LODs normally lower than 10 ng/L by using the most intense MS/MS transition for quantification. The high sensitivity of the methods and the relatively small number of analytes in each analytical run also allowed the simultaneous confirmation of all compounds at 0.025 µg/L by acquiring a second MS/MS transition.

The application of this methodology to real-world water samples pointed out the higher occurrence of TPs findings in relation to the parent pesticides. These results illustrate the convenience to include TPs in multiresidue methods. For this reason, it would be interesting to study the degradation/transformation of several pesticides, frequently found in the samples analyzed, such as bromacil, in order to include their related TPs in future monitoring programs. Obviously, not only the concentrations, but mainly the toxicity of these TPs should be evaluated to have a realistic knowledge about the water quality in agricultural environments.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using the Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer.

This work has been developed under financial support of the Ministry of Science and Technology (Ref. REN2002-01818 and Ref. BQU2003-02685).

REFERENCES

- [1] Council Directive 98/83/EC, Official J. European Communities, November 3, 1998.
- [2] T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A* **1000** (2003), p. 477
- [3] Y. Picó, C. Blasco and G. Font, *Mass Spectrom. Rev.* **23** (2004), p. 45.
- [4] R.B. Geerdink, W.M.A. Niessen and U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* **970** (2002), p. 65.
- [5] A.C. Hogenboom, W.M.A. Niessen and U.A.Th. Brinkman, *J. Sep. Sci.* **24** (2001), p. 331.
- [6] A. Ingelse, R.C.J. van Dam, R.J. Vreeken, H.G.J. Mol and O.M. Steujger, *J. Chromatogr. A* **918** (2001), p. 67.
- [7] C. Hogenboom, W.M.A. Niessen and U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* **794** (1998), p. 201.
- [8] B. Koppen and N.H. Spliid, *J. Chromatogr. A* **803** (1998), p. 157
- [9] E. Dijkman, D. Mooibroek, R. Hoogerbrugge, E. Hogendoorn, J.V. Sancho, O. Pozo and F. Hernandez, *J. Chromatogr. A* **926** (2001), p. 113.
- [10] R. Castro, E. Moyano and M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* **914** (2001), p. 111.
- [11] J.C. Marr and J.B. King, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11** (1997), p. 479.
- [12] J.V. Sancho, O.J. Pozo and F. Hernández, *Analyst* **129** (2004), p. 38.
- [13] F. Hernández, J.V. Sancho, O. Pozo, A. Lara and E. Pitarch, *J. Chromatogr. A* **939** (2001), p. 1.
- [14] A.C. Borba da Cunha, M.J. Lopez de Alda, D. Barcelò, T.M. Pizzolato and J.H.Z. Dos Santos, *Anal. Bioanal. Chem.* **378** (2004), p. 940
- [15] R.J.C.A. Steen, A.C. Hogenboom, P.E.G. Leonards, R.A.L. Peerboom, W.P. Cofino and U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* **857** (1999), p. 157.
- [16] R. Bossi, K.V. Vejrup, B.B. Mogensen and W.A.H. Asman, *J. Chromatogr. A* **957** (2002), p. 27.
- [17] D.W. Kolpin, E.M. Thurman and S.M. Linhart, *Sci. Total Environ.* **248** (2000), p. 115.
- [18] D.W. Kolpin, E.M. Thurman and S.M. Linhart, *Environ. Sci. Technol.* **35** (2001), p. 1217
- [19] R.A. Rebich, R.H. Coupe and E.M. Thurman, *Sci. Total Environ.* **321** (2004), p. 189.
- [20] A.C. Belfroid, M. van Druenen, M.A. Beek, S.M. Schrap, C. A.M. van Gestel and B. Van Hattum, *Sci. Total Environ.* **222** (1998), p. 167.
- [21] F. Hernandez, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. Lopez, J.M. Marin and M. Ibañez, *Trends Anal. Chem.* **24** (2005), p. 596.
- [22] Commission Decision 2002/657/CE of August 2002.
- [23] F. Hernandez, M. Ibañez, J.V. Sancho and O.J. Pozo, *Anal. Chem.* **76** (2004), p. 4349.
- [24] F.M. Lagerwerf, W.D. Van Dongen, R.J.J.M. Steenvoorden, M. Honing and J.H.G. Jonkman, *Trends Anal. Chem.* **19** (2000), p. 418
- [25] P.G.M. Kienhuis and R.B. Geerdink, *Trends Anal. Chem.* **19** (2000), p. 460.
- [26] J.V. Sancho, O.J. Pozo, F.J. Lopez and F. Hernandez, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16** (2002), p. 639.

- [27] T. Beninjts, R. Dams, W. Lambert and A. De Leenheer, *J. Chromatogr. A* **1029** (2004), p. 153.
- [28] M. Ibañez, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. Lopez and F. Hernandez, *J. Chromatogr. A* **1081** (2005), p. 145.

2.2.3 Discusión de los resultados del artículo científico 1

Las condiciones óptimas para la detección en el espectrómetro de masas se establecieron mediante infusión de patrones, comprobándose que tan solo 5 de los 27 compuestos se ionizaron preferentemente en modo negativo, mientras que el resto lo hicieron en positivo. Todos ellos mostraban, en el espectro obtenido en modo "full-scan", como ion más abundante el $[M+H]^+$ o el $[M-H]^-$, a excepción del insecticida oxamilo para el cual el aducto sodiado $[M+Na]^+$ fue el más abundante, obteniéndose para el mismo una buena fragmentación. Con tal de conseguir la mayor especificidad y sensibilidad en las transiciones seleccionadas, se eligieron para cada compuesto los iones producto más abundantes procedentes, a ser posible, de fragmentaciones específicas de la molécula, para así poder confirmar la presencia de todos los analitos estudiados como mínimo al nivel del LOQ objetivo (0.025 µg/L), evitando incurrir en falsos positivos o negativos. Con el objetivo de equiparar la sensibilidad de la transición de cuantificación con la de confirmación en el mayor número de compuestos posible, se aprovechó la posibilidad que ofrecen los analitos con patrón de distribución isotópica. Para éstos, se seleccionaron dos iones precursores distintos, con lo que se consiguió, además de aproximar la sensibilidad dependiendo de la abundancia isotópica del elemento en cuestión (normalmente Cl: ^{35}Cl (2/3) y ^{37}Cl (1/3)), incrementar el número de IPs pasando de 4 a 5, con lo que se aportó un plus de seguridad en la confirmación.

En un análisis multiresidual raramente se alcanza la situación ideal en la que la determinación de todos los compuestos se optimiza con las mismas condiciones para cada una de las diversas etapas analíticas implicadas en el proceso. De este modo, se hace necesario llegar a un compromiso entre las condiciones de preconcentración mediante SPE, de separación cromatográfica por LC y, finalmente, de detección por MS para poder determinar satisfactoriamente el mayor número de analitos. La consecución de dicho compromiso se dificulta a medida que las propiedades físico-químicas de los compuestos son más dispares. Este es el caso de los analitos involucrados en el presente estudio, entre los que podemos encontrar compuestos

ácidos (MCPA, fluroxypyr), básicos (TPs) y neutros, con rangos de polaridad muy diversos. De este modo, para protonar y así favorecer la retención de los analitos más ácidos, tanto en el cartucho como en la columna, fue necesaria la adición de una pequeña cantidad de ácido (HCOOH) en la muestra y en la fase móvil. Sin embargo, para los compuestos básicos este aporte extraordinario de protones en el medio perjudicaba aún más su falta de retención. Para dichos analitos, se precisaba la adición de un formador de pares iónicos (ácido heptafluorobutírico, HFBA) para formar un compuesto voluminoso no iónico, más fácil de quedar retenido tanto en el relleno polimérico del cartucho como en el de la columna (C₁₈). Sin embargo, la adición de dicho ácido carboxílico de cadena larga provocaba una enorme supresión en la ionización de los analitos determinados en modo negativo. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que la mejor manera para determinar estos compuestos tan distintos entre sí era separarlos en dos métodos distintos, uno con un pequeño aporte de HCOOH y el otro con la adición del HFBA. El resto de compuestos (neutros) se distribuyó entre ambos métodos en función de su tiempo de retención, evitando la aglomeración de analitos en una misma zona cromatográfica y manteniendo un número adecuado de puntos por pico (>10) sin pérdida de sensibilidad trabajando a "dwell times" de 100 ms.

El desarrollo de metodología analítica para la determinación de productos fitosanitarios, así como de otros contaminantes ambientales, debería tener siempre como objetivo final su aplicación a muestras reales, procurando además que los resultados reportados posean la mayor fiabilidad posible. De este modo, nuestros dos métodos fueron validados siguiendo las recomendaciones de las guías SANCO de la UE para la validación de metodología analítica¹⁰⁶, a dos niveles de concentración (0.025 y 0.1 µg/L), acordes con la Directiva 98/83/EC³⁶, en muestras blanco de agua superficial y subterránea. Se obtuvieron resultados satisfactorios para la mayoría de los compuestos, tanto en precisión como en exactitud. El hecho de utilizar en la validación muestras de agua cuyas matrices se asemejan en mayor o menor grado a las muestras medioambientales analizadas es, en principio, la aproximación analítica preferida. Pese a que dentro de un mismo tipo de agua se asume que existe cierta

variabilidad en las matrices, siempre será preferible utilizar en la validación muestras blanco medioambientales que hacer uso de agua HPLC. Para contrarrestar la variabilidad de matriz existente en las muestras medioambientales y el posible efecto matriz observado en LC-MS/MS, como ya se ha comentado con anterioridad, la mejor aproximación para conseguir cuantificaciones correctas sería poder utilizar para cada analito su patrón marcado isotópicamente. Este hecho es altamente complicado a medida que aumenta la multiresidualidad del método, debido tanto al coste económico que supone como a la no disponibilidad de todos los patrones, sobretodo cuando se trata de compuestos no contemplados en las determinaciones más frecuentes (p.e. ciertos TPs). Una alternativa habitualmente utilizada es la aplicación de un único analito marcado para corregir la respuesta de un grupo de compuestos de la misma clase química o de tiempo de retención parecido, aunque esto no asegura la correcta cuantificación de todos los analitos¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Por este motivo, quedando descartada también la aplicación de calibrados en matriz a consecuencia de la falta de homogeneidad en muestras de agua medioambiental, se decidió cuantificar las muestras mediante calibrado con patrones en solvente, incluyendo en cada secuencia de análisis dos muestras fortificadas a los niveles de la validación (QCs), aceptando los datos siempre que sus valores de recuperación estuvieran entre el 70-120%.

El método se aplicó a un total de 147 muestras de agua (61 superficiales y 86 subterráneas) en las que tan solo 4 de los 27 compuestos analizados no fueron nunca detectados. De todos los positivos, tan solo 6 plaguicidas no fueron cuantificados en ninguna ocasión por encima de 0.1 µg/L. Los analitos presentes más frecuentemente en las muestras fueron los herbicidas triazínicos y sus TPs. Generalmente, las concentraciones de TPs en las muestras de agua fueron superiores a las de sus plaguicidas precursores, hecho que demuestra la importancia de la inclusión de este tipo de compuestos en análisis multiresiduales aplicados a programas de control. Así, quedó de manifiesto la necesidad de ahondar más en el estudio de los TPS y la necesidad de incluir un mayor número de estos compuestos en trabajos futuros. En esta línea, nuestro grupo de trabajo ha publicado recientemente un estudio en el que

se investiga la presencia de éstos y otros TPs asociados a plaguicidas encontrados en muestras de agua analizadas en el presente trabajo, habiéndose detectado otros TPs de plaguicidas como bentazona, diuron y terbumetona¹¹⁰. Al igual que nosotros, otros grupos de investigación siguen la misma línea de trabajo, poniendo de manifiesto la presencia de TPs en las aguas junto a sus plaguicidas precursores, o incluso en ausencia de éstos, lo que junto al estudio de sus propiedades toxicológicas refuerza la necesidad de su inclusión en los métodos de análisis¹¹¹.

La identificación de los analitos en las muestras se llevó a cabo mediante la adquisición de dos transiciones específicas para cada uno de ellos. De este modo se pudo cuantificar y confirmar de manera simultánea en una sola inyección. La confirmación de los positivos se realizó por comparación de las concentraciones obtenidas para cada transición, fijándose una desviación máxima del $\pm 20\%$.

Por último, cabe destacar la elevada sensibilidad que se logra alcanzar con los métodos desarrollados, obteniéndose LODs inferiores a 0.01 ng/L para la mayoría de los analitos (25 de los 27), además de la cuantificación y confirmación simultánea al nivel de 0.025 µg/L.

2.3 Estudio de la presencia de residuos de plaguicidas y productos de transformación en aguas de la Comunidad Valenciana.

2.3.1. Introducción

De manera global, se considera que la protección y calidad del agua en Europa ha mejorado tras más de 30 años de legislación con directivas destinadas a este propósito (Directivas 76/464/CE, 98/83/CE³⁶, 2000/60/CE¹¹², 2006/118/CE¹¹³), reduciéndose los niveles de sustancias peligrosas tales como el fósforo, materia orgánica, metales pesados,..., procedentes generalmente de fuentes puntuales de contaminación (plantas depuradoras, procesos industriales,..). Sin embargo, existen otros muchos contaminantes procedentes mayoritariamente de fuentes difusas (escorrentías de las tierras agrarias, sistemas de eliminación de residuos,..) entre los que destacan los plaguicidas, para los cuales, los datos disponibles no son suficientes como para realizar una correcta evaluación. Por ello, la Directiva Marco del Agua 2000/60/EC¹¹², con la que se pretende garantizar la seguridad del agua para consumo humano, exige a todos los estados miembros de la UE que evalúen el estado químico de sus aguas subterráneas y superficiales para obtener información comparable y relevante sobre la presencia tanto de plaguicidas como de otras sustancias contaminantes en ellas.

El regadío es un elemento esencial en la producción agrícola de ciertos países del sur de Europa, entre los que se encuentra España, lo que contribuye a que la mayor parte del agua que se consume en ellos esté destinada a este sector. Este exceso de captación de agua para el regadío genera situaciones de estrés hídrico que se manifiesta con fenómenos como la sobreexplotación de los acuíferos, afectando de manera directa a la calidad de las aguas subterráneas que los conforman. Estas aguas son utilizadas en muchas regiones (por ejemplo, la Comunidad Valenciana) como fuente principal de suministro público. Para proteger la calidad de las aguas subterráneas, manteniendo un control riguroso sobre la contaminación, la UE promulgó la Directiva 2006/118/EC¹¹³ en la que, al igual que se recoge en la 98/83/EC³⁶, se establecían, entre otras, las normas de calidad en materia de plaguicidas fijando en 0.1 µg/L y 0.5 µg/L los límites máximos permisibles por plaguicida individual o por la suma total de todos ellos.

Pese a que España es uno de los países europeos con mayor uso de plaguicidas¹¹⁴ y aunque en la actualidad existen algunos datos disponibles de niveles de plaguicidas en aguas subterráneas españolas^{41,115-118}, se necesita poner en marcha un mayor número de programas de control de sustancias seleccionadas por su mayor aplicación y potencial contaminante con tal de conocer, de manera más precisa, el estado real de contaminación en este tipo de aguas, ya que de ellas depende el abastecimiento de agua potable de numerosas poblaciones. En este sentido, por su mayor uso y susceptibilidad de alcanzar con más facilidad las aguas subterráneas debido a su movilidad y aplicación directa al suelo, los herbicidas suelen ser los principales plaguicidas a controlar en los acuíferos^{44,45,49,104,105}. Como se ha señalado anteriormente, la inclusión de TPs, por su elevada polaridad y mayor movilidad, debe ser siempre considerada, ya que muchos plaguicidas no llegan a contaminar las aguas como tales, sino que lo hacen sus TPs, normalmente con un impacto mayor que sus precursores^{100,119}.

Para llevar a cabo el estudio presentado en este capítulo, se seleccionaron pozos representativos de distintos tipos de acuíferos de la Comunidad Valenciana. Se eligieron aquellos cuya relevancia en cuanto a la actividad agrícola era mayor. La selección de los plaguicidas de la primera campaña de muestreo, llevada a cabo en el año 2000, se realizó en función de la información obtenida en las principales cooperativas agrarias y aplicadores profesionales de la zona. De este modo, se investigó mediante el método desarrollado por Sancho et al.⁹⁹, la presencia de 37 plaguicidas de diferentes familias (21 insecticidas, 14 herbicidas, 1 fungicida y 1 acaricida), así como 10 de sus principales TPs. A partir de los resultados obtenidos en dicho periodo, y con objeto de enfocar la siguiente campaña de muestreo (2003) en los compuestos más detectados y sus principales TPs, además de incluir otros plaguicidas de amplio uso, se desarrolló el método analítico presentado anteriormente como "artículo científico 1", de modo que se estudió la presencia de 18 plaguicidas (13 herbicidas, 3 insecticidas y 2 fungicidas) y 9 TPs. Ambas campañas de muestreo fueron llevadas a cabo entre los meses de Abril y Diciembre, realizando un muestreo mensual excepto en los meses de mayor aplicación comprendidos entre Junio y

Octubre (ambos incluidos), donde las muestras se tomaron cada dos semanas. Tanto la toma de las muestras del año 2000 como su consecuente análisis fue realizado por compañeros del grupo de investigación cuya dilatada experiencia en el campo del análisis de aguas de la Comunidad Valenciana se remonta a la década de los 90. En 2001 entré a formar parte del grupo de investigación, participando en el muestreo y análisis de las muestras de la campaña de 2003.

Con el **artículo científico 2** que se presenta a continuación se pretende ampliar el conocimiento del grado de contaminación por plaguicidas y TPs de las aguas subterráneas de la Comunidad Valenciana, así como su evolución en el tiempo mediante el aporte de datos fiables obtenidos con metodología analítica avanzada.

2.2 Artículo científico 2

"Pesticide residues and transformation products in groundwater from a Spanish agricultural region on the Mediterranean Coast"

Félix Hernández, José M. Marín, Óscar J. Pozo, Juan V. Sancho, Francisco J. López e Ignacio Morell.

International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 88 (2008) 409-424.

Intern. J. Environ. Anal. Chem.
Vol. 88, No. 6, 15 May 2008, 409–424



Pesticide residues and transformation products in groundwater from a Spanish agricultural region on the Mediterranean Coast

Félix Hernández*, José M. Marín, Óscar J. Pozo, Juan V. Sancho, Francisco J. López and Ignacio Morell

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

(Received 30 July 2007; final version received 1 October 2007)

An overview is given on the presence and changes over time of pesticide residues in groundwater from the Valencia region, one of the most important citrus cultivation sites of southern Europe. A multiresidue LC-MS/MS method was applied for the screening of around 50 pesticides in 75 water samples collected during 2000. The herbicides simazine, terbuthylazine, bromacil, terbutometon, and diuron were the most frequently detected compounds. On the basis of compounds detected in these samples, another method that focused on 30 herbicides and relevant transformation products (TPs) was developed and applied to around 80 water samples collected during 2003. Simazine was the most frequently found compound followed by several triazine metabolites. Data for this paper show the vulnerability of groundwater in this area to herbicide applications and illustrate the importance of including pesticide TPs in environmental monitoring programmes, as four out of the five compounds most frequently detected were pesticide TPs.

Keywords: pesticides; transformation products; water-pollution monitoring; liquid chromatography; tandem mass spectrometry

1. Introduction

In spite of a general decrease in pesticide use and the appearance of a new generation of pesticides with lower impact on the environment, the development of monitoring programmes to provide more information on surface and groundwater pollution is still needed.

Pesticide concentration in groundwater depends on many factors such as crop and soil type, weather, season, degradation rates in the environment, physical and chemical characteristics of the pesticide, application rate and management practices [1]. There are generally fewer data available on the presence of pesticides in groundwater than for surface water. However, increasing interest in this topic in recent years, as well as the improvement in the methods of analysis, has produced more information about the quality of groundwater. In recent years several monitoring programmes have been applied in the USA [2–7] and in many European countries [8–15] to determine a large variety of pesticides and some transformation products (TPs) in groundwater. Although some data are available on pesticide residues in Spanish groundwater [16–20], there is a lack of

INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY

Inter. J. Environ. Anal. Chem. 2008; **88**: 409–424

Received: 30 July 2007; Accepted: 01 October 2007; Published online in Taylor & Francis

(www.informaworld.com) DOI: 10.1080/0306731070124772

Pesticide residues and transformation products in groundwater from a Spanish agricultural region on the Mediterranean Coast

Félix Hernández, José M. Marín, Óscar J. Pozo, Juan V. Sancho, Francisco J. López, Ignacio Morell

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n E-12071 Castellón, Spain

ABSTRACT

An overview is given on the presence and changes over time of pesticide residues in groundwater from the Valencia region, one of the most important citrus cultivation sites of southern Europe. A multiresidue LC-MS/MS method was applied for the screening of around 50 pesticides in 75 water samples collected during 2000. The herbicides simazine, terbutylazine, bromacil, terbumeton, and diuron were the most frequently detected compounds. On the basis of compounds detected in these samples, another method that focused on 30 herbicides and relevant transformation products (TPs) was developed and applied to around 80 water samples collected during 2003. Simazine was the most frequently found compound followed by several triazine metabolites. Data for this paper show the vulnerability of groundwater in this area to herbicide applications and illustrate the importance of including pesticide TPs in environmental monitoring programmes, as four out of the five compounds most frequently detected were pesticide TPs.

KEYWORDS

pesticides; transformation products; water-pollution monitoring; liquid chromatography; tandem mass spectrometry

*Correspondence to Félix Hernández, Jaume I. E-mail: hernandf@exp.uji.es

1. INTRODUCTION

In spite of a general decrease in pesticide use and the appearance of a new generation of pesticides with lower impact on the environment, the development of monitoring programmes to provide more information on surface and groundwater pollution is still needed.

Pesticide concentration in groundwater depends on many factors such as crop and soil type, weather, season, degradation rates in the environment, physical and chemical characteristics of the pesticide, application rate and management practices [1]. There are generally fewer data available on the presence of pesticides in groundwater than for surface water. However, increasing interest in this topic in recent years, as well as the improvement in the methods of analysis, has produced more information about the quality of groundwater. In recent years several monitoring programmes have been applied in the USA [2-7] and in many European countries [8-15] to determine a large variety of pesticides and some transformation products (TPs) in groundwater. Although some data are available on pesticide residues in Spanish groundwater [16-20], there is a lack of monitoring programmes of sufficient scope to focus on the compounds that are most widely applied and, consequently, with the highest potential to contaminate groundwater. This is relevant, considering that Spain is one of the European countries with the highest pesticide usage (kg) per unit area (ha) [1]. Therefore, it seems very important that more data are obtained to provide better knowledge about European, and specifically Spanish, pollution of groundwater by pesticides.

Although herbicides are normally less toxic than other pesticide families, their inclusion in priority lists of monitoring programmes is of great importance to obtain more comprehensive knowledge of groundwater pollution, as these compounds have been the main pesticide contaminants in this type of water sample. Triazines, fenoxycids, or phenylureas are among the most frequently detected due to their higher mobility in the soil-water environment [21,22].

Once the contact between pesticides and the soil-water environment is made, they can be degraded in different ways to a variety of TPs. Although TPs are usually less active and harmless than their parents, they can still have a certain degree of toxicity [23,24]. As a consequence of their polarity, they normally have a higher mobility in the soil-water environment and can reach groundwater more easily than their parent compounds. Therefore, the inclusion of relevant TPs in analytical methodology applied in water monitoring programmes is necessary to provide a realistic overview of pesticide pollution.

In contrast to food analysis where the analytes are determined by the residue definition given in the MRL regulation, the EU regulation of residues in drinking-water does not contain detailed residue definitions and only gives a general reference to pesticide-related compounds [25]. In this case, metabolites or degradation products (in general, pesticide TPs) may be unknown, and their detection and identification become an important part of the analytical task [26]. Pesticide TPs are considered particularly relevant within the group of so-called emerging contaminants [27,28], and their determination is an analytical challenge, as has been recently pointed out by our own research group [29].

Until recently, most available data on pesticides in water have been obtained by application of multiresidue methods based on solid-phase extraction (SPE), solid-phase microextraction (SPME) or solvent extraction (ELL), followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) [30,31]. However, when polar pesticides and TPs have to be included in the analytical methodology, the application of liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) is required, and it has become the preferred technique for polar pesticide residues determinations [26,32-36].

The use of LC in combination with tandem mass spectrometry (MS/MS) allows considerable improvement in sensitivity as well as selectivity, achieving limits of quantification (LOQ) low enough to satisfy the EU regulations in water, without even applying the common prior SPE step [37]. Although quantification requirements have been carefully considered in the scientific literature, not much attention has been paid to the confirmation of the identity of compounds detected in water, mainly when using LC-based methods. Thus, some methods have been based on the acquisition of only one transition, when using selected reaction monitoring (SRM) mode (LC-MS/MS methods), or even only on one ion measurement (LC-MS methods) for each target compound monitored. The acquisition of at least two MS^2 transitions and the measurement of their ion abundance ratio has been proposed to minimise the possibility of reporting false positives or false negatives [32,35], providing a more reliable confirmation process [38,39].

The main objective of this work is to provide a wider knowledge of pesticides and TPs present, and changes in concentration over time, in groundwater from the Valencia Mediterranean Region (eastern Spain), where there is intensive agricultural activity. For this purpose, the SPE-LC-MS/MS methodology developed at our laboratory has been applied to the determination of pesticides widely used in this area, mainly herbicides. Several wells, representing the different types of aquifers present in this area, were monitored during two sampling periods of

a year (2000 and 2003). Around 50 pesticides and TPs were included in the 2000 monitoring, while 2003's analyses were focused on the most frequently detected compounds in the previous monitoring, mainly herbicides, and their TPs. Special attention has been paid to the reliable confirmation of the identity of compounds detected in samples, which was based on acquisition of two MS/MS transitions, and also by applying LC-QTOF MS to selected positive samples.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents and chemicals

Pesticides and TPs reference standards were purchased from Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), Riedel de Haën (Seelze, Germany) or Sigma (St. Louis, MO). Compounds investigated in this work are shown in Table 1.

HPLC-grade acetonitrile and methanol were purchased from ScharLab (Barcelona). LC-grade water was obtained by purification of demineralised water in a Nanopure II system (Barnstead Newton, MA). Formic and heptafluorobutyric acids were supplied by Fluka (Buchs, Switzerland).

2.2 Description of the study area

The coastal strip of the Valencia community is formed by a succession of coastal alluvial plains filled with materials of the Plioquaternary Age consisting of conglomerates, gravel, sands, lime, and clays, with frequent lateral changes of facies. From north to the south, the plains of Vinaroz-Benicarló, Oropesa-Torreblanca, Castellón, Sagunto and Valencia are distinguishable (Figure 1).

From the hydrogeological point of view, each coastal plain constitutes a detritic unconfined aquifer, more or less complex, in which the natural recharge takes place by effective infiltration of rainwater (12%) and irrigation water (8%), as well as by lateral feeding from mesozoic aquifers. The natural discharge takes place by direct flow to the sea or through associated coastal wetland zones, some of them of great ecological interest.

The thickness of the unsaturated zone increases from the coastline towards the interior. The minimum thickness is found in well 2 (Burriana) where it does not surpass 2 m, while in the rest of the area it is normally between 8 and 20 m.

Table 1. Compounds monitored at 2000 (Method 1) and 2003 (Methods 2a and 2b) sampling periods

Compound	Use	Family	Method	Compound	Use	Family	Method
2-ABZ	-	Carbendazim TP	1,2a	2-HydroxyTbze	-	Triazine TP	2a
Azynphosmethyl	INS	OP	1	Imazalil	FG	Conazole	2a
6-Chloronicotinic acid	-	Diflubenzuron TP	1	Imidacloprid	INS	Nitroguanidine	1
Bentazone	HB	Carbamate	2b	Malathion	INS	OP	1
Bromacil	HB	Uracil	1,2b	MCPA	HB	Phenoxyacetic	1,2b
Buprofezin	INS	Phenithiadiazinone	1	Mecarbam	INS	OP	1
Carbendazim	FG	Benzimidazole	1,2a	Methidation	INS	OP	1,2a
Carbofuran	INS	Benfuracarb TP	1	Methiocarb	INS	Carbamate	1
GBF-3-OH	-	Benfuracarb TP	1	3-Me-p-Nitrophenol	-	Fenitrothion TP	1
GBF-7-phenol-3-keto	-	Benfuracarb TP	1	Methomyl	INS	Carbamate	1
Chorpyrifos	INS	OP	1	Molinate	HB	Carbamate	1,2b
Chorpyrifos-methyl	INS	OP	1	Oxamyl	INS	Carbamate	1,2b
Desethyl-2-OH-Tbze	-	Triazine TP	2a	Penalimethalin	HB	Nitroaniline	1
DesethylTerbume-ton	-	Triazine TP	2a	Pirimiphos-methyl	INS	OP	1
DesethylTbze	-	Triazine TP	2a	Propanil	HB	Anilide	2a
DIA	-	Triazine TP	1,2a	Pyridaben	INS	Pyridazinone	1
2-OH-DIA	-	Triazine TP	2a	Pyridaphenthion	INS	OP	1
3,4-Dichloroaniline	-	OP	1	Pyrimicarb	INS	Carbamate	1
Dimethoate	INS	OP	1,2a	Pyriproxyfen	INS	Phenoxy-pyridine	1
Diuron	HB	Phenylurea	1,2b	Quinalphos	INS	OP	1
Ethiofencarb	INS	Carbamate	1	Simazine	HB	Triazine	1,2b
Fluazipop free acid	HB	APP	1	TCPY	-	Chlorpyrifos TP	1
Fluroxypyr	HB	Pyridine	1,2b	Tebufenpyrad	INS	Pyrazole	1
Fomesafen	HB	Amide & NPE	1	Terbacil	HB	Uracil	1,2b
Hexythiazox	AC	Carboxamide	1	Terbume-ton	HB	Triazine	1,2b
2-Hydroxysimazine	-	Triazine TP	2a	Tbze	HB	Triazine	1,2b
				Terbutryne	HB	Triazine	1,2a
				Thiobencarb	HB	Carbamate	1,2a

Note: ABZ: aminobenzimidazol; CBF: carbofuran; Tbze: terbuthylazine; DIA: desisopropylatrazine; TCPY: 2,4,6-trichloro-3-pyridinol; INS: insecticide; HB: herbicide; FG: fungicide; AC: acaricide; OP: organophosphorate; APP: aryloxyphenoxypropionic; NPE: nitrophenyl ether.

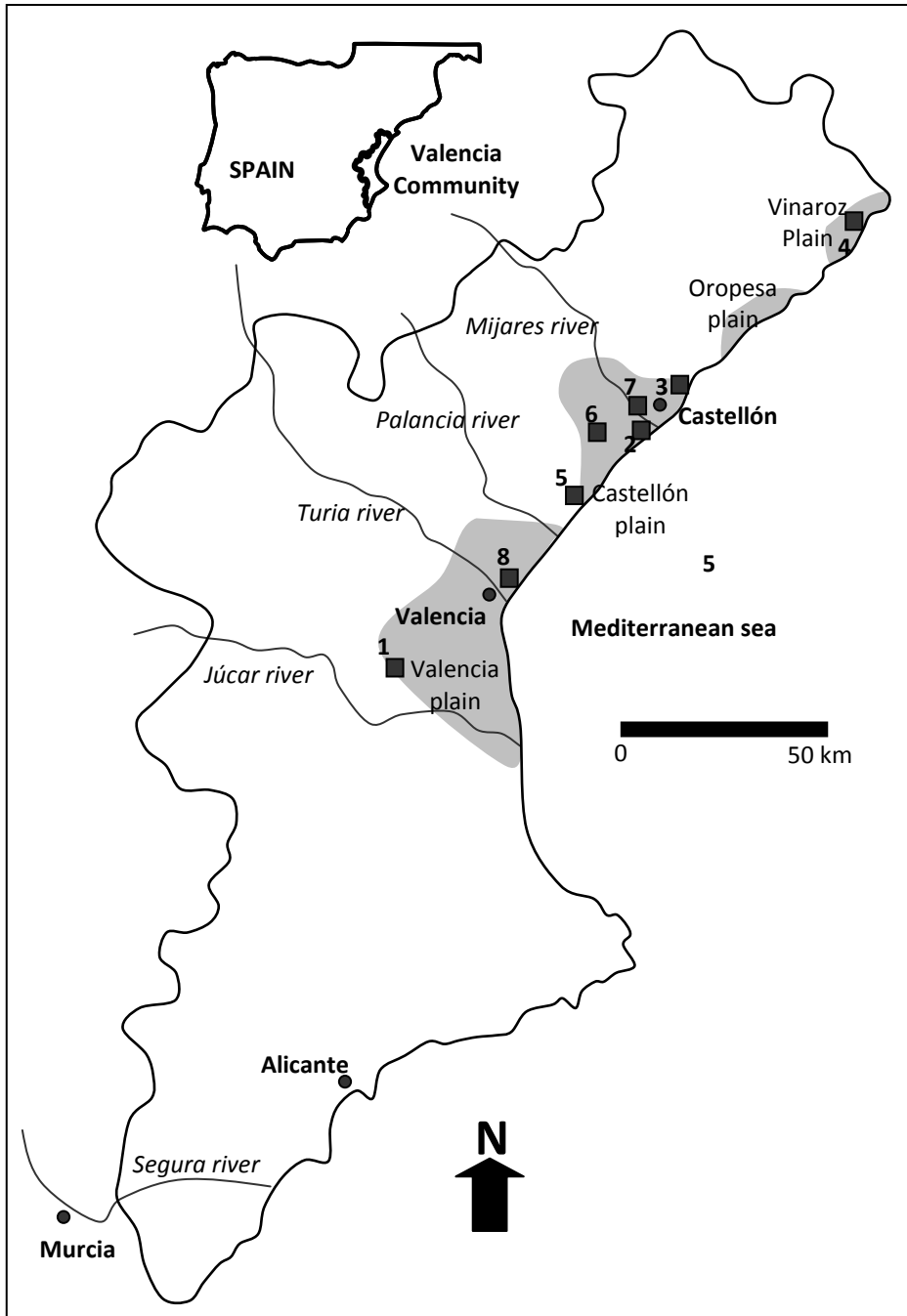


Figure 1. Map of the study area and sampling points. 1: Carcaixent; 2: Burriana; 3: Benicassim; 4: Benicarló; 5: Almenara; 6: Nules; 7: Castellón; 8: Alborcia.

2.3 Sampling

Groundwater samples were collected during 2000 and 2003. In each monitoring period, about 80 groundwater samples were collected from eight representative wells (Figure 1). Sampling points were chosen on the basis of agricultural relevance of the area and aquifer type. Sampling was carried out from April to December, at 2 week intervals from June to October, and monthly in the other months. Samples were collected in duplicate in high-density polyethylene containers (ca. 60 mL) and were stored in the dark at a temperature below -18°C until analysis.

2.4 Instrumentation

An HPLC system, based on a 233XL Gilson autosampler and two pumps, an Agilent 1100 binary pump used to condition and wash the SPE on-line cartridge, and a Waters Alliance 2690 quaternary pump used for the chromatographic separation, was interfaced to a Quattro LC triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer with an orthogonal Z-spray-electrospray interface (Waters). The experimental setup can be found elsewhere [34,36].

2.5 Analytical procedure

Water samples, previously centrifuged at 3500 rpm for 10 min if suspended particulate matter was present, were analysed by LC tandem MS. For samples collected in 2000, an SPE-LC-MS/MS method [36] was applied to determine 37 pesticides widely used in the study area and 10 TPs (see Method 1, Table 1). In these analyses, only one MS/MS transition was acquired. An additional injection, to acquire another transition per compound, was applied to confirm positive findings at concentrations higher than 0.1 µg L⁻¹. For samples collected in 2003, on the basis of the first sampling period results, the monitoring was focused on 18 pesticides and nine TPs (belonging mainly to the triazine family). Two complementary SPE-LC-MS/MS methods [34] were applied to every water sample: one for acidic and neutral pesticides (Method 2b), and the other for basic and the remaining neutral analytes (Method 2a; see Table 1). For these analyses, two transitions were acquired for each compound, which allowed the simultaneous quantification and confirmation of positives in only one analytical run.

All methods applied were previously validated and fulfilled the analytical characteristics typically required in the field of pesticide residue analysis.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 2000 Monitoring programme

The groundwater samples collected in the study area (75) were analysed by applying a method based on on-line trace enrichment coupled to tandem MS (SPE-LC-MS/MS) [36]. Figure 2A shows the detection frequency for the compounds found (25 out of 47 analysed). Herbicides were by far the most commonly detected compounds, making up about 90% of positive detections. As an example, among the 15 most frequently found compounds, 11 were herbicides, two were herbicide TPs, one was a fungicide, and one was an insecticide. Desisopropylatrazine (DIA), a triazine TP, was the most frequently found compound (72% of samples analysed), while the triazines simazine and terbuthylazine and the fungicide carbendazim were detected in around 50% of the samples.

Several target compounds were often found at concentrations higher than $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ (close to 40% of the compounds detected were quantified over this level). In the case of bromacil, MCPA and DIA, concentrations were over $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ in more than 50% of their positive findings (Figure 2A), with maximum concentrations of $4.5 \mu\text{g L}^{-1}$ for bromacil, $0.4 \mu\text{g L}^{-1}$ for DIA, and $0.8 \mu\text{g L}^{-1}$ for MCPA (Table 2). Although less frequently, polar insecticides such as ethiofencarb, carbofuran, or methidation were also found in some samples but represented less than 5% of detections and always at levels below $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$.

The average pesticide concentrations at each sampling point are compared in Figure 3A. It can be observed that herbicides, especially triazines, were the group of pesticides most commonly detected. These results are in accordance with data previously reported in other areas [6,8,11,15,22]. The highest pesticide levels were found in sampling points 1 and 2. Well 1, located at Carcaixent, belongs to a karstic aquifer, and its piezometric level is situated at 60 m. The agricultural soil is predominantly sandy, with a thickness no greater than 80 cm and directly overlying high karstified limestones. Well 2, located at Burriana, belong to a coastal aquifer with an unsaturated zone thickness less than 2 m, having a high hydraulic conductivity, due to the prevalence of gravel and sands. Both wells 1 and 2 are subject to extensive citrus crop activity. The sum of average concentrations of triazines plus DIA, and the sum for the rest of the herbicides (mainly bromacil), in wells 1 and 2 were higher than $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$. For the rest of the wells monitored, the average concentration levels normally did not exceed $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$. Positives referred to as 'other pesticides' were mainly attributed to carbendazim and its TP, 2-aminobenzimidazole. No relevant variation of pesticides concentrations were observed during sampling performed in 2000.

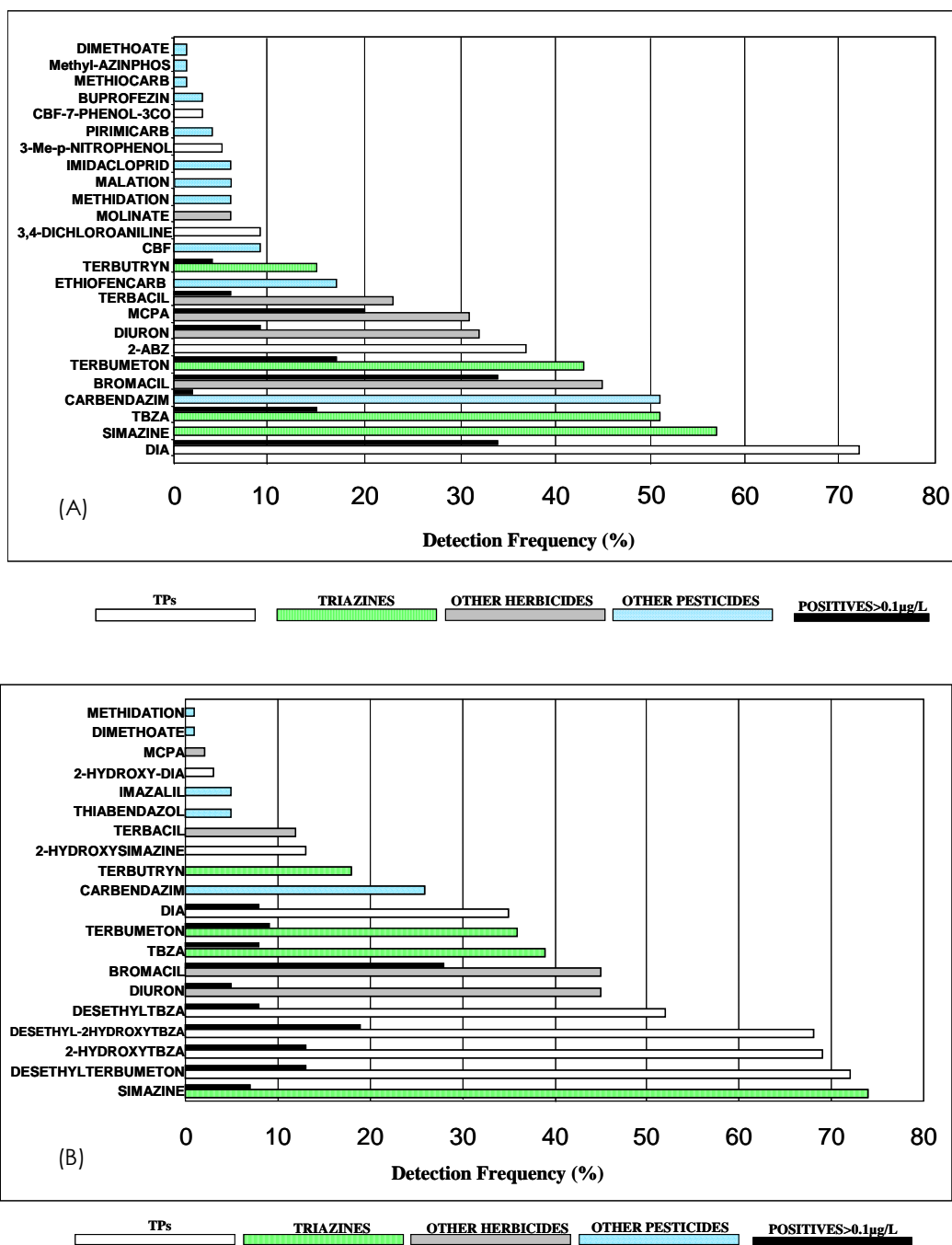


Figure 2. Detection frequency (%) of pesticides and transformation products (TPs) in groundwater samples collected at (A) 2000 and (B) 2003 monitoring periods.

Table 2. Summary of the results obtained during 2000 pesticide monitoring in groundwater (total number of samples analyzed 75)

COMPOUND	% POSITIVE SAMPLES	% SAMPLES >0.1µg L ⁻¹	MAXIMUM LEVEL (µg L ⁻¹)
Azinphos-methyl	1	0	<0.025
Bromacil	45	35	4.5
Buprofezin	3	0	<0.025
Carbendazim	51	3	0.12
Carbofuran	8	0	<0.025
Chlorpyrifos	0	0	n.d.
Chlorpyrifos-methyl	0	0	n.d.
Diazinon	0	0	n.d.
Dimethoate	1	0	0.04
Diuron	32	8	0.24
Ethiofencarb	17	0	0.07
Fluazifop	0	0	n.d.
Fluroxypyr	0	0	n.d.
Fomesafen	0	0	n.d.
Hexythiazox	0	0	n.d.
Imidacloprid	7	0	0.04
Malathion	7	0	0.06
MCPA	31	20	0.84
Mecarbam	0	0	n.d.
Methidation	7	0	<0.025
Methiocarb	1	0	<0.025
Methomyl	0	0	n.d.
Molinate	7	0	0.03
Oxamyl	0	0	n.d.
Pendimetalin	0	0	n.d.
Pirimiphos-methyl	0	0	n.d.
Pyridaben	0	0	n.d.
Pyridaphenthion	0	0	n.d.
Pyrimicarb	4	0	<0.025
Pyriproxyfen	0	0	n.d.
Quinalphos	0	0	n.d.
Simazine	57	0	0.09
Tebufenpyrad	0	0	n.d.
Terbacil	24	7	0.72
Terbumeton	43	17	1.54
Terbutylazine	51	15	0.49
Terbutryn	15	4	0.31
Thiobencarb	0	0	n.d.
2-Aminobenzimidazole ^α	37	0	0.03
CBF-3-hydroxy ^α	0	0	n.d.
CBF-7-PhOH-3CO ^α	3	0	0.06
4-Chloroaniline ^α	0	0	n.d.
6-Chloronicotinic acid ^α	0	0	n.d.
DIA ^α	72	35	0.36
3,4-dicloroaniline ^α	8	0	<0.025
3-Me-p-NO ₂ PhOH ^α	5	0	0.05
TCPY ^α	0	0	n.d.

^α Transformation products

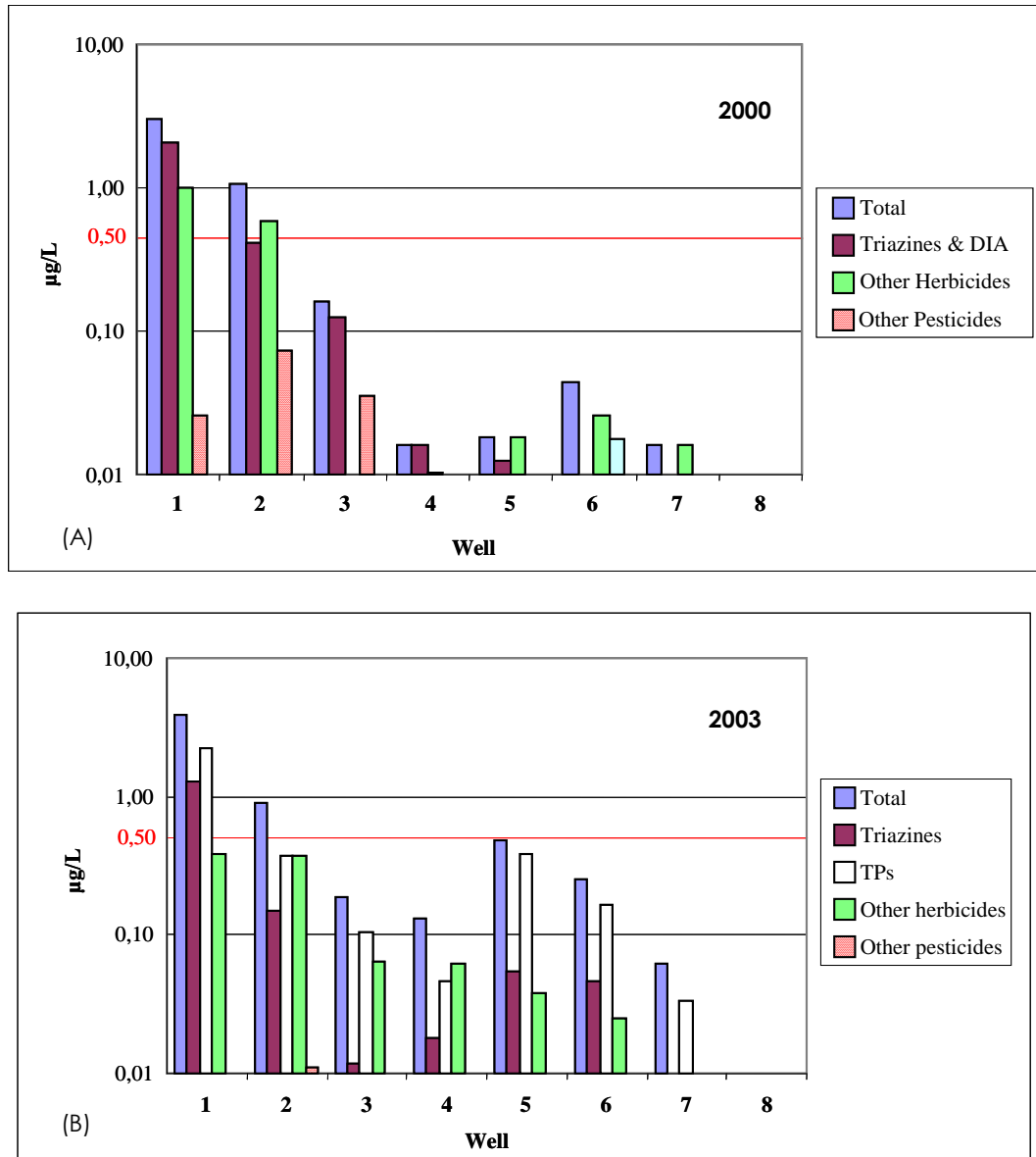


Figure 3. Comparison of pesticide concentrations found at every sampling point during (A) 2000 and (B) 2003 (data correspond to the sum of the average concentration of each pesticide during the monitoring period).

3.2 2003 monitoring programme

Results obtained during the first monitoring period were taken into account when selecting the list of target pesticides for the 2003 monitoring period (Table 1). Thus, seldom detected, less-polar analytes (mainly insecticides) were removed from the list, and emphasis was placed on polar analytes, mostly herbicides and their TPs, and other compounds, such as carbendazim and its TP 2-aminobenzimidazole, that were also widely detected in the previous monitoring.

Table 3. Summary of the results obtained during 2003 pesticide monitoring in groundwater (total number of samples analyzed 85)

COMPOUND	% POSITIVE SAMPLES	% SAMPLES >0.1 µg L ⁻¹	MAXIMUM LEVEL (µg L ⁻¹)
Bentazone	0	0	n.d.
Bromacil	45	28	0.57
Carbendazim	26	1	0.37
Dimethoate	1	0	<0.025
Diuron	45	5	0.37
Fluroxypyr	0	0	n.d.
Imazalil	5	0	0.09
MCPA	2	0	0.03
Methidathion	0	0	0.03
Molinate	0	0	n.d.
Oxamyl	0	0	n.d.
Propanil	0	0	n.d.
Simazine	74	7	0.52
Terbacil	12	1	0.13
Terbumeton	36	9	1.07
Terbuthylazine	39	8	0.46
Terbutryn	18	0	<0.025
Thiabendazole	5	0	0.03
Thiobencarb	0	0	n.d.
2-Aminobenzimidazole ^a	0	0	n.d.
Desethyl-2-hydroxyterbuthylazine ^a	68	19	0.21
Desethylterbumeton ^a	72	13	1.62
Desethylterbuthylazine ^a	52	8	1.42
Desisopropylatrazine ^a	35	8	0.25
Desisopropyl-2-hydroxyatrazine ^a	5	0	0.04
3,4-Dichloroaniline ^a	0	0	n.d.
2-hydroxysimazine ^a	13	1	0.15
2-hydroxyterbuthylazine ^a	69	13	0.15

^a Transformation products

A total of 85 groundwater samples were analysed by applying two complementary SPE-LC-MS/MS methods [34], with the result that 20 out of the 28 compounds investigated were detected. Triazine herbicides were widely detected (Figure 2B), with simazine being the compound most frequently found in both sampling periods. The maximum triazine levels were $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ for simazine and terbutylazine, and $1.1 \mu\text{g L}^{-1}$ for terbumeton (Table 3).

The results obtained in this work support the interest for including TPs in monitoring programmes. Thus, DIA was the compound most commonly detected in 2000, and when the number of target TPs was increased in 2003, the result was that four out of the five compounds most frequently detected were desethylterbumeton, 2-hydroxyterbutylazine (2-hydroxyTbze), desethyl-2-hydroxyterbutylazine (desethyl-2-OH-Tbze) and desethylterbutylazine (desethylTbze), all of them triazine TPs (Figure 2B). It should be emphasised that these compounds were also the most frequently found at concentrations higher than $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, reaching maximum values of $1.6 \mu\text{g L}^{-1}$ for desethylterbumeton, $0.7 \mu\text{g L}^{-1}$ for desethylTbze, and $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ for 2-hydroxyTbze and desethyl-2-OH-Tbze (Table 3).

The relevance of TPs inclusion is also proven when comparing the average concentration of a parent compound and its TPs. The case of terbutylazine is illustrated in Figure 4, where it can be seen that TP concentrations were generally higher than that of the parent compound. TPs levels exceeded $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ in several wells, even in those where the terbutylazine average concentration was lower than $0.025 \mu\text{g L}^{-1}$, as in sampling points 2 and 5. In some cases, TPs were detected in spite of the fact that parent terbutylazine was absent (wells 3 and 4).

A similar pattern was observed for other triazines (simazine, terbumeton) and their TPs (2-hydroxysimazine and desisopropyl-2-hydroxyatrazine; DIA and desethylterbumeton, respectively). Thus, average simazine concentration in well 1 was $0.07 \mu\text{g L}^{-1}$, while for DIA it was $0.14 \mu\text{g L}^{-1}$. With regard to terbumeton, its degradation product desethylterbumeton was always found at higher concentration than the parent compound. Also, this TP was detected in wells 3 and 4 where terbumeton was not found.

In relation to other compounds also detected in 2000, DIA and bromacil were also found at relevant concentrations during 2003, while MCPA detections were minimised. Bromacil, due to its high water solubility and propensity to leaching, can be found in groundwater overtime [40]. Our data show that positive findings of bromacil exceeded $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ in around 30% of samples, in both 2000 and 2003, with maximum values of $4.5 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.6 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively (Table 2).

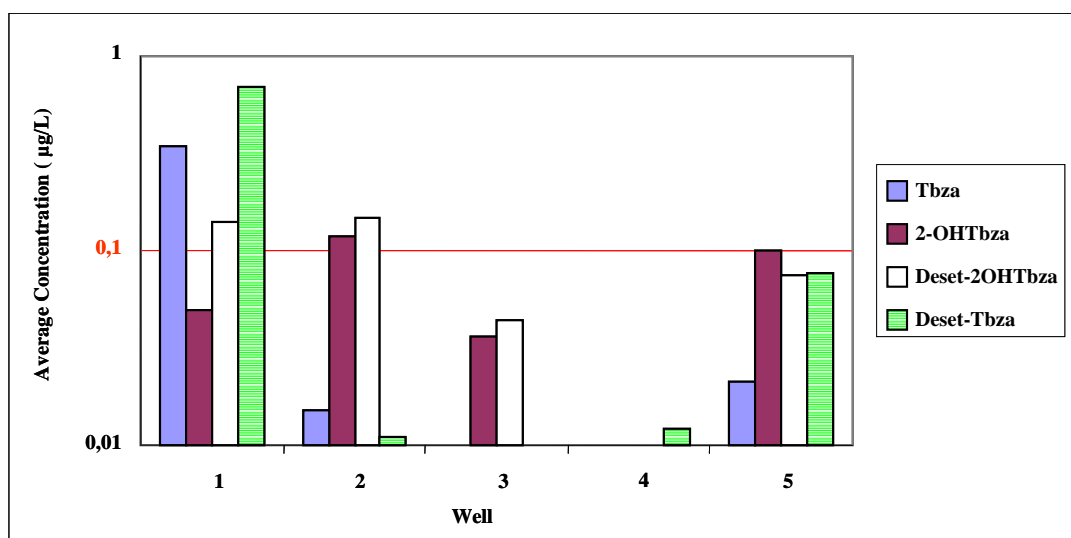


Figure 4. Average concentrations of terbuthylazine and some of its transformation products at every sampling points during 2003.

Wells 1 (Carcaixent) and 2 (Burriana) were again the most polluted sites (Figure 3B). The sum of triazine average concentrations in well 1 was higher than $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$. Positives referred to as 'other herbicides' corresponded to bromacil findings in both wells, close to $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$. As in 2000, no pesticides were detected in well 8, and the sum of parent pesticides concentrations did not exceed $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ in the rest of the sampling points. The relevance of the TP findings is illustrated in Figure 3B, where it can be seen that the 'total pesticide concentration' came mainly from pesticide TPs. No significant variation of pesticide and TP concentrations in any well was observed during the 2003 sampling period.

A more detailed study of data obtained for the 18 common compounds included in both monitoring periods for wells 1 and 2 (the most polluted) shows that the herbicides simazine, terbutometon, terbutryn, diuron, terbacil, and bromacil, and a triazine TP (DIA) were the most commonly detected compounds. In both wells, all these herbicides, except simazine, were found at lower concentrations in 2003. In some cases, a significantly lower average concentration level was observed in 2003, for example from $0.26 \mu\text{g L}^{-1}$ in 2000 to $<0.025 \mu\text{g L}^{-1}$ in 2003 for terbutryn (well 2), or from $0.12 \mu\text{g L}^{-1}$ to $0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ for terbacil (well 1). A similar result occurred for bromacil (both wells), terbuthylazine, terbutometon, and DIA (well 1), where considerable concentration decreases were observed, although levels higher than $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ were still found. Average

simazine and diuron concentrations were always lower than $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ in both wells in both years. A summary is shown in Figure 5 where the concentration decrease over time is observed for both wells, especially well 2, where most of compounds were found at levels lower than $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ in 2003. This decrease in pesticide pollution might be explained by a reduction in the application of these pesticides, an improvement in agricultural practices, or pesticide degradation to non-target metabolites.

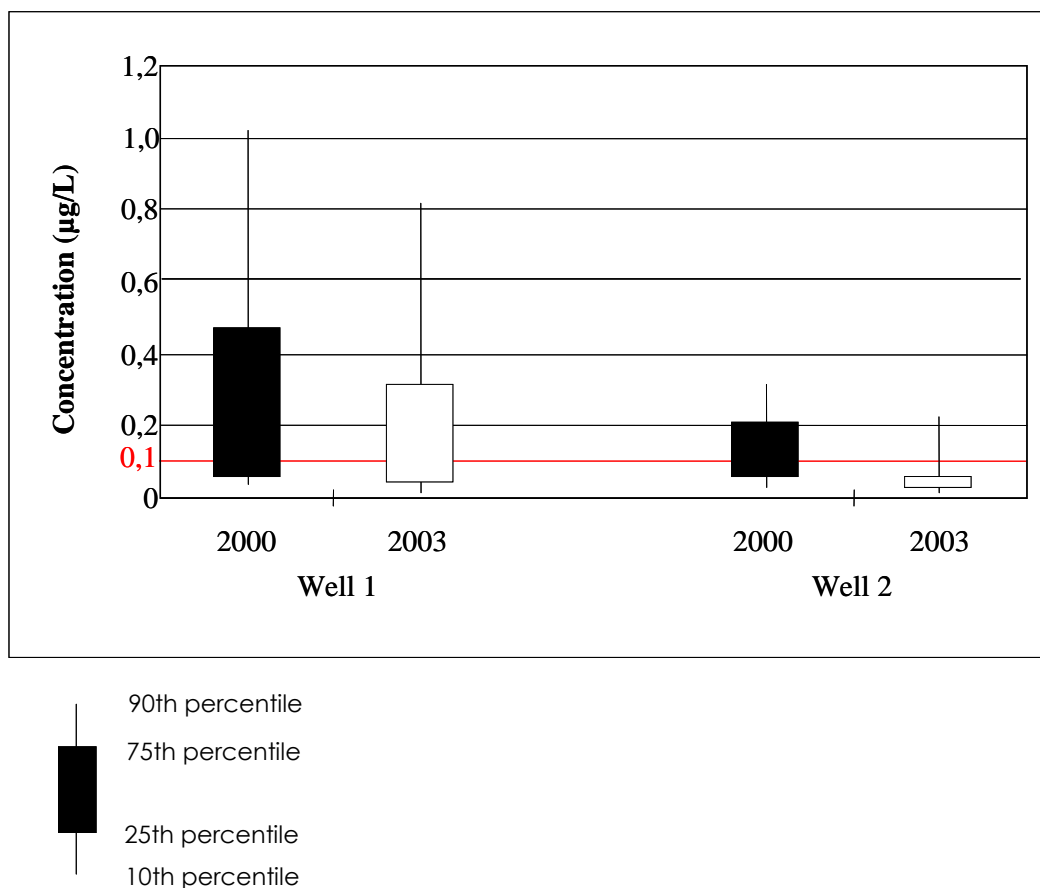


Figure 5. Evolution, over a 3-year period, of the total pesticide concentration in the two most polluted sites. Data correspond to the 18 common compounds monitored in both 2000 and 2003.

Data presented in this paper are limited, as only eight sampling points have been included in monitoring, which obviously do not represent the whole area under study. However, data obtained from the analysis of around 150 samples illustrate how some pesticides and TPs can reach groundwater in areas of intensive agricultural activity. A more complete monitoring

selecting a higher number of wells would be required to have a full overview of the Valencian area.

3.3 Confirmation

In the analysis of samples collected in 2000, only one transition was acquired for both quantification and qualification. The acquisition of an additional transition for confirmation purposes would have required the use of a higher number of channels, requiring longer chromatographic runs to decrease the data points available per peak and considerably decreasing the sample throughput. Confirmation of positives was performed only in those cases where analyte concentration exceeded $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ by re-injecting the samples into the LC-MS/MS system and acquiring one additional transition per analyte.

Samples collected in 2003 were analysed by applying two different SPE-LC-MS/MS methods, in this case acquiring two transitions per compound, which allowed simultaneous quantification and reliable identification of positive findings. The most sensitive transition was used for quantification (Q) and the additional one for confirmation (q). This methodology was feasible due to the reduction in the number of compounds monitored. As an example, Figure 6 shows the SRM chromatograms corresponding to two water samples where two parent herbicides and several of their TPs were detected. All findings were confirmed with compliance of both retention time and Q/q ratio, with those of a reference standard.

In order to compare and confirm several selected findings, around 20 positive samples collected in 2003, with analyte concentrations higher than $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, were re-analysed using an SPE system coupled on-line with an LC-QTOF instrument. This additional confirmation was carried out by recording the product ion spectra of the selected compound. All positives detected and identified by QqQ-MS were also confirmed with QTOF, in this way verifying that the use of two specific transitions in QqQ was a satisfactory approach for reliable identification. The lower sensitivity of our QTOF instrument compared with triple quadrupole working in SRM mode made the confirmation of positives samples at lower concentration levels difficult.

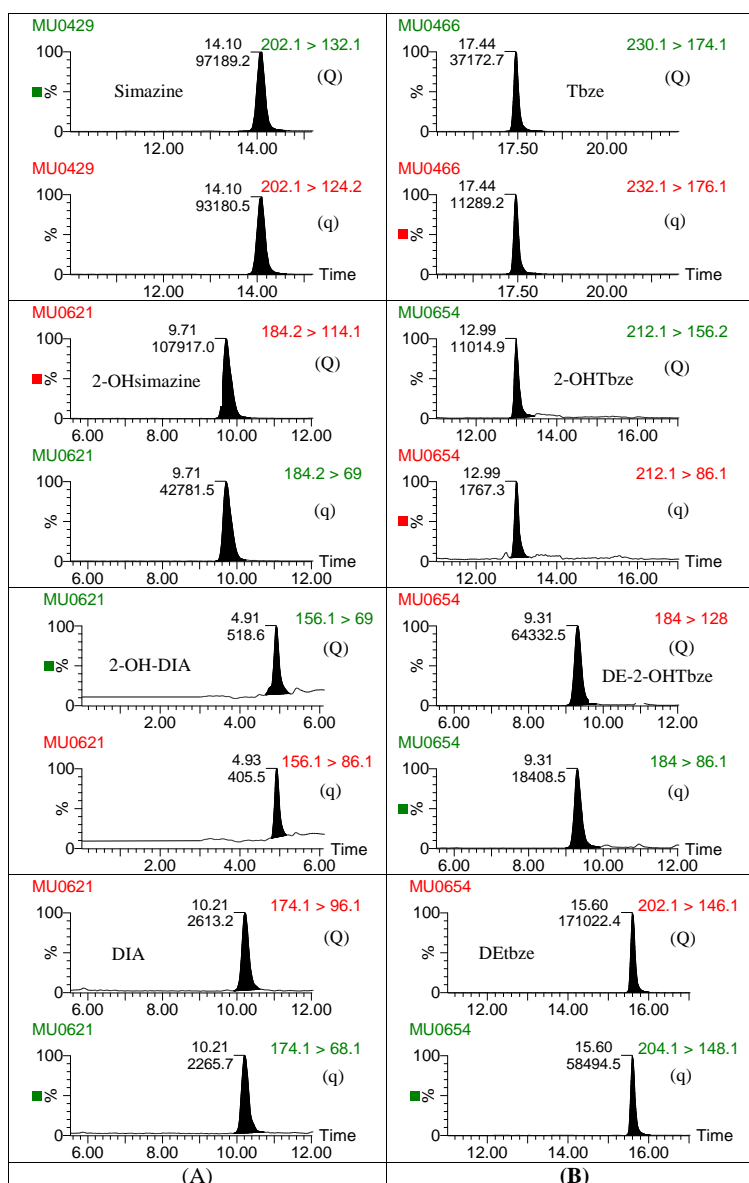


Figure 6. Selected LC-MS/MS chromatograms for positive groundwater samples. (A) Sample collected on 28 October 2003 at well 2 containing simazine at $0.52 \mu\text{g L}^{-1}$, 2-hydroxysimazine (2-OHsimazine) at $0.15 \mu\text{g L}^{-1}$, desisopropyl-2-hydroxyatrazine (2-OH-DIA) at $0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ and desisopropylatrazine (DIA) at $0.19 \mu\text{g L}^{-1}$. (B) Sample collected on 17 December 2003 at well 1 containing terbuthylazine (Tbze) at $0.12 \mu\text{g L}^{-1}$, 2-hydroxyterbuthylazine (2-OHTbze) at $0.03 \mu\text{g L}^{-1}$, desethyl-2-hydroxyterbuthylazine (DE-2-OHTbze) at $0.12 \mu\text{g L}^{-1}$ and desethylterbuthylazine (DEtbze) at $0.43 \mu\text{g L}^{-1}$. (Q) quantification transition; (q) confirmation transition.

4. CONCLUSIONS

Several herbicides have been widely detected in groundwater from the Spanish Mediterranean Region, an important agricultural area with a predominance of citrus crops. Triazines, such as simazine, terbutylazine, terbumeton, and terbutryn, and other herbicides such as bromacil, diuron, or MCPA were frequently found at concentrations around $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ or higher in most of the samples collected during the year (both 2000 and 2003).

The relevance of pesticide TPs inclusion in groundwater monitoring programmes has been demonstrated, as several TPs were found at concentrations higher than that of their parent compounds. Hence, in future works the inclusion of other TPs of widely detected pesticides, such as bromacil, will also be considered.

Although a decrease in pesticide concentrations has been observed from 2000 to 2003, groundwater pollution in the wells tested is still notable. Therefore, good agricultural practices that are sustainable and that respect the environment are required together with intensive monitoring programs that increase our understanding of pesticide interactions in the environment and as a means of regulation. Furthermore, special attention must be paid to those areas where the most contaminated wells are located. A detailed hydrogeological study should be carried out to better understand the high vulnerability of these aquifers to agricultural practices.

Both accurate quantification at low analyte levels and reliable identification of positives findings have been carried out using LC with tandem mass spectrometry and the acquisition of two specific MS/MS transitions. The use of LC-QTOF allowed an additional, unequivocal confirmation of positives in those cases where the analyte concentration exceeded $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to the SCIC of the University of Jaume I for using the LC-MS equipment. This work has been developed under financial support from the Spanish Ministry of Science and Technology (Ref. BQU 2003-02685 and Ref. REN 2002-01818).

REFERENCES

- [1] Scheidleber, A., Grath, J., Winkler, G., Stärk, U., Koreimann, C., Gmeiner, C., Nixon, S., Casillas, J., Gravesen, P., Leonard, J. and Elvira, M. (1999) *Groundwater Quality and Quantity in Europe* pp. 1-123. European Environment Agency, Copenhagen.
- [2] Battaglin, WA, Furlong, ET, Burkhardt, MR and Peter, CJ (1998) *Sci. Total Environ.* **248**, p. 123.
- [3] Kolpin, DW, Thurman, EM and Linhart, SM (2000) *Sci. Total Environ.* **248**, p. 115.
- [4] Kolpin, DW, Schnoebelen, DJ and Thurman, EM (2004) *Ground Water* **42**, p. 601.
- [5] Mills, PC, Kolpin, DW, Scribner, EA and Thurman, EM (2005) *J. Amer. Water Resources Assoc.* **41**, p. 537.
- [6] Spalding, RF, Exner, ME, Snow, DD, Cassada, DA and Burbach, ME (2003) *J. Environ Qual.* **32**, p. 92.
- [7] Wade, HF, York, AC, Morey, AE, Padmore, JM and Rudo, KM (1998) *J. Environ Qual.* **27**, p. 1018.
- [8] Batista, S., Silva, E., Galhardo, S., Viana, P. and Cerejeira, MJ (2002) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **82**, p. 601.
- [9] Caracciolo, AB, Giuliano, G., Grenni, P., Guzzella, L., Pozzoni, F., Bottoni, P., Fava, L., Crobe, A. and Orru, M. (2005) *Environ. Pollut.* **134**, p. 525.
- [10] Cerejeira, MJ, Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valerio, MJ, Silva, A., Ferreira, M. and Silva-Fernandes, AM (2003) *Water Res.* **37**, p. 1055.
- [11] Guzzella, L., Pozzoni, F. and Giuliano, G. (2006) *Environ. Pollut.* **142**, p. 344.
- [12] Lapworth, DJ, Gooddy, DC, Stuart, ME, Chilton, PJ, Cachandt, G., Knapp, M. and Bishop, S. (2006) *Water Environ. J.* **20**, p. 55.
- [13] Papadopoulou-Mourkidou, E., Karpouzas, DG, Patsias, J., Kotopoulou, A., Milothridou, A., Kintzikoglou, K. and Vlachou, P. (2004) *Sci. Total Environ.* **321**, p. 147.
- [14] Silva, E., Batista, S., Viana, P., Antunes, P., Merodio, L., Cardoso, AT and Cerejeira, MJ (2006) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **86**, p. 955.
- [15] Van Maanen, JMS, De Vaan, MAJ, Veldstra, AWF and Hendrix, WPAM (2001) *Environ. Monit. Assess.* **72**, p. 95.
- [16] Carabias-Martinez, R., Rodriguez-Gonzalo, E., Fernandez-Laespada, ME, Calvo-Seronero, L. and Roman, FJ Sanchez-San (2003) *Water Res.* **37**, p. 928.
- [17] Fernandez-Alba, AR, Agüera, A., Contreras, M., Peñuela, G., Ferrer, I. and Barceló, D. (1998) *J. Chromatogr. A* **823**, p. 35.
- [18] Garrido, T., Fraile, J., Niñerola, JM, Figueras, M., Ginebreda, A. and Olivella, L. (2000) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **78**, p. 51.
- [19] Hernández, F., Morell, I., Beltrán, J. and López, FJ (1993) *Chromatographia* **37**, p. 303.

- [20] Quintana, J., Martí, I. and Ventura, F. (2001) *J. Chromatogr. A* **938**, p. 3.
- [21] Isenbeck-Schröeter, M., Bedbur, E., Kofod, MB, König, B., Schram, T. and Mattheb, G. (1997) *Occurrence of Pesticides in Water-Assessment of the Current Situation in Selected EU Countries* Universität Bremen, Berichte — No. 91
- [22] Kolpin, DW, Barbash, JE and Gilliom, RJ (1998) *Environ. Sci. Technol.* **32**, p. 558.
- [23] Belfroid, AC, van Drunen, M., Beek, MA, Schrap, SM, van Gestel, CAM and van Hattum, B. (1998) *Sci. Total Environ.* **222**, p. 167.
- [24] Sinclair, CJ and Boxall, ABA (2003) *Environ. Sci. Technol.* **37**, p. 4617.
- [25] European Council Drinking Water Directive (1998) EC, Brussels — EU 98/83/EC
- [26] Alder, L., Greulich, K., Kempe, G. and Vieth, B. (2006) *Mass Spectrom. Rev.* **25**, p. 838.
- [27] Richardson, SD (2006) *Anal. Chem.* **78**, p. 4021.
- [28] Richardson, SD and Ternes, TA (2005) *Anal. Chem.* **77**, p. 3807.
- [29] Hernández, F., Ibáñez, M., Pozo, OJ and Sancho, JV (2007) *J. Mass Spectrom.* **43**, p. 173.
- [30] Albanis, TA, Hela, DG, Lambropoulou, DA and Sakkas, VA (2004) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **84**, p. 1079.
- [31] Geerdink, RB, Niessen, WMA and Brinkman, UAT (2002) *J. Chromatogr. A* **970**, p. 65.
- [32] Hernández, F., Pozo, OJ, Sancho, JV, López, FJ, Marín, JM and Ibáñez, M. (2005) *Trends Anal. Chem.* **24**, p. 596.
- [33] Kampiotti, AA, da Cunha, ACB, de Alda, ML and Barceló, D. (2005) *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, p. 1815.
- [34] Marín, JM, Sancho, JV, Pozo, OJ, López, FJ and Hernández, F. (2006) *J. Chromatogr. A* **1133**, p. 204.
- [35] Reemtsma, T. (2003) *J. Chromatogr. A* **1000**, p. 477.
- [36] Sancho, JV, Pozo, OJ and Hernández, F. (2004) *Analyst* **129**, p. 38.
- [37] Huang, SB, Mayer, TJ, Yokley, RA and Perez, R. (2006) *J. Agric. Food Chem.* **54**, p. 713.
- [38] Pozo, OJ, Sancho, JV, Ibañez, M., Hernández, F. and Niessen, WMA (2006) *Trends Anal. Chem.* **25**, p. 1030.
- [39] Pozo, OJ, Guerrero, C., Sancho, JV, Ibañez, M., Pitarch, E., Hogendoorn, E. and Hernández, F. (2006) *J. Chromatogr. A* **1103**, p. 83.
- [40] de Barreda Jr, D Gómez, Vila, M Gamón, Rueda, E Lorenzo, Olmo, A Saez, de Barreda, D Gomez, de la Cuadra, J García, Ten, A. and Peris, C. (1998) *J. Chromatogr. A* **795**, p. 125.

2.3.3 Discusión de los resultados del artículo científico 2

Año 2000

En las 75 muestras analizadas, se detectaron 25 de los 47 compuestos monitorizados, siendo los herbicidas, con diferencia, los más frecuentemente detectados (90%). El analito que fue encontrado en mayor número de ocasiones (72% de las muestras) fue un TP de la familia de las triazinas, la desisopropilatrazina (DIA). Tras éste, tanto los herbicidas triazínicos simazina y terbutilazina como el fungicida carbendazima se detectaron en casi la mitad de las muestras analizadas. El rango de concentraciones de los analitos encontrados fue muy amplio, siendo remarcable el hecho de que aproximadamente el 40% de los compuestos detectados fueron, en alguna ocasión, cuantificados por encima de 0.1 µg/L. Dentro de este grupo de compuestos destacan los herbicidas MCPA y bromacilo, así como DIA, los cuales estuvieron por encima de este nivel en más del 50% de las detecciones. Cabe destacar el poco peso de los insecticidas en los positivos detectados, representando menos del 5% de los mismos. Los más comúnmente detectados fueron compuestos relativamente polares como el metidation o el carbofuran.

Entre los pozos controlados en el estudio, destacaron por su elevada contaminación por plaguicidas los situados en Borriana (acuífero costero) y Carcaixent (acuífero cárstico), los cuales se encuentran localizadas en un entorno citrícola altamente explotado durante décadas. La suma de las concentraciones medias obtenidas para los plaguicidas detectados durante los muestreos realizados fue superior a 3 µg/L en Carcaixent, mientras que en Borriana sobrepasó 1 µg/L. Estas elevadas concentraciones en ambos pozos se deben principalmente a la presencia de DIA, triazinas y otros herbicidas, entre los que destaca el bromacilo. En cuanto a los demás puntos de muestreo, el comportamiento sigue las mismas pautas en lo que se refiere a los analitos más encontrados (herbicidas), aunque la suma de sus concentraciones medias, excepto en el pozo de Benicassim, no sobrepasaron los 0.1 µg/L. Cabe destacar positivamente el punto de muestreo localizado en Alboraiá, junto a enormes campos de cultivo de chufa, ya que éste nunca presentó ninguna

detección de los plaguicidas estudiados. Este hecho puede deberse a que se realizan pocos tratamientos fitosanitarios y con dosis muy ajustadas, ya que son pocas las plagas que afectan al cultivo de chufa. Pese a ésto, existe la posibilidad de que en dicha zona se emplearan otros productos fitosanitarios no incluidos en nuestro método multirresidual. Aún así, la ausencia de detecciones de herbicidas típicos como las triazinas o el bromacilo es un dato significativo, además de muy positivo.

Año 2003

En esta campaña se analizaron 85 muestras, en las que se detectaron 20 de los 28 analitos investigados. Tal y como sucediera en el anterior periodo de muestreo, los herbicidas triazínicos fueron los más detectados, destacando la simazina, con más de un 70% de muestras positivas, y la terbumetona y terbutilazina que rondaron el 40%. Además de refrendar los resultados obtenidos en el periodo anterior, así como los obtenidos por otros grupos de investigación respecto a la importancia de controlar los herbicidas por su mayor riesgo para contaminar las aguas, los datos obtenidos prueban la importancia de la inclusión de los TPs en los programas de vigilancia. En este sentido, 7 de los 9 TPs estudiados fueron encontrados, siendo cuatro de ellos, tras la simazina, los analitos más frecuentes en las muestras analizadas. Además, dos de ellos (desetilterbumetona y desetilterbutilazina) fueron los compuestos encontrados a mayor concentración (1,62 y 1,42 µg/L). En todos los pozos controlados, excepto el situado en Alboraiá, tal y como ya sucediera en 2000, se obtuvieron positivos de herbicidas triazínicos y de sus TPs. Si comparamos las detecciones reportadas para cada punto de muestreo, se observa que el porcentaje aportado por los TPs es siempre superior al 60% de la concentración total, llegando incluso al 90% en el pozo localizado en Benicassim. En cuanto a los niveles encontrados, tan sólo en el pozo de Benicarló la concentración media de las triazinas identificadas superó ligeramente a la de sus TPs. La necesidad de incluir TPs se pone también de manifiesto en casos concretos como el de la terbumetona. Este analito fue detectado en 3 de los 8 pozos, observándose en todos ellos que la concentración media de su TP, la desetilterbumetona, fue siempre superior a la suya. Además, en otros dos

emplazamientos (Benicassim y Benicarló), se detectó en varias ocasiones el TP y nunca el plaguicida. El mismo comportamiento fue corroborado para otros analitos cuyos TPs también fueron investigados (terbutilazina y simazina).

Respecto a otros analitos de interés, como bromacilo, DIA o MCPA, detectados habitualmente a concentraciones superiores a 0.1 µg/L en la campaña de 2000, se continúa observando su presencia en las aguas. Sin embargo, así como el bromacilo parece continuar en la misma línea en cuanto a frecuencia de detección y niveles de concentración (muchos positivos > 0.1 µg/L), el DIA y, sobretodo, el MCPA se han detectado menos veces y a menor concentración. Cabe señalar los altos niveles de bromacilo encontrados en diversos puntos de muestreo, destacando entre ellos los pozos de Borriana y de Benicarló. Dicho herbicida, además de ser, con diferencia, el plaguicida detectado más frecuentemente en estos puntos de muestreo, aporta más de un tercio del total de la suma de las concentraciones de todos los analitos.

Los pozos de Borriana y Carcaixent continúan siendo con diferencia los más contaminados. Así, la suma de las concentraciones medias para los compuestos detectados fue superior a 3.9 µg/L en Carcaixent, mientras que en Borriana se quedó en 0.9 µg/L. En el resto de emplazamientos controlados dicha suma no sobrepasó los 0.1 µg/L. El pozo de Alboraiá continuó sin presentar detecciones para los analitos estudiados. Tal y como sucediera en el muestreo del año 2000, no se observaron variaciones significativas en las concentraciones de los plaguicidas y de los TPs en ninguno de los pozos durante los meses que duró el estudio.

2000 vs 2003

Para estudiar la evolución temporal de la presencia de plaguicidas en las aguas subterráneas analizadas, se compararon los resultados correspondientes a 18 compuestos comunes analizados en los dos periodos de muestreo.

Hay que diferenciar entre los pozos de Carcaixent y Borriana (más contaminados) y el resto de puntos de muestreo. En los pozos menos contaminados, la

suma de las concentraciones medias de plaguicidas en el año 2003 es ligeramente superior a la de 2000. Cabe destacar que los niveles encontrados fueron relativamente bajos, ya que la suma de las concentraciones no superó en ninguno de los casos los 0.16 µg/L obtenidos para el pozo de Benicassim. En cambio, esta tendencia se invierte en los pozos más contaminados, ya que se observa una clara disminución de la contaminación en 2003. En ambas localizaciones los compuestos más frecuentemente detectados son coincidentes, y en general se encuentran presentes a concentraciones menores en el segundo periodo de muestreo (2003). Así, mientras la suma de concentraciones medias en el 2000 fue de 3.04 y 1.05 µg/L en Carcaixent y Borriana, respectivamente, en 2003 disminuyeron casi a la mitad, obteniéndose valores de 1.88 y 0.61 µg/L. En el pozo de Borriana la mayoría de los analitos fueron cuantificados por debajo de 0.1 µg/L durante el año 2003, siendo reseñable el herbicida terbutrina que pasó de un valor medio cercano a 0.2 µg/L en 2000 a estar por debajo de 0.025 µg/L en 2003. En este emplazamiento, las máximas concentraciones en ambos periodos fueron obtenidas para el herbicida bromacilo, siendo de 1.75 y 1.19 µg/L en 2000 y 2003, respectivamente. Respecto al pozo de Carcaixent, son habituales en ambos periodos las detecciones por encima de 0.1 µg/L, destacando la terbumetona, la cual fue cuantificada siempre por encima de este nivel de concentración llegando a alcanzar 3.68 y 2.67 µg/L en 2000 y 2003, respectivamente. La disminución general de la contaminación en ambos pozos puede ser debida a diversos factores tales como la reducción de la aplicación de estos compuestos al utilizar otros productos de acción similar, o mejoras en las prácticas agrícolas de la zona, entre otros.

Paralelamente a las aguas subterráneas, también se llevaron a cabo muestreos de aguas superficiales en localizaciones de interés ecológico y susceptibles de ser contaminadas por productos fitosanitarios. De este modo, durante el año 2000 se controlaron zonas rodeadas de explotaciones agrícolas, mayoritariamente citricolas (Clot de la Mare de Déu de Borriana y el Estany de Almenara) o arroceras (La Albufera de València). En la campaña del año 2003 se añadieron al estudio, siguiendo el mismo criterio, otras zonas de interés (Riu Verd en Massalavés, Marjal de Pego-Oliva o el Molí

La Font situado en el marjal de Castelló de la Plana). Entre los dos periodos de muestreo se analizaron más de 100 muestras de agua superficial.

Durante el año 2000, los herbicidas fueron de nuevo los analitos más frecuentemente encontrados en las aguas superficiales, constituyendo aproximadamente un 60% del total de las detecciones. Se encontraron niveles considerables de algunos de ellos, predominantemente triazinas en la zona citrícola, y molinato y MCPA en la Albufera. Como ejemplo, en las muestras del Clot la concentración total de herbicidas nunca estuvo por debajo de 2 µg/L. Mientras que en el Clot de Borriana y el Estany de Almenara la detección de triazinas parecía no depender de la época del año, en la Albufera sí que se obtuvieron más positivos, y a mayor concentración, coincidiendo con los periodos de aplicación. Durante el año 2003 se confirmó la tendencia observada, obteniéndose además muchos positivos de productos de transformación triazínicos, que fueron en muchas ocasiones más frecuentemente detectados que sus precursores. Así, mientras que la terbutilazina se encontró en el 60% de las muestras analizadas, sus tres TPs se encontraron en un 84% (2-hidroxiterbutilzaina), 80% (desetil-2-hidroxiterbutilzaina) y 70% (desetilterbutilzaina). La terbumetona fue reportada en el 23% de las muestras y la desetilterbumetona lo hizo en un 67%. En comparación con las aguas subterráneas, los niveles de concentración para los TPs encontrados fueron inferiores, siendo la concentración máxima de 0.20 µg/L (desetilterbumetona en el Estany). Cabe destacar los altos niveles de 3,4-dicloroanilina obtenidos en La Albufera y el marjal de Pego-Oliva en 2000 y 2003, obteniéndose concentraciones de hasta 4.0 µg/L y 9.9 µg/L, respectivamente. Este compuesto se incluyó en los análisis por tratarse de un metabolito del herbicida diuron, obteniéndose por hidrólisis del grupo urea. Sin embargo, la 3,4-dicloroanilina puede formarse también a partir de otros compuestos, lo cual podría justificar que en estas muestras nunca se detectara diuron. Es destacable el caso del herbicida bromacilo que pasó de ser detectado en casi la mitad de las muestras de agua subterránea, y a niveles por encima de 0.1 µg/L en más de un 60% de los casos, a tan solo encontrarse en menos de un 10% de las muestras superficiales, en las que el 75% estaba por debajo de 0.1 µg/L. Los resultados obtenidos pueden ser lógicos, ya que los herbicidas son

compuestos generalmente móviles, por lo que aplicados directamente en el suelo parece asegurado su lixiviado hacia los acuíferos, bien como tales o en su forma degradada dependiendo de las condiciones del medio (suelo, temperatura, microorganismos,...). Además, el efecto dilutivo de las grandes superficies de aguas superficiales (ríos, lagos, estanques,...) suele ser mayor al de las aguas subterráneas en las cuales, tal y como se ha comprobado en este estudio, el nivel de contaminación por plaguicidas permanece prácticamente constante en el tiempo, mientras que en las superficiales las mayores concentraciones se han obtenido coincidiendo con las épocas de aplicación.

Pese a que los datos que se presentan en este artículo son insuficientes a la hora de realizar una extrapolación a un territorio tan grande en superficie como la Comunidad Valenciana, ya que tan solo han sido controlados pozos en ocho localizaciones, sí que se puede concluir con las más de 150 muestras analizadas que los TPs deben ser tenidos en cuenta en programas de control futuros por su elevado potencial para contaminar las aguas subterráneas. Además, también ha quedado demostrado el impacto negativo sobre los acuíferos que tiene el empleo de la agricultura intensiva convencional basada en productos de síntesis química. Así, en los lugares con mayor actividad agrícola se han encontrado importantes contaminaciones de los acuíferos, haciéndose necesaria la implantación de medidas para revertir esta situación. En este sentido, y con ayuda de la administración valenciana, los agricultores están empezando a adoptar cambios en sus hábitos a la hora de proteger sus cultivos frente a plagas y/o enfermedades con tal de asegurar sus cosechas aproximándose a la filosofía de la producción integrada. En ella, se opta por medidas de carácter preventivo más respetuosas con el medio ambiente y tan solo se permite el uso de compuestos de baja toxicidad cuya aplicación no está regida por calendarios de tratamiento rutinarios, sino utilizados tan solo en caso de necesidad por la aparición de la plaga o enfermedades en los cultivos, que no hayan podido ser controlados con otras medidas "no químicas".

2.4 Determinación de contaminantes orgánicos prioritarios en aguas procedentes de una planta de residuos sólidos urbanos mediante extracción en fase sólida en línea con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Estudio del efecto de la matriz.

2.4.1. Introducción

Una de las vías por la que los plaguicidas, así como muchos otros contaminantes orgánicos, pueden llegar a las aguas es a través de las aguas residuales procedentes de plantas de residuos sólidos urbanos⁸⁵. Por ello, las "aguas" procedentes del lixiviado de los desechos acumulados son tratadas en sistemas de depuración, basados generalmente en procesos de ósmosis inversa, antes de ser vertidas al medio ambiente. Para conocer la efectividad de estos sistemas se precisa metodología analítica avanzada capaz de llevar a cabo el análisis tanto de muestras de aguas depuradas como brutas lixiviadas, cuya elevada carga orgánica y suciedad van a dificultar la determinación de los analitos^{66,87,89,94,120}.

Como ya se ha comentado con anterioridad, para solventar los indeseables efectos de los interferentes de la matriz que compiten con los analitos en el proceso de ionización provocando supresiones o exaltaciones de la señal, se pueden utilizar diversas aproximaciones. De modo general y en particular en el análisis de aguas, la preferida por la mayoría de los autores se basa en el uso de analitos marcados isotópicamente¹²⁰⁻¹²¹ ya que su semejanza estructural hará que analito y marcado coeluyan y se ionicen al mismo tiempo, siendo presumible que los interferentes de la matriz provoquen en ellos los mismos efectos o muy parecidos, facilitando así la corrección ideal en el proceso de cuantificación. Los principales hándicaps que presenta dicha solución son tanto la falta de disponibilidad comercial del analito marcado, así como el prohibitivo coste de muchas de estas sustancias. Además, a medida que aumenta la multiresidualidad del método este doble problema se agrava. Por eso, sin abandonar esta filosofía de trabajo se buscan otras alternativas cuyo coste económico sea asumible sin comprometer en demasía la fiabilidad de los datos reportados. Para el análisis de aguas, muchos autores se decantan por el empleo de análogos estructurales^{108,122} como patrones internos pese a que con esta decisión se incrementa el riesgo de incurrir en errores a consecuencia de la disparidad de comportamiento de estos compuestos respecto al analito^{107,108}. Otras posibles soluciones pueden ser un mayor tratamiento de muestra con tal de reducir o eliminar

los interferentes de la matriz¹⁰⁹, así como la cuantificación mediante el método de adiciones estándar¹²³, aunque conllevan un mayor consumo de tiempo que puede desvirtuar uno de los puntos más fuertes del análisis por LC-MS/MS como es la rapidez. La aplicación de calibrados en matriz está ligada a la existencia de muestras blanco representativas, constituyendo una de las opciones preferidas para el análisis de muestras vegetales¹²⁴. En cambio, dicha aproximación es casi imposible en el análisis de aguas mediambientales como consecuencia de la enorme complejidad y variabilidad de estas matrices, incluso en muestras del mismo tipo. Por último, tal y como se presenta en este trabajo, cuando la sensibilidad del método es elevada, con el fin de homogeneizar las matrices y facilitar una correcta cuantificación independientemente del tipo de muestra y de su carga de matriz, se puede llevar a cabo la dilución de las muestras o de sus extractos con agua HPLC¹²⁵.

En el presente estudio fueron seleccionados diversos compuestos incluidos, en su mayoría, en el Anexo X de la Directiva Marco 2000/60/EC¹¹² referido a sustancias prioritarias peligrosas en el ámbito de la política de aguas de la UE. Además de compuestos polares, poco apropiados para ser determinados por GC, también se seleccionaron otros de polaridad intermedia, con el fin de evitar las etapas de tratamiento de muestras asociadas al análisis por GC-MS ya disponible en nuestro laboratorio.

El trabajo que se presenta a continuación, **artículo científico 3**, muestra el desarrollo y validación de metodología analítica basada en SPE "on-line" con LC-MS/MS y su aplicación a muestras brutas de lixiviado y depuradas procedentes de la planta de tratamiento de residuos sólidos urbanos de Onda (Castellón). También se ha estudiado el efecto matriz en aguas superficiales, subterráneas y procedentes de la depuradora. Además, el método fue optimizado adquiriendo varias transiciones por compuesto para, en una sola inyección, asegurar la identificación fiable de los positivos encontrados.

2.4.2 Artículo científico 3

"Quantification and confirmation of priority organic micropollutants in water by LC-tandem mass spectrometry"

Elena Pitarch, José M. Marín, Francisco J. López, Elbert Hogendoorn y Félix Hernández.

International Journal of Environmental and Analytical Chemistry, 87 (2007) 237-248.

Intern. J. Environ. Anal. Chem.
Vol. 87, No. 4, 10 April 2007, 237-248



Quantification and confirmation of priority organic micropollutants in water by LC-tandem mass spectrometry

ELENA PITARCH[†], JOSÉ M. MARIN[†], FRANCISCO LOPEZ[†],
ELBERT HOGENDOORN[‡] and FELIX HERNÁNDEZ^{*†}

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

[‡]Laboratory for Analytical Chemistry, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands

(Received 24 May 2006; in final form 23 October 2006)

Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with a triple quadrupole analyser was used to determine selected (medium) polar organic pollutants—isonitrofurantoin, diuron and pentachlorophenol, as the herbicides simazine, atrazine, terbuthilazine, alachlor, and metolachlor—in treated water from urban solid-waste leachates. Two millilitres of water was preconcentrated by on-line trace enrichment (solid-phase extraction liquid chromatography) which allowed rapid analysis, but still with a satisfactory sensitivity, as the limits of quantification were $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$, while the limits of detection were in the range of $0.001\text{--}0.01 \mu\text{g L}^{-1}$. Confirmation of the identity of compounds was ensured by the use of two tandem mass spectrometry transitions. Moreover, a study of matrix effects was thoroughly investigated by applying the developed procedure to different ground and surface waters. A simple dilution of the water sample with high-performance-liquid-chromatography-grade water was sufficient to minimize and/or remove this undesirable effect in all water samples tested, this approach being feasible due to the excellent sensitivity of the method.

Keywords: Organic pollutants; Water analysis; Municipal solid waste leachates; LC-MS; Matrix effects; Tandem mass spectrometry

1. Introduction

Nowadays, many organic contaminants can be present in environmental water, normally at the $\mu\text{g L}^{-1}$ level or below [1, 2]. One of the routes for the contaminants to enter into the aquatic environment is from municipal solid waste landfill leachates. These leachates frequently contain a variety of hazardous chemicals which may cause severe biological effects in the aquatic environment, as many of the identified compounds are highly toxic or even carcinogenic [2-5]. Therefore, efficient treatment of landfill leachates is required, and monitoring of organic pollutants is compulsory to assure the water quality after treatment.

*Corresponding author. Fax: +34-964-387368. Email: hernandf@exp.uji.es

INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY

Intern. J. Environ. Anal. Chem. 2007; **87**: 237–248

Received: 24 May 2006; Accepted: 23 October 2006; Published online in Taylor & Francis

(www.informaworld.com) DOI: 10.1080/03067310601087809

Quantification and confirmation of priority organic micropollutants in water by LC-tandem mass spectrometry

Elena Pitarch, José M. Marín, Francisco J. López, Elbert Hogendoorn*, Félix Hernández

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n E-12071 Castellón, Spain

*Laboratory for Analytical Chemistry, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM),

Bilthoven, The Netherlands

ABSTRACT

Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with a triple quadrupole analyser was used to determine selected (medium) polar organic pollutants—*isoproturon*, *diuron* and *pentachlorophenol*, as the herbicides *simazine*, *atrazine*, *terbuthilazine*, *alachlor*, and *metolachlor*—in treated water from urban solid-waste leachates. Two millilitres of water was preconcentrated by on-line trace enrichment (solid-phase extraction liquid chromatography) which allowed rapid analysis, but still with a satisfactory sensitivity, as the limits of quantification were $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$, while the limits of detection were in the range of 0.001 - $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$. Confirmation of the identity of compounds was ensured by the use of two tandem mass spectrometry transitions. Moreover, a study of matrix effects was thoroughly investigated by applying the developed procedure to different ground and surface waters. A simple dilution of the water sample with high-performance-liquid-chromatography-grade water was sufficient to minimize and/or remove this undesirable effect in all water samples tested, this approach being feasible due to the excellent sensitivity of the method.

KEYWORDS

Organic pollutants; Water analysis; Municipal solid waste leachates; LC-MS; Matrix effects; Tandem mass spectrometry

*Correspondence to Félix Hernández, Jaume I. E-mail: hernandf@exp.uji.es

1. INTRODUCTION

Nowadays, many organic contaminants can be present in environmental water, normally at the $\mu\text{g L}^{-1}$ level or below [1, 2]. One of the routes for the contaminants to enter into the aquatic environment is from municipal solid waste landfill leachates. These leachates frequently contain a variety of hazardous chemicals which may cause severe biological effects in the aquatic environment, as many of the identified compounds are highly toxic or even carcinogenic [2-5]. Therefore, efficient treatment of landfill leachates is required, and monitoring of organic pollutants is compulsory to assure the water quality after treatment.

Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) has been the major adopted analytical technique to perform multiresidue monitoring of semi-volatile compounds [6, 7]. Nowadays, enrichment via non-selective solid-phase extraction (SPE) using relatively low sample volumes followed by GC-MS, or even better, GC coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS), is the preferred approach for GC-amenable organic micropollutants. The high separation efficiency and the suitability of GC-MS for identification/confirmation of compounds is also widely accepted [8].

For more polar, less or non-GC-amenable contaminants, liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) with the appropriate choice of atmospheric pressure ionization interfaces (API) is increasing in environmental trace-level analysis, drastically changing the analytical methods used to detect polar pollutants in water [9, 10]. However, there is growing awareness and experimental evidence that matrix present in the samples may affect the ionization of the target analytes and may result in erroneous LC-MS quantification. Interesting approaches to compensate or to remove matrix effects in environmental samples have been reviewed recently [9]. Several authors have reported comprehensive reviews discussing the perspectives of the LC developments and their impact on current and future applications in pesticide trace analysis [11] or dealing with the complementarity of LC- and GC-based techniques for the trace-level determination of pesticides and their transformation products in water [8].

In order to improve sensitivity as well as selectivity in LC-MS-based methods, a trace enrichment step is commonly applied in the processing of water samples. On-line SPE is frequently chosen for this purpose, as it is a simple way of preconcentration and also of removing some interferences present in the matrix with very little sample manipulation. The combination of on-line SPE with tandem mass spectrometric detection (SPE-LC-MS/MS) has proven to be a powerful

approach for the direct, sensitive, and selective multiresidue analysis for both medium polar and polar compounds [12-19] and has been successfully applied for this purpose at our laboratory [12, 17-19].

The multiresidue determination of 55 organic contaminants in treated water has been carried out in our laboratory by the complementary use of GC-MS and LC-MS. Provided that the determination of low-polarity compounds by GC-MS has been largely studied in the bibliography, the work presented in this article is focused only on the development of SPE-LC-MS/MS methodology for the determination of eight polar and medium-polar contaminants in water, selected among the pollutants monitored, while the rest of the analytes have been determined by a conventional GC-MS procedure.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents and chemicals

Standards were purchased from Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Individual stock solutions (generally around 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared by dissolving standards in acetone and stored in a freezer at -20°C . For LC analysis, solutions were diluted in methanol or high-performance-liquid-chromatography (HPLC)-grade water.

Acetone (pesticide-residue analysis), acetonitrile, and methanol (HPLC grade) were purchased from Scharlab (Barcelona). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead Newton, MA). Ammonium acetate (Scharlab) was of reagent-grade.

2.2. Samples

Treated water samples were collected between May 2003 and November 2004, from urban solid-waste leachates that were treated in RECIPLASA, a municipal treatment plant sited in Onda (Castellón, Spain). The general waste landfill leachate treatment consisted of a reverse-osmosis process.

Groundwater and surface-water samples used to check matrix effects were collected at different sites from the Comunidad Valenciana between April and November 2003.

2.3. LC-MS instrumentation

The HPLC system interfaced to the mass spectrometer was based on a 233XL autosampler with a loop of 2000 μL (Gilson, Villiers-le-Bel, France) and two pumps: an Agilent 1100 (Agilent, Waldbron, Germany) binary pump as P-1 and a Waters Alliance 2690 (Waters, Mildford, MA) quaternary pump as P-2. The system has been described in more detail in our previous work [12]. The SPE preconcentration was performed using a cartridge C_{18} , 10 x 2 mm, 5 μm (Teknokroma, Barcelona) used as C-1. For the LC separation, a Kromasil C_{18} column 125 x 2 mm, 5 μm (Scharlab, Barcelona) was used as C-2. The mobile phases were water and acetonitrile in P-1, and a mixture of methanol-water (5 mM ammonium acetate in both solvents) in P-2. The linear gradient used in P-2 was as follows: 0 min, 30%; 1 min, 30%; 12 min, 90%; 13 min, 90%; 14 min, 30%; 20 min, 30% at a flow rate of 0.3 mL min^{-1} .

A Quattro LC (triple quadrupole) mass spectrometer with an orthogonal Z-spray-electrospray interface (Micromass, Manchester, UK) was used. The drying gas and nebulizing gas was nitrogen generated from pressurized air in an NG-7 nitrogen generator (Aquilo, Etten-Leur, The Netherlands). The nebulizer gas flow was set to approximately 80 L h^{-1} and the desolvation gas flow to 800-900 L h^{-1} . Infusion experiments were performed using a Model 11 single syringe pump (Harvard, Holliston, MA), directly connected to the interface.

For operation in MS/MS mode, the collision gas was 99.995% argon (Carbueros Metalicos, Valencia, Spain) with a pressure of 1×10^{-3} mbar in the collision cell. Capillary voltages of 3 and 3.5 kV were used in the negative and positive ionization mode, respectively. The interface temperature was set to 350°C, and the source temperature to 120°C. Dwell times of 0.1 s scan^{-1} were chosen.

2.4. SPE-LC-MS/MS procedure

SPE C_{18} cartridges were sequentially conditioned with acetonitrile for 3 min, followed by 3 min with water using P-1 (flow rate of 1 mL min^{-1}). The water sample (2 mL) was then preconcentrated on-line in the cartridge using water as mobile phase in P-1 (1 mL min^{-1}). Then, it was washed with 3 mL of HPLC water. After washing, the analytes were backflushed and transferred to the analytical column (C-2), using a P-2 pump, to perform the chromatographic separation. Standards used for quantification were also preconcentrated on-line using the same SPE-LC procedure as for samples.

The determination was carried out by MS/MS under optimized conditions that are shown in table 1. A solvent delay of 8 min was included in the MS/MS programme to avoid contamination of the source.

Table 1. Mass spectrometry optimized parameters for the LC-MS/MS determination of selected herbicides and pentachlorophenol.

Compounds	Transition used ^a	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Cone voltage (V)	Q/q ratio	Number of IPs [23]	LOD (ngL ⁻¹)
Simazine	Q	202	132	20	30		4	6
	q	202	124	20	30	1.5		
Atrazine	Q	216	174	15	35		4	2
	q	216	96	15	35	2.2		
Isoproturon	Q	207	72	15	25		4	1
	q	207	165	15	25	3.7		
Diuron	Q	233	72	18	25		5	2
	q	235	72	18	25	1.5		
Terbutylazine	Q	230	174	15	30		5	1
	q	232	176	15	30	3.6		
Pentachlorophenol ^b	Q	265	265	15	45		3	10
	q ₁	267	267	15	45	1.9		
	q ₂	263	263	15	45	2.1		
Alachlor	Q	270	238	10	10		5	10
	q	238	162	18	25	0.9		
Metolachlor	Q	284	252	15	25		4	3
	q	284	176	25	25	1.8		

^aQ: quantification; q: confirmation

^bAll analytes were measured in ESI positive mode, with the exception of pentachlorophenol, which was measured in ESI negative mode.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. General considerations

Around 50 organic pollutants in treated water samples from municipal solid-waste leachates were determined. Target analytes included were: (1) non-polar compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and organochlorine pesticides; and (2) a number of more polar and medium-polar compounds, e.g. triazine herbicides, some organophosphorus pesticides, phenylurea herbicides, alachlor, or pentachlorophenol. Several of these compounds are relevant in the field of water policy of the European Union, and in fact are included in Annex X of the Directive 2000/60/EC [20].

Although the majority of analytes selected were determined by GC-MS, due to their low polarity and sufficient volatility, our aim was not to investigate the GC-MS methodology but simply to apply conventional (solvent extraction) procedures based on the literature [21]. Thus, our research was focused on the development of LC-MS/MS methodology for several compounds. LC-MS/MS method was first developed only for the determination of the polar, less-amenable GC compounds, pentachlorophenol, diuron and isoproturon. In order to investigate the possibility of using LC-MS instead of GC-MS, the LC-MS/MS method was further optimized to also include several medium-polar GC amenable compounds, finally selecting eight analytes that were used as model compounds for a detailed study. Changing GC-MS by LC-MS/MS for the determination of medium-polar compounds gave us an opportunity to simplify sample pretreatment, as then GC-MS would be applied only to non-polar compounds, while the rest of the analytes could be determined by LC-MS/MS after a simple on-line trace enrichment with (almost) no sample manipulation.

3.2. LC-MS/MS procedure for treated water analysis

3.2.1 LC-MS/MS optimization

The full-scan mass and the MS/MS spectra of the compounds determined by SPE-LC-MS/MS were obtained from infusion of $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of 50 : 50 methanol-water individual standard solutions at a flow rate of $10 \mu\text{L min}^{-1}$.

The mass spectrometry parameters selected and the precursor and product ions are shown in table 1. The two most intense transitions were normally selected for each compound: one for quantification and the other for confirmation. For a reliable confirmation, the intensity ratio between both transitions was calculated, and a deviation of $\pm 20\%$ was accepted to consider a finding as positive. Pentachlorophenol presented a MS/MS spectrum without abundant fragments. Thus, three precursor ions were selected according to its chlorine pattern, at m/z 263, 265, and 267. With an appropriate low collision energy (15 eV), these precursor ions were also measured as product ions trying to break possible interferences preserving the analyte molecule [12].

On-line trace enrichment (SPE-LC) was carried out using a C_{18} preconcentration cartridge and selecting 3 mL of HPLC water as the washing volume. As regards optimization of the elution and chromatographic separation of the analytes, different gradients of methanol:water and acetonitrile:water (5 mM ammonium acetate in both solvents) were

checked. Methanol:water was finally selected because it provided a good peak shape for all the analytes, especially for pentachlorophenol and alachlor.

Under the experimental conditions selected (see section 2), the total chromatographic run from sample injection to the last peak elution was 17 min. This time included the first 8 min of solvent delay where the column eluate was sent to waste to avoid the contamination of the ionization source. The total analysis time per sample subjected to the overall analytical procedure, i.e. including on-line trace enrichment and LC-MS/MS analysis, was around 18 min, as the cartridge conditioning and SPE process for a sample overlapped (partly) with the chromatographic analysis of the previous sample.

Linearity was evaluated by means of calibration curves prepared by analysing standard solutions by triplicate in the same way as for samples, i.e. after SPE-LC-MS/MS. The concentration range studied was 10-1000 ng L⁻¹ (seven concentration levels), and the correlation coefficients were better than 0.99 for all compounds. Limits of detection were estimated from the chromatograms of the most diluted standards analysed and ranged between 1 and 10 ng L⁻¹ (table 1).

3.2.2 Validation study

Validation of the developed SPE-LC-MS/MS method was carried out in blank treated water spiked at two concentration levels (50 and 500 ng L⁻¹). The results (table 2) were satisfactory with recoveries of 70-110%, except for atrazine (56%) at the lowest level assayed. Precision (repeatability) was in general better than 15 and 20% for the highest and the lowest concentration level tested, respectively. Intermediate precision (precision between days) was also studied, performing analyses at three different days ($n = 3$, each day) with blank treated water spiked at both concentration levels. As can be seen in table 2, the relative standard deviations (RSD) were better than 20% in all cases, and the average recoveries were satisfactory (most of them in the range of 70-100%) demonstrating the robustness of the method. The limit of quantification (LOQ) objective, defined as the lowest concentration level for which the method was validated, with satisfactory recoveries (70-110%) and precision (<20%), was 0.05 µg L⁻¹ for all compounds. The limits of detection (LOD), calculated as the concentration giving a peak of three times the signal-to-noise ratio in the chromatograms obtained at the LOQ level, were in the range of 1-10 ng L⁻¹.

Table 2. Repeatability and reproducibility of the SPE-LC-MS/MS procedure in treated water spiked at two concentration levels: mean recoveries and relative standard deviation (in parentheses).

	0.05 µg L ⁻¹		0.5 µg L ⁻¹	
	Repeatability (n=5)	Reproducibility (n=9) ^a	Repeatability (n=5)	Reproducibility (n=9) ^a
Simazine	70 (16)	84 (18)	74 (5)	77 (11)
Atrazine	56 (16)	69 (17)	83 (8)	80 (12)
Isoproturon	95 (11)	96 (9)	90 (7)	90 (6)
Diuron	88 (20)	104 (16)	84 (15)	87 (7)
Terbutylazine	76 (12)	77 (11)	87 (9)	90 (15)
Pentachlorophenol	90 (13)	89 (19)	108 (10)	100 (14)
Alachlor	88 (20)	103 (4)	87 (16)	93 (9)
Metolachlor	88 (12)	96 (13)	83 (16)	92 (9)

^a Data corresponding to the analysis of spiked treated water sample in 3 days, n=3 each day

As the results show, a number of medium-polar and even low-polar analytes traditionally analysed by GC-MS can also be satisfactorily determined by LC-MS/MS, although the main applications of LC-MS/MS in water analysis are found for polar/ionic compounds. According to our experience, several pesticides typically determined by GC-MS, such as chlorpyrifos, dimethoate, methidathion, diazinon, etc., can also be successfully determined by LC-MS/MS with less sample manipulation [12, 17].

3.2.3 Confirmation of analyte identity

As regards the identification and confirmation of compound identity, the suitability of GC-MS and the availability of large libraries for searching and meeting defined criteria when using electron impact ionization are well known [8]. However, the benefits of spectral libraries in LC-API-MS are still a matter of debate. Due to the strong influence of instrumental as well as operational parameters on collision-induced fragmentation processes in API-MS, this approach is far less straightforward than GC-MS. The monitoring of two transitions (Q: quantification; q: confirmation) in LC-MS/MS procedures based on SRM (selected reaction monitoring) mode used to be sufficient for a safe positive finding [22-24] together with a Q/q ratio fitting accordingly

(deviations $\leq \pm 20\%$) with that of the standard reference. Using triple-quadrupole instruments, this typically results in earning 4 identification points (IPs): 1 IP corresponding to the precursor ion and 1.5 for each product ion. In our work, the number of IPs ranged between 3 and 5, depending on the MS/MS transitions acquired (see table 1). The number of IPs for all analytes is acceptable for a satisfactory confirmation, although the specificity of the transition should also be considered, as we have discussed recently [24].

3.2.4 Application to real samples

The analytical methodology described was applied to the analysis of 29 treated water samples from a municipal leachate treatment plant, and also to two raw leachate samples. Raw samples were diluted 50 times with HPLC-grade water before being analysed. In every set of analyses, two blank treated waters spiked at 0.05 and 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ were included as quality-control samples.

Table 3 shows the positive findings after the application of SPE-LC-MS/MS procedure. Four organic contaminants (diuron, pentachlorophenol, simazine, and terbuthylazine) were detected, in most cases below the LOQ objective (0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$). In spite of the low concentrations found, the detections could be confirmed as the intensity ratios (Q/q) were $\pm 20\%$ of those of reference standards.

Table 3. Compounds detected in the analysis of treated and raw leachate water samples by SPE-LC-MS/MS,

	Treated water (n=29)		Raw leachate water (n=2)	
	Positive detections	Number of samples above LOQ (concentration range, $\mu\text{g L}^{-1}$)	Positive detections	Number of samples above LOQ (concentration, $\mu\text{g L}^{-1}$)
Diuron	14	4 (0.062-0.37)	1	1 (2.2)
Pentachlorophenol	3	1 (0.072)	0	–
Simazine	8	1 (0.066)	2	1 (5.8)
Terbuthylazine	2	–	2	1 (0.37)

In summary, among the 29 treated waters analysed, diuron and simazine were the most frequent pollutants. Pentachlorophenol was also found in three samples, and terbuthylazine was detected in two samples. All the concentration levels were below $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, with the only exception of one sample that contained $0.37 \mu\text{g L}^{-1}$ of diuron, a herbicide widely used in the study area.

With regards to the raw water samples analysed, one of them showed relatively low concentrations of contaminants, while the other had the highest concentrations found for diuron, simazine and terbuthylazine. It seemed that after treatment of the raw leachate, the concentrations of organic pollutants were drastically reduced, as expected.

As an example, figure 1 shows selected chromatograms corresponding to the analyses of three positive samples, where diuron, pentachlorophenol, and simazine were detected. The excellent sensitivity of the procedure applied can be easily deduced from this figure, as all these compounds were found at concentrations below the LOQ objective, but still with satisfactory chromatographic peaks. Although the method was not fully validated at concentrations lower than $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$, it seems evident that most of the analytes could be quantified below this value. From the Q/q ratios, together with the agreement in retention time of reference standards, the confident confirmation of the identity was ensured.

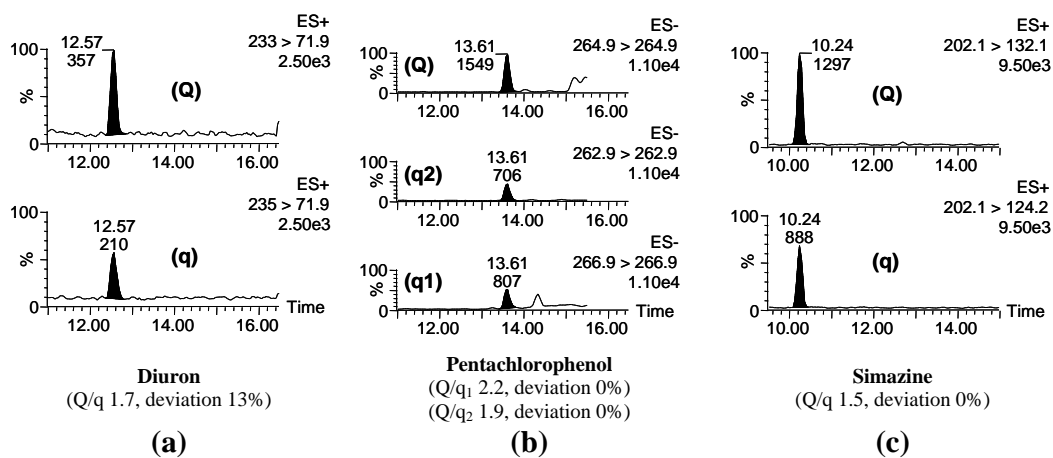


Figure 1. SPE-LC-(ESI)-MS/MS chromatograms corresponding to: (a) treated water containing diuron at estimated concentration of 5 ng L^{-1} , (b) treated water containing pentachlorophenol at estimated concentration of 30 ng L^{-1} and (c) treated water containing simazine at estimated

concentration of 30 ng L⁻¹. For every compound, the MS/MS transitions used for quantification (Q) and confirmation (q) are shown. In brackets, the experimental Q/q intensity ratios and their deviations are shown.

3.3 Matrix effect study

The SPE-LC-MS/MS procedure developed was additionally applied for the analysis of other types of water, ground and surface waters collected in the Comunidad Valenciana area, in order to investigate the matrix effects, which might result in erroneous quantification due to enhancement or signal suppression in the ESI interface.

Matrix effects were evaluated by determining the experimental recoveries in a variety of water samples spiked at 100 ng L⁻¹ ($n = 2$) after applying the SPE-LC-MS/MS method. Recoveries were obtained by comparison with a 100 ng L⁻¹ standard analysed by the overall SPE-LC procedure. Eleven different water samples were selected to perform this study: one treated water (sample A), five surface waters (samples B-F) and five groundwaters (samples G-K).

As table 4 shows, six samples (A, B, C, D, E, and G) did not present appreciable matrix effects on any of the selected compounds, as the recovery values were 70-110%. Among the rest of the samples, three groundwaters (H, I, and K) exhibited a slight signal enhancement for several analytes, whereas a strong signal suppression occurred in two waters (surface F and ground J). This fact demonstrated the different ionization behaviour of the analytes depending on the matrix composition and could lead to a lack of robustness of the LC-MS/MS developed, as the quantification results would be dependent on the type of water analysed.

Samples presenting an alteration in the analyte MS response were diluted four times with HPLC-grade water and then re-analysed by SPE-LC-MS/MS. This simple dilution was found to be sufficient for minimizing or removing matrix effects, as the recoveries obtained for the five samples re-analysed were satisfactory (70-110%) for all the analytes. After sample dilution, both the interferences and the analytes are concentrated in the SPE cartridge, maintaining the same ratio as before. However, matrix effects are minimized, as the absolute amount of interferences decreases, and consequently an improvement of recoveries is observed. Obviously, the application of a fourfold dilution approach affects the LOD values but still maintains a satisfactory sensitivity.

In relation to pentachlorophenol, the only compound measured in negative mode, the matrix effect study was performed only in treated and surface waters, i.e. the first samples studied. Later, the equipment showed inconsistent behaviour when working in negative mode and for this reason, data for groundwater are not shown in this article.

The use of internal standards (surrogates) (IS) is the best way to compensate for matrix effects. However, this is troublesome in a multiresidue LC-MS analysis, as one should select a number of labelled analytes similar to that of the target compounds investigated, since the matrix effect is compound-dependent. This fact has been emphasized in the recent bibliography, where difficulties in finding adequate internal standards in LC-MS/MS based methods have been mentioned [25-27]. Ideally, the isotopically labelled analyte should be used to ensure adequate correction of matrix effects, although structural analogues are sometimes used [16]. However, the latter is unsatisfactory in some cases [25, 28], thus making problematic the use of structural analogues as IS in LC-MS methods applied to samples where one can expect notable variations in matrix composition. As an alternative to using internal standards, and accordingly to our data, a previous fourfold dilution of the sample seems to be a simple and satisfactory approach by which to remove matrix effects in water analysis, as a compromise between sensitivity and minimization of matrix effects.

Table 4. Mean recoveries (n=2) after applying the SPE-LC-MS/MS procedure to different types of water spiked at 0.1 µg/L: water samples analyzed directly, without any dilution (x1), or diluted four times with HPLC water (x4)

	Treated		Surface						Ground								
	Water A	Water B	Water C	Water D	Water E	Water F		Water G	Water H			Water I		Water J		Water K	
	x1	x1	x1	x1	x1	x1	x4	x1	x1	x4	x1	x4	x1	x4	x1	x4	
Simazine	98	99	87	93	75	22	73	94	111	82	110	107	48	94	108	103	
Atrazine	88	96	98	87	78	45	81	92	120	96	120	99	53	65	124	100	
Isoproturon	97	94	95	90	84	62	97	91	110	100	110	95	58	84	113	101	
Diuron	76	106	91	68	87	62	97	83	108	106	123	109	55	85	134	104	
Terbutylazine	97	102	104	87	89	64	92	98	113	113	116	109	64	88	132	107	
Pentachlorophenol	98	86	95	124	79	54	95	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Alachlor	99	106	107	95	107	66	86	112	127	98	112	113	88	73	149	102	
Metolachlor	103	113	105	94	108	64	78	111	125	108	110	114	88	88	148	108	

* No consistent data obtained

3. CONCLUSIONS

Monitoring organic pollutants of wide polarity ranges in water requires the combined use of GC-MS (for the determination of non-polar (semi)volatile analytes) and LC-MS (for more polar analytes) methods. In this article, an automated on-line SPE-LC-MS/MS method has been developed for the determination of several (medium) polar analytes, meaning a short total analysis time, with minimum sample treatment and consumption of organic extracting solvents. Besides its excellent sensitivity, the procedure allows a confident confirmation of compounds detected by acquiring at least two MS/MS transitions and calculating the corresponding intensity ratio.

The application of conventional solvent extraction GC-MS methodology, together with the LC-MS/MS method developed, to treated water from urban solid-waste leachates has allowed the monitoring of 55 organic priority pollutants. The herbicides diuron and simazine have been the most frequently detected in treated water, although at concentrations below $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, while raw leachate water exceeded $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

A study of matrix effects has been performed by applying the SPE-LC-MS/MS procedure to different type of waters (ground, surface, and treated water). A fourfold dilution of samples with HPLC-grade water before injection into the LC-MS equipment has been found to be a simple, rapid, and efficient approach by which to minimize signal suppression or enhancement, in all the water samples tested.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for the use of the Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer. This work has been developed under the financial support of RECIPLASA as a part of the project 'Investigación de contaminantes orgánicos en las aguas de lixiviado de residuos urbanos de la planta de compostaje de Onda' and of the Ministry of Science and Technology (Ref. REN2002-01818), Spain. We thank Mr Fernando Albarrán (RECIPLASA) for his support in carrying out this study, and Dr Pozo for his valuable comments.

The research stay of Dr Hogendoorn at the Universitat Jaume I was financially supported by Bancaixa, Castellón, Spain.

REFERENCES

- [1] Pichon, V. (2000) *J. Chromatogr. A* **885**, p. 195.
- [2] Slack, RJ, Gronow, J. and Voulvoulis, N. (2005) *Sci. Total Environ.* **337**, p. 119.
- [3] Kjeldsen, P., Barlaz, P., Rooker, AP, Baun, A., Ledin, A. and Christensen, TH (2002) *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **32**, p. 297.
- [4] Jimenez, L., Alzaga, R. and Bayona, JM (2002) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **82**, p. 415.
- [5] Schwarzbauer, J., Heim, S., Brinker, S. and Littke, R. (2002) *Wat. Res.* **36**, p. 2275.
- [6] EPA. *Semivolatile Compounds. Methods 625/8270, Base/Neutral and Acid Extractable Organics*. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. Available online at: http://www.accustandard.com/asi/epa_downloads.php3 (accessed 5 May 2005).
- [7] Santos, FJ and Galceran, MT (2002) *Trends Anal. Chem.* **21**, p. 672.
- [8] Geerdink, RB, Niessen, WMA and Brinkman, U.A.Th. (2002) *J. Chromatogr. A* **970**, p. 65.
- [9] Reemtsma, T. (2003) *J. Chromatogr. A* **1000**, p. 477.
- [10] Zwiener, C. and Frimmel, FH (2004) *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, p. 851
- [11] Pico, Y., Blasco, C. and Font, G. (2004) *Mass Spectrom. Rev.* **23**, p. 45.
- [12] Hernández, F., Sancho, JV, Pozo, O., Lara, A. and Pitarch, E. (2001) *J. Chromatogr. A* **939**, p. 1.
- [13] Asperger, A., Efer, J., Koal, T. and Engewald, W. (2002) *J. Chromatogr. A* **960**, p. 109.
- [14] Bossi, R., Vejrup, VV, Mogensen, BB and Asman, WAH (2002) *J. Chromatogr. A* **957**, p. 27.
- [15] Kampiotti, AA, da Cunha, ACB, de Alba, ML and Barceló, D. (2005) *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, p. 1815.
- [16] Stoob, K., Singer, HP, Goetz, CW, Ruff, M. and Mueller, SR (2005) *J. Chromatogr. A* **1097**, p. 138.
- [17] Sancho, JV, Pozo, O. and Hernández, F. (2004) *Analyst* **129**, p. 38.
- [18] Hernández, F., Pozo, OJ, Sancho, JV, López, FJ, Marín, JM and Ibáñez, M. (2005) *Trends Anal. Chem.* **24**, p. 596.
- [19] Pozo, OJ, Guerrero, C., Sancho, JV, Ibáñez, M., Pitarch, E., Hogendoorn, E. and Hernández, F. (2006) *J. Chromatogr. A* **1103**, p. 83.
- [20] Directive 2000/60/EC. (2000) *Off. J. Eur. Comm.*
- [21] EPA. *Methods for Determining Organics in Waste Water. Method 610, Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. Available online at: http://www.accustandard.com/asi/epa_downloads.php3 (accessed 5 May 2005)
- [22] European Commission Decision 2002/657/EC. (2002) *Off. J. Eur. Comm.* **L221/8**
- [23] Hernández, F., Ibáñez, M., Sancho, JV and Pozo, O. (2004) *Anal. Chem.* **76**, p. 4349.

- [24] Pozo, OJ, Sancho, JV, Ibáñez, M., Hernández, F. and Niessen, WMA (2006) *Trends Anal. Chem.* **25**, p. 1030.
- [25] Sancho, JV, Pozo, OJ, López, FJ and Hernández, F. (2002) *Rapid. Comm. Mass Spectrom.* **16**, p. 639.
- [26] Hernández, F., Sancho, JV and Pozo, OJ (2005) *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, p. 934.
- [27] Olsson, OA, Baker, SE, Nguyen, JV, Romanoff, LC, Udunka, SO, Walker, RD and Flemmen, KT (2004) *Anal. Chem.* **76**, p. 2453.
- [28] Lagerwerf, FM, van Dongen, WD, Steenvoorden, RJJM, Honing, M. and Jonkman, JHG (2000) *Trends Anal. Chem.* **19**, p. 418.

2.4.3 Discusión de los resultados del artículo científico 3

Mediante la infusión de disoluciones patrón individuales de cada analito en el espectrómetro de masas, se optimizaron los iones precursores y producto de cada compuesto excepto para el el pentaclorofenol. Para este compuesto, debido a la ausencia de fragmentación de su molécula en la celda de colisión, se seleccionaron los iones más abundantes de su patrón de distribución isotópica, siendo utilizados como iones precursores y producto pudiéndose obtener así tres transiciones. Para el resto de compuestos se seleccionaron los dos iones producto más abundantes evitando los obtenidos a partir de pérdidas poco selectivas (H_2O , CO ,...), estableciéndose así dos transiciones por analito. De este modo, todos los compuestos detectados pudieron ser identificados en las muestras de agua analizadas en una sola inyección alcanzando un mínimo de 3 IPs. El criterio para confirmar la identidad de los analitos se basó en la comparación entre patrones y muestras de las relaciones de intensidad para ambas transiciones. Se aceptaron desviaciones de hasta un 20%, independientemente de la abundancia relativa, por lo que dicho criterio se puede considerar incluso más estricto que el establecido en la legislación europea en materia de confirmación cuando se hace uso de instrumentos de espectrometría de masas¹²⁶.

La necesidad de poder determinar bajos niveles de concentración en las muestras de agua, requirió la aplicación de una etapa de preconcentración (SPE) que se llevó a cabo en modo "on-line". En dicha etapa, totalmente automatizada, con tan solo 2 mL de muestra, utilizando un cartucho C_{18} y eluyendo los analitos en "backflush", se consiguió la sensibilidad suficiente, con un rango de linealidad entre 0.01 y 1 $\mu g/L$, y precisión y exactitud satisfactorias para los niveles validados (0.05 y 0.05 $\mu g/L$) para la mayoría de los analitos seleccionados. Además de los parámetros típicos exigidos en las guías de validación de la UE¹⁰⁶, se realizó un ensayo de precisión y exactitud a 3 días para los dos niveles, obteniéndose resultados altamente satisfactorios, reforzando así la robustez del método desarrollado.

La metodología desarrollada fue aplicada principalmente en el análisis de muestras de agua recogidas tras el proceso de depuración aplicado en la planta de

residuos, aunque también fueron analizadas diversas muestras brutas anteriores a este proceso. Estas mal llamadas "aguas", ya que son muestras procedentes del lixiviado de los residuos acumulados en la planta, fueron diluidas 50 veces previamente a su inyección en el sistema para evitar problemas en las etapa de preconcentración y cromatografía, así como para disminuir los efectos de los interferentes de la matriz en el proceso de ionización. En cada secuencia de análisis se intercalaron muestras tratadas fortificadas a los niveles de validación (QCs) con tal de asegurar la calidad de los resultados, que fueron aceptados siempre que las recuperaciones de los QCs estuvieron entre un 70 y 110%. Los compuestos más frecuentemente detectados en las aguas tratadas fueron diuron y simazina. Ambos herbicidas están identificados en el Anexo X de la Directiva 2000/60/CE como sustancias peligrosas prioritarias. Casi ningún positivo superó los 0.05 µg/L y tan solo el diuron se llegó a encontrar por encima de 0.1 µg/L. En cambio, los niveles de estos analitos en las aguas brutas de lixiviado fueron notablemente superiores, obteniendo valores que superaban las 2 µg/L, tanto para el diuron como para la simazina. De este modo, se puede concluir que el proceso de depuración que se lleva a cabo en la planta de compostaje resulta efectivo para los analitos seleccionados.

Con el objeto de estudiar el efecto de la matriz, se tomaron aleatoriamente más de una decena de muestras de agua de diferente origen (superficiales, subterráneas y residuales depuradas). Para llevar a cabo el estudio se fortificaron todas las aguas a 0.1 µg/L y se comparó su respuesta con la obtenida para patrones en agua HPLC sometidos al mismo procedimiento de análisis (SPE-LC-MS/MS). Los resultados obtenidos fueron muy variables según la muestra de agua analizada. Así, mientras que para algunas de las muestras la matriz apenas tenía efectos apreciables, consiguiéndose recuperaciones cercanas al 100%, en otras se observaron exaltaciones (>110%) o, mayoritariamente, supresiones (<70%) de la señal en presencia de la matriz. Este hecho pone de manifiesto las diferencias existentes en el proceso de ionización de un mismo analito en distintas matrices acuosas, con lo que la robustez del método, así como la de la mayoría de métodos basados en esta técnica, podría ser cuestionable. Una solución sencilla a esta falta de homogeneidad en las matrices de

las aguas analizadas,, resultó ser una rápida y simple dilución x4 con agua HPLC. Como ya se ha apuntado con anterioridad, la aplicación de esta aproximación está en función de la sensibilidad del método, por lo que en los casos en los que ésta no sea suficiente, se deben considerar otras vías para solventar el indeseable efecto matriz y así asegurar la calidad de los resultados reportados.

2.5 Determinación multirresidual de plaguicidas de diversa naturaleza en aguas residuales y medioambientales mediante la aplicación de cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem. Estudio y corrección del efecto matriz en el proceso de cuantificación.

2.5.1. Introducción

El acoplamiento cromatográfico con analizadores cada vez más avanzados, basados en la poderosa técnica identificativa de espectrometría de masas, puede llevar a descuidar la etapa de separación cromatográfica en métodos LC-MS. Sin embargo, la multiresidualidad en los métodos y la variabilidad y complejidad de las muestras, pueden provocar problemas (disminución de los puntos por pico acompañada de pérdida de sensibilidad y reproducibilidad por coelución de demasiados analitos, supresiones o exaltaciones de señal debidas a interferentes de la matriz, ...) difícilmente solucionables tan sólo mediante la detección por MS. Disponer de una buena separación cromatográfica contribuye a mejorar los niveles de detección, así como la calidad de los datos obtenidos con los detectores de MS.

Recientemente, con tal de satisfacer los requerimientos de los analistas por desarrollar nuevos métodos más rápidos, sensibles y selectivos, ha hecho aparición una nueva y poderosa técnica de separación conocida con el nombre de cromatografía líquida de ultra presión (UHPLC). Mediante el uso de columnas cuya fase estacionaria se conforma de partículas porosas híbridas de sílica con puentes de etileno de tamaño inferior a 2 μm , se consigue mejorar la resolución cromatográfica, así como la sensibilidad disminuyendo a su vez los tiempos de análisis¹²⁷. Estas mejoras se fundamentan en la ecuación empírica de Van Deemter en la que se describe la relación entre la velocidad lineal de la fase móvil y la altura de plato teórico, la cual es inversamente proporcional a la eficacia de la columna (Figura 1). El uso de estas partículas como fase estacionaria permite alcanzar una mayor eficacia, incluso trabajando a altas velocidades lineales de flujo de fase móvil. De este modo, mediante el empleo de la UHPLC se consigue disminuir sustancialmente el tiempo de análisis respecto a una cromatografía convencional por HPLC, así como aumentar considerablemente la sensibilidad debido a la mayor capacidad de pico de estas columnas como consecuencia de la menor difusión de las moléculas del analito a través de la fase estacionaria, consiguiéndose picos más estrechos con óptima

resolución cromatográfica. Este hecho es especialmente útil en métodos multiresiduales aplicados a matrices complejas (suelos, aguas, fluidos biológicos,...).

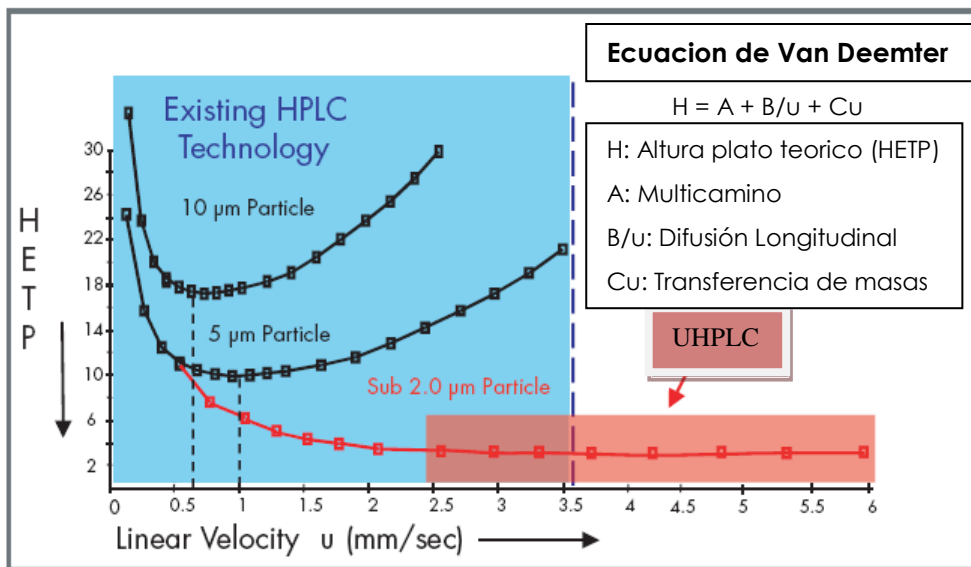


Figura 1. Efecto del tamaño de la partícula

Para obtener los beneficios de trabajar a elevados flujos de fase móvil con partículas inferiores a 2 µm es necesario disponer de instrumentación avanzada capaz de soportar la elevada presión (alredor de 700 bar) que se genera en el sistema. Así mismo, son necesarios sistemas de detección basados en espectrometría de masas con altas velocidades de barrido, capaces de operar con tiempos de "dwell" menores (hasta 5 mS) que los equipos convencionales (hasta 100 mS), ajustándose así a la mayor rapidez de la cromatografía manteniendo un adecuado número de puntos por pico cromatográfico (mínimo de 10). Esto es muy beneficioso en métodos multiresiduales con fines confirmativos, en los que se adquieren varias transiciones por compuesto.

Pese a ser una técnica de reciente aparición y de elevado coste económico, existen ya muchos métodos basados en el acoplamiento de UHPLC a detectores MS en tándem que mejoran en rapidez y sensibilidad los anteriormente publicados para la

determinación de una gran variedad de compuestos en numerosas matrices. Así, por ejemplo, en el campo del análisis de aguas (superficiales, subterráneas, potables, tratadas,.....) se pueden encontrar diversas publicaciones para la determinación de fármacos^{123,128}, drogas^{120,129}, toxinas¹³⁰ y plaguicidas^{122,131}.

Tal y como ya se ha comentado anteriormente, pese a la elevada sensibilidad intrínseca a la técnica de HPLC-MS/MS, en los métodos multiresiduales de plaguicidas en aguas habitualmente se necesita aplicar etapas de preconcentración, generalmente por SPE, con tal de alcanzar límites de cuantificación inferiores a 0.1 µg/L para todos los analitos³⁶. Además, cuando se trabaja en modo "on-line" SPE-LC se puede alcanzar un elevado rendimiento ("throughput"), pudiendo analizarse muchas muestras al día minimizando la intervención humana y el consumo de disolventes. En cambio, pese a las ventajas de la SPE on-line respecto a la SPE off-line en métodos LC-MS/MS (rapidez y rendimiento del análisis, menor volumen de muestra necesario, menor consumo de disolventes, menor intervención del personal en el proceso)⁹³, en los métodos basados en UHPLC-MS/MS que precisan etapas de preconcentración, éstas se llevan a cabo mayoritariamente en modo off-line^{108,109,120,122,123,127-131}. Este hecho es consecuencia de la drástica disminución en el tiempo de análisis (alrededor de tres veces menor que en HPLC), lo que hace que la parte correspondiente a la medida instrumental represente en el tiempo global de análisis una fracción menor a la que constituiría la aplicación de SPE on-line convencional, en donde sus diferentes etapas (acondicionamiento, carga, lavado y transferencia) continuarían con la misma duración. Al tratarse de una técnica de reciente aparición, es de preveer que en un futuro próximo la SPE on-line evolucione adaptando sus procesos a las exigencias, en cuanto a rapidez y eficacia, requeridas para ser acoplada eficientemente a UHPLC.

Otra de las ventajas que, a priori, puede aportar el uso de la cromatografía por UHPLC es la eliminación parcial o total del indeseable efecto que producen ciertos interferentes presentes en la matriz en el proceso de ionización de los analitos, al poseer dicha técnica un mayor poder de separación cromatográfica entre analitos e interferentes, con picos más resueltos y estrechos¹²³.

En el **artículo científico 4** que se presenta a continuación, se muestra el desarrollo, validación y aplicación a muestras de agua medioambientales (superficiales y subterráneas) y procedentes de una planta de residuos sólidos urbanos, de un método rápido, sensible y selectivo para la determinación de 37 plaguicidas. Los compuestos fueron seleccionados en función de su uso y de su detección previa en trabajos anteriores. El método aplicado está basado en una etapa de preconcentración por SPE off-line previa al análisis por UHPLC-MS/MS. En la metodología desarrollada se presta especial atención a la identificación fiable de todos los positivos reportados, para lo cual se adquieren tres transiciones SRM por analito. Además de la eficacia del proceso de extracción y de la optimización de la separación cromatográfica, se plantea un estudio en profundidad del efecto de la matriz en la cuantificación de los plaguicidas seleccionados. Para ello, se utilizaron diversos tipos de aguas evaluando la capacidad correctiva de una serie de analitos marcados isotópicamente, usados como patrones internos.

2.5.2 Artículo científico 4

“Application of ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples”

José M. Marín, Emma Gracia-Lor, Juan V. Sancho, Francisco J. López y Félix Hernández.

Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 1410–1420.

Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 1410–1420



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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



Application of ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples Study of matrix effects

José M. Marín, Emma Gracia-Lor, Juan V. Sancho, Francisco J. López, Félix Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Avda. Sos Baynat, E-12071 Castellón, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 September 2008
Received in revised form 16 December 2008
Accepted 30 December 2008
Available online 8 January 2009

Keywords:
Pesticides
Ultra-high-pressure liquid chromatography
Tandem mass spectrometry
Confirmation
Matrix effects
Triple quadrupole
Internal standard
Environmental and waste water

ABSTRACT

An ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) method for the determination of 37 pesticides (herbicides, insecticides and fungicides) in environmental and wastewater has been developed. To efficiently combine UHPLC with MS/MS, a fast-acquisition triple quadrupole mass analyzer was used. This analyzer (minimum dwell time, 5 ms) allows acquiring up to three simultaneous transitions in the selected reaction monitoring mode for each compound assuring a reliable identification without resolution or sensitivity losses. A pre-concentration step based on solid-phase extraction using Waters Oasis HLB cartridges (0.2 g) was applied with a 100-fold pre-concentration factor along the whole analytical procedure. The method was validated based on European SANCO guidelines using surface, ground, drinking and treated water (from an urban solid residues treatment plant) spiked at two concentration levels (0.025 and 0.1 µg/L), the lowest having been established as the limit of quantification objective. The method showed excellent sensitivity, with instrumental limits of detection ranging from 0.1 to 7 pg. It was applied to environmental water samples (ground and surface water) as well as to samples of urban solid waste leachates (raw leachate and treated leachate after applying reversed osmosis) collected from a municipal treatment plant. Matrix effects have been studied in the different types of water samples analyzed, and several isotope-labelled internal standards have been evaluated as a way to compensate the signal suppression observed for most of the compounds studied, especially in wastewater samples. As a general remark, only those pesticides which response was corrected using their own isotope-labelled molecule, could be satisfactorily corrected in all type of samples, assuring in this way the accurate quantification in all matrix samples.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays, the development of sensitive and multi-class methods for determination of pesticides in water has become a major issue, due to the intensive usage of phytosanitary products and the strict legal European Union (EU) requirements for water quality for human consumption [1]. Most of pesticides and metabolites that normally reach environmental water, and especially groundwater, are medium–high polar. This makes LC–MS/MS [2–6] the most appropriate technique for their analysis, as it leads to satisfactory results from both the quantification and confirmation point of view. The high sensitivity of tandem mass spectrometry can even allow direct injection of water samples, reaching low detection limits, as recently reported [7]. However, a pre-concentration step, nor-

mally based on solid-phase extraction (SPE), is usually required for the satisfactory determination of sub-ppb levels in samples where a great variety of analytes have to be determined. This pre-concentration step can be performed in both off-line [8–10] or on-line modes [10–12].

Recently, ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) has been developed as an innovative and powerful separation technique based on the use of columns containing stationary phases of particles size (<2 µm) smaller than conventional HPLC. This has led to higher resolution and sensitivity, and shorter analysis time [13]. UHPLC in combination to tandem MS has been shown as an excellent analytical tool for multi-residual determinations in environmental waters of compounds like pharmaceuticals and drugs [14,15], toxins [16] and pesticides [17–20]. However, to take profit of UHPLC advantages it is not sufficient to couple a conventional tandem mass spectrometer due to its scanning speed limitations [15]. Faster-acquisition triple quadrupole analyzers are needed. These analyzers allow reducing dwell times, increasing notably the

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; fax: +34 964 387368.
E-mail address: felix.hernandez@qf.uji.es (F. Hernández).

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

J. Chromatogr. A 2009; **1216**: 1410–1420

Received: 17 September 2008; Accepted: 30 December 2008; Published online 8 January 2009 in ScienceDirect (www.sciencedirect.com) DOI: 10.1016/j.chroma.2008.12.094

Application of ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples: Study of matrix effects

José M. Marín, Emma Gracia-Lor, Juan V. Sancho, , Francisco J. López, Félix Hernández

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n E-12071 Castellón, Spain

ABSTRACT

An ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) method for the determination of 37 pesticides (herbicides, insecticides and fungicides) in environmental and wastewater has been developed. To efficiently combine UHPLC with MS/MS, a fast-acquisition triple quadrupole mass analyzer was used. This analyzer (minimum dwell time, 5 ms) allows acquiring up to three simultaneous transitions in the selected reaction monitoring mode for each compound assuring a reliable identification without resolution or sensitivity losses. A pre-concentration step based on solid-phase extraction using Waters Oasis HLB cartridges (0.2 g) was applied with a 100-fold pre-concentration factor along the whole analytical procedure. The method was validated based on European SANCO guidelines using surface, ground, drinking and treated water (from an urban solid residues treatment plant) spiked at two concentration levels (0.025 and 0.1 µg/L), the lowest having been established as the limit of quantification objective. The method showed excellent sensitivity, with instrumental limits of detection ranging from 0.1 to 7 pg. It was applied to environmental water samples (ground and surface water) as well as to samples of urban solid waste leachates (raw leachate and treated leachate after applying reversed osmosis) collected from a municipal treatment plant. Matrix effects have been studied in the different types of water samples analyzed, and several isotope-labelled internal standards have been evaluated as a way to compensate the signal suppression observed for most of the compounds studied, especially in wastewater samples. As a general remark, only those pesticides which response was corrected using their own isotope-labelled molecule, could be satisfactorily corrected in all type of samples, assuring in this way the accurate quantification in all matrix samples.

KEYWORDS

Pesticides; Ultra-high-pressure liquid chromatography; tandem mass spectrometry; Confirmation; Matrix effects; Triple quadrupole; Internal standard; Environmental and waste water

*Correspondence to Félix Hernández, Jaume I. E-mail: hernandf@exp.uji.es

1. INTRODUCTION

Nowadays, the development of sensitive and multi-class methods for determination of pesticides in water has become a major issue, due to the intensive usage of phytosanitary products and the strict legal European Union (EU) requirements for water quality for human consumption [1]. Most of pesticides and metabolites that normally reach environmental water, and especially groundwater, are medium-high polar. This makes LC-MS/MS [2-6] the most appropriate technique for their analysis, as it leads to satisfactory results from both the quantification and confirmation point of view. The high sensitivity of tandem mass spectrometry can even allow direct injection of water samples, reaching low detection limits, as recently reported [7]. However, a pre-concentration step, normally based on solid-phase extraction (SPE), is usually required for the satisfactory determination of sub-ppb levels in samples where a great variety of analytes have to be determined. This pre-concentration step can be performed in both off-line [8-10] or on-line modes [10-12].

Recently, ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) has been developed as an innovative and powerful separation technique based on the use of columns containing stationary phases of particles size (<2 µm) smaller than conventional HPLC. This has led to higher resolution and sensitivity, and shorter analysis time [13]. UHPLC in combination to tandem MS has been shown as an excellent analytical tool for multi-residual determinations in environmental waters of compounds like pharmaceuticals and drugs [14-15], toxins [16] and pesticides [17-20]. However, to take profit of UHPLC advantages it is not sufficient to couple a conventional tandem mass spectrometer due to its scanning speed limitations [15]. Faster-acquisition triple quadrupole analyzers are needed. These analyzers allow reducing dwell times, increasing notably the selectivity of the method without sacrificing sensitivity, also being an ideal tool for confirmation purposes [21]. Thus, even more than two selected reaction monitoring (SRM) transitions can be acquired without losing sensitivity. Therefore, UHPLC-MS/MS can offer not only good sensitivity but also a high confidence on confirmation of residues compounds detected in samples, allowing to easily reach 3 or 4 identification points (IPs), as established in EU guidelines [22-23].

Accordingly to European legislation on drinking water [1], pesticide limits of quantification (LOQs) of 0.025 µg/L, four times lower than the maximum allowed (0.1 µg/L), are required. To this aim, the application of a pre-concentration step, e.g. based on SPE, is typically required in multi-residue methods where a large number of compounds are determined. Several drawbacks of off-line SPE procedures in comparison to on-line ones in LC-MS/MS based methods have been reported (time consuming, higher sample volumes required, low automation and low throughput)

[24]. Surely for this reason, several of the most recent LC-MS/MS multi-residue methods for pesticides in environmental water have used an on-line SPE-LC pre-concentration step [25-27]. However, despite UHPLC chromatographic run time is around three times shorter than in HPLC, the time involved in the different on-line trace enrichment steps (conditioning, loading, washing and transferring the on-line cartridge) remains the same. Therefore, the typical on-line SPE overlapping between samples for significantly reducing the global analysis time cannot be easily applied. Then, UHPLC run time represents only a small fraction of the on-line processing time resulting in a marginal analysis time improvement. Thus, off-line SPE has been normally used for analyte pre-concentration in UHPLC methods [14-21], although the advantages of the on-line approach will surely lead to new developments in the near future to solve the efficient coupling with UHPLC.

It is well known that matrix effects are one of the main drawbacks of LC-MS/MS methods, making quantification in samples problematic in some cases, as has been widely reported in the literature [28-36]. Co-eluting compounds from the sample matrix can affect analyte ionization process leading to a signal enhancement or signal suppression. These undesirable effects typically cause a loss of method accuracy, precision and sensitivity leading to incorrect quantification and also to problems for a safe confirmation [28,37]. Different approaches can be applied to remove or minimize matrix effects, like applying an efficient sample clean-up [33], the standard additions method [30,38], use of matrix-matched standards [35], a simple sample dilution [36], or the most widely applied, based on the use of appropriate internal standards (I.S.s) [33-35,37,39].

Environmental waters have high sample composition variability and it is difficult finding homogeneous blank samples that assure the same matrix composition, even when samples belong to the same type of water (surface, ground.). Therefore, the use of matrix-matched standards, widely applied in analysis of fruits and vegetables, is rather problematic in the environmental field. Other options, like the application of standard additions method or performing a clean-up step are more laborious, time consuming and can introduce analytical errors associated to sample manipulation. Normally, the use of analyte isotope-labelled I.S.s is the preferred way to solve matrix effects, but it can be limited because of commercial unavailability of reference standards and because of economical reasons, making their use in multi-residue methods more problematic. When the analyte isotope-labelled I.S. is not available, other compounds eluting at similar retention times or being structurally analogues have been tested, but no satisfactory data are always assured [14, 29, 33, 40].

When using UHPLC it could be expected that analytes co-elute with less interferences that affect the ionization process, so matrix effects would be lower or might be even eliminated as a consequence of its better resolution and the narrower peaks in comparison to HPLC [38]. The aim of this paper is to develop rapid, selective and sensitive analytical methodology based on the use of UHPLC–MS/MS for the determination of around 40 pesticides commonly applied in the Spanish Mediterranean agriculture. Up to three SRM transitions are acquired for the simultaneous detection, quantification and confirmation of positive samples in just one injection. Furthermore, a detailed study of matrix effects is carried out on nine different water samples (three surface, two ground, and four wastewater – two raw and two treated – from an urban solid-waste treatment plant) by using UHPLC coupled to MS/MS. Several isotope-labelled I.S.s are tested as a way to compensate for matrix effects observed.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents and chemicals

Pesticide reference standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), Riedel-de Haën (Seelze, Germany) or Sigma (St. Louis, MO, USA). Pesticides determined ranged from highly polar (methomyl, $\log K_{ow}$: 0.1) to low polar compounds (buprofezin, $\log K_{ow}$: 4.8). HPLC-grade methanol, HPLC-grade acetonitrile and acetone for residue analysis were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q Gradient A10 (Millepore, Bedford, MA, USA). Formic acid (HCOOH, content >98%) and ammonium acetate (NH₄Ac, reagent grade) were supplied by Scharlau.

Stock standard solutions were prepared dissolving 50 mg, accurately weighted, in 100 mL of acetone obtaining a final concentration of 500 mg/L. For LC–MS analysis, the stock solutions were mixed and diluted with methanol to give a final concentration of around 50 mg/L and subsequently diluted with HPLC-grade water to obtain working solutions of pesticides mixtures.

Isotopically labelled compounds used were [²H₆]dimethoate (dimethoate-d₆), [²H₃](2-methyl-4-chlorophenoxy)acetic acid (MCPA-d₃), [²H₃]carbofuran (carbofuran-d₃), [²H₆]diuron (diuron-d₆), [²H₅]terbuthylazine (terbuthylazine-d₅), [²H₅]imazalil (imazalil-d₅) and [²H₆]thiabendazole (thiabendazole-d₆) purchased from Dr. Erhenstorfer. A mix of all isotopically

labelled compounds at 100 µg/L was prepared by dilution of individual stock solutions of 1 mg/L in methanol. Further dilutions of this mix were prepared in HPLC-grade water.

To prepare calibration curves, working mix solutions of pesticides and isotopically labelled compounds were prepared in acetonitrile–water (10:90, v/v).

Cartridges used for SPE were Oasis HLB (0.2 g) from Waters (Milford, MA, USA).

2.2. Liquid chromatography

UHPLC analysis was carried out using a Waters Acquity UPLC system (Waters), equipped with a binary solvent manager and a sample manager. For the chromatographic separation, an Acquity UPLC HSS T3 column, 1.8 µm, 100 mm × 2.1 mm I.D. (Waters) at a flow rate of 0.3 mL/min was used. The column was kept at 40 °C and the sample manager was maintained at 5 °C. Mobile phase consisted of water/methanol gradient both 0.1 mM NH₄Ac where the methanol percentage was changed linearly as follows: 0 min, 5%; 7 min, 90%; 8 min, 90%; 8.1 min; 5%. Analysis run time was 10 min.

The sample volume injected in UHPLC system was 20 µL.

2.3. Mass spectrometry

A TQD tandem mass spectrometer with an orthogonal Z-spray-electrospray interface (Waters) was used for UHPLC analysis. Drying gas as well as nebulising gas were nitrogen generated from pressurized air in a N₂ LC–MS (Claind, Teknokroma, Barcelona, Spain). The cone gas and desolvation gas flows were optimized at 60 L/h flow and 1200 L/h, respectively. For operation in MS/MS mode, collision gas was Argon 99.995% (Carburros Metalicos, Valencia, Spain) with a pressure of 2×10^{-3} mbar in the T-Wave cell. Positive/negative ionization switching was performed using capillary voltages of 3.5 and 3.0 kV in positive and negative ionization mode, respectively. Interface temperature and source temperature were optimized at 500 and 120 °C, respectively. Dwell times of 10 ms were selected.

For UHPLC analysis, Masslynx NT v 4.1 (Waters) software was used to process quantitative data obtained from calibration standards and from water samples.

2.4. Recommended procedure

Water samples were centrifuged at 4500 rpm for 5 min, only when suspended particulate matter was observed. Then, 1 mL of concentrated HCOOH as well as 1 mL of I.S. mixture solution was added to a 100-mL volumetric flask, where the water sample was used to fill it and to adjust the final volume, giving a final concentration of 0.05 µg/L for each surrogate isotope-labelled I.S.

Oasis HLB (0.2 g) cartridges were conditioned with 5 mL of methanol, 5 mL of acetone, 5 mL of methanol and 5 mL of acidified water (1% HCOOH). Then, 100 mL of sample were passed through the cartridge. After drying under vacuum, analytes were eluted with 5 mL of acetone. The extract was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream (40 °C) and finally reconstituted with 1 mL of acetonitrile–water (10:90, v/v). Analyses were performed by injecting 20 µL of the final extract in the UHPLC–MS/MS system.

2.5. Validation study

The linearity of the method was studied by analyzing standard solutions in triplicate at six concentrations ranging from 1 to 100 µg/L. Satisfactory linearity using weighed (1/X) least squares regression was assumed when the correlation coefficient (r) was higher than 0.99, based on analyte peak areas measurement, and the residuals lower than 30%.

Accuracy (estimated by means of recovery experiments) and precision (expressed as repeatability in terms of relative standard deviation) were evaluated by analyzing surface water (SW), ground water (GW), drinking water (DW) and treated wastewater (TW) samples spiked at two concentration levels each (0.025 and 0.1 µg/L). All experiments were performed in quintuplicate for each type of water samples tested.

The LOQ objective was taken as the lowest concentration level for which the method was fully validated using spiked samples with satisfactory recovery (between 70 and 120%) and precision (RSD ≤ 20%). The instrumental limit of detection (LOD) was estimated for a signal-to-noise ratio of three from the chromatograms of standards at low concentration levels, ranging from 0.05 to 1 µg/L.

2.6. Application to real samples

Around 40 water samples (SW, GW, DW, raw leachate water (LW) and TW from an urban solid residue treatment plant) were collected in different sites of the Mediterranean Spanish coast

and analyzed in order to investigate the presence of selected pesticides. Samples were stored in plastic (high density polyethylene) containers and stored in the dark at <-18 °C until analyses.

In every sequence of analysis, water sample SPE extracts were injected by duplicate between two calibration curves (from 1 to 100 $\mu\text{g/L}$). Two quality control samples (QCs), i.e. a blank water sample (previously analyzed) fortified at LOQ and $4\times$ LOQ levels, were also analyzed for quality control. QC recoveries were considered satisfactory if they were in the range 70–120% for every analyte.

Confirmation of positive findings was carried out by calculating the peak area ratios between the quantification (Q) and confirmation (q_1 and q_2) transitions and comparing them with ion-ratios obtained from a reference standard. The sample was considered positive when the experimental ion-ratio fell within the tolerance range, in the line of EU Decision 2002/657/EC [22,

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. MS optimization

Full-scan and MS/MS mass spectra were obtained from infusion of 1 mg/L methanol/water (50:50, v/v) individual standard solutions of each compound at a flow rate of 10 $\mu\text{L/min}$. The majority of the analytes were determined by positive ionization and only four compounds (terbacil, bromacil, MCPA and bentazone) presented more abundant ionization in negative mode.

All compounds showed an abundant $[M+H]^+$ or $[M-H]^-$ ion, which were usually selected as precursor ions. However, for some compounds (azinphos methyl, buprofezin and terbacil), their easy fragmentation at low collision energies generated a predominant product ion. This led us to consider the possibility of promoting an in-source fragmentation, selecting the in-source fragment as the precursor ion by increasing the cone voltage. The fragmentation of these ions produced the expected products ions but with higher abundance, making possible the acquisition of other sensitive transitions (see Table 1, q_2 transition for the mentioned pesticides).

It is well-known that, at least, two specific transitions must be acquired for each compound to have a confirmative method, obtaining in this way the minimum number of IPs

required for a safe confirmation. In the present work, we use a tandem mass spectrometer which fast-acquisition triple quadrupole mass analyzer allows decreasing dwell times or ionization mode switching time without apparent sensitivity losses. This gave us the possibility of acquiring up to three SRM transitions per compound at 10 ms dwell time. Non-specific transitions were avoided as much as possible to minimize the risk of false positives [28]. For several compounds (terbutylazine, atrazine, simazine, alachlor, metolachlor, fenarimol, triadimenol, imazalil, imidachloprid, bromacil, terbacil, MCPA), the presence of one chlorine atom in their structure allowed us to use two different precursor ions (corresponding to the ^{35}Cl and ^{37}Cl isotopes, respectively). Therefore, acquiring three SRM transitions, and using two different precursor ions for several compounds, led to a satisfactory number of IPs (between 5.5 and 6.5) [22], allowing a safe confirmation even at concentrations around the LOD of the method.

On the other hand, to assure a good peak shape and acceptable reproducibility, at least 10 points per chromatographic peak should be obtained. In this work, a total of 117 SRM transitions were acquired in a 10-min chromatographic run time. In order to reach the acceptable data point-rate for UHPLC peaks (5–7 s), the different transitions were distributed along eight functions using short dwell times (10 ms).

Mass spectrometry parameters selected, like precursor and product ions, cone voltage, collision cell energy, and ion intensity ratios of selected transitions are shown in Table 1.

3.2. Chromatography optimization

Methanol and acetonitrile with different HCOOH and NH_4Ac contents were tested as organic solvents during chromatographic optimization looking for a compromise between peak shape and sensitivity. Most of compounds determined in positive mode presented better peak shape and ionization yield when methanol was used as organic modifier due to its protic character. Besides, these parameters were improved for most compounds when a small amount of NH_4Ac (0.1 mM) was added both in water and methanol mobile phase solvents. The use of HCOOH as modifier was discarded because peak shape and sensitivity got worse. On the contrary, for compounds determined in negative ionization mode, the use of aprotic solvents, i.e. acetonitrile, as well as non-acidified mobile phases favour analytes ionization although acidified mobile phases would improve their chromatographic retention. The use of acetonitrile without any additive (with the exception of adding NH_4Ac to improve MCPA peak shape) would have been the best option to achieve optimum results for compounds ionized in negative mode.

As the majority of monitored compounds (33 out of 37) were determined in positive ionization mode, we finally selected methanol and NH_4Ac as modifier for the multi-residue determination of the 37 pesticides. Therefore, a small shift in the chromatographic retention time was observed for two acidic analytes, bentazone and MCPA. This situation was solved after a few injections when the column was completely equilibrated.

3.3. SPE recovery

Oasis HLB cartridges were selected due to their ability to retain both non-polar and polar compounds. In the case of relatively high acidic compounds, such as MCPA, sample acidification was required to obtain an adequate recovery. To this aim, different amounts of HCOOH were evaluated, selecting finally 1% (v/v).

Efficiency and robustness on analytes pre-concentration process was tested for nine different water samples (two GW samples from Mediterranean coastal aquifers located at Burriana (GW1) and Almassora (GW2), three SW samples from Ebro (SW1), Tajo (SW2) and Mijares (SW3) Spanish rivers, two TW and two raw LW from an urban solid residues treatment plant). Raw LW samples were 50-fold diluted previously to SPE pre-concentration to decrease their high organic matter content and viscosity. Responses obtained for samples spiked at the same level ($4 \times \text{LOQ}$, e.g. typically $0.1 \mu\text{g/L}$) before (X) and after (Y) SPE step were compared ($n = 3$). The ratio $(X/Y \times 100)$ was taken as SPE absolute recovery [32]. Blank samples, without spiking, were also processed to subtract the levels of possible target compounds. As can be seen in Fig. 1, satisfactory recoveries were obtained for almost all compounds. Only a few pesticide/matrix combinations gave recoveries slightly higher than 120%, and typically occurred in samples where the target pesticide was detected, which means that subtracting the analyte amount present in the blank sample introduced higher errors in the recovery calculation. Only for thiobencarb and pirimiphos methyl significant losses in this process were observed in practically all water samples tested. It is remarkable that MCPA suffered important losses only in one sample out of the nine tested, specifically GW1, possibly due to the presence of substances which might react and degrade MCPA molecules or neutralize formic acid added, avoiding MCPA protonation and its retention in the cartridge (breakthrough losses). The low recovery for MCPA in this GW sample could be corrected when adding the isotope-labelled analyte as surrogate (MCPA- d_3). However, low recoveries for thiobencarb and pirimiphos methyl, could not be corrected because their isotope-labelled molecule was not available, as it will be discussed later. With these exceptions, the use of isotope-labelled I.S.s as surrogates was not strictly necessary to correct losses in the SPE step.

Table 1. MS/MS optimized conditions for selected compounds

Compound	Polarity	Q Transition	Cone (V)	Col. Ener. (eV)	q1 Transition	Col. Ener. (eV)	q2 Transition	Col. Ener. (eV)	Ion ratio 1	Ion ratio 2
Acetamidiprid	ESI+	223.2 > 126.1	45	20	223.2 > 55.7	15	223.2 > 89.9	25	3.1	8.2
Alachlor	ESI+	270.2 > 238.2	30	10	272.2 > 240.2	10	270.2 > 162.2	20	1.4	2.7
Atrazine	ESI+	216.3 > 174.3	45	20	218.3 > 176.3	20	216.3 > 96.0	25	1.8	3.1
Azinphos-methyl	ESI+	318.1 > 160.1	25	10	318.1 > 160.1	10	160.1 > 132.1 (Cone: 45V)	5	1.0	3.9
Azoxystrobin	ESI+	404.2 > 372.2	35	15	404.2 > 344.3	25	404.2 > 329.2	30	3.0	3.7
Bentazone	ESI-	239.0 > 132.0	50	30	239.0 > 197.0	20	239.0 > 175.0	20	2.0	2.1
Bromacil	ESI-	259.0 > 203.0	45	20	261.0 > 205.0	20	259.0 > 79.0	30	1.2	3.5
Buprofezin	ESI+	306.1 > 201.1	35	10	306.1 > 116.1	15	201.1 > 116.1 (Cone: 40V)	10	1.3	2.7
Carbaryl	ESI+	202.2 > 145.2	30	10	202.2 > 127.2	30	202.2 > 127.2	25	2.7	7.0
Carbendazim	ESI+	192.0 > 160.0	40	20	192.0 > 132.0	30	192.0 > 105.0	35	5.7	11.2
Carbofuran	ESI+	222.2 > 165.2	40	10	222.3 > 123.1	20	222.3 > 54.7	25	1.3	8.7
Cyprodinil	ESI+	226.2 > 93.1	45	35	226.2 > 77.0	45	226.2 > 108.1	25	1.5	2.0
Dimethoate	ESI+	230.0 > 199.0	40	10	230.0 > 125.0	20	230.0 > 171.0	15	1.2	2.0
Diuron	ESI+	232.9 > 72.1	45	15	232.9 > 46.1	15	232.9 > 160.1	25	2.1	24
Fenarimol	ESI+	331.2 > 81.0	35	30	333.2 > 81.0	30	333.2 > 139.0	40	1.4	2.7
Imazalil	ESI+	297.1 > 159.1	40	25	297.1 > 41.0	25	299.1 > 41.1	20	0.7	1.5
Imidacloprid	ESI+	256.3 > 175.2	45	15	256.3 > 209.2	15	258.3 > 211.2	15	1.3	4.1
Isoproturon	ESI+	207.3 > 71.8	45	15	207.3 > 45.6	15	207.3 > 165.3	15	4.6	6.3
Malathion	ESI+	331.1 > 127.1	30	15	331.1 > 125.0	25	331.1 > 285.1	10	3.7	2.5
MCPA	ESI-	199.0 > 141.0	40	10	201.0 > 143.0	10	---	---	3.5	---
Metaxyl	ESI+	280.3 > 220.2	30	15	280.3 > 192.2	20	280.3 > 45.0	30	1.8	3.3
Methidation	ESI+	302.9 > 85.1	35	25	302.9 > 145.1	10	302.9 > 58.1	35	1.0	4.4
Methiocarb	ESI+	226.3 > 169.1	30	10	226.3 > 121.0	20	226.3 > 92.9	20	1.4	7.6
Metolachlor	ESI+	284.2 > 252.2	25	15	286.2 > 254.2	15	284.2 > 176.2	25	2.7	3.3
Methomyl	ESI+	163.3 > 87.8	35	10	163.3 > 105.8	10	163.3 > 121.9	5	1.4	2.5
Primicarb	ESI+	239.2 > 72.0	25	20	239.2 > 182.2	15	239.2 > 85.1	30	2.4	10.3
Priniphos-methyl	ESI+	306.1 > 108.1	45	30	306.2 > 67.1	35	306.1 > 164.1	20	1.4	1.1
Propanil	ESI+	218.0 > 162.0	45	15	218.0 > 127.0	25	218.0 > 57.1	20	1.4	2.3
Pyridaphenthion	ESI+	341.2 > 189.2	45	25	341.2 > 92.0	40	341.2 > 205.1	25	0.6	1.5
Simazine	ESI+	202.1 > 132.1	45	20	202.1 > 124.1	45	204.1 > 134.1	20	1.9	2.3
Terbutylazine	ESI+	230.1 > 174.1	45	15	232.1 > 176.1	15	230.1 > 96.1	30	3.2	4.6
Terbacil	ESI-	215.2 > 159.1	40	15	217.2 > 161.1	15	159.1 > 42.0 (Cone: 55V)	15	3.5	7.1
Terbutmeton	ESI+	226.1 > 170.1	45	20	226.1 > 114.1	25	226.1 > 142.1	20	9.5	20.6
Terbutryn	ESI+	242.1 > 186.1	45	20	242.1 > 71.1	35	242.1 > 91.1	25	4.4	5.4
Thiabendazol	ESI+	202.2 > 175.2	55	25	202.2 > 131.2	30	202.2 > 64.7	35	1.6	3.3
Thiobencarb	ESI+	258.2 > 125.1	30	20	258.2 > 100.1	15	258.2 > 89.1	35	14.3	26.9
Triadimenol	ESI+	296.2 > 70.1	20	10	298.2 > 70.1	10	296.2 > 99.1	15	2.6	11.6

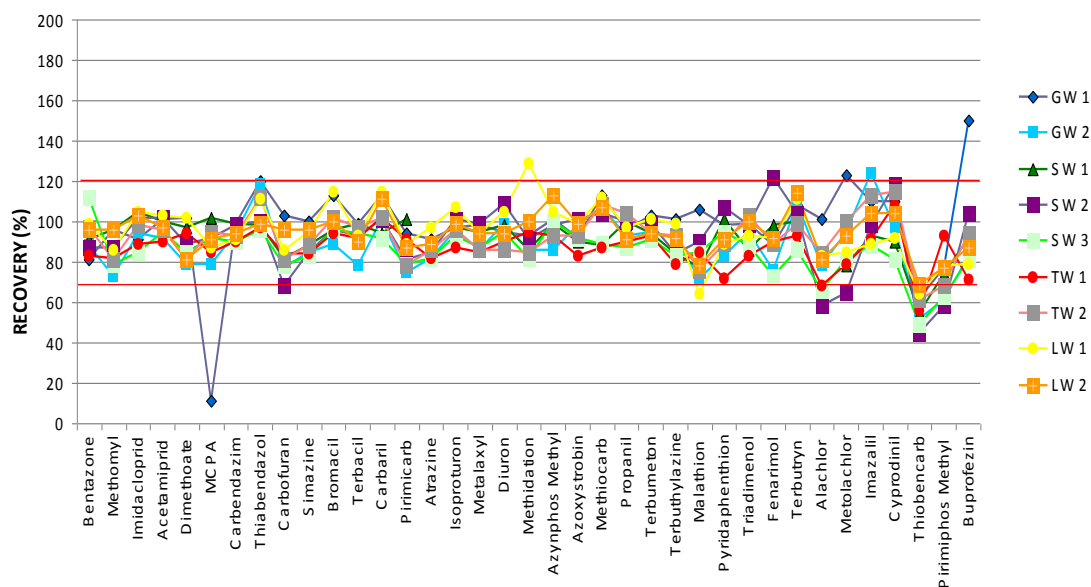


Fig. 1. Recovery of pesticides in the SPE process using Oasis HLB cartridges for different types of water samples.

3.4. Matrix effects

Matrix effects from the nine water samples mentioned above (two GW samples, three SW, two TW and two 50-fold diluted raw LW) were evaluated for the 37 selected pesticides.

The SPE extracts obtained for each blank sample were spiked at 10 µg/L of each individual pesticide (equivalent to 0.1 µg/L in sample) and 5 µg/L of each isotope-labelled I.S. used (equivalent to 0.05 µg/L in sample). After UHPLC–MS/MS analysis, responses obtained (Y) were compared with those of a solvent standard mix at 10 µg/L (Z). The ratio ($Y/Z \times 100$) was taken as absolute matrix effect [32]. Signal suppression (ratio <100%) was typically observed.

Matrix effects were not much significant for those pesticides determined in negative ionization mode. Only low signal suppression was observed for bromacil and terbacil, in the raw LW (Fig. 2). Most of pesticides were determined in positive ionization mode, and signal suppression was generally observed for all water types analyzed, except for buprofezin which was the last eluting compound. As expected, signal suppression in raw LW was notably greater than in the other type of samples (see yellow and orange bars in Fig. 2). In general, compounds

more retained (from imazalil to pirimiphos methyl) suffered higher signal suppression than compounds less retained in all types of waters. This fact is in accordance to other studies using UHPLC–MS/MS where other analytes, like pharmaceuticals, were determined in surface water [41].

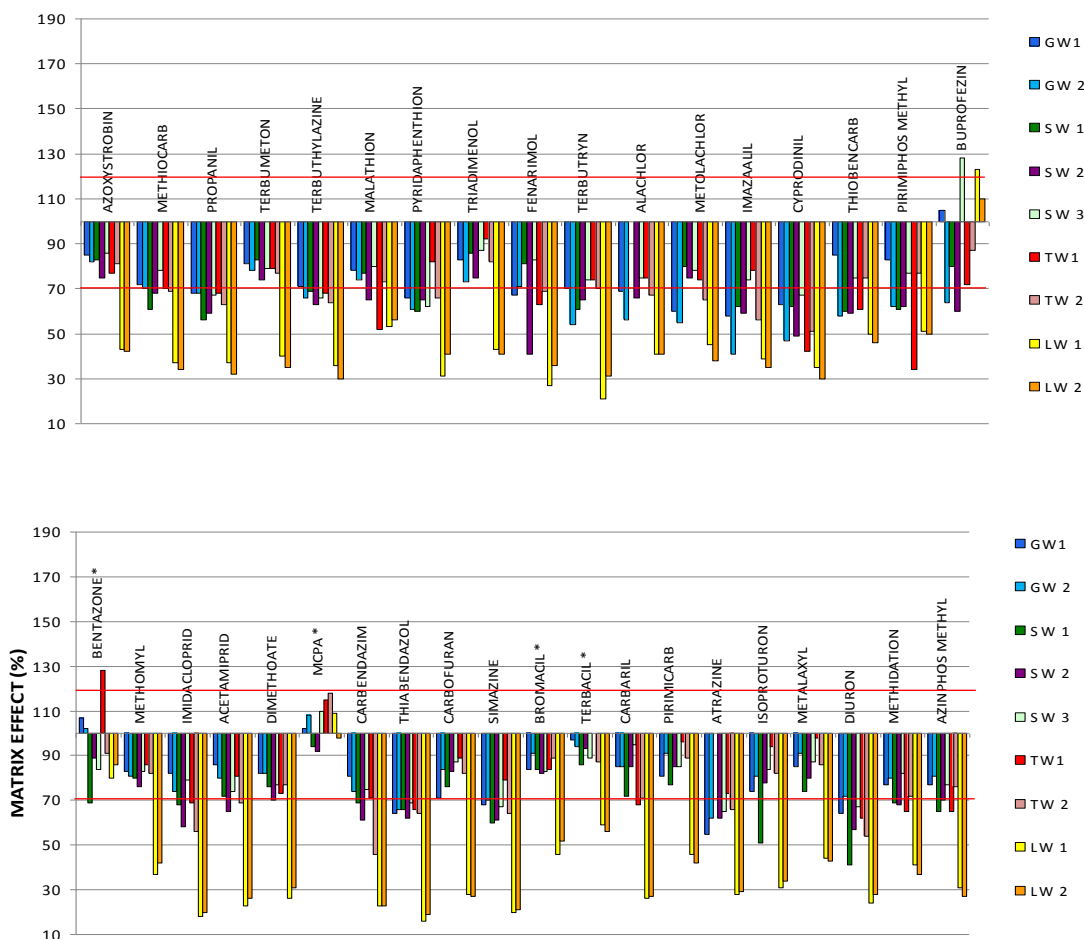


Fig. 2. Matrix effect for selected pesticides in two ground (GW), three surface (SW), two treated (TW) and two leached (LW) water samples analyzed by UHPLC-MS/MS. Analyte concentration 0.1 µg/L for each pesticide. *Compounds determined in negative ionization mode.

Matrix effects are both compound and sample dependent. The effect of the sample matrix is evident as depicted in several figures of this paper, especially for LW samples. In addition, the signal suppression observed for a given sample was generally compound

dependent, even within the same pesticide family. For example, isoproturon and diuron are both phenylurea herbicides, however while isoproturon has tolerable suppression in two SW samples (SW2 and SW3), the diuron signal decreased considerably (<70%). In the other SW analyzed (SW1), signal suppression was unacceptable for both herbicides. Terbumeton and atrazine are triazine herbicides, however when matrix effects in GW1 and GW2 were compared, only tolerable signal suppression was found in the case of terbumeton. These and other examples illustrate a heterogeneous behaviour when determining multi-class analytes in different environmental water matrices, making rather difficult matrix effect correction. Application of matrix-matched calibration is not reliable due to differences existing in environmental waters composition; other options like standard additions for each sample or additional clean-up steps, are time-consuming, involve more sample manipulation and may increase the analytical errors associated to sample treatment; sample dilution might be a good option although it would reduce method sensitivity and would difficult the use of three transitions at the LOQ level for some compounds. The best solution seems to be the use of isotope-labelled I.S.s to correct analytes signal suppressions or enhancements resulting from matrix interferences. The ideal situation, where each analyte would be corrected by its own isotope-labelled molecule, is rather problematic when the multi-residuality of the method increases due to the commercial unavailability of reference standards for several compounds and to economical restrictions to acquire a large number of isotope-labelled reference standards. In spite of this, some applications using the isotope-labelled molecule for each individual analyte have been reported in multi-residue methods, especially when determining pharmaceuticals in environmental water. An option normally applied within the environmental field, the use of only a few isotope-labelled I.S.s, has been explored in this work for correction of matrix effects (7 labelled compounds were used out of 37 compounds determined). Analytes were divided into several groups as a function of their retention time with the objective of performing correction with the I.S. of the nearest retention time. As expected (Fig. 3), satisfactory corrections were observed when isotope-labelled analytes were applied to their corresponding compound for all water samples tested, LW included. However, when the labelled I.S. was used to correct for matrix effects of other compounds eluting at similar retention time, unsatisfactory results were obtained in several cases. Different examples are shown in Fig. 4. Thus, for compounds corrected by diuron- d_6 (Fig. 4a), an undesirable enhancement was obtained for metalaxyl (compound at the nearest retention time), isoproturon (compound that belongs to the same diuron pesticide family) and pirimicarb. On the contrary, atrazine matrix effect was notably corrected in all water types (no values are reported for atrazine in SW1 because this sample was positive at a level much higher than 4xLOQ). Methidation and azinphos methyl were properly corrected except for SW1, where matrix

suppression was not correctly compensated by the I.S. used. Another example is shown in Fig. 4b for compounds corrected by terbuthylazine-d₅. Despite terbumeton is also a triazine herbicide and almost co-eluting with terbuthylazine, matrix effect for all samples tested increased from around 80%, without I.S. correction, up to around 120% when using the analogue isotope-labelled I.S. On the contrary, for compounds eluting separately to terbuthylazine-d₅, like methiocarb, propanil, pyridaphenthion and fenarimol, their matrix effect were notably corrected in all samples. In the case of azoxystrobyn and triadimenol, undesirable enhancement was observed in most of samples, making the use of this isotope-labelled molecule not advisable. However, a good correction was obtained for malathion, except for SW3.

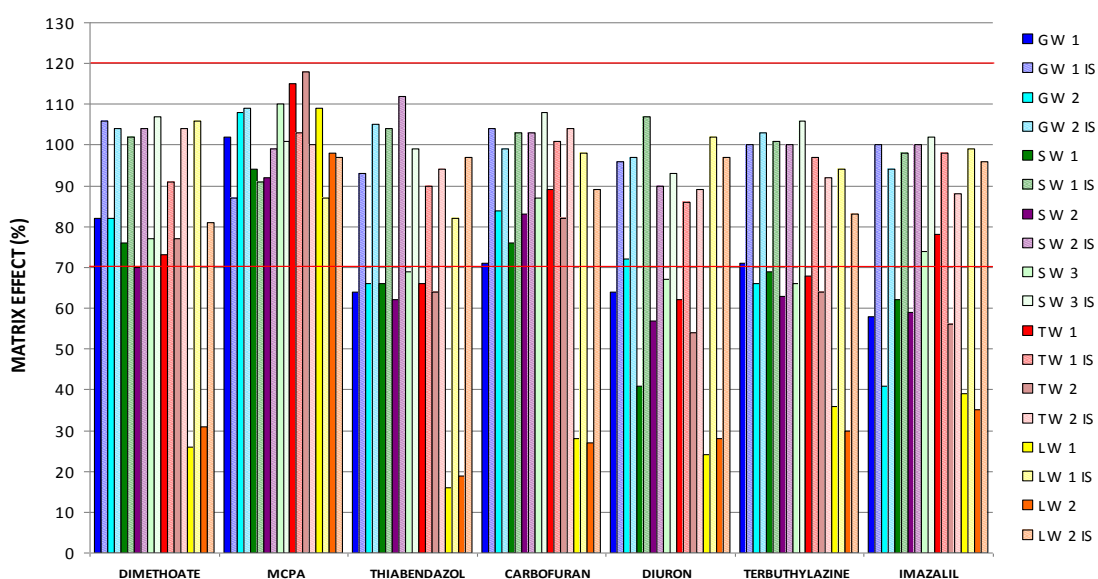


Fig. 3. Matrix effects in different water types, ground (GW), surface (SW), treated (TW) and leachate (LW), before and after correction with the own analyte labelled IS.

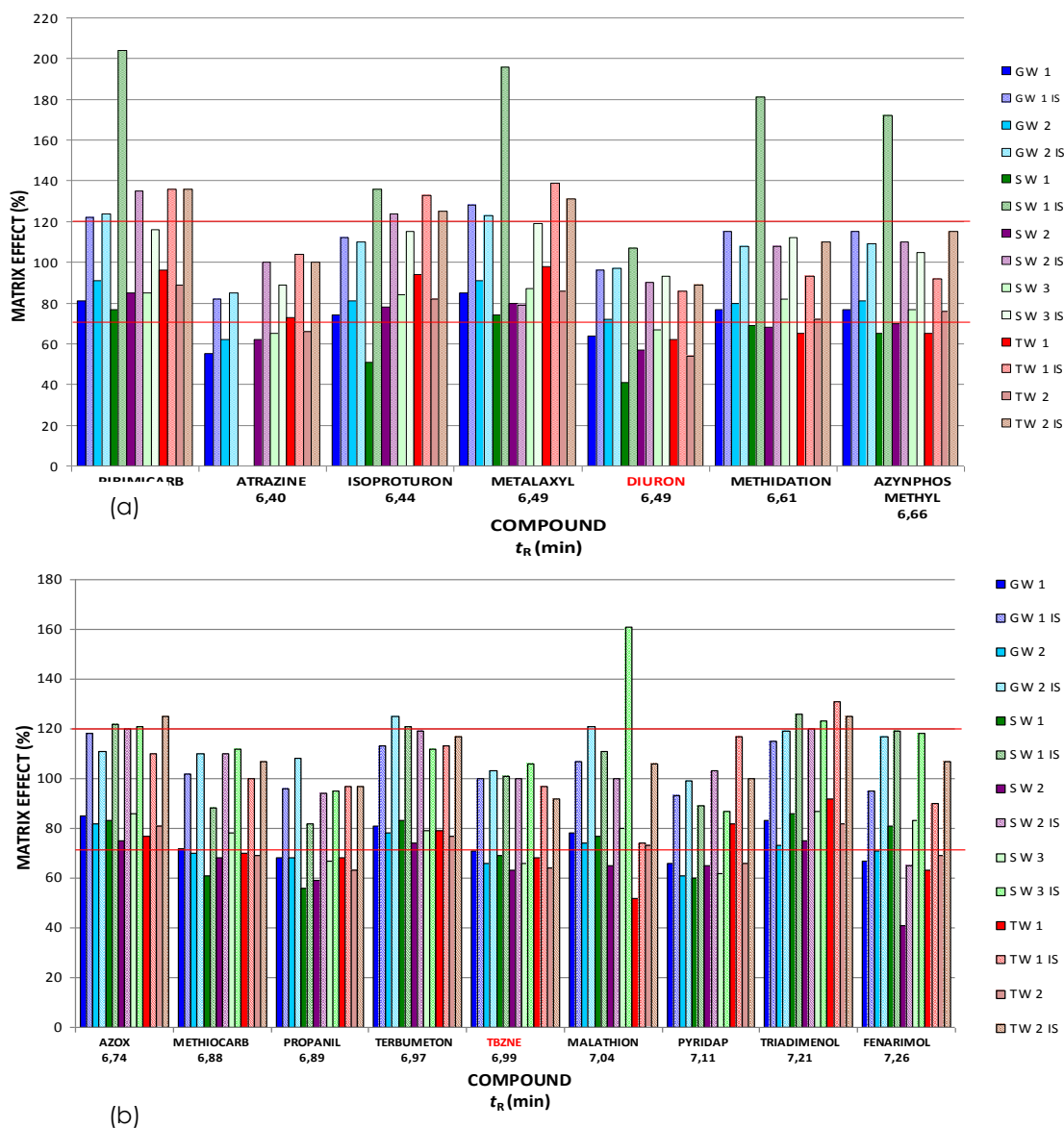
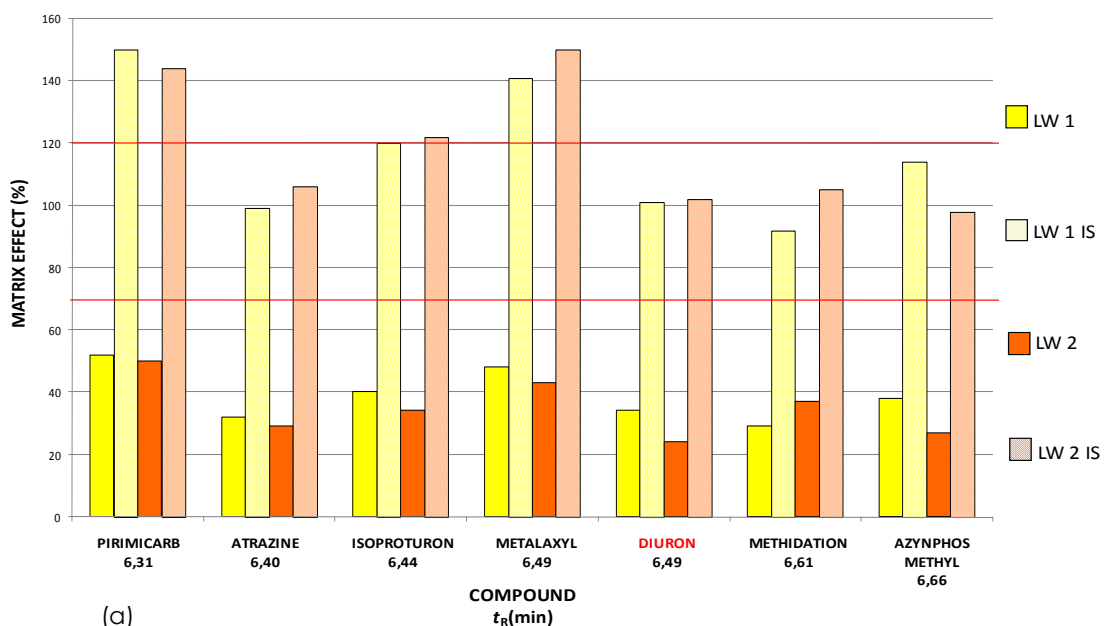


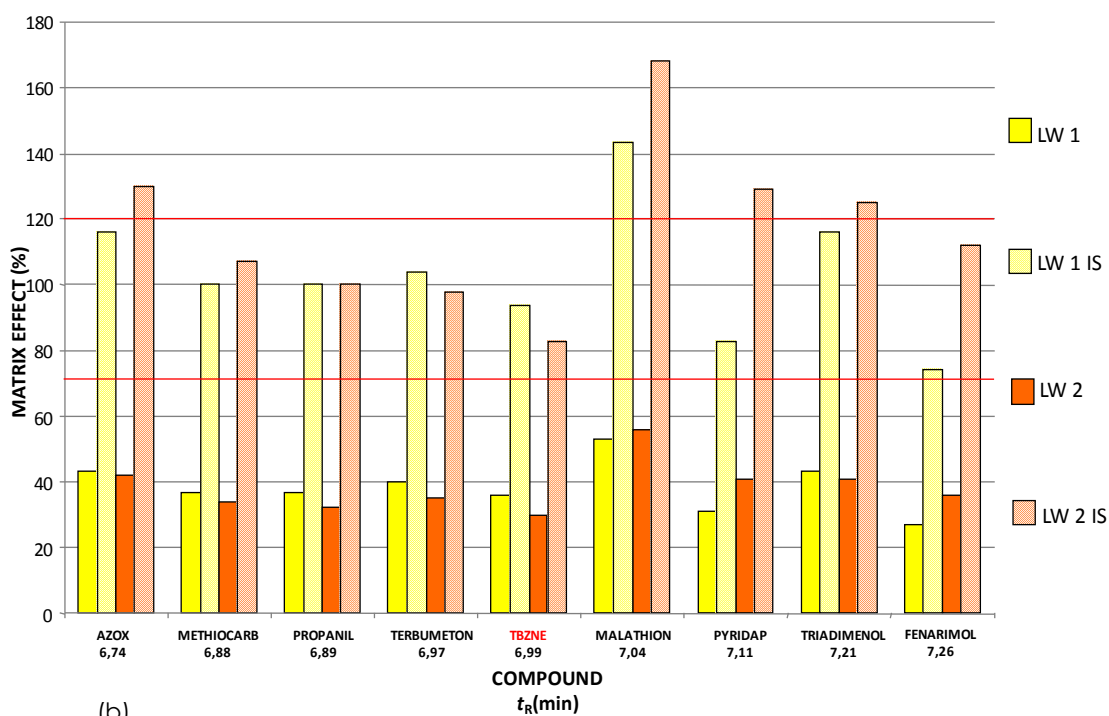
Fig. 4. Matrix effects in different water types, ground (GW), surface (SW) and treated (TW), before and after correction with the nearest retention time labelled analyte (a) compounds corrected by diuron- d_6 , (b) compounds corrected by terbuthylazine- d_5 . Abbreviations: AZOX (azoxystrobin); TBZNE (terbuthylazine); PYRIDAP (pyridaphenthion).

Concerning LW matrix, a relatively uniform, although strong, suppression for almost all compounds was observed. In these samples, the use of isotope-labelled I.S.s, even when it differed substantially with analytes retention time, was found a general good approach for quantification (Fig. 5a and b). The strong suppression observed in this type of samples forced us to use isotope-labelled I.S.s for correction, even if this correction was not the most appropriate. In other words, it seemed that potential errors introduced by a (not fully adequate) I.S. would be smaller than those obtained without any type of correction. As an example, terbuthylazine- d_5 was not recommended for matrix effect correction on terbumeton in SW, GW and TW. However, in the case of LW (Fig. 5b) its use allowed to compensate matrix effect from 40% to a corrected value around 100%, leading to a right quantitation. Only bentazone, terbacil and bromacil (measured in negative ionization mode) were not corrected using isotope-labelled I.S.s in LW. For these compounds, MCPA- d_3 should be used. However, this I.S. showed a different behaviour in this type of samples, and it seemed not fully appropriate to be used as I.S. for these herbicides. The other exception was buprofezin that was not corrected with imazalil- d_5 , due to opposite behaviour in LW (see Fig. 2). With these four exceptions, the other compounds were corrected using the nearest retention-time isotope-labelled I.S.: dimethote- d_6 (methomyl to carbendazim); thiabendazol- d_6 (thiabendazol); carbofuran- d_3 (carbofuran to carbaril); diuron- d_6 (pirimicarb to azinphos-methyl); terbuthylazine- d_5 (azoxystrobin to fenarimol); imazalil d_5 (terbutryn to pirimiphos-methyl).

Based on empirical behaviour observed, we tried to find a compromise for all analyte/sample matrix combinations, consisting on using the seven isotope-labelled I.S.s tested for matrix effects correction of their corresponding seven analytes in all type of water samples, and also for some of the remaining compounds included in the multi-residual method. The rest of compounds (14 out of 37) were not corrected for matrix effects, as we did not observe a clear improvement when using these I.S.s. This approach was found satisfactory for all water matrices tested with the exception of raw LW, as commented above. Matrix effects correction in real-world samples (DW, SW, GW, TW) was performed as shown in Table 2.



(a)



(b)

Fig. 5. Matrix effects in two raw leachate water samples before and after correction with the nearest retention time labelled analytes. Abbreviations: AZOX (azoxystrobin); TBZNE (terbutylazine); PYRIDAP (pyridaphenthion).

Table 2. Method validation for drinking water (DW), surface water (SW), ground water (GW) and treated water (TW). Recovery (%) and relative standard deviation (RSD, %) for five replicates and limits of detection

Compound	f_{KOW}	LOD (µg)	DW						SW						TW					
			LOQ (n=5)		4LOQ (n=5)		LOQ (n=5)		4LOQ (n=5)		LOQ (n=5)		4LOQ (n=5)		LOQ (n=5)		4LOQ (n=5)			
			Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)		
Benzo(a)pyrene	3.30	1.40	93	5	97	16	89	5	108	12	6	99	12	93	15	120	13	104	13	
Methomyl	3.50	0.40	91	8	87	14	80	7	116	7	8	116	7	93	8	105	11	111	11	
Imidacloprid	4.12	0.70	103	8	113	23	111	10	109	4	4	112	8	70	8	82	7	99	11	
Acetamiprid	4.49	0.10	75	6	96	1	87	3	102	6	7	113	7	91	12	101	16	107	6	
Dinoseb	4.51	0.30	93	5	103	1	101	8	109	3	3	100	7	101	14	94	11	105	2	
MCPA	4.68	7.00	73	5	76	6	106	3	105	8	8	93	8	100	6	117	8	114	1	
Carbendazim	4.93	0.10	90	8	113	11	80	2	115	3	3	89	7	116	16	112	11	107	6	
Thiabendazol	5.46	0.30	96	4	100	1	99	2	101	3	3	95	11	95	8	89	7	94	9	
Carbofuran	5.77	0.10	99	2	101	1	101	8	101	5	5	120	5	93	7	107	8	102	3	
Simazine	5.81	0.20	102	5	120	20	117	11	104	6	6	194	27	125	9	96	2	96	17	
Bromacil	5.81	1.20	93	9	113	5	79	12	101	3	3	101	16	97	12	74	9	86	1	
Terbacil	5.93	1.90	104	7	104	5	95	6	100	2	2	97	16	106	9	92	2	95	4	
Carbaryl	5.93	0.10	78	1	77	10	74	3	88	1	1	72	17	79	7	99	16	98	16	
Prinacarb	6.31	0.30	65	13	74	19	55	4	83	1	1	108	13	93	2	74	18	79	16	
Atrazine	6.40	0.40	86	2	80	5	85	5	88	5	5	84	14	85	5	111	13	98	15	
Isoproturon	6.44	0.20	84	5	98	5	91	6	109	6	3	116	3	111	6	80	3	85	7	
Metolaxyl	6.49	0.60	84	0	89	16	77	3	105	4	4	110	3	115	4	85	7	84	5	
Diuron	6.49	0.10	97	2	97	5	101	4	96	2	2	117	5	105	2	96	12	89	2	
Methidation	6.61	0.70	77	3	79	10	79	15	85	5	5	118	7	112	14	104	17	98	8	
Azoxystrobin	6.66	0.10	101	11	92	3	82	1	82	10	10	102	13	102	2	99	21	102	10	
Methicarb	6.74	0.50	72	6	81	8	72	10	86	7	7	99	2	114	1	55	4	67	5	
Propazin	6.88	0.10	100	7	104	13	108	4	108	4	4	108	5	101	3	120	5	108	4	
Terbufoson	6.89	0.30	70	7	134	22	79	8	117	6	6	152	26	136	11	117	3	112	5	
Terbutylazine	6.97	0.40	83	7	77	10	73	13	84	4	4	111	8	115	1	77	4	77	4	
Milabion	6.99	0.40	99	6	98	4	95	2	99	3	3	93	11	107	3	111	3	101	2	
Pyridaphenthion	7.04	0.40	71	17	90	12	56	13	84	6	6	52	4	88	11	113	15	95	6	
Triadimenol	7.11	0.10	94	7	113	29	98	8	94	3	3	120	10	111	6	112	10	93	18	
Fenazintol	7.21	0.40	72	6	87	1	76	5	91	2	2	80	18	83	9	77	2	76	7	
Terbutryn	7.26	2.50	128	28	97	12	105	13	82	3	3	103	9	100	15	110	16	93	14	
Aliclor	7.41	1.00	70	13	60	1	71	5	70	9	9	83	9	80	6	72	5	70	8	
Metolachlor	7.42	2.50	70	17	94	13	94	10	126	13	13	125	7	83	11	90	12	84	21	
Imazali	7.48	0.40	76	15	90	6	79	6	99	7	7	85	14	87	8	61	16	60	10	
Cyprodinil	7.64	0.40	91	5	103	3	96	7	108	2	2	100	7	97	4	115	2	102	4	
Thiobencarb	7.67	1.00	90	13	96	5	97	7	98	8	8	119	6	93	4	89	6	73	7	
Primiphos Methyl	7.84	0.20	46	20	74	8	60	17	85	13	13	63	23	79	14	28	7	38	12	
Buprofen	8.26	0.10	77	11	72	5	71	14	88	7	7	70	7	70	14	31	12	24	16	
																81	6	63	18	

3.5. Method validation

For validation purposes four different types of blank water samples (DW, SW, GW, TW) were used. Raw LW was discarded due to the difficulties to find a real blank sample, recommendable for validation purposes. Linearity of method was studied in the range 0.5–100 µg/L for all selected compounds, obtaining satisfactory results. Residuals were always below 30% and correlation coefficients by linear or quadratic curves (bentazone, MCPA and alachlor) were greater than 0.99.

Precision and accuracy of the overall analytical procedure were evaluated by spiking the blank samples at two different concentration levels (0.025 and 0.1 µg/L), and analyzing them in quintuplicate. In relation to the LOQ, we decided to establish a LOQ objective consisting on a common value for all compounds included in the method, which was satisfactory for our purposes, i.e. being in the line of the EU Directive for drinking water [1]. This LOQ objective was set up at 0.025 µg/L, and the method was fully validated in samples at this value. Besides, all the three SRM transitions could be acquired at this low level for all analytes, making the reporting data highly confident.

As Table 2 shows, recoveries were satisfactory (between 70 and 120%) for most of compounds at the two spiking levels. The best results for all types of water tested were obtained for those pesticides with available isotope-labelled molecules, and also for compounds ionized in negative mode. Several pesticides could be quantified without I.S. correction with acceptable recoveries and precision, while for others the use of analogue isotope-labelled I.S.s improved recovery data.

Thiobencarb and pirimiphos methyl presented low recoveries in all samples due to SPE pre-concentration losses. Unsatisfactory results were obtained for simazine and propanil in GW, especially at the LOQ level, possibly due to a poor correction of matrix effects by the I.S. used. However for the rest of water samples, recovery data for these two pesticides were mostly acceptable.

The method presented satisfactory precision with most RSD values below 15%. For a few compounds quantified using the nearest retention-time isotope-labelled I.S., like imidacloprid, propanil, pyridaphenthion, alachlor and fenarimol, sporadic higher levels were observed.

The excellent sensitivity of the method allowed us to reach very low instrumental LODs values, ranging from 0.1 to 7 pg (Table 2). The method was found highly specific as no relevant signals were observed in the blanks at the analyte's retention times.

3.6. Application to environmental water samples

The UHPLC–MS/MS method developed in this paper was applied to around 40 water samples, including SW (9 samples), GW (3 samples), DW (3 samples) and also leaching water samples from an urban solid residues plant collected before (LW, 13 samples) and after (TW, 13 samples) osmosis treatment. Most of positives findings were detected in the raw LW samples. A great variety of target pesticides were detected, at least once, in this type of samples (concretely 28 out of 37 compounds monitored), in a wide range of concentrations. More than 50% of pesticides were found in all the raw LW samples analyzed. Besides, the highest pesticide concentrations corresponded to these samples. Illustrative examples are the herbicides MCPA (maximum concentration found 225 µg/L), terbuteton (29 µg/L), simazine (13 µg/L), terbutryn (12 µg/L) and terbutylazine (40 µg/L); fungicides like carbendazim (25 µ/L) or imazalil (2.2 µg/L); and insecticides like carbofuran (24 µg/L), malathion (13 µg/L) and methidathion (13 µg/L).

The majority of SW samples were collected from the Ebro and Tajo rivers. 46% of target pesticides were detected at least once, but normally at levels lower than 0.025 µg/L. Most of reported positives corresponded to herbicides, being noteworthy the triazines family, especially atrazine that was found in 5 samples, in all cases at levels higher than 0.025 µg/L with a maximum value of 0.74 µg/L. Regarding GW, three samples collected from wells located within an agricultural citric area were analyzed. A total of 11 pesticides were detected, and 7 of them were herbicides. Around 50% of positives presented concentrations lower than LOQ and only in one case (bromacil) the concentration exceeded 0.1 µg/L (0.22 µg/L). In relation to drinking water, only three detections were reported, corresponding to buprofezin, imazalil and diuron, which were detected only once, and at levels lower than 0.025 µg/L.

Fig. 6 shows selected UHPLC–MS/MS chromatograms for an Ebro river SW sample. As this figure shows, the high sensitivity of method allowed the reliable detection and confirmation of levels even lower than the LOQ established as objective in our work (i.e. 0.025 µg/L). In this sense, the three SRM transitions acquired for imidacloprid, simazine, diuron, thiobencarb, metalaxyl and carbendazim can be reliably used for their determination, with estimated levels between 0.002 and 0.020 µg/L. A safe confirmation of positive findings, even at these low levels, was feasible acquiring to 3 SRM transitions and evaluating their Q/q ion ratios.

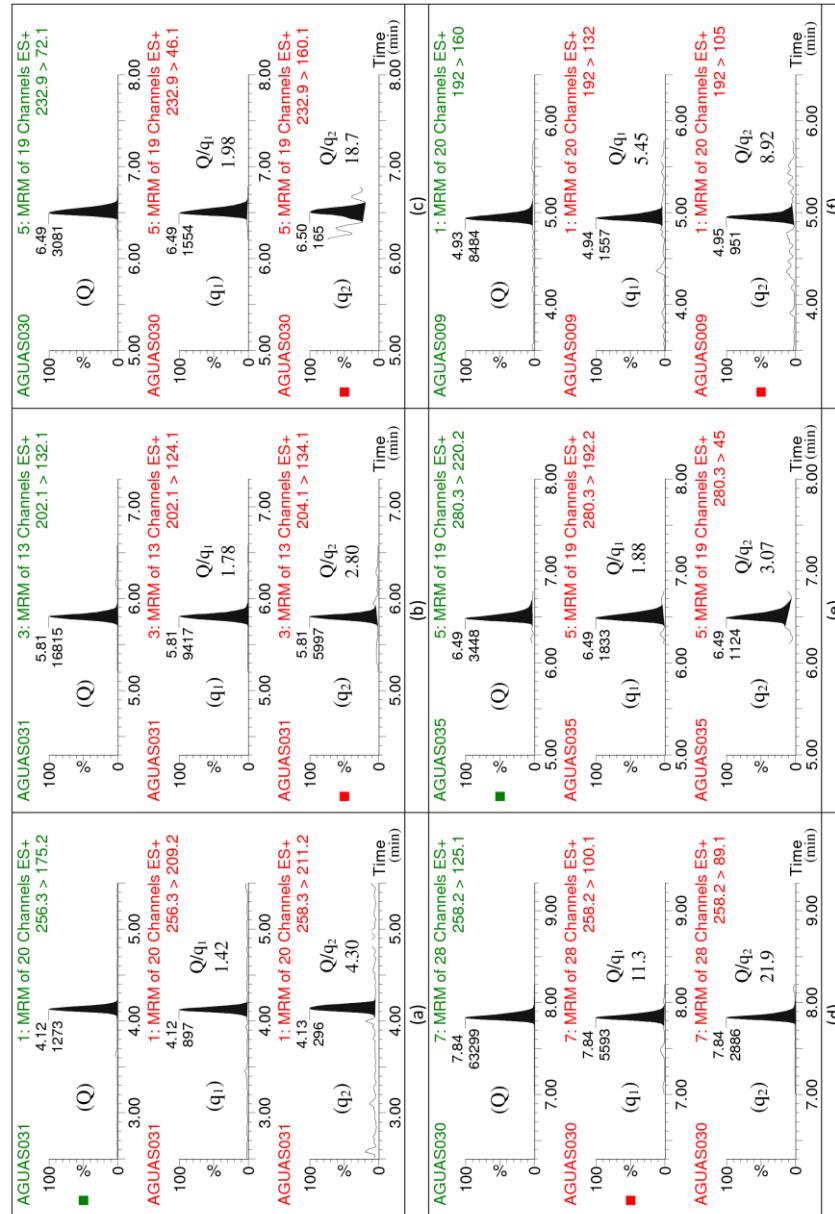


Fig. 6. Selected UHPLC–MS/MS chromatograms for a surface water sample from the Ebro river. All pesticide concentrations were below 0.025 µg/L. Estimated concentrations (a) imidacloprid 0.015 µg/L, (b) simazine 0.020 µg/L, (c) diuron 0.003 µg/L, (d) thiobencarb 0.015 µg/L, (e) metalaxyl 0.002 µg/L, (f) carbendazim 0.002 µg/L. Quantification transition (Q), confirmation transitions (q₁ and q₂).

4. Conclusions

This paper shows that UHPLC–MS/MS is a rapid, selective and sensitive technique for the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples. Use of a fast-acquisition triple quadrupole mass analyzer allows reducing dwell times (10 ms) and acquiring up to three SRM transitions per compound to assure a reliable confirmation maintaining good peak shape. With a chromatographic run time of 10 min, up to 37 pesticides were satisfactorily quantified at 0.025 µg/L in different water types, with a previous off-line SPE pre-concentration step.

Special emphasis has been made in this work to the study of matrix effects in different types of water samples. The best approach to correct these undesirable effects was found to be the use of isotope-labelled analytes as I.S.s. However, the non-availability of isotopic compounds for all the 37 pesticides tested and the high cost of using a high number of isotope-labelled I.S.s, led us to consider the use of only 7 I.S.s for correction of matrix effects. Our data showed a heterogeneous behaviour in the 37 pesticides/9 water matrices tested. It was difficult to establish general rules, with the exception of that using the own analyte labelled I.S.s assured a satisfactory correction in all the samples tested, raw LW included. Apart from this expected fact, the use of analogue isotope-labelled I.S.s did not always assure an efficient correction, as it was highly dependent on every analyte/matrix combination. Only in raw leachate samples, where strong signal suppression was observed for most pesticides, it was worth to use analogues, because data obtained were always better than without correction. However, in other water types (SW, GW or TW) where matrix effects were lower, using analogue isotope-labelled I.S.s did not always lead to satisfactory results in comparison to the non-corrected data, and for several pesticides no correction was required in the analysis of these water samples. With some exceptions, in absence of the analyte isotope labelled compound, the best approach was the use of an analogue I.S. with close retention time. However, although the heterogeneous behaviour observed would make necessary a detailed study of matrix effects for every analyte/sample matrix combination to have confident quantitative data.

The developed method has been applied for monitoring pesticide residues in different environmental (SW, GW and DW) and wastewaters (raw and treated urban solid waste leachates). Satisfactory results have been obtained, both regarding quantitative and confirmative issues, within the same chromatographic run. All detections at concentrations above 0.025 µg/L were confirmed by the three acquired SRM transitions and the compliance of

their Q/q ratios. In several cases, the excellent method sensitivity allowed the safe confirmation of positive findings in real samples far below the validated LOQ level (see Fig. 6).

Acknowledgements

The authors are very grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using Acquity and TQD instruments.

This work has been developed under financial support of the Ministry of Education and Science Research Project (Ref. CTM2006-06417).

References

- [1] Council Directive 98/83/EC, Off. J. Eur. Commun., L330 (3 November 1998) 32.
- [2] T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A* **1000** (2003), p. 477.
- [3] Y. Picó, C. Blasco and G. Font, *Mass Spectrom. Rev.* **23** (2004), p. 45.
- [4] F. Hernández, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, J.M. Marín and M. Ibañez, *Trends Anal. Chem.* **24** (2005), p. 96.
- [5] M. Kuster, M. López de Alda and D. Barceló, *Mass Spectrom. Rev.* **25** (2006), p. 900.
- [6] R. Rosen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **18** (2007), p. 246.
- [7] K. Greulich and L. Alder, *Anal. Bioanal. Chem.* **391** (2008), p. 183.
- [8] R. Bossi, K.V. Vejrup, B.B. Mogensen and W.A.H. Asman, *J. Chromatogr. A* **957** (2002), p. 27.
- [9] F. Liu, G. Bischoff, W. Pestemer, W. Xu and A. Kofoet, *J. Chromatography* **63** (2006), p. 233.
- [10] F. Perreau, P. Bados, L. Kerhoas, S. Nélieu and J. Einhorn, *Anal. Bioanal. Chem.* **388** (2007), p. 1265
- [11] F. Hernández, J.V. Sancho, O.J. Pozo, A. Lara and E. Pitarch, *J. Chromatogr. A* **939** (2001), p. 1.
- [12] J.V. Sancho, O.J. Pozo and F. Hernández, *Analyst* **129** (2004), p. 38.
- [13] J.S. Mellors and J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* **76** (2004), p. 5441.
- [14] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale and A.J. Guwy, *Anal. Bioanal. Chem.* **391** (2008), p. 1293.
- [15] A.L. Batt, M.S. Kostich and J.M. Lazorchak, *Anal. Chem.* **80** (2008), p. 5021.
- [16] J. Wang, X. Pang, F. Ge and Z. Ma, *Toxicol.* **49** (2007), p. 1120.
- [17] E. Pastor-Montoro, R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, M.E. Hernández-Torres and J.L. Martínez-Vidal, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21** (2007), p. 3585.
- [18] M. Mezcuca, A. Agüera, J.L. Llibería, M.A. Cortés, B. Bagó and A.R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* **1109** (2006), p. 222.

- [19] M. Ibáñez, J.V. Sancho, D. McMillan, R. Rao and F. Hernández, *Trends Anal. Chem.* **27** (2008), p. 481.
- [20] G. Gervais, S. Brosillon, A. Laplanche and C. Helen, *J. Chromatogr. A* **1202** (2008), p. 163.
- [21] C.C. Leandro, P. Hancock, R.J. Fussell and B.J. Keely, *J. Chromatogr. A* **1103** (2006), p. 94.
- [22] European Union Decision 2002/657/EC, Off. J. Eur. Commun., L221 (12 August 2002) 8.
- [23] European Commission DG-SANCO, Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed, No. SANCO/2007/3131, Brussels, 31 October 2007, http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf.
- [24] S. Rodríguez-Mozaz, M.J. López de Alda and D. Barceló, *J. Chromatogr. A* **1152** (2007), p. 97.
- [25] A.A. Kampioti, A.C. Borba da Cunha, M. López de Alda and D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* **382** (2005) 1815).
- [26] J.M. Marín, J.V. Sancho, O.J. Pozo, F.J. López and F. Hernández, *J. Chromatogr. A* **1133** (2006), p. 204.
- [27] L. Viglino, K. Aboulfadl, A.D. Mahvelat, M. Prévost and S. Sauvé, *J. Environ. Monit.* **10** (2008), p. 482.
- [28] O.J. Pozo, J.V. Sancho, M. Ibáñez, F. Hernández and W.M.A. Niessen, *Trends Anal. Chem.* **25** (2006) 1030).
- [29] J.V. Sancho, O.J. Pozo, F.J. López and F. Hernández, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16** (2002), p. 639.
- [30] W.M.A. Niessen, P. Manini and R. Andreoli, *Mass Spectrom. Rev.* **25** (2006), p. 881.
- [31] P.J. Taylor, *Clin. Biochem.* **38** (2005), p. 328.
- [32] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer and C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* **75** (2003), p. 3019.
- [33] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert and A. De Leenheer, *J. Chromatogr. A* **1029** (2004), p. 153.
- [34] J.C. Van De Steene, K.A. Mortier and W.E. Lambert, *J. Chromatogr. A* **1123** (2006), p. 71.
- [35] J. Kang, L.A. Hick and W.E. Price, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21** (2007), p. 4065.
- [36] E. Pitarch, J.M. Marín, F. López, E. Hogendoorn and F. Hernández, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **87** (2007), p. 237.
- [37] F. Hernández, J.V. Sancho and O.J. Pozo, *Anal. Bioanal. Chem.* **382** (2005), p. 934.
- [38] J.C. Van De Steene and W.E. Lambert, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19** (2008), p. 713.
- [39] B.J. Vanderford and S.A. Snyder, *Environ. Sci. Technol.* **40** (2006), p. 7312.
- [40] F.M. Lagerwerf, W.D. van Dongen, R.J.J.M. Steenvoorn, M. Honing and J.H.G. Jonkman, *Trends Anal. Chem.* **19** (2000), p. 418.
- [41] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale and A.J. Guwy, *J. Chromatogr. A* **1161** (2007), p. 132.

2.5.3 Discusión de los resultados del artículo científico 4

En primer lugar, se optimizaron los parámetros de masas para los iones precursores y producto de todos los analitos seleccionados. La mayoría de los compuestos se ionizaron en modo positivo, a excepción de cuatro herbicidas, siendo sus iones $[M+H]^+$ (positivo) o $[M-H]^-$ (negativo) los más abundantes, por lo que generalmente fueron seleccionados como iones precursores. Para tres analitos se aprovechó su facilidad de fragmentación a bajas energías para tomar su ion producto más abundante como ion precursor en alguna de las transiciones, promoviendo su formación en el cono mediante la aplicación de un voltaje de cono elevado (entre 40 y 55 V). Con tal de asegurar en una sola inyección la identificación del analito en la muestra se seleccionaron tres transiciones, evitando en la medida de lo posible las que implicaran fragmentaciones poco específicas (pérdidas de H_2O , $CO...$). Además, en aquellos analitos con presencia de halógenos en su estructura (Cl y Br) se seleccionaron las transiciones con los dos isótopos más abundantes con el fin de evitar diferencias de sensibilidad sustanciales entre la transición de cuantificación y las de confirmación, además del aporte adicional en cuanto a número de IPs que dicha elección representa. El analizador de triple cuadrupolo TQD™ permitió simultanear la adquisición de muchas transiciones sin pérdida considerable de sensibilidad, conservando un número adecuado de puntos por pico, gracias a la nueva celda de colisión no hexapolar T-Wave que permite trabajar a mayores velocidades de barrido, de hasta 5 mS. Además, con este instrumento también se consigue reducir el tiempo empleado en el cambio de polaridad, pudiendo pasar de positivo a negativo, y viceversa, en tan solo 20 mS. Esta mayor velocidad del espectrómetro de masas es de vital importancia en el acoplamiento a una cromatografía tan rápida como UHPLC, haciendo posible trabajos como el nuestro en el que se requiere detectar cerca de 40 compuestos con tres transiciones en tan solo 10 minutos.

Una vez definidas las condiciones de detección por MS/MS, se estudió la parte relacionada con la cromatografía. En métodos multiresiduales es difícil llegar a una situación ideal en la que la forma de pico y la sensibilidad de todos los analitos se

optimicen con las mismas condiciones cromatográficas. Así, en el proceso de elección de la fase móvil más idónea, tras probar diversas combinaciones que implicaban el uso de agua, metanol y acetonitrilo junto a varios aditivos (HCOOH y NH₄Ac) a distintas concentraciones, se encontró que el mejor compromiso forma de pico/sensibilidad para la mayoría de los compuestos se obtenía con agua y metanol, ambos en presencia de 0.1mM de NH₄Ac. Además, se probaron dos columnas UHPLC de Waters (BEH y HSS T3), ambas conformadas por rellenos C₁₈ pero con mecanismos de retención diferentes. La BEH, con particulado de 1.7 μm, incorpora ligandos trifuncionales donde las cadenas hidrocarbonadas C₁₈ se enlazan a un sustrato híbrido de sílice con puentes de etileno. En la HSS T3, con particulado de 1.8 μm, las cadenas C₁₈ se enlazan a partículas puras de sílice de alta resistencia. Los resultados fueron muy similares ya que ambas columnas son adecuadas para la retención de un amplio rango de compuestos de distinta naturaleza y polaridad. La selección de la HSS T3 se basó en la mayor resistencia teórica de las partículas porosas de esta columna a las altas presiones exigidas en UHPLC, lo cual nos permitiría realizar un mayor número de inyecciones.

Para preconcentrar los analitos y alcanzar la sensibilidad suficiente para que todos ellos pudieran ser identificados haciendo uso de sus tres transiciones al nivel del LOQ objetivo (0.025 μg/L), se utilizaron cartuchos Oasis HLB de 0.2 g, cuyo sorbente de fase inversa es un copolímero humedecible en agua que permite un balance hidrofílico - lipofílico ideal, tanto para compuestos polares como apolares o de polaridad intermedia. Pese a ello, para obtener una buena recuperación de compuestos con carácter ácido se necesitó la adición de un 1% de HCOOH a la muestra previo a su paso por el cartucho para protonar estos analitos, disminuyendo así su polaridad y facilitando la retención. Para comprobar la eficacia y robustez del proceso de preconcentración, se utilizaron 9 aguas de distinta naturaleza (subterráneas, superficiales y aguas de lixiviado procedentes de una planta de residuos sólidos urbanos recogidas antes y después del proceso de depuración). Previo paso por el cartucho, las "aguas brutas" de lixiviado fueron diluidas 50 veces con agua HPLC con tal de disminuir su elevado contenido en materia orgánica y viscosidad.

Todas las muestras fueron fortificadas al nivel de 0.1 µg/L (n=3) y sometidas al proceso de preconcentración y reconstitución descrito en el artículo científico. Se aplicó el procedimiento de SPE con un factor de preconcentración de 100 (100 mL de muestra y volumen final de 1 mL) y se comparó la respuesta para cada analito con la obtenida para las mismas muestras, pero fortificadas (10 µg/L) tras la SPE. De este modo, el efecto matriz afectó por igual a las muestras y tan sólo se cuantificaron las posibles pérdidas en el proceso de extracción. La recuperación obtenida en todas las aguas fue satisfactoria para la mayoría de los compuestos, con la excepción de dos de los analitos más apolares (tiobencarb y metilpirimifos), para los cuales se observaron pérdidas incluso eluyendo con 10 mL de acetona. Una primera prueba de la variabilidad de la matriz en las muestras ambientales se puso de manifiesto en las recuperaciones obtenidas para el herbicida MCPA. Para todas las muestras se obtuvieron buenas recuperaciones, a excepción tan sólo de un agua subterránea para la cual se observaron pérdidas considerables (Rec < 20%), que podrían asociarse a la presencia de ciertas sustancias capaces de reaccionar y degradar al plaguicida, o consumir el ácido añadido, evitando la necesaria protonación de la molécula de MCPA para su retención en el cartucho. Al disponer de analito marcado isotópicamente (MCPA-d₃) se consiguió corregir la baja recuperación obtenida en este caso.

Como ya se ha comentado en la introducción, una de las principales ventajas de los métodos analíticos que usan UHPLC es la posibilidad de disminuir el efecto negativo de la matriz a consecuencia de la mayor capacidad de separación de analitos e interferentes. Por ello, se consideró interesante durante el desarrollo del método realizar un estudio del impacto de diversas matrices acuosas de distinta naturaleza sobre la cuantificación de los 37 plaguicidas seleccionados, así como la posibilidad de corregir los errores asociados a las supresiones y exaltaciones de señal mediante el uso de hasta 7 compuestos marcados isotópicamente. Para ello, se compararon las respuestas obtenidas con un patrón en agua HPLC y para cada una de las muestras fortificadas al mismo nivel (10 µg/L, equivalente a 0.1 µg/L en muestra) tras el proceso de extracción por SPE. Para la mayoría de los analitos, en especial los

más apolares, se obtuvieron supresiones de señal en todos los tipos de aguas, siendo mucho más acusadas en el caso de las aguas brutas de lixiviado, pese a haber sido previamente diluidas 50 veces. Se observó que los efectos matriz obtenidos dependían tanto de los analitos como de las matrices en las que se encontraban disueltos. Debido a esta falta de homogeneidad, resultaba extremadamente difícil y arriesgado establecer un criterio general de corrección para la totalidad de los compuestos seleccionados. Este hecho se puso claramente de manifiesto en la variabilidad de las respuestas obtenidas para plaguicidas estructuralmente muy parecidos y pertenecientes a la misma familia química frente a una matriz idéntica (p.e. los herbicidas isoproturon y diuron en la misma agua superficial sufren efectos matriz distintos, con respuestas relativas próximas al 80% para el primero y menores del 60% para el segundo). A este hecho se une la variabilidad de la matriz, incluso dentro del mismo tipo de aguas. Así, el fungicida fenarimol sufrió una acusada supresión de señal comparable a la obtenida en la aguas de lixiviado (40%) en una de las tres aguas superficiales, mientras que en las otras dos estaría dentro de los límites establecidos como aceptables (alrededor del 80%). Este comportamiento se reprodujo para varios analitos en otros tipos de aguas (p.e. terbutrina en aguas subterráneas o metilpirimifos en aguas tratadas).

Debido a la alta variabilidad de comportamiento de los analitos en los distintos tipos de aguas que se ha comprobado en este trabajo, se desaconseja la aplicación de algunas aproximaciones usadas para corregir el efecto matriz. Así, la cuantificación mediante calibrado en matriz no es factible a consecuencia de las grandes diferencias de composición entre los distintos tipos de aguas medioambientales. El uso del método de adiciones estándar para cada muestra o la aplicación de etapas de purificación adicionales conlleva mucha manipulación de muestra y alarga los análisis, desaprovechando las ventajas de rapidez asociada a los análisis por UHPLC, disminuyendo ostensiblemente el número de muestras analizables en el tiempo. Por último, la dilución de las muestras con el fin de homogeneizar lo más posible las distintas matrices es de difícil aplicación en análisis multiresiduales en el que se requiere alta sensibilidad para identificar en una sola inyección y de una manera

segura, mediante la presencia de tres transiciones SRM, todos los analitos a un bajo nivel de concentración (0.025 µg/L).

Descartadas las anteriores aproximaciones, la adición de patrones internos en forma de compuestos marcados isotópicamente parece ser la mejor solución. Sin embargo, como ya se ha ido apuntando durante la Tesis, al aumentar la multiresidualidad de los métodos, la aplicación de esta aproximación de manera ideal, es decir, cada analito corregido con su propio compuesto marcado, está condicionada por la disponibilidad comercial de los marcados, así como por el coste económico. Debido a ello, algunos autores optan por hacer uso de unos pocos marcados, generalmente análogos estructurales, para corregir los efectos de la matriz de todos los analitos incluidos en el método con el riesgo que ello conlleva. Esta aproximación se ha estudiado en este trabajo utilizando 7 analitos marcados para 37 compuestos. Se ha optado por agruparlos en función de su tiempo de retención y corregir sus respuestas con el patrón interno más cercano, cuya ionización en la interfase será en principio más próxima a la del analito.

Como era de esperar, los efectos de la matriz para los 7 compuestos cuya molécula marcada fue usada como patrón interno fueron satisfactoriamente corregidos en todas las aguas investigadas. Sin embargo, cuando se intentó corregir analitos que eluían a tiempos de retención similares con el patrón interno más próximo a ellos se obtuvieron resultados poco adecuados en muchos casos, sin que siguieran ningún patrón de comportamiento. Incluso compuestos pertenecientes a la misma familia química que la sustancia marcada y con t_R muy parecidos, dieron peores resultados al ser corregidos con el patrón interno que otros analitos químicamente más diferenciados y con tiempos de retención más dispares (p.e terbutilazina- d_5 (t_R :6.99) corrige mejor a metiocarb (t_R :6.88) que a terbumetona (t_R :6.97)).

Mención especial merecen las "aguas brutas" de lixiviado para las que, pese a estar diluidas 50 veces, se obtuvieron fuertes supresiones de la ionización. En este caso particular, debido a esta homogeneidad de comportamiento, el uso generalizado de los compuestos marcados, incluso eluyendo a tiempos de retención sustancialmente

diferentes, fue adoptada como la mejor solución para cuantificar este tipo de muestras.

En definitiva, la corrección del efecto matriz únicamente quedó asegurada cuando se dispuso del propio analito marcado isotópicamente. Para el resto de compuestos, basándonos en el comportamiento experimental analito/matriz, se intentó llegar a una situación de compromiso aplicando la corrección con otros patrones marcados tan sólo en aquellos casos cuyos resultados empíricos para las muestras analizadas fueron generalmente satisfactorios.

El método fue validado siguiendo las guías europeas SANCO¹⁰⁶ en cuatro tipos de aguas (superficial, subterránea, tratada y mineral), obteniéndose resultados satisfactorios en cuanto a precisión y exactitud para los dos niveles de concentración ensayados (0.025 y 0.1 µg/L). Los mejores resultados se obtuvieron para los compuestos cuantificados con ayuda de su propia molécula marcada y para los determinados por ionización en modo negativo. Muchos compuestos fueron correctamente cuantificados mediante la aplicación de calibración externa sin ningún tipo de corrección, mientras que otros mejoraron sus resultados al aplicarles el patrón marcado más cercano.

La aplicabilidad del método ha quedado demostrada tras analizar más de 50 muestras de diferente naturaleza. En cada secuencia de análisis se incluyeron muestras "blanco" fortificadas a los dos niveles que fueron usadas como controles de calidad (QCs) para dar mayor fiabilidad en el proceso de cuantificación. Más del 80% de los analitos han sido detectados en alguna ocasión cumpliendo los requisitos en materia de identificación en cuanto a tolerancia máxima admisible en las intensidades relativas de sus transiciones¹²⁶. En las aguas procedentes del lixiviado de la planta de residuos sólidos urbanos se encontraron más de la mitad de los plaguicidas, siendo sus concentraciones, con diferencia, las más elevadas entre todas las muestras analizadas. Sin embargo, en las aguas de lixiviado depuradas se observó una considerable reducción de estos niveles, incluso hasta niveles de no detección. En las muestras de aguas superficiales de ríos de gran caudal, como el Tajo y el Ebro, se

obtuvieron positivos para más del 40% de los plaguicidas estudiados, aunque la mayor parte de ellos fueron a niveles inferiores a 0.025 µg/L. Los herbicidas, sobretodo triazinas, fueron los compuestos más frecuentemente detectados en todas las aguas, alcanzando en varias ocasiones niveles superiores a 0.1 µg/L. Las muestras de varios pozos localizados en el interior de zonas citrícolas de la marjal castellonense presentaron positivos para alrededor del 30% de los compuestos, correspondiendo la mayor parte de los casos a herbicidas detectados a concentraciones inferiores al LOQ del método. Tan solo el herbicida bromacilo, tal y como sucediera en estudios anteriores llevados a cabo en pozos de características similares, fue encontrado por encima de 0.1 µg/L, reforzando así la necesidad de ser controlado de manera rigurosa.

El LOQ objetivo del método fue establecido en el nivel más bajo validado, para el cual se adquirieron tres transiciones por analito, y se confirmaron los positivos haciendo uso siempre de las intensidades relativas obtenidas. Así, el valor del LOQ fue de 0.025 µg/L en todos los plaguicidas. Sin embargo, para muchos compuestos se podrían haber establecido LOQs a niveles considerablemente más bajos, con una o incluso con dos transiciones, debido a la enorme sensibilidad alcanzada con el método desarrollado. No obstante, el nivel validado de 0.025 µg/L se consideró satisfactorio y suficientemente bajo para obtener datos de relevancia ambiental.

A la espera del salto tecnológico que implica el acoplamiento de SPE en modo "on-line" a UHPLC, con las ventajas derivadas en cuanto a automatización y ganancia de tiempo, el método desarrollado en este trabajo basado en UHPLC acoplada a un analizador de triple cuadrupolo de elevada velocidad de adquisición, mejora la sensibilidad, selectividad y rapidez de la mayoría de los métodos multiresiduales desarrollados para plaguicidas en aguas mediante HPLC con espectrómetros de masas en tándem convencionales. Con el estudio realizado en cuanto al efecto matriz, se ha demostrado que la aproximación más fiable en el campo medioambiental es utilizar, en la medida de lo posible, analitos marcados isotópicamente, siendo arriesgado realizar correcciones con otros compuestos. Una limitación que se ha observado es que, pese a la mayor capacidad de UHPLC para

separar los analitos e interferentes, el uso de interfases de acoplamiento como la utilizada en este estudio, cuyo funcionamiento no permite trabajar a los flujos elevados para los que se optimizaría el rendimiento de UHPLC, tiene como consecuencia que la teórica disminución del efecto matriz respecto a la HPLC convencional no sea la esperada, tal y como se ha comprobado en este trabajo al inyectar los mismos extractos por las dos técnicas (UHPLC-MS/MS y HPLC-MS/MS).

2.6. Bibliografía

1. L. Ritter, K. Solomon, P. Sibley, *Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: A perspective prepared for the Walkerton inquiry*, *J. Toxicol. Environ. Health*, **65**, 2002, 1-142.
2. R.J. Gilliom, J.E. Barbash, D.W. Kolpin, S.J. Larson, *Testing water quality for pesticide pollution*, *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 1999, 164A-169A.
3. R. Krieger, *Handbook of Pesticide Toxicology*. Vol. 1 (Agents), Vol. 2 (Principles). Editor Robert Krieger, Universidad de California, Ed. Academic Press, 2001.
4. L.G. Costa, G. Giordano, M. Guizzetti, A. Vitalone, *Neurotoxicity of pesticides: A brief review*, *Front. Biosci.*, **13**, 2008, 1240-1249.
5. P. Bery, *Pesticides and the intoxication of wild animals*, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **30**, 2007, 93-100.
6. M.E. DeLorenzo, G.I. Scott, P.E. Ross, *Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**, 2001, 84-98.
7. H.L. Needleman, *The Neurotoxic Properties of Pesticides*, *Int. Rev. Res. Mental Retardat.*, **30**, 2005, 225-236.
8. R.A. Rudel, K.R. Attfield, J.N. Schifano, J.G. Brody, *Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention*, *Cancer*, **109**, 2007, 2635-2666.
9. M. Gavrilescu, *Fate of pesticides in the environment and its bioremediation*, *Eng. Life Sci.*, **5**, 2006, 497-526.
10. R. Angulo-Lucena, M. Farouk-Allam, S. Serrano-Jimenez, M.L. Jodral-Villarejo, *A review of environmental exposure to persistent organochlorine residuals during the last fifty years*, *Curr. Drug Safety*, **2**, 2007, 163-172.
11. U.S. Environmental Protection Agency, 2000-2001 Pesticide Market Estimate: Usage (http://www.epa.gov/oppbead1/pestsales/01pestsales/usage2001.htm#3_1)
12. D. Barceló, M.C. Hennion, *Trace Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Water, Techniques & Instrumentation in Analytical Chemistry*, Vol. 19, Ed. Elsevier, 1997.
13. P. Lepom, B. Brown, G. Hanke, R. Loos, P. Quevauviller, *Needs for reliable analytical methods for monitoring chemical pollutants in surface water under the*

- European Water Framework Directive* J. Wollgast, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 2009, 302-315.
14. A.C. Belfroid, M. Van Drunen, M.A. Beek, S.M. Schrap, C.A.M. van Gestel, B. Van Hattum, *Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems*, *Sci. Total Environ.*, **222**, 1998, 167-183.
 15. C.J. Sinclair, A.B.A. Boxall, *Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation products*, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 2003, 4617-4625.
 16. S.O. Pehkonen, Q. Zhang, *The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: A critical review*, *Critical Rev. Env. Sci. Technol.*, **32**, 2002, 17-72.
 17. M. Arias-Estévez, E. López-Periago, E. Martínez-Carballo, J. Simal-Gándara, J.C. Mejuto, L. García-Río, *The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources*, *Agric. Ecosyst. Environ.*, **123**, 2008, 247-260.
 18. Y. Nakano, A. Miyazaki, T. Yoshida, K. Ono, T. Inoue, *A study on pesticide runoff from paddy fields to a river in rural region - 1: Field survey of pesticide runoff in the Kozakura River, Japan*, *Water Res.*, **38**, 2004, 3017-3022.
 19. X. Huang, T. Pedersen, M. Fischer, R. White, T.M. Young, *Herbicide runoff along highways. 1. Field observations*, *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 2004, 3263-3271.
 20. W.J. Ntow, P. Drechsel, B.O. Botwe, P. Kelderman, H.J. Gijzen, *The impact of agricultural runoff on the quality of two streams in vegetable farm areas in Ghana*, *J. Environ. Qual.*, **37**, 2008, 696-703.
 21. M. Flury, *Experimental evidence of transport of pesticides through field soils - A review*, *J. Environ. Qual.*, **25**, 1996, 25-45.
 22. D.W. Kolpin, J.E. Barbash, R.J. Gilliom, *Pesticides in ground water of the United States, 1992-1996*, *Ground Water*, **38**, 2000, 858-863.
 23. F. Worrall, T. Besien, D.W. Kolpin, *Groundwater vulnerability: Interactions of chemical and site properties*, *Sci. Tot. Environ.*, **299**, 2002, 131-143.
 24. F. Aulagnier, L. Poissant, D. Brunet, C. Beauvais, M. Pilote, C. Deblois, N. Dassylva, *Pesticides measured in air and precipitation in the Yamaska Basin (Quebec): Occurrence and concentrations in 2004*, *Sci. Tot. Environ.*, **394**, 2008, 338-348.

25. D. Quaghebeur, B. De Smet, E. De Wulf, W. Steurbaut, *Pesticides in rainwater in Flanders, Belgium: Results from the monitoring program 1997-2001*. *J. Environ. Monitor.*, **6**, 2004, 182-190.
26. T. Clark, J. Duyzer, *Pesticide concentrations in air and precipitation in the Netherlands*, *J. Environ. Monitor.*, **5**, 2003, 77N-80N.
27. R. Karthikeyan, L.C. Davis, L.R. Erickson, K. Al-Khatib, P.A. Kulakow, P.L. Barnes, S.L. Hutchinson, A.A. Nurzhanova, *Potential for Plant-Based Remediation of Pesticide-Contaminated Soil and Water Using Nontarget Plants such as Trees, Shrubs, and Grasses*, *Critical Rev. Plant Sci.*, **23**, 2004, 91-101.
28. D.I. Gustafson, *Groundwater ubiquity score: A simple method for assessing pesticide leachability*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**, 1989, 339-357.
29. J. Staudinger, P.V. Roberts, *A critical review of Henry's law constants for environmental applications*, *Critical Rev. Environ. Sci. Technol.*, **26**, 1996, 205-297.
30. S. Wiktelius, C.A. Edwards, *Organochlorine insecticide residues in African Fauna: 1971-1995*, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **151**, 1997, 1-37.
31. C. D'Amato, J.P.M. Torres, O. Malm, *DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane): Toxicity and environmental contamination - A review*, *Quim. Nova*, **25**, 2002, 995-1002.
32. B. K. Singh, A. Walker, *Microbial degradation of organophosphorus compounds*, *FEMS Microbial Rev.*, **30**, 2006, 428-471.
33. A.K. Sarmah, J. Sabadie, *Hydrolysis of sulfonylurea herbicides in soils and aqueous solutions: A review*, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2002, 6253-6265.
34. H.D. Burrows, L.M. Canle, J.A. Santaballa, S. Steenken, *Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **67**, 2002, 71-108.
35. S. Beulke, I.G. Dubus, C.D. Brown, B. Gottesburen, *Simulation of pesticide persistence in the field on the basis of laboratory data - A review*, *J. Environ. Qual.*, **29**, 2000, 1371-1379.
36. Council Directive 98/83/EC, Off. J. Eur. Commun., L330 (3 November 1998) 32-54.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:ES:PDF>
37. U.S. Environmental Protection Agency. Drinking Water Contaminants.
<http://www.epa.gov/safewater/contaminants/index.html#mcls>

38. A.S. Terry, A.D. Carter, R.L. Humphrey, E. Capri, B. Grua, A.C. Panagopoulous, A. Pulido-Bosch, S.H. Kennedy, *A monitoring programme for 1,3-dichloropropene and metabolites in groundwater in five EU countries*, *Pest Manag. Sci.*, **64**, 2008, 923-932.
39. J.A.C. Barth, D. Steidle, D. Kuntz, T. Gocht, C. Mouvet, W. Von Tümpling, I. Lobe, A. Langenhoff, H.J. Albrechtsen, J.S. Janniche, B. Morasch, D. Hunkeler, P. Grathwohl, *Deposition, persistence and turnover of pollutants: First results from the EU project AquaTerra for selected river basins and aquifers*, *Sci. Tot. Environ.*, **376**, 2007, 40-50.
40. R. Loos, B.M. Gawlik, G. Locoro, E. Rimaviciute, S. Contini, G. Bidoglio, *EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters*, *Environ. Pollut.*, **157**, 2009, 561-568.
41. A. Hildebrant, M. Guillamón, S. Lacorte, R. Tauler, D. Barceló, *Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain)*, *Water Res.*, **42**, 2008, 3315-3326.
42. P.N.M. Schipper, M.J.M. Vissers, A.M.A. van der Linden, *Pesticides in groundwater and drinking water wells: Overview of the situation in the Netherlands*, *Water Sci. Technol.*, **57**, 2008, 1277-1286.
43. D.C. Googy, M.E. Stuart, D.J. Lapworth, P.J. Chilton, S. Bishop, G. Cachandt, M. Knapp, T. Pearson, *Pesticide pollution of the Triassic sandstone aquifer of South Yorkshire*, *Quarterly J. Engineering Geol. Hidrogeol.*, **38**, 2005, 53-63.
44. M.J. Cerejeira, P. Viana, S. Batista, T. Pereira, E. Silva, M.J. Valério, A. Silva, M. Ferreira, A.M. Silva-Fernandes, *Pesticides in Portuguese surface and ground waters*, *Water Res.*, **37**, 2003, 1055-1063.
45. L. Guzzella, F. Pozzoni, G. Giuliano, *Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy*, *Environ. Pollut.*, **142**, 2006, 344-353.
46. Z. Vryzas, G. Vassiliou, C. Alexoudis, E. Papadopoulou-Morkidou, *Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece*, *Water Res.*, **43**, 2009, 1-10.
47. S. Beernaerts, M. Gerard, P. Debongnie, J.p. Barthelemy, L. Pussemier, A. Copin, *Two years of pesticides monitoring in a Belgian watershed*, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **83**, 2003, 469-480.

48. L. Comoretto, B. Arfib, S. Chiron, *Pesticides in the Rhône river delta (France): Basic data for a field-based exposure assessment*, *Sci. Tot. Environ.*, **380**, 2007, 124-132.
49. K. Haarstad, G.H. Ludvigsen, *Ten years of pesticide monitoring in norwegian ground water*, *Ground Water Remediat.*, **27**, 2007, 75-89.
50. L.A. Sprague, L.H. Nowell, *Comparison of pesticide concentrations in streams at low flow in six metropolitan areas of the United States*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **27**, 2008, 288-298.
51. L.L. McConell, C.P. Rice, C.J. Hapeman, L. Drakeford, J.A. Harman-Fetcho, K. Bialek, M.H. Fulton, A.K. Leight, G. Allen, *Agricultural pesticides and selected degradation products in five tidal regions and the main stem of Chesapeake Bay, USA*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **26**, 2007, 2567-2578.
52. R.J. Gillion, *Pesticides in U.S. streams and groundwater*, *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 2007, 3409-3414.
53. K. Kannan, J. Ridal, J. Struger, *Pesticides in the Great Lakes*, *Handbook Environ. Chem. Volume 5: Water Pollut.*, **5N**, 2006, 151-199.
54. R.A. Rebich, R.H. Coupe, E.M. Thurman, *Herbicide concentrations in the Mississippi River basin-The importance of chloroacetanilide herbicide degradates*, *Sci. Tot. Environ.*, **321**, 2004, 189-199.
55. S. Bondarenko, J. Gan, D.L. Haver, J.N. Kabashima, *Persistence of selected organophosphate and carbamate insecticides in waters from a coastal watershed*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**, 2004, 2649-2654.
56. J.E. Barbash, G.P. Thelin, D.W. Kolpin, R.J. Gilliom, *Major herbicides in ground water: results from the National Water-Quality Assesment*, *J. Environ. Qual.*, **30**, 2001, 831-845.
57. D.W. Kolpin, J.E. Barbash, R.J. Gilliom, *Occurrence of pesticides in shallow groundwater of the United States: Initial results from the National Water-Quality Assessment program*, *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 1998, 558-566.
58. D.W. Kolpin, M. Thurman, D.A. Goolsby, *Occurrence of selected pesticides and their metabolites in near-surface aquifers of the midwestern United States*, *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 1996, 335-340.

59. S. Gaw, M.E. Close, M.J. Flintoft, *Fifth national survey of pesticides in groundwater in New Zealand*, *New Zealand J. Marine Freshwater Res.*, **42**, 2008, 397-407.
60. M. B. Woudneh, M. Sekela, T. Tuominen, M. Gledhill, *Acidic herbicides in surface waters of Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada*, *J. Chromatogr. A*, **1139**, 2007, 121-129.
61. R. Zhou, L. Zhu, K. Yang, Y. Chen, *Distribution of organochlorine pesticides in surface water and sediments from Qiantang River, East China*, *J. Hazard. Mater.*, **137**, 2006, 68-75.
62. S.A. Senseman, T.L. Lavy, J.D. Mattice, E.E. Gbur, B.W. Skulman, *Trace level pesticide detections in Arkansas surface waters*, *Env. Sci. Technol.*, **31**, 1997, 395-401.
63. F.J. López, J. Beltrán, M. Forcada, F. Hernández, *Comparison of simplified methods for pesticide residue analysis Use of large-volume injection in capillary gas chromatography*, *J. Chromatogr. A*, **823**, 1998, 25-33.
64. Y. Picó, A.J.H. Louter, J.J. Vreuls, U.A.T. Brinkman, *On-line trace-level enrichment gas chromatography of triazine herbicides, organophosphorus pesticides, and organosulfur compounds from drinking and surface waters*, *Analyst*, **119**, 1994, 2025-2030.
65. J. Quintana, I. Martí, F. Ventura, *Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results*, *J. Chromatogr. A*, **938**, 2001, 3-13.
66. S. Öllers, H.P. Singers, P. Fässler, S.R. Müller, *Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water*, *J. Chromatogr. A*, **911**, 2001, 225-234.
67. F.J. Santos, M.T. Galcerán, *Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis*, *J. Chromatogr. A*, **1000**, 2003, 125-151.
68. S. Hatrík, J. Tekel, *Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water*, *J. Chromatogr. A*, **733**, 1996, 217-233.
69. S. Lacorte, I. Guiffard, D. Fraise, D. Barceló, *Broad spectrum analysis of 109 priority compounds listed in the 76/464/CEE Council Directive using solid-phase extraction and GC/EI/MS*, *Anal. Chem.*, **72**, 2000, 1430-1440.

70. F. Hernández, J. Beltrán, F.J. López, J.V. Sancho, *Use of solid-phase microextraction for the quantitative determination of herbicides in soil and water samples*, *Anal. Chem.*, **72**, 2000, 2313-2322.
71. M. Forcada, J. Beltrán, F.J. López, F. Hernández, *Multiresidue procedures for determination of triazine and organophosphorus pesticides in water by use of large-volume PTV injection in gas chromatography*, *Chromatogr.*, **51**, 2000, 362-368.
72. E. Pitarch, C. Medina, T. Portolés, F.J. López, F. Hernández, *Determination of priority micro-pollutants in water by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*, *Anal. Chim. Acta*, **583**, 2007, 246-258.
73. S.P.J. van Leeuwen, J. De Boer, *Advances in the gas chromatographic determination of persistent organic pollutants in the aquatic environment*, *J. Chromatogr. A*, **1186**, 2008, 161-182.
74. L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, B. Vieth, *Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS?*, *Mass Spectrom Rev.*, **25**, 2006, 838-865.
75. S. Lacorte, D. Barceló, *Improvements in the determination of organophosphorus pesticides in ground- and wastewater samples from interlaboratory studies by automated on-line liquid-solid extraction followed by liquid chromatography-diode array detection*, *J. Chromatogr. A*, **725**, 1996, 85-92.
76. S. Chiron, A. Valverde, A. Fernández-Alba, D. Barceló, *Automated sample preparation for monitoring groundwater pollution by carbamate insecticides and their transformation products*, *J. AOAC Int.*, **78**, 1995, 1346-1352.
77. J. Abian, *The coupling of Gas and Liquid Chromatography with Mass Spectrometry*, *J. Mass Spectrom.*, **34**, 1999, 157-168.
78. W.M.A. Niessen, *Chromatographic Science Series: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, Vol. 97, Ed. Taylor & Francis, 2006.
79. T. Reemtsma, *Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants*, *J. Chromatogr. A*, **1000**, 2003, 477-501.
80. A.C. Hogenboom, W.M.A. Niessen, U.H.Th. Brinkman, *The role of column liquid chromatography-mass spectrometry in environmental trace-level analysis:*

- Determination and identification of pesticides in water*, J. Sep. Sci., **24**, 2001, 331-354.
81. A. C. Borba da Cunha, M. J. López de Alda, D. Barceló, T. M. Pizzolato, J. H. Z. dos Santos, *Multianalyte determination of different classes of pesticides (acidic, triazines, phenyl ureas, anilines, organophosphates, molinate and propanil) by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem., **378**, 2004, 940-954.
82. Y. Picó, C. Blasco, G. Font, *Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview*, Mass Spectrom. Rev., **23**, 2004, 45-85.
83. C. Zwiener, F.H. Frimmel, *LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment – a critical review*. Anal. Bioanal. Chem., **378**, 2004, 862-874.
84. O.J. Pozo, J. V. Sancho, M. Ibáñez, F. Hernández, W.M.A. Niessen, *Confirmation of organic micropollutants detected in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Achieve and pitfalls*, Trends Anal. Chem., **25**, 2006, 1030-1042.
85. R. Rosen, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**, 2007, 246-251.
86. D. Barceló, M. Petrovic, *Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on*, Trends Anal. Chem., **26**, 2007, 2-11.
87. M. Kuster, M. López de Alda, D. Barceló, *Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques*, Mass Spectrom. Rev., **25**, 2006, 900-916.
88. J.J. Carvalho, P.C.A. Jerónimo, C. Gonçalves, *Evaluation of a multiresidue method for measuring fourteen chemical groups of pesticides in water by use of LC-MS-MS*, Anal. Bioanal. Chem., **392**, 2008, 955-968.
89. M. Kuster, M. López de Alda, D. Barceló, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters*, J. Chromatogr. A, **1216**, 2009, 520-529.
90. S.B. Huang, T.J. Mayer, R.A. Yokley, R. Pérez, *Direct aqueous injection liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry/mass spectrometry*

- analysis of water for atrazine, simazine, and their chlorotriazine metabolites, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 2006, 713-719.
91. K. Greulich, L. Alder, *Direct aqueous injection liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry/mass spectrometry analysis of water for atrazine, simazine, and their chlorotriazine metabolites*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**, 2008, 183-197.
92. F. Liu, G. Bischoff, W. Pestemer, W. Xu, A. Kofoet, *Multi-Residue Analysis of Some Polar Pesticides in Water Samples with SPE and LC-MS-MS*, *J. Chromatogr.*, **63**, 2006, 233-237.
93. S. Rodríguez-Mozaz, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water*, *J. Chromatogr. A*, **1152**, 2007, 97-115.
94. L. Viglino, K. Aboufadel, A.D. Mahvelat, M. Prévost, S. Sauvé, *On-line solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry to quantify pharmaceuticals, pesticides and some metabolites in wastewaters, drinking, and surface waters*, *J. Environ. Monitor.*, **10**, 2008, 482-489.
95. F. Perreau, P. Bados, L. Kerhoas, S. Nélieu, *Trace analysis of sulfonylurea herbicides and their metabolites in water using a combination of off-line or on-line solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 2007, 1265-1273.
96. F. Hernández, J.V. Sancho, O.J. Pozo, A. Lara, E. Pitarch, *Rapid direct determination of pesticides and metabolites in environmental water samples at sub- $\mu\text{g/l}$ level by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography - Electrospray tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **939**, 2001, 1-11.
97. F.J. Santos, M.T. Galcerán, *The application of gas chromatography to environmental analysis*, *Trends Anal. Chem.*, **21**, 2002, 672-685.
98. Decisión 2002/657/EC de la Unión Europea, *Off. J. Eur. Commun.*, **L221**, 12 Agosto 2002, 8-36.
99. J.V. Sancho, O.J. Pozo, F. Hernández, *Liquid chromatography and tandem mass spectrometry: a powerful approach for the sensitive and rapid multiclass*

- determination of pesticides and transformation products in water, *The Analyst*, **129**, 2004, 38-44.
100. D.W. Kolpin, E.M. Thurman, S.M. Linhart, *Finding minimal herbicide concentrations in ground water? Try looking for their degradates*, *Sci. Tot. Environ.*, **248**, 2000, 115-122.
101. D.W. Kolpin, D.J. Scnoebelen, E.M. Thurman, *Degradates provide insight to spatial and temporal trends of fherbicides in ground water*, *Ground Water*, **42**, 2004, 601-608.
102. P.C. Mills, D.W. Kolpin, E.A. Scribner, E.M. Thurman, *Herbicides and degradates in shallow aquifers of Illinois: Spatial and temporal trends*, *J. Am. Water Resour. Assoc.*, **41**, **2005**, 537-547.
103. D. De Almeida Azevedo, S. Lacorte, T. Vinhas, P. Viana, D. Barceló, *Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **879**, 2000, 13-26.
104. D.W. Kolpin, J.E. Barbash, R.J. Gilliom, *Occurrence of pesticides in shallow groundwater of the United States: Initial results from the National Water-Quality Assessment program*, *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 1998, 558-566.
105. R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, M.E. Fernández-Laespada, F.J. Sánchez-San Román, *Evaluation of surface- and ground-water pollution due to herbicides in agricultural areas of Zamora and Salamanca (Spain)*, *J. Chromatogr. A*, **869**, 2000, 471-480.
106. European Commission. Quality control procedures for pesticide residues analysis Document No. SANCO/10476/2003, Brussels, (5 Febrero 2004) http://www.crlpesticides.eu/library/docs/srm/AqcGuidance_Sanco_10476_2003.pdf
107. F.M. Lagerwerf, W.D. van Dongen, R.J.J.M. Steenvoorn, M. Honing, J.H.G. Jonkman, *Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative LC-MS-MS*, *Trens Anal. Chem.*, **19**, 2000, 418-427.
108. B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, *The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by*

- solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**, 2008, 1293-1312.
109. T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, *Countering matrix effects in environmental liquid chromatography- electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals*, *J. Chromatogr. A*, **1029**, 2004, 153-159.
110. F. Hernández, M. Ibañez, O.J. Pozo, J.V. Sancho, *Investigating the presence of pesticide transformation products in water by using liquid chromatography-mass spectrometry with different mass analyzers*, *J. Mass Spectrom.*, **43**, 2008, 173-184.
111. R. Brix, N. Bahi, M.J. López de Alda, M. Farré, J.M. Fernández, D. Barceló, *Identification of disinfection by-products of selected triazines in drinking water by LC-Q-ToF-MS/MS and evaluation of their toxicity*, *J. Mass Spectrom.*, **44**, 2009, 330-337.
112. Directive 2000/60/EC. Off. J. Eur. Comm., L327 (23 Octubre 2000) 1-72.
(<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2000:327:0001:0072:ES:PDF>)
113. Directive 2006/118/EC. Off. J. Eur. Comm., L372 (12 Diciembre 2006) 19-31
(<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:372:0019:0031:ES:PDF>)
114. A. Scheidleber, J. Grath, G. Winkler, U. Stärk, C. Koreimann, C. Gmeiner, S. Nixon, J. Casillas, P. Gravesen, J. Leonard, M. Elvira, *Groundwater Quality and Quantity in Europe*, Ed. European Environment Agency, 1999, 1-123.
115. R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, M.E. Fernández-Laespada, L. Calvo-Serono, F.J. Sánchez-San Román, *Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain)*, *Wat. Res.*, **37**, 2003, 928-938.
116. A. Hildebrandt, S. Lacorte, D. Barceló, *Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 2007, 1459-1468.
117. D. Barceló, S. Chiron, A. Fernández-Alba, A. Valverde, M.F. Alpendurada, *Monitoring pesticides and metabolites in surface water and groundwater in Spain*, *ACS Symposium Series*, **630**, 237-253.

118. T. Garrido, J. Fraile, J.M. Niñerola, M. Figueras, A. Ginebreda, L. Olivella, *Survey of ground water pesticide pollution in rural areas of Catalonia*, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **78**, 2000, 51-65.
119. G.V. Steele, H.M. Johnson, M.W. Sandstrom, P.D. Capel, J.E. Barbash, *Occurrence and fate of pesticides in four contrasting agricultural settings in the United States*, *J. Environ. Qual.*, **37**, 2008, 1116-1132.
120. L. Bijlsma, J.V. Sancho, E. Pitarch, M. Ibañez, F. Hernández, *Simultaneous ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of amphetamine and amphetamine-like stimulants, cocaine and its metabolites, and a cannabis metabolite in surface water and urban wastewater*, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 2009, 3078-3089.
121. B.J. Vanderford, S. Snyder, B.J. *Analysis of pharmaceuticals in water by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 2006, 7312-7320
122. G. Gervais, S. Brosillon, A. LaPlanche, C. Helen, *Ultra-pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water*, *J. Chromatogr. A*, **1202**, 2008, 163-172.
123. J.C. Van de Steene, W.E. Lambert, *Comparison of matrix effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS. Analysis of nine basic pharmaceuticals in surface waters*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 2008, 713-718.
124. W.M.A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli, *Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry*, *Mass Spectrom. Rev.*, **25**, 2006, 881-899.
125. F. Hernández, J.V. Sancho, O.J. Pozo, *Direct determination of alkyl phosphates in human urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 2002, 1766-1773.
126. Decisión de la UE 2002/657/CE, *Off. J. Eur. Commun.*, **L221**, 12 Agosto 2002, 8-36.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:ES:PDF>
127. J.S. Mellors, J.W. Jorgenson, *Use of 1.5- μ m porous ethyl-bridged hybrid particles as a stationary-phase support for reversed-phase ultra high-pressure liquid-chromatography*, *Anal. Chem.*, **76**, 2004, 5441-5450.

128. A.L. Batt, M.S. Kostich, J.M. Lazorchak, *Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC-MS/MS*, *Anal. Chem.*, **80**, 2008, 5021-5030.
129. M. Huerta-Fontela, M.T. Galcerán, J. Martín-Alonso, F. Ventura, *Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain*, *Sci. Tot. Environ.*, **397**, 2008, 31-40.
130. W. Xu, Q. Chen, T. Zhang, Z. Cai, X. Jia, Q. Xie, Y. Ren, *Development and application of ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples*, *Anal. Chim. Acta*, **626**, 2008, 28-36.
131. E. Pastor-Montoro, R. Romero-Gonzalez, A. Garrido-Frenich, M.E. Hernández-Torres, J.L. Martínez-Vidal, *Fast determination of herbicides in waters by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 2007, 3585-3592.

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA POR LC-MS/MS. ESTUDIO DE DIFERENTES INTERFASES A PRESIÓN ATMOSFÉRICA

3.1 Introducción

3.2 Artículo científico 5

Study of different atmospheric-pressure interfaces for LC-MS/MS determination of acrylamide in water at sub-ppb levels
J. Mass Spectrom, 41 (2006) 1041-1048

3.2.1. Discusión de los resultados del artículo científico 5

3.3 Bibliografía

3.1 Introducción

La acrilamida o 2-propenamida (Figura 3.1) es un monómero, conocido desde los años cincuenta, que se emplea en la síntesis de poliacrilamidas cuya producción anual en la Unión Europea ronda las 100.000 toneladas.

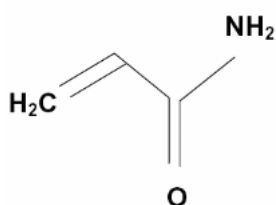


Figura 3.1 Estructura química de la acrilamida

Uno de sus usos más importantes es como floculante para la eliminación de partículas y otras impurezas en el tratamiento de aguas de suministro a las poblaciones, así como para retirar sólidos en suspensión de las aguas residuales urbanas e industriales. Al disolverse en agua, la acrilamida coagula y atrapa a los sólidos suspendidos, facilitando su eliminación. Sin embargo, parte de la acrilamida no coagula y puede permanecer disuelta en el agua.

Este compuesto también se utiliza en la producción de plásticos y adhesivos, en el procesado de la pulpa de papel, como aditivo en cosméticos y acondicionadores de suelos, en el procesado de minerales, en la formulación de agentes selladores para diques, túneles y alcantarillados, en la preparación de muestras en laboratorios biotecnológicos, en la elaboración de cigarrillos

Las principales fuentes de exposición a la acrilamida por parte de la población general parecen ser el agua potable, el humo de los cigarrillos y principalmente los alimentos que contienen fécula, cereales o almidón y son procesados a altas temperaturas (más de 100°C, acelerándose su producción a partir de los 140°C) como las patatas fritas o asadas, galletas, cereales, pan, café,..... Aunque no se ha podido determinar con certeza el mecanismo de formación de este compuesto, se cree que está relacionado con la reacción de Maillard en la que la descomposición del aminoácido aspargina, en presencia de azúcares como la dextrosa durante los procesos de tueste o fritura, da lugar a diversos subproductos entre los que se encontraría la acrilamida.

La acrilamida es una sustancia química genotóxica y neurotóxica¹⁻⁴, estando clasificada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) como potencialmente cancerígena y catalogada en la categoría oficial 2A (probablemente carcinógena en humanos), no habiendo sido todavía posible determinar un nivel de exposición seguro o umbral tóxico. Pese a que la ingesta de acrilamida ha llevado a desarrollar diversas formas de cáncer como papilomas y cáncer de piel en ratas y ratones de laboratorio, además de diversas neuropatías en primates, sus efectos nocivos aún no han podido demostrarse en humanos. Aún así, se debe asumir que existe algún riesgo, aunque sea pequeño, incluso a niveles de exposición muy bajos. En consecuencia, organismos como, por ejemplo, el comité independiente del Reino Unido sobre carcinogenicidad de productos químicos en los alimentos, los productos de consumo y el medio ambiente (COC), recomiendan que la exposición a genotóxicos cancerígenos como la acrilamida ha de ser tan baja como sea posible.

La presencia de acrilamida en alimentos fue descubierta en el año 2002 por la "Swedish National Food Administration" (NFA) junto a investigadores de la Universidad de Estocolmo. En un estudio realizado a un grupo de trabajadores se advirtieron concentraciones inusualmente altas de acrilamida, hecho que se asoció a su dieta alimenticia. La FAO y la OMS (2002) establecieron el nivel de ausencia de efectos adversos (NOAEL) para la neuropatía producida por acrilamida en 0.5 mg/Kg de peso por día. Según diversos estudios, la población está expuesta a través de la dieta a una

dosis media diaria de entre 1 y 4 µg/Kg de peso. La acrilamida se biodegrada con rapidez, no se bioacumula en la cadena trófica y no es lipofílica (no se acumula en tejidos adiposos).

En los últimos años se han desarrollado numerosos métodos analíticos para la determinación de acrilamida en alimentos⁵⁻⁸, muchos de ellos basados en LC-MS/MS⁹⁻¹⁶. Sin embargo, existen muy pocos métodos para su determinación en aguas, a pesar de su elevada solubilidad (2150000 mg/L) y la posibilidad de ser encontrada en aguas de diversos tipos como consecuencia de sus aplicaciones. En este campo, la legislación vigente es muy restrictiva. Así, el límite máximo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y establecido en la Unión Europea (UE) en su directiva referente a aguas de consumo humano (EU 98/83) es de 0.1 µg/L. Por su parte, la EPA establece este límite en cero. De este modo, resulta evidente la necesidad de desarrollar metodologías analíticas rápidas, altamente selectivas y muy sensibles para la determinación de acrilamida en programas de control de aguas. Los métodos existentes basados en GC alcanzan límites de detección satisfactorios, pero precisan de laboriosos tratamientos de muestra (derivatizaciones¹⁷, bromaciones¹⁸,...), así como del uso de grandes volúmenes de muestra¹⁹, haciéndolos difícilmente aplicables a programas de control. En cuanto a la metodología existente basada en LC, se han descrito muy pocos métodos que determinan acrilamida directamente sin ningún tratamiento previo de muestra mediante detección por UV²⁰ o por MS²¹, pero sin conseguir alcanzar los 0.1 µg/L exigidos por la legislación europea; además, tampoco aseguran una confirmación inequívoca de la presencia del analito en la muestra.

En este contexto, el objetivo del trabajo fue el desarrollo de metodología analítica rápida y sensible para la determinación de acrilamida en aguas basada en LC-MS/MS, prestando especial atención a la capacidad identificativa, para lo cual se adquieren dos transiciones en modo SRM. Se ha evaluado el uso de tres tipos de interfases de acoplamiento en LC-MS/MS (ESI, APCI e Ion Sabre™ APCI), optimizándose las condiciones de ionización y los parámetros instrumentales del analizador para los iones precursores y productos. Así mismo, dadas las propiedades físico-químicas de la acrilamida (elevada polaridad, bajo peso molecular,..), se ha investigado el efecto de

la utilización como fase móvil de metanol y acetonitrilo, tanto sobre la ionización como sobre la forma de pico, en las diferentes interfases. Con objeto de alcanzar los límites de detección requeridos por la legislación, se ha estudiado la inyección de grandes volúmenes (LVI).

Los resultados obtenidos se plasman en el **artículo científico 5**, que se presenta a continuación.

3.2 ARTÍCULO CIENTÍFICO

3.2.1 Artículo científico 5

"Study of different atmospheric-pressure interfaces for LC-MS/MS determination of acrylamide in water at sub-ppb levels"

José M. Marín, Óscar J. Pozo, Juan V. Sancho, Elena Pitarch, Francisco J. López y Félix Hernández.

Journal of Mass Spectrometry, 41 (2006) 1041-1048

3.2.1 Artículo científico 5

"Study of different atmospheric-pressure interfaces for LC-MS/MS determination of acrylamide in water at sub-ppb levels"

José M. Marín, Óscar J. Pozo, Juan V. Sancho, Elena Pitarch, Francisco J. López y Félix Hernández.

Journal of Mass Spectrometry, 41 (2006) 1041-1048

JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY
J. Mass Spectrom. 2006, 41: 1041-1048
Published online 11 July 2006 in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/jms.1063

JMS

Study of different atmospheric-pressure interfaces for LC-MS/MS determination of acrylamide in water at sub-ppb levels

José M. Marín, Óscar J. Pozo, Juan V. Sancho, Elena Pitarch, Francisco J. López and Félix Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n E-12071 Castellón, Spain

Received 4 April 2006; Accepted 22 May 2006

A rapid, sensitive and selective method based on LC-MS/MS has been developed for the direct determination of acrylamide residues in water in compliance with the current European Union (EU) 98/83 Drinking Water Directive. Given the high polarity of acrylamide, the application of a rapid on-line solid phase extraction step, commonly used for preconcentrating low analyte levels, was not found to be completely satisfactory. Therefore, an alternative approach based on the use of direct large-volume injection into the LC-MS/MS system has been used. Three atmospheric-pressure interfaces (ESI, APCI and Ion Sabre APCI) were checked to reach the required sensitivity (0.1 µg/l). All three interfaces were tested by analysis of six different water samples (surface water, groundwater, drinking water and three treated water samples) spiked at three concentration levels each (0.1, 1 and 10 µg/l). When using ESI, poor sensitivity and high matrix effects were observed. This situation improved when APCI was used as the interface because no matrix effect was found, although sensitivity was not completely satisfactory. The best results were obtained by interfacing the Ion Sabre APCI; its higher sensitivity for acrylamide (LOD 0.03 µg/l) and the absence of matrix effects recommended its selection. Using this approach, satisfactory recoveries (90–97%) and precision (<12%) were obtained for all water samples studied. Besides, the acquisition of two different MS/MS transitions allowed not only the quantification but also the confirmation of acrylamide in water at concentration levels around 0.1 µg/l. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: atmospheric-pressure interfaces; liquid chromatography; tandem mass spectrometry; acrylamide; water

INTRODUCTION

Acrylamide (2-propenamide) is used as a coagulant aid in drinking water treatment but it can also be employed as a grouting agent in laying drinking water pipes by plastics and dye industries and for improving production from oil wells, making organic chemicals, sizing of paper and textiles, processing of ore, constructing dam foundations and tunnels, etc.¹

When acrylamide is dissolved in water, it coagulates and traps suspended solids, which permits their easier removal. However, some of the acrylamide does not coagulate and remains in the water. It is a neurotoxin defined as 'probably carcinogenic' by the International Agency for Research on Cancer (IARC).² Thus, the WHO guideline has fixed acrylamide concentration in drinking water at 0.5 µg/l corresponding to a daily intake of about 1 µg of the compound.³ More restrictive is the European Union (EU), which has established in the 'EU 98/83 Drinking Water Directive' a minimum quality requirement of 0.1 µg/l in

water for human consumption.⁴ Still more stringent is the US Environmental Protection Agency (USEPA) directive,¹ as the maximum contaminant level (MCL) for acrylamide has been set at zero. These low levels fixed by current legislation, together with the need for carrying out monitoring programs, make it necessary to develop a new rapid, sensitive and selective analytical methodology for the determination of this analyte in water samples.

Since the Swedish National Food administration reported high acrylamide levels in heat-treated, carbohydrate-rich foods, a considerable number of analytical methods for monitoring food matrices have been developed.^{5–8} However, there are very few methods to determine acrylamide in water, in spite of its high water solubility and the requirements commented upon above. Three different GC-based methods have been proposed,^{9–11} which allowed reaching suitable limits of detection. However, the earlier methods of bromination⁹ or derivatization with pentafluorophenyl isothiocyanate,¹⁰ or high sample volume preconcentration¹¹ make them laborious, not easily automated, and therefore not easily applicable for monitoring and routine analysis. Besides, in some cases it was not possible to distinguish between acrylamide and *N*-methylolacrylamide.¹⁰ Acrylamide has been directly

*Correspondence to: Félix Hernández, Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n E-12071 Castellón, Spain. E-mail: hermandf@exp.uji.es

JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY

J. Mass Spectrom. 2006; **41**: 1041–1048

Received: 4 April 2006; Accepted: 22 May 2006; Published online 11 July 2006 in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/jms.1063

Study of different atmospheric-pressure interfaces for LC-MS/MS determination of acrylamide in water at sub-ppb levels

José M. Marín, Óscar J. Pozo, Juan V. Sancho, Elena Pitarch, Francisco J. López, Félix Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n E-12071 Castellón, Spain

ABSTRACT

A rapid, sensitive and selective method based on LC-MS/MS has been developed for the direct determination of acrylamide residues in water in compliance with the current European Union (EU) 98/83 Drinking Water Directive. Given the high polarity of acrylamide, the application of a rapid on-line solid phase extraction step, commonly used for preconcentrating low analyte levels, was not found to be completely satisfactory. Therefore, an alternative approach based on the use of direct large-volume injection into the LC-MS/MS system has been used. Three atmospheric-pressure interfaces (ESI, APCI and Ion Sabre APCI) were checked to reach the required sensitivity (0.1 µg/l). All three interfaces were tested by analysis of six different water samples (surface water, groundwater, drinking water and three treated water samples) spiked at three concentration levels each (0.1, 1 and 10 µg/l). When using ESI, poor sensitivity and high matrix effects were observed. This situation improved when APCI was used as the interface because no matrix effect was found, although sensitivity was not completely satisfactory. The best results were obtained by interfacing the Ion Sabre APCI; its higher sensitivity for acrylamide (LOD 0.03 µg/l) and the absence of matrix effects recommended its selection. Using this approach, satisfactory recoveries (90–97%) and precision (<12%) were obtained for all water samples studied. Besides, the acquisition of two different MS/MS transitions allowed not only the quantification but also the confirmation of acrylamide in water at concentration levels around 0.1 µg/l. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS

atmospheric-pressure interfaces • liquid chromatography • tandem mass spectrometry • acrylamide • water

*Correspondence to Félix Hernández, Jaume I. E-mail: hernandf@exp.uji.es

1. INTRODUCTION

Acrylamide (2-propenamide) is used as a coagulant aid in drinking water treatment but it can also be employed as a grouting agent in laying drinking water pipes by plastics and dye industries and for improving production from oil wells, making organic chemicals, sizing of paper and textiles, processing of ore, constructing dam foundations and tunnels, etc [1].

When acrylamide is dissolved in water, it coagulates and traps suspended solids, which permits their easier removal. However, some of the acrylamide does not coagulate and remains in the water. It is a neurotoxin defined as 'probably carcinogenic' by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [2]. Thus, the WHO guideline has fixed acrylamide concentration in drinking water at 0.5 µg/l corresponding to a daily intake of about 1 µg of the compound [3]. More restrictive is the European Union (EU), which has established in the 'EU 98/83 Drinking Water Directive' a minimum quality requirement of 0.1 µg/l in water for human consumption [4]. Still more stringent is the US Environmental Protection Agency (USEPA) directive [1], as the maximum contaminant level (MCL) for acrylamide has been set at zero. These low levels fixed by current legislation, together with the need for carrying out monitoring programs, make it necessary to develop a new rapid, sensitive and selective analytical methodology for the determination of this analyte in water samples.

Since the Swedish National Food administration reported high acrylamide levels in heat-treated, carbohydrate-rich foods, a considerable number of analytical methods for monitoring food matrixes have been developed [5-8]. However, there are very few methods to determine acrylamide in water, in spite of its high water solubility and the requirements commented upon above. Three different GC-based methods have been proposed [9-11], which allowed reaching suitable limits of detection. However, the earlier methods of bromination [9] or derivatization with pentafluorophenyl isothiocyanate [10], or high sample volume preconcentration [11] make them laborious, not easily automated, and therefore not easily applicable for monitoring and routine analysis. Besides, in some cases it was not possible to distinguish between acrylamide and *N*-methylacrylamide [10]. Acrylamide has been directly determined in water by HPLC-UV without any previous step [12], but the low sensitivity associated with the detection system employed resulted in a high detection limit of 5 µg/l. Owing to its higher selectivity and sensitivity, hyphenation of LC with mass spectrometry (LC-MS) has become a powerful tool in recent years for the determination of polar organic pollutants in water [13,14]. Using this technique, Cavalli *et al.* [15] reported a fast method to determine acrylamide based on the combination of ion-exclusion chromatographic separation and MS detection by large-volume direct injection (LVI). However, the estimated detection limit (0.2 µg/l) does not satisfy the requirements of the EU drinking water legislation.

Furthermore, the use of a single quadrupole mass analyzer does not allow the unequivocal confirmation of the analyte. The combination of LC with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) allows the improvement of selectivity and sensitivity, making this technique adequate for determination at low concentration levels with short analysis times. Besides, the acquisition of two or more transitions working in the MS/MS mode leads to reliable confirmation of the identity of the analyte detected in water, minimizing the possibility of reporting false-positive findings [13][16-18].

Different atmospheric-pressure interfaces (API) can be used to couple LC with tandem mass spectrometry, in which the analyte molecules are commonly ionized by electrospray (ESI) or atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) interfaces. The selection of the correct interface depends on analyte properties, matrix composition and the sensitivity required. In general, more polar compounds are commonly analyzed by ESI and the less polar ones by APCI. Additionally, the APCI sensitivity can be increased by the use of Ion Sabre APCI, as previously reported by our group [19]. Another important aspect to be taken into account is the well-known matrix effect, which can affect analyte ionization. The presence of significant matrix effects can determine the interface selection because they can greatly depend on the interface used, being normally more important when using ESI and a minimum when using APCI [20].

The goal of this work is to compare the efficiencies of different atmospheric-pressure ionization interfaces used in LC-MS/MS for the determination of acrylamide in environmental water samples. Additionally, a large-volume direct injection method will be developed and fully validated, in order to correctly quantify and confirm positive samples at the low levels required by the European drinking water legislation.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Reagents and chemicals

Acrylamide (>99%) and $^2\text{H}_3$ -acrylamide (99.4% ^2H) analytical reference standards were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany) and CDN Isotopes (Quebec, Canada), respectively. Acetonitrile, HPLC-grade methanol and acetone for residue analysis were supplied by ScharLab (Barcelona, Spain), and LC-grade water was obtained by purification of demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA).

Acrylamide and $^2\text{H}_3$ -acrylamide standard stock solutions were prepared at 500 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively, in acetone and stored in the dark at $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Working standard solutions were prepared every month by dilution in methanol for concentrations higher than 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and using LC-grade water for lower concentrations. The working standards were stored at $4\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2 Instrumentation

An HPLC system based on a 233XL autosampler (Gilson, Villiers-le-Bel, France) and a Waters Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, USA) pump was interfaced to a Quattro Micro API triple-quadrupole (quadrupole-hexapole-quadrupole) mass spectrometer (Waters). Three different interfaces (ESI, APCI and Ion Sabre APCI, Waters) were used.

When ESI was employed, the LC separation was performed using an Atlantis dC₁₈ column, 5 μm , 100 \times 2.1 mm (i.d.) (Waters) at a flow rate of 0.2 ml/min. The mobile phase used was a water/methanol gradient where the percentage of methanol was changed linearly as follows: 0 min, 5%; 3 min, 5%; 4 min, 60%; 5 min, 60%; 5.1 min, 5%, and 7 min, 5%. The desolvation gas flow and cone gas flow were set at ~ 600 and 60 l/h, respectively. Infusion experiments were performed using the built-in syringe pump at a flow rate of 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. A capillary voltage of 3.5 kV was used in the positive ionization mode. The desolvation temperature was set at $350\text{ }^\circ\text{C}$ and the source temperature at $120\text{ }^\circ\text{C}$.

In the case of APCI, two interfaces were tested: conventional APCI and Ion Sabre APCI. The Ion Sabre source presents an optimized heater with thermally balanced vaporization and fully symmetrical heating, which can increase the number of ions in the gas phase and therefore the sensitivity of the method. In both interfaces, the LC separation was performed using an Atlantis dC₁₈ column, 5 μm , 100 \times 4.6 mm i.d. (Waters) at a flow rate of 1 ml/min. The mobile phase used was a water/acetonitrile gradient where the percentage of acetonitrile was changed linearly using the same gradient as that employed for ESI. The

desolvation gas was set at 50 l/h and no cone gas was used. Infusion experiments were performed using the Alliance 2695 at a flow rate of 1 ml/min for APCI and Ion Sabre APCI. The current intensity in the corona pin was selected as 2 μ A. The source temperature was selected as 120 °C and probe temperature was set at 200 °C.

In all experiments, the drying gas as well as the nebulizing gas was nitrogen generated from pressurized air in a high-purity nitrogen generator NM30LA 230Vac Gas Station from Peak Scientific (Inchinnan, Scotland). For operation in the MS/MS mode, the collision gas was Argon 99.995% (Carburas Metalicos, Valencia, Spain) at a pressure of 7×10^{-3} mbar in the collision cell. Dwell times of 0.15 and 0.05 s/scan were chosen for acrylamide and $^2\text{H}_3$ -acrylamide, respectively. A solvent delay of 1.5 min was selected to give an additional clean-up using the built-in divert valve controlled by the Masslynx NT v.4.0 software (Waters). The application manager QuanLynx (Waters) was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from water samples.

2.3 Recommended procedure

Water samples (around 20 ml) were centrifuged at 3500 rpm for 10 min (only if suspended particulate matter was present). For ESI experiments, 150 μ l of $^2\text{H}_3$ -acrylamide solution (90 μ g/l) was added to a 1.5 ml sample aliquot. Then, 100 μ l of this solution was directly injected into the system. For APCI experiments, 300 μ l of $^2\text{H}_3$ -acrylamide solution (90 μ g/l) was added to a 3 ml sample aliquot. Then, 750 μ l of this solution was directly injected into the system.

LC-MS/MS analysis was performed using Ion Sabre APCI under the experimental conditions described above, by acquiring two transitions, m/z 72 \rightarrow 55 for quantification and m/z 72 \rightarrow 27 for confirmation.

Calibration was made using standards in HPLC-grade water, and quantification was made using isotopically labelled acrylamide as internal standard (IS).

2.4 Validation study

The linearity of the methods (ESI, APCI and Ion Sabre APCI) was studied by analyzing standard solutions in triplicate at seven concentration values ranging from 0.05 to 25 μ g/l by using an IS calibration. The methods were taken to be linear if a correlation coefficient (r) higher than 0.99 and residuals lower than 30% were obtained.

Accuracy (expressed as recovery, as a percentage) and precision (repeatability expressed as relative standard deviation, as a percentage) were evaluated by analyzing six different water samples (surface water, groundwater, three samples from different stages of a drinking water treatment plant (DWTP) and drinking water) spiked at three concentration levels each (0.1, 1 and 10 µg/l). All experiments were performed in triplicate ($n = 3$).

The limit of quantification (LOQ) was established as the lowest concentration level that was fully validated, from spiked samples subjected to the overall analytical procedure, with satisfactory recovery (between 70 and 120%) and precision (RSD < 15%). The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration that the analytical process can reliably differentiate from background levels, was estimated for a signal-to-noise ratio of 3 from the chromatograms of the samples spiked at the lowest analyte concentration tested.

2.5 Confirmation

Confirmation of the identity of acrylamide was carried out by comparison of the intensity of both quantification (Q: 72 → 55) and confirmation (q: 72 → 27) transitions. The ion intensity ratio between both transitions was calculated and compared with a reference standard. Detection was considered positive when this ratio fell within the tolerance range, in the line of the European Union Decision 2002/657/EC for identification and quantification of organic residues in animals and fresh meat [21].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. MS optimization

The positive electrospray and APCI full-scan spectra of acrylamide are shown in Fig. 1(a) and (b), respectively. As can be seen in this figure, the main difference observed between both interfaces was the presence of an abundant peak at m/z 94 corresponding to the sodium adduct $[M + Na]^+$, which was found only in the ESI MS experiments. Except for this, MS and MS/MS spectra obtained by both interfaces were similar.

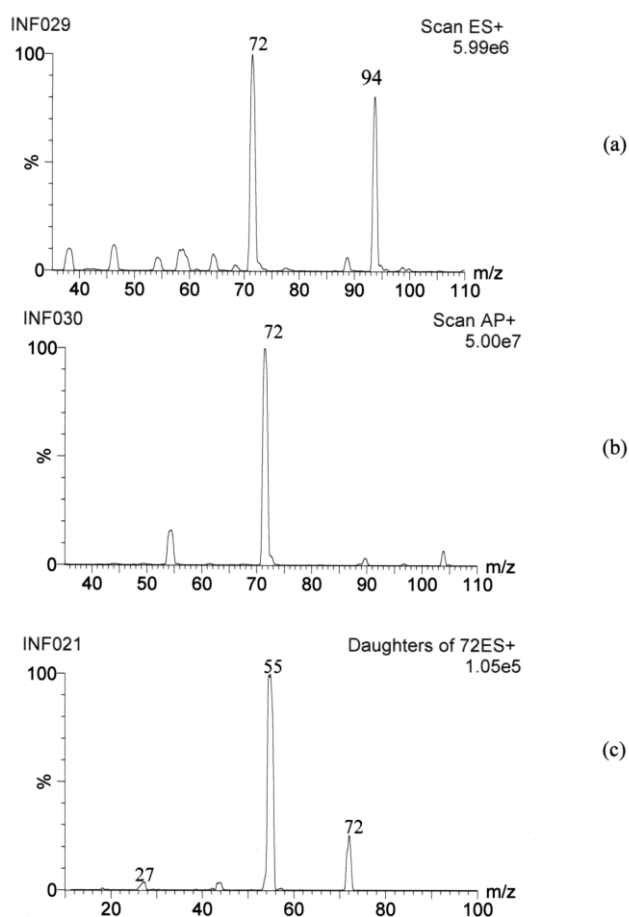
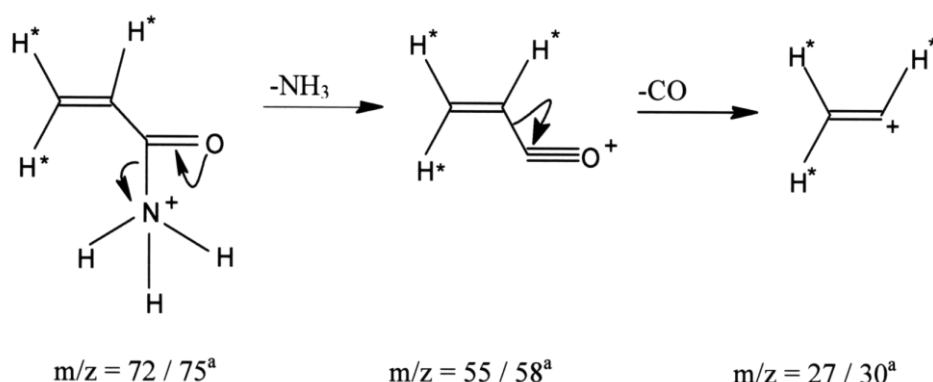


Figure 1. (a) Positive electrospray ionization full-scan mass spectrum of acrylamide at a cone voltage of 20 V and (b) positive atmospheric chemical ionization full-scan mass spectrum of acrylamide at a cone voltage of 20 V. (c) Product ion spectrum for m/z 72 at 10 eV.

The full-scan spectra show an abundant $[M + H]^+$ peak at m/z 72, which was

optimized at a cone voltage of 20 V. When selecting this ion as precursor (Fig. 1(c)), two product ions were obtained in the MS/MS spectra. The most abundant fragment, at m/z 55, was optimized at a collision energy of 10 eV and can be explained by the loss of ammonia from the protonated acrylamide; meanwhile the product ion at m/z 27 was optimized at 20 eV and can be explained by the loss of CO from the m/z 55 ion. The proposed fragmentation pathway shown in Fig. 2 is consistent with the losses observed for the $^2\text{H}_3$ -acrylamide, where product ions containing three deuterium atoms were obtained (m/z 58 and m/z 30), demonstrating that no deuterium was present in the neutral losses observed. When $[\text{M} + \text{Na}]^+$ was selected as precursor ion in ESI experiments, no product ions were observed, showing the inconvenience of using this type of adducts as precursor ions. Therefore, the use of this $[\text{M} + \text{Na}]^+$ was not considered in further experiments.



H^* : ^1H in acrylamide molecule, ^2H in isotopically labelled acrylamide molecule.
 a: $^2\text{H}_3$ -acrylamide

Figure 2. Fragmentation pathway proposed for protonated acrylamide and $^2\text{H}_3$ -acrylamide molecules.

The main experimental differences between ESI and APCI interfaces were related to the temperature used. While the desolvation temperature for ESI was optimized at a typical value of 350 °C, in the case of APCI and Ion Sabre APCI the maximum response was obtained at a probe temperature of 200 °C, substantially lower than the usual values.

The experimental MS conditions selected are summarized in Table 1. This table also

shows the relative abundance of both the product ions obtained. It must be emphasized that the product ion at m/z 27 was much less abundant than that at m/z 55 (around only 2%). Thus, although the possibility to acquire two different transitions exists, allowing the confirmation of acrylamide's findings, the great differences observed between the relative abundances of both transitions make the analyte confirmation at low concentration levels difficult.

Table 1. Acrylamide and $^2\text{H}_3$ -acrylamide MS and MS/MS optimized conditions.

Compound	Precursor Ion (m/z)	Cone (V)	Product Ion (m/z)	Dwell time (s)	Collision energy (eV)	Relative abundance
Acrylamide	72	20	55 (Q)	0.15	10	100
			27 (q)	0.15	20	2
$^2\text{H}_3$ -acrylamide	75	20	58 (Q)	0.05	10	100
			30 (q)	0.05	20	2

(Q)-Quantification transition, (q)-confirmation transition

3.2 Method optimization

Owing to the high polarity associated with acrylamide, a high water percentage is usually required in the retention and chromatographic separation processes when using reversed-phase materials. An Atlantis dC₁₈ column was chosen because of its satisfactory behavior when working with highly aqueous mobile phases (95%). Under these circumstances, the selection of the organic modifier does not seem critical; however, the use of methanol or acetonitrile can be of importance as they can notably affect both the ionization process and the chromatographic behavior, e.g. peak shape.

Regarding ionization, the use of methanol as the organic solvent favored the protonation mainly in ESI approach [22] owing to its protic character, generating more intense peaks than acetonitrile, as can be seen in Table 2. However, this effect was not observed when using APCI; in fact, higher ion abundances were obtained for acetonitrile. With regard to chromatography, the use of acetonitrile led to a narrower acrylamide peak (Table 2) and it allowed a more favorable signal-to-noise ratio using APCI interfaces. Both effects (ionization and peak width) have to be considered in order to obtain a better signal-to-noise ratio. Thus, in the case of APCI interfaces, the use of acetonitrile was preferred because under these conditions a narrow peak was obtained without any loss in sensitivity due to ionization. For ESI, methanol was selected because the signal increase due to the ionization was more important than the chromatographic effect.

Table 2. Summary of the main conditions tested for each interface in LC-MS/MS determination of acrylamide.

Interface	Injection Volume (μL)	Organic Solvent	Peak height (Q)	Peak area (Q)	Peak Base Width (s)	S/N _Q ^a	S/N _q ^a
ESI	100 ^b	MeOH	$5.9 \cdot 10^3$	$9.7 \cdot 10^2$	36	20	4
	150	CH ₃ CN	$3.4 \cdot 10^3$	$1.7 \cdot 10^2$	14	6	< 3
APCI	500	MeOH	$6.0 \cdot 10^4$	$6.0 \cdot 10^3$	34	37	5
	750 ^b	CH ₃ CN	$3.7 \cdot 10^5$	$1.2 \cdot 10^4$	14	135	21
Ion Sabre	500	MeOH	$9.2 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^4$	28	106	13
APCI	750 ^b	CH ₃ CN	$6.3 \cdot 10^5$	$2.1 \cdot 10^4$	14	887	95

^a Estimated from a 10 $\mu\text{g/L}$ standard solution, ^b Selected for further validation.

(Q)-Quantification transition, (q)-confirmation transition

While the use of narrow peaks (peak width 14 s) leads to an increase in sensitivity, it is advisable to reduce the dwell time in order to maintain a satisfactory number of data points per peak. This reduction leads to a sensitivity loss when conventional quadrupole analyzers are used. So, a compromise has to be reached to obtain satisfactory sensitivity. In order to minimize sensitivity losses, the dwell time for acrylamide was set to 0.15 s, while for ²H₃-acrylamide it was decreased to 0.05 s as the loss in sensitivity could be compensated by adding higher concentrations of the IS (9 $\mu\text{g/l}$) to the sample.

Cavalli *et al.* [15] showed the difficulties in quantifying acrylamide at low levels using a single quadrupole. Their method was not sensitive enough to comply with the European legislation level (0.1 $\mu\text{g/l}$), and they proposed the use of tandem MS detection to further lower the LOD. Although this statement used to be correct for most analytes because of the higher inherent sensitivity of the MS/MS technique (mainly due to chemical noise reduction), it was not observed in the case of acrylamide, where the MS/MS instrument did not allow reaching the objective LODs. This unusual effect can be mainly due to the low molecular weight of this analyte together with the low specificity of the quantification transition (72 \rightarrow 55, loss of ammonia), which lead to notable background noise in all interfaces tested, reducing the attainable sensitivity. However, the chemical noise using acetonitrile was notably lower in Ion Sabre APCI than in the conventional APCI, which led to the highest S/N ratios (Table 2). The acquisition of a more specific transition (72 \rightarrow 27) could minimize the chemical noise, as shown in Fig. 3. However, the very low relative abundance of this transition (Table 1) does not allow the increase of absolute sensitivity.

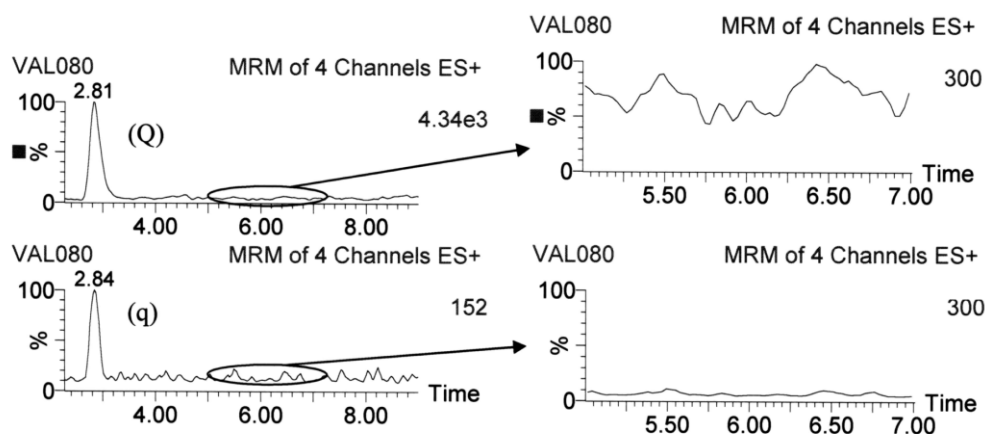


Figure 3. Background noise in the selected reaction monitoring (SRM) chromatograms for a 100 μl injection of 10 $\mu\text{g/l}$ acrylamide standard using ESI and methanol as organic modifier in the mobile phase. (Q): 72 \rightarrow 55; (q): 72 \rightarrow 27.

In order to increase the sensitivity of the method, large-volume injection was tested for the three interfaces, in order to reach a compromise between sensitivity and peak shape. Using methanol as the mobile phase modifier, the maximum volume that could be injected without loss of sensitivity was 100 μl (ESI) and 500 μl (APCI). Using acetonitrile, these volumes could be increased up to 150 μl (ESI) and 750 μl (APCI).

Finally, after considering the ionization and chromatographic behavior and the volume injection effect, Ion Sabre APCI was found to be the most sensitive approach for obtaining satisfactory results at sub-ppb levels. On the other hand, the sensitivity notably decreased with ESI, hampering the determination of acrylamide at the required concentration levels. Under optimized conditions (Table 2), the methods using the three interfaces were subjected to a validation process.

3.3. Method validation

Linearity was satisfactory, with correlation coefficients higher than 0.998 for all interfaces at different concentration ranges (depending on sensitivity) and residuals lower than 30%. Analytical characteristics, precision (repeatability) and accuracy (expressed as recovery), were estimated by analyzing ($n = 3$) different blank samples spiked at three concentration levels each (0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/l}$). Results obtained for the three interfaces tested are reported in Table 3.

Table 3. Average recoveries and relative standard deviations (in brackets) at different concentration levels of acrylamide in several types of water (n=3).

	ESI (10µg/L) ^b			APCI (0.2µg/L) ^b			Ion Sabre APCI (0.03µg/L) ^b		
	0.1µg/L	1µg/L	10µg/L ^a	0.1µg/L	1µg/L	10µg/L	0.1µg/L	1µg/L	10µg/L
SW	-	-	5 (26)	-	100 (4)	107 (3)	90 (1)	96 (4)	100 (6)
GW	-	-	7 (32)	-	97 (4)	109 (1)	97 (6)	98 (5)	101 (8)
DW	-	-	8 (29)	-	96 (3)	105 (4)	93 (12)	99 (4)	101 (3)
DWTP1	-	-	-	-	95 (1)	106 (4)	93 (6)	93 (2)	96 (6)
DWTP2	-	-	-	-	94 (3)	110 (3)	93 (6)	92 (3)	97 (5)
DWTP3	-	-	-	-	98 (5)	106 (1)	97 (12)	93 (4)	102 (4)

^a Calculated with external standard calibration, b. Limit of detection measured in real water samples, - not detected

When ESI was interfaced, the LOD obtained with standard solutions was even higher than that reported by Cavalli *et al.* [15] using a single quadrupole. Besides, low recovery values were obtained when real spiked water samples were analyzed (Fig. 4). This fact might be due either to the ionization suppression, possibly produced by unretained salts, and/or to the increase of sodium adduct formation when real water samples are injected. Using this interface, the lowest concentration level that could be detected in real samples was 10 µg/l but with unsatisfactory accuracy and precision (Table 3). Therefore, the use of ESI in LC-MS/MS is not recommended for the determination of acrylamide in water.

For the APCI approach, the matrix effect observed was much lower than for ESI (Fig. 4). This fact is in agreement with previously reported methods in which APCI showed lower ionization suppression in complex matrixes such as plasmas [20,23]. Using APCI, acrylamide was measured without significant intensity variations between standard solutions and real water samples. Satisfactory recoveries (94-110%) and repeatability (RSD < 5%) were obtained for 1 and 10 µg/l, as can be seen in Table 3. However, the estimated LOD was 0.2 µg/l, which does not satisfy the legislation requirements for drinking water, as the lowest concentration that could be fully validated (LOQ) was fixed at 1 µg/l.

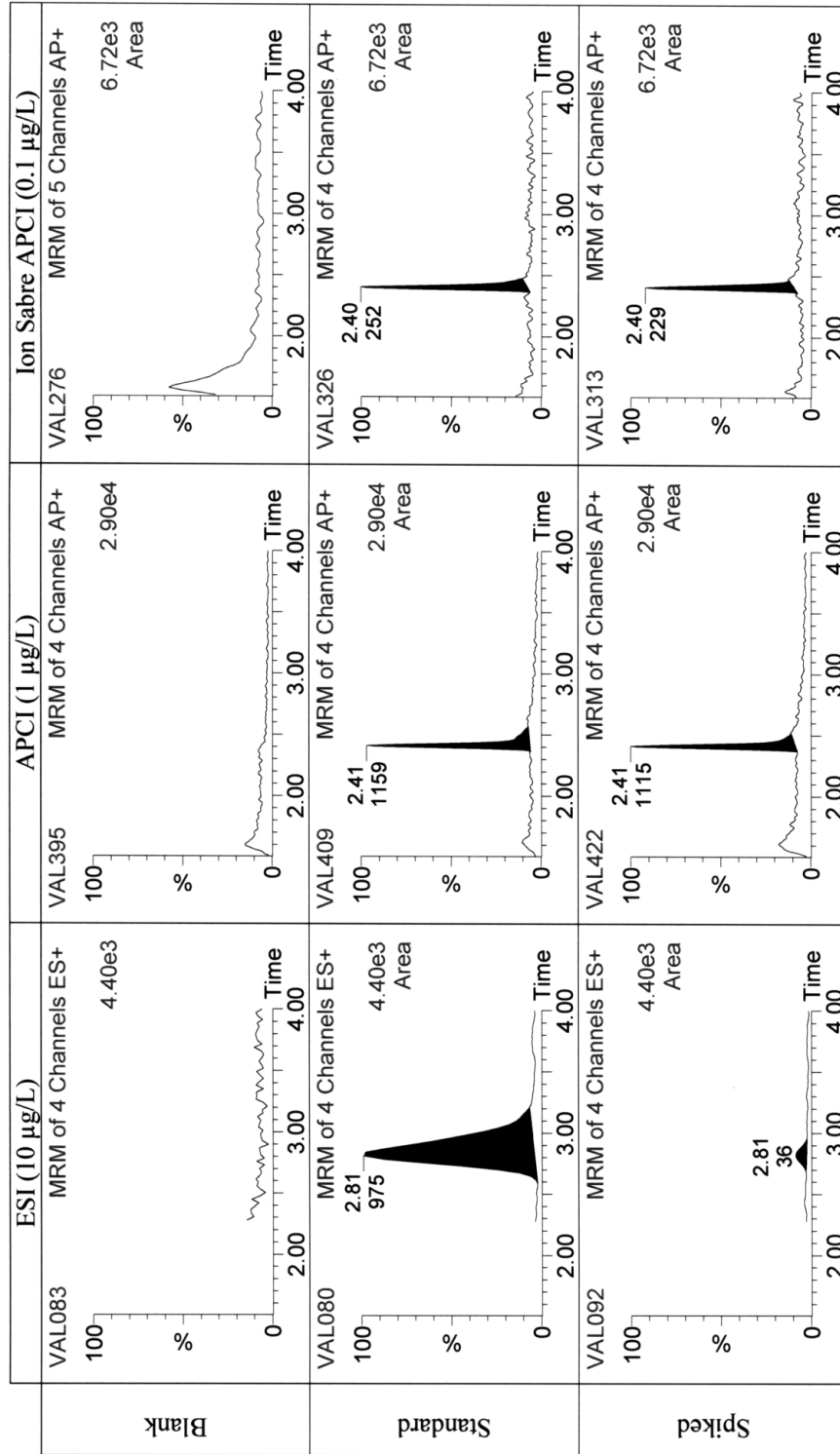


Figure 4. SRM chromatograms for the quantification transition (72 → 55) of an acrylamide reference standard, a drinking water blank and a spiked drinking water sample using the three interfaces tested (a) ESI, (b) APCI and (c) Ion Sabre APCI. Concentrations used: 10 µg/l (ESI), 1 µg/l (APCI), 0.1 µg/l (Ion Sabre APCI).

Finally, the best results were obtained for Ion Sabre APCI. Absolute sensitivity was notably increased in comparison to the other interfaces (Fig. 4). As in the case of APCI, no ionization suppression was observed in any of the six water samples studied. The LOD reached in real water samples was 0.03 µg/l, comparable to that reported by Kawata *et al.* [11], who reached an LOD of 0.02 µg/l after extracting 500 ml of water and using a more laborious procedure. This allows a reliable quantification at 0.1 µg/l (Fig. 4(c)), with satisfactory recoveries (90-102%) and precision (RSD < 12%) for all types of water samples analyzed (Table 3) at the three assayed levels.

The method developed was based on the use of the IS, as the use of a labeled IS is probably the best approach to correct the ionization suppression. In the ESI experiments, the high ionization suppression observed made the labeled IS undetectable at the concentration tested. This fact hampered the use of IS correction and therefore very poor recoveries were obtained (Table 3). Satisfactory recoveries might be predicted if higher IS concentrations were used. However, this approach was not tested because the low sensitivity in ESI impeded acrylamide determination at the required level. In the case of APCI, the absence of ionization suppression would make IS correction unnecessary. However, this approach is still advisable in order to compensate for unpredictable differences between water samples of different origin.

3.4 Confirmation

One of the more attractive advantages associated with the use of tandem mass spectrometry is the possibility to acquire two or more SRM transitions to confirm the presence of analytes in the sample [13,16,17]. In the determination of acrylamide, the acquisition of two transitions makes reliable confirmation possible at concentrations close to 0.1 µg/l. The comparison between a reference standard and a spiked sample at 1 µg/l is shown in Fig. 5(a) and (b). The ion intensity ratio obtained in the spiked sample differed only by 17% from that of the reference standard, despite the low signal of the confirmative transition. This deviation falls in the tolerance range suggested by the 2002/657/EC guideline, where a deviation up to 50% is acceptable for product ions with relative abundance lower than 10%. This fact demonstrated the suitability of the method for confirmation of positive findings at low concentration levels.

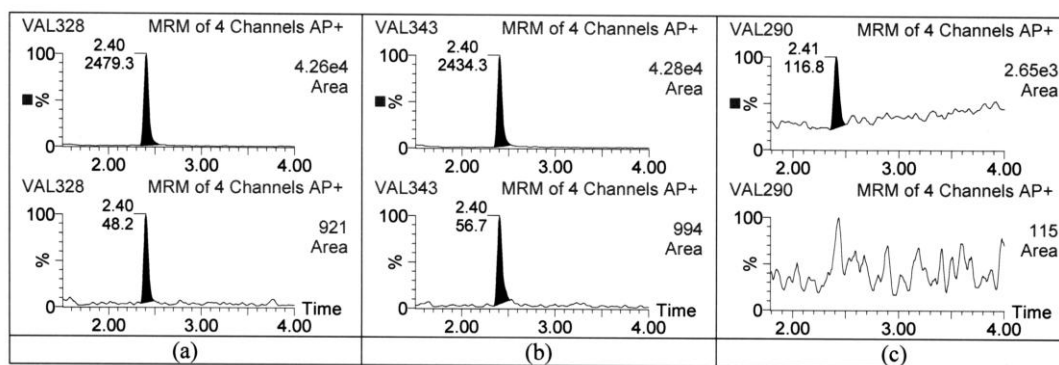


Figure 5. SRM chromatograms obtained under optimum conditions by Ion Sabre APCI (a) standard at 1 $\mu\text{g/l}$, (b) drinking water spiked at 1 $\mu\text{g/l}$ and (c) standard at 0.05 $\mu\text{g/l}$. Top, quantification transition; bottom, confirmation transition.

However, the strong differences in the selected transition intensities hampered the confirmation at very low levels. Figure 5(c) shows the chromatogram obtained from a 0.05 $\mu\text{g/l}$ standard. The high sensitivity given by the quantitative transition allowed the quantification of acrylamide at this low level, estimating an LOD of 0.03 $\mu\text{g/l}$. Nevertheless, the confirmative transition could not be detected, the acrylamide confirmation being limited to concentrations $\geq 0.2 \mu\text{g/l}$.

CONCLUSION

A comparison of the three interfaces tested for acrylamide (ESI, APCI and Ion Sabre APCI) shows that APCI interfaces are less affected by the ionization suppression produced by sample matrix components and also present higher sensitivity than ESI. Thus, APCI interfaces are more suitable for the determination of acrylamide in water. Ion Sabre APCI leads to around tenfold higher sensitivity than conventional APCI and therefore it is the most suitable interface for this purpose.

The development of an LC-Ion Sabre-MS/MS method with large-volume injection has allowed the rapid, sensitive and selective determination of acrylamide in water. The almost non-existent sample pretreatment (centrifugation and IS addition) together with the high sensitivity achieved (LOD 0.03 µg/l) and the absence of matrix effects makes this method suitable for monitoring programs in compliance with drinking water regulatory requirements (0.1 µg/l). Owing to these characteristics, the developed approach significantly improves previously reported methods, which presented drawbacks such as time-consuming steps, laborious procedures or insufficient sensitivity.

Although the method developed allows the reliable quantification at 0.1 µg/l, its main drawback is related to the confirmation of positive samples at concentration levels below 0.2 µg/l because of the low sensitivity attainable by the confirmative transition. This fact shows one of the main limitations of the confirmation process based on the acquisition of two transitions when one of the product ions is much less abundant than that selected for quantification. The sensitivity of the confirmative transition has to be taken into consideration in order to calculate the limit of confirmation (LOC), as it is not feasible to report positive findings at analyte concentrations between LOD and LOC. This drawback might be minimized by the use of new generation triple-quadrupole instruments, in which a sensitivity increase of around 1 order magnitude is normally claimed.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to Iproma S.L. for financial support and for supplying drinking and treatment-plant water samples. The Quattro Micro LC-MS/MS was funded by the European Union (Fondos Feder-Reino de España, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Ref. UNJM-E004). This work was developed under financial support from the Ministry of Science and Technology (Ref. REN2002-01818).

REFERENCES

- [1] US Environmental Protection Agency. *National Primary Drinking Water Regulations*: Cincinnati, OH, 2002. www.epa.gov/safewater/mcl.html.
- [2] International Agency for research on Cancer. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*: Lyon, 1994; 389. <http://www.monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol60/volume60.pdf>
- [3] WHO guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, 2003.
- [4] European council Drinking Water Directive EU 98/83/EC. Brussels, 1998.
- [5] Zhang Y, Zhang G, Zhang Y. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods. Review and recent developments. *J. Chromatogr., A* 2005; **1075**: 1.
- [6] Castle L, Eriksson S. Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods. *J. AOAC Int.* 2005; **88**: 274.
- [7] Wenzl T, de la Calle MB, Anklam E. Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. *Food Addit. Contam.* 2003; **20**: 885.
- [8] Núñez O, Moyano E, Galcerán MT. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. *Trends Anal. Chem.* 2005; **24**: 683.
- [9] US Environmental Protection Agency. *Method 8032A: Acrylamide by Gas Spectrometry*: Cincinnati, OH, 1996; <http://www.epa.gov/SW-846/pdfs/8032a.pdf>.
- [10] Licea Perez H, Osterman-Golkar S. A sensitive gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for detection of alkylating agents in water: application to acrylamide in drinking water, coffee and snuff. *Analyst* 2003; **128**: 1033.
- [11] Kawata K, Ibaraki T, Tanabe A, Yagoh H, Shinoda A, Suzuki H, Yasuhara A. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of hydrophilic compounds in environmental water by solid-phase extraction with activated carbon fiber felt. *J. Chromatogr., A* 2001; **911**: 75.
- [12] Weideborg M, Kallqvist T, Odegard KE, Sverdrup LE, Vik EA. Environmental assesment of acrylamide and methyloacrylamide from a grouting agent used in the tunnel construction of Romeriksporten, Norway. *Wat. Res.* 2001; **35**: 2645.
- [13] Hernández F, Pozo OJ, Sancho JV, López FJ, Marín JM, Ibáñez M. Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS² using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers. *Trends Anal. Chem.* 2005; **24**: 596.
- [14] Reemtsma T. Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. *J. Chromatogr., A* 2003; **1000**: 477.
- [15] Cavalli S, Polesello S, Sacconi G. Determination of acrylamide in drinking water by

- large-volume direct injection and ion-exclusion chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 2004; **1039**: 155.
- [16] Stolker AAM, Niesing W, Hogendoorn EA, Rambali AB, Vleeming W. Determination of nicotine and cotinine in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 2003; **1020**: 35.
- [17] Hernández F, Ibáñez M, Sancho JV, Pozo OJ. Comparison of different mass spectrometric techniques combined with liquid chromatography for confirmation of pesticides in environmental water based on the use of identification points. *Anal. Chem.* 2004; **76**: 4349.
- [18] Pozo OJ, Sancho JV, Ibáñez M, Hernández F, Niessen WMA. Confirmation of organic micropollutants detected in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Achievements and pitfalls. *Trends Anal. Chem.* 2006; **25**: 1030.
- [19] Grimalt S, Pozo OJ, Marín JM, Sancho JV, Hernández F. Evaluation of different quantitative approaches for the determination of non-easily ionizable molecules by different atmospheric pressure interfaces used in liquid chromatography tandem mass spectrometry: Abamectin as case of study. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2005; **16**: 1619.
- [20] Matuszewski BK. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2006; **830**: 293.
- [21] European Union Decision 2002/657/EC. Brussels, 2002.
- [22] Jemal M, Hawthorne DJ. Effect of high performance liquid chromatography mobile phase (methanol vs acetonitrile) on the positive and negative ion electrospray response of a compound that contains both an unsaturated lactone and a methyl sulfone group. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999; **13**: 61.
- [23] Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *J. Chromatogr., A* 2004; **1058**: 61.

3.2.2 Discusión de los resultados del artículo científico 5

La principal diferencia que se observó entre las interfases ESI y APCI fue la presencia del aducto sodiado (m/z 94), con una abundancia comparable al ion molecular (m/z 72), cuando se utilizó la interfase ESI²². Pese a su abundancia, la ausencia de iones producto tras la fragmentación en la celda de colisión impidió el uso del aducto sodiado como ion precursor. En ambas interfases, se obtuvieron dos iones producto (m/z 55, m/z 27) usando como ion precursor el $[M+H]^+$, m/z 72, lo que permitió adquirir dos transiciones para llevar a cabo la confirmación de los positivos encontrados.

En cuanto al disolvente orgánico utilizado como fase móvil, la acrilamida se ionizaba mejor en modo positivo mediante ESI con un modificador orgánico de carácter prótico como es el metanol²³. En cambio, al tratarse de mecanismos de ionización diferentes, para las interfases APCI la ionización óptima se obtuvo usando acetonitrilo. En cuanto a la forma de pico, se obtuvieron picos más estrechos con acetonitrilo, aumentando considerablemente la relación señal-ruido en el caso de las interfases APCI. Esta mejora cromatográfica observada no compensaba la elevada sensibilidad que el metanol confería en el proceso de ionización en ESI.

La necesidad de desarrollar un método capaz de determinar residuos de acrilamida a bajos niveles de concentración (0.1 $\mu\text{g/L}$) nos llevó a realizar diversas experiencias usando extracción en fase sólida (SPE) con tal de lograr preconcentrar el analito. Se utilizaron cartuchos con distintas fases estacionarias (C_{18} , intercambio catiónico y poliméricos) y pese a ello no se consiguió retener de manera satisfactoria el analito, habiendo estudiado diferentes parámetros como la influencia de la acidificación de la muestra a varios pH, volumen de muestra preconcentrado, diversos disolventes para la elución,..... Por todo ello, el trabajo se centró en estudiar las diversas posibilidades que la inyección directa por LC-MS/MS nos ofrece.

Pese a la elevada sensibilidad intrínseca que conlleva el uso de la espectrometría de masas en tándem, el bajo peso molecular del analito junto a la poca especificidad de la transición de cuantificación (pérdida de amoniaco)

provocaba para las tres interfases un aumento notable en el ruido de fondo. La inyección de grandes volúmenes (100 μL para ESI y 750 μL para APCI) mejoró la sensibilidad del método, obteniendo la mejor relación señal-ruido en el caso de la interfase APCI Ion Sabre con acetonitrilo (6.5 veces más sensible que APCI convencional y 44 veces más que ESI usando metanol). Si a este hecho se suma la elevada supresión en la ionización observada en ESI debido a interferentes de matriz que co-eluyen con la acrilamida, el LOD calculado en los distintos tipos de aguas seleccionadas resultó demasiado alto (10 $\mu\text{g/L}$). En cambio, cuando se utilizó la ionización por APCI y APCI Sabre el efecto matriz se minimizó²⁴ mejorando ostensiblemente la sensibilidad del método, obteniéndose LODs de 0.2 $\mu\text{g/L}$ y 0.03 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. El método basado en el uso de la interfase APCI Sabre y utilizando acrilamida-D3 como patrón interno, se validó con buenas precisiones y exactitud para todos los tipos de muestras chequeados incluso al nivel de 0.1 $\mu\text{g/L}$ requerido por la legislación mediante. A pesar de que la ausencia de supresión en la ionización utilizando las interfases APCI puede hacer innecesario el uso de acrilamida marcada isotópicamente, se mantiene su presencia en el método para compensar posibles e impredecibles diferencias en muestras de agua de origen distinto a las estudiadas en este trabajo. En cuanto a la confirmación de los positivos por APCI Ion Sabre, el límite de confirmación (LOC) se estableció en 0.2 $\mu\text{g/L}$, el doble que el LOQ, a consecuencia de la diferencia de sensibilidad entre las transiciones de cuantificación (Q , 72>55) y confirmación (q , 72>27) seleccionadas. Ello es debido a la poca abundancia del ión producto obtenido por pérdida de CO (m/z 27) respecto al obtenido por la pérdida de NH_3 (m/z 55).

Con posterioridad a este trabajo, se han publicado algunos métodos analíticos basados en LC para determinar acrilamida en agua con LODs y LOQs inferiores a los obtenidos por nosotros. En el primero de ellos, Chu y Metcalfe²⁵ proponen un método para determinar acrilamida en aguas superficiales basado en LC-APCI-MS/MS estableciendo el LOQ en 0.06 ng/mL y el LOD en 0.02 ng/mL. Para alcanzar dichos límites, se requiere un tratamiento de muestra muy tedioso con sucesivas etapas de evaporación y reconstitución que llevan a un consumo de tiempo muy elevado por muestra analizada, que lo hace inadecuado para su implantación en programas de

control además del inevitable uso de acrilamida marcada isotópicamente para compensar las pérdidas producidas durante el proceso. Por otro lado, tan solo se adquiere una transición y de baja selectividad (pérdida de amoníaco) con el peligro que ello conlleva a la hora de reportar falsos positivos o negativos.

En el trabajo de Alpmann y Morlock²⁶ se desarrolla un método basado en HPTLC-FD para aguas potables con el que logran obtener un LOD de 0.025 ng/mL y un LOQ de 0.083 ng/mL. A consecuencia de la instrumentación empleada, es necesario un exhaustivo tratamiento de muestra con etapas de derivatización y preconcentración mediante SPE con un elevado consumo de tiempo y posibles pérdidas del analito. Respecto a esto, los autores proponen compensar dichas pérdidas mediante el uso de la N,N-dimetilacrilamida como patrón interno con el riesgo que implica la utilización de otras sustancias de estructura química distinta al analito en cuestión²⁷⁻³¹. Además, se hace uso de un detector de baja sensibilidad y selectividad como es el FD, lo que obliga al anteriormente mencionado tratamiento de la muestra y además no permite la confirmación de los positivos simultáneamente teniendo que acudir a otras técnicas de instrumentación más costosas (RMN, TOF) para ello.

Recientemente, se ha publicado un nuevo método basado en la técnica LC-MS/MS para determinar acrilamida en aguas de consumo humano³². Para satisfacer la legislación europea y alcanzar un LOQ similar al del método presentado en esta Tesis (0.1 µg/L), se lleva a cabo una etapa de SPE con un factor de concentración de 1000 (500 mL de muestra, volumen final 0.5 mL), utilizando cartuchos de carbón activo. Con el fin de corregir las posibles pérdidas en la extracción y el efecto de la matriz durante la ionización, a las muestras se les adiciona como patrón interno acrilamida marcada [¹³C₃]. El LOD estimado para este método es ligeramente inferior (0.02 µg/L) al de nuestro trabajo. Por otro lado, el uso de una columna de intercambio iónico de grandes dimensiones (250 x 9 mm) obliga a realizar una división (1/10) del flujo de elución para poder ser introducido en la fuente de ionización "turboinspray" utilizada. Además, el uso de esta columna provoca un elevado tiempo de análisis cromatográfico (25 minutos) de manera que, considerando también el tiempo necesario para realizar la preconcentración de cada muestra, supone una clara

desventaja respecto al método que proponemos en cuanto a "sample throughput". Al mismo tiempo, aunque se indica que se adquieren dos transiciones con objeto de llevar a cabo la confirmación de las muestras positivas, en la lectura del artículo no se desvela a qué nivel es posible realizar dicha confirmación.

Por tanto, el trabajo presentado se encuentra en la vanguardia de la metodología desarrollada para la determinación de acrilamida en aguas. El método desarrollado fue validado de manera satisfactoria a 0.1 µg/L (LOQ) y además se prestó especial énfasis en la confirmación de los positivos mediante la adquisición de dos transiciones, consiguiendo dicho propósito al nivel de 0.2 µg/L.

3.3 Bibliografía

1. W. Parzefall, *Minireview on the toxicity of dietary acrylamide*, *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 2008, 1360-1364.
2. R.M. LoPachin, T. Gavin, *Acrylamide-induced nerve terminal damage: Relevance to neurotoxic and neurodegenerative mechanisms*, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 2008, 5994-6003.
3. A. Shipp, G. Lawrence, R. Gentry, T. McDonald, H. Bartow, J. Bounds, N. Macdonald, H. Clewell, B. Allen, C. Van Landingham, *Acrylamide: Review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects*, *Crit. Rev. Toxicol.*, **36**, 2006, 481-608.
4. A. Besaratinia, G. P. Pfeifer, *Genotoxicity of acrylamide and glycidamide*, *J. Natl. Cancer Inst.*, **96**, 2004, 1023-1029.
5. D. Taeymans, J. Wood, P. Ashby, I. Blank, A. Studer, R.H. Stadler, P. Gondé, P. Van Eijck, S. Lalljie, H. Lingnert, M. Lindblom, R. Matissek, D. Müller, D. Tallmadge, J. O'Brien, S. Thompson, D. Silvani, T. Whitmore, *A Review of Acrylamide: An Industry Perspective on Research, Analysis, Formation and Control*, *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, **44**, 2004, 323-347.
6. T. Wenzl, D.W. Lachenmeier, V. Gökmen, *Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food*, *Anal. Bional. Chem.*, **389**, 2007, 119-137.
7. Y. Zhang, G. Zhang, Y. Zhang, *Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods: Review and recent developments*, *J. Chromatogr. A*, **1075**, 2005, 1-21.
8. L. Castle, S. Eriksson, *Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods*, *J. AOAC Int.*, **88**, 2005, 274-284.
9. E. Bermudo, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán, *Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in typical Spanish products*, *Talanta*, **76**, 2008, 389-394.
10. J. Liu, G. Zhao, Y. Yuan, F. Chen, X. Hu, *Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry*, *Food Chem.*, **108**, 2008, 760-167.

11. C. T. Kim, E.S. Hwang, H.J. Lee, *An improved LC-MS/MS method for the quantitation of acrylamide in processed foods*, *Food Chem.*, **101**, 2007, 401-409.
12. Y. Ren, Y. Zhang, J. Jiao, Z. Cai, Y. Zhang, *Sensitive isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry method for the determination of acrylamide in chocolate*, *Food Addit. Contam.*, **23**, 2006, 228-236.
13. N.J. Nielsen, K. Granby, R.V. Hedegaard, L.H. Skibsted, *A liquid chromatography - Tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in bread*, *Anal. Chim. Acta*, **557**, 2006, 211-220.
14. K. Granby, S. Fagt, *Analysis of acrylamide in coffee and dietary exposure to acrylamide from coffee*, *Anal. Chim. Acta*, **520**, 2004, 177-182.
15. E.J.M. Konings, A.J. Baars, J.D. van Klaveren, M.C. Spanjer, P.M. Rensen, M. Hiemstra, J.A. van Kooij, P.W.J. Peters, *Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks*, *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 2003, 1569-1579.
16. J. Rosén, K.E. Hellenäs, *Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry*, *Analyst*, **127**, 2002, 880-882.
17. H. Licea Perez, S. Osterman-Golkar, *A sensitive gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for detection of alkylating agents in water: Application to acrylamide in drinking water, coffee and snuff*, *Analyst*, **128**, 2003, 1033-1036.
18. US Environmental Protection Agency. Method 8032A, 1996.
19. K. Kawata, T. Ibaraki, A. Tanabe, H. Yagoh, A. Shinoda, H. Suzuki, A. Yasuhara, J. *Chromatogr. A*, *Gas chromatographic-mass spectrometric determination of hydrophilic compounds in environmental water by solid-phase extraction with activated carbon fiber felt*, **911**, 2001, 75-83.
20. M. Weideborg, T. Kallqvist, K.E. Odegard, LE Sverdrup, E.A. Vik, *Environmental risk assessment of acrylamide and methylolacrylamide from a grouting agent used in the tunnel construction of romeriksporten, Norway*, *Wat. Res.*, **35**, 2001, 2645-2652.
21. S. Cavalli, S. Polesello, G. Sacconi, *Determination of acrylamide in drinking water by large-volume direct injection and ion-exclusion chromatography-mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **1039**, 2004, 155-159.

22. E.M. Thurman, I. Ferrer, D. Barceló, *Choosing between atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides*, *Anal. Chem.*, **73**, 2001, 5441-5449.
23. M. Jemal, D.J. Hawthorne, *Effect of high performance liquid chromatography mobile phase (methanol versus acetonitrile) on the positive and negative ion electrospray response of a compound that contains both an unsaturated lactone and a methyl sulfone group*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 1999, 61-66.
24. B.K. Matuszewski, *Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis*, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **830**, 2006, 293-300.
25. S. Chu, C.D. Metcalfe, *Analysis of acrylamide in water using a coevaporation preparative step and isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry*, *Anal. Chem.*, **79**, 2007, 5093-5096.
26. A. Alpmann, G. Morlock, *Rapid and sensitive determination of acrylamide in drinking water by planar chromatography and fluorescence detection after derivatization with dansulfinic acid*, *J. Sep. Sci.*, **31**, 2008, 71-77.
27. F.M. Lagerwerf, W.D. van Dongen, R.J.J.M. Steenvoorden, M. Honing, J.H.G. Jonkman, *Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative LC-MS-MS*, *Trends Anal. Chem.*, **19**, 2000, 418-427.
28. P.G.M. Kienhuis, R.B. Geerdink, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of surface and waste water with atmospheric pressure chemical ionisation. II. Applications*, *Trends Anal. Chem.*, **19**, 2000, 460-474.
29. J.V. Sancho, O.J. Pozo, F.J. López, F. Hernández, *Different quantitation approaches for xenobiotics in human urine samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 2002, 639-645.
30. T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, *Countering matrix effects in environmental liquid chromatography- electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals*, *J. Chromatogr. A*, **1029**, 2004, 153-159.
31. M. Ibáñez, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, *Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil*

*samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A, **1081**, 2005, 145-155.*

32. L. Lucentini, E. Ferretti, E. Veschetti, L. Achene, L. Turrio-Baldassari, M. Ottaviani, *Determination of low-level acrylamide in drinking water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, J. AOAC Int., **92**, 2009, 263-270.*

CAPÍTULO 4

DESARROLLO DE MÉTODOS LC-MS/MS PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS DE MAYOR DIFICULTAD ANALÍTICA EN MUESTRAS VEGETALES

4.1 Introducción

4.2 Artículos científicos 6 y 7

4.2.1 Artículo científico 6

An ion pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of ethephon residues in vegetables
Rapid Commun. Mass Spectrom., 20 (2006) 419-426

4.2.2 Artículo científico 7

Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry
J. Chromatogr. A, 992 (2003) 133-140

4.2.3 Discusión de los resultados de los artículos científicos 6 y 7

4.3 Bibliografía

4.1 Introducción

En las últimas décadas, con la finalidad de proteger los cultivos para asegurar la producción, el uso de plaguicidas en el mundo se ha multiplicado por cuatro, desde los 0.49 Kg/Ha en 1961 hasta los 2 Kg/ha de 2004¹. Esta masiva y continua aplicación de gran variedad de productos fitosanitarios requiere la evaluación de la presencia de posibles residuos de estos productos químicos en los alimentos para garantizar su consumo sin riesgos para la salud. Para ello, con el objetivo de conseguir que la cantidad de residuos de fitosanitarios en los alimentos sea la más baja posible y segura para los consumidores, los plaguicidas son registrados para su uso en la UE tras someterse a diversos estudios de persistencia en los cultivos y de toxicidad siguiendo la Directiva 91/414/CEE². Así mismo, los ensayos de residuos de plaguicidas permiten establecer los límites máximos de residuos (LMRs) por plaguicida y cultivo tolerados en los alimentos o en los piensos, que en muchos casos son del orden de unos pocos $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ³. Actualmente, gracias a la mejora de las técnicas de análisis, los laboratorios de referencia de la UE son capaces de determinar del orden de 700 plaguicidas en sus programas de control. Según datos de 2004, tras analizar más de 62.000 muestras, tan sólo el 4.7% superaba los límites de residuos legales mientras que el 41% tenía niveles semejantes o inferiores⁴. Estos programas de control requieren metodología analítica rápida, sensible y selectiva para determinar el mayor número de compuestos en el mayor número de matrices posibles. En este sentido, en los últimos años la aplicación de la LC-MS/MS se ha convertido en la herramienta ideal para la determinación multiresidual de una gran variedad de plaguicidas de distinta naturaleza en diversas de matrices vegetales⁵⁻¹⁵.

A pesar de que la LC en fase inversa acoplada a MS/MS mediante ESI permite afrontar el análisis de una gran diversidad de compuestos con características físico-químicas muy distintas, todavía existen algunos plaguicidas, considerados de especial dificultad analítica, cuya inclusión en métodos multiresiduales comprometería la determinación del resto de analitos. Entre ellos, destacan los compuestos de elevada polaridad, incluidos aquellos que se encuentran en forma iónica, caso del etefón, que para ser retenidos en la fase estacionaria apolar precisan de la adición de reactivos formadores de pares iónicos, (Fosetil Al¹⁶, ciromazina y melamina¹⁷), compuestos como el glifosato, glufosinato y AMPA que requieren reacciones de derivatización específicas¹⁸⁻²² u otras técnicas cromatográficas con mecanismos de separación distintos como la cromatografía por intercambio iónico²³.

Otros compuestos de especial dificultad son aquellos cuya ionización mediante ESI se ve comprometida por la ausencia de centros lo suficientemente ácidos o básicos, requiriéndose la adición de reactivos (NH₄Ac, NaAc,...) capaces de formar aductos estables, debido a su afinidad por los centros oxigenados, los cuales pueden ser empleados como iones precursores²⁴⁻²⁵. En este grupo se encuentran dos insecticidas "naturales" como la abamectina y la azadiractina.

Etefón

Existe una serie de sustancias, tanto naturales como sintéticas que, pese a no tener una acción plaguicida típica, se suelen considerar dentro de este amplio grupo de compuestos. Su uso en la agricultura es consecuencia de las diversas acciones fisiológicas positivas que producen en los vegetales como respuesta al estímulo que provocan cuando se emplean a bajas concentraciones²⁶. En el grupo de sustancias naturales endógenas se enmarcan las fitohormonas u hormonas vegetales entre las que destacan las auxinas (ácido indolacético), citocininas, giberelinas, ácido abscísico y el etileno.

El etileno, además de ser el principal regulador de la abscisión de hojas y frutos, es conocido como la hormona de la maduración, ya que promueve la maduración y

coloración de los frutos. Pese a que los vegetales biosintetizan el etileno a partir del aminoácido metionina de forma natural, las necesidades de producción conllevan a la utilización de productos sintéticos, caracterizados por su rápida absorción a través de tejidos vegetales, que generan etileno in-situ de modo paulatino, permitiendo concentrar la cosecha en un periodo corto de tiempo y adelantando, además, la coloración, lo que permite alcanzar un mejor precio en el mercado como fruto primerizo. Este es el caso del etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico), el cual se hidroliza rápidamente (a pH superior a 4, por medio de la radiación UV o por altas temperaturas) dentro de los tejidos vegetales liberando etileno y fosfato (Figura 4.1).

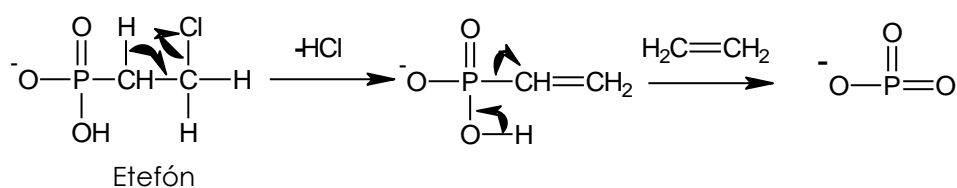


Figura 4.1. Mecanismo de degradación del etefón por el cual se obtiene etileno y fosfato.

Como consecuencia de su baja estabilidad, así como de la elevada polaridad, solubilidad en agua y baja volatilidad que le proporciona la presencia del grupo ácido fosfónico en su estructura, se dificulta en gran medida su determinación analítica directa tanto por GC como por LC. Algunos métodos publicados se han basado en determinaciones indirectas de etileno en diversos cultivos tras aumentos de pH o temperatura²⁷, con la consecuente falta de especificidad que conlleva, al presuponer que la totalidad del etileno producido procede del etefón sin tener en cuenta que los vegetales también lo producen de forma natural. El uso de una técnica de elevada especificidad, sensibilidad y selectividad como GC-MS ha permitido abordar la determinación directa de residuos de etefón, tanto en vegetales²⁸ como en diversos tipos de aguas²⁹, pero el elevado tratamiento de muestra requerido con etapas de preconcentración y derivatización, además de generar pérdidas puede reducir

considerablemente el número de muestras analizables por día. En este sentido, la elevada selectividad y especificidad de la LC-MS/MS¹⁵, y su idoneidad para determinar compuestos de elevada polaridad, e incluso iónicos, favorece la reducción de los procesos de tratamiento de muestra, pudiendo inyectarse los extractos de manera directa en el sistema manteniendo sensibilidades satisfactorias³⁰, incluso después de diluir la muestra para minimizar el efecto matriz¹⁶. Pese a ello, la determinación directa por LC-MS/MS de compuestos de elevada polaridad como el etefón, sin añadir etapas de tratamiento de muestra, requiere el uso de reactivos formadores de pares iónicos (p.ej. acetato de tetrabutilamonio (TBA) para aniones; ácido heptafluorobutírico (HFBA), ácido tridecafluoroheptanoico (TDFHA), ácido nonafluoropentanoico (NFFHA) para cationes), y de esta manera posibilitar la retención en la columna de cromatografía de fase inversa^{16,17,31-35}. Sin embargo, estos reactivos, al tratarse generalmente de sales, no son muy adecuados para ser usados con detectores de espectrometría de masas, ya que suelen ser poco volátiles y además pueden generar efectos matriz considerables si se introducen de manera continua en el sistema mediante la fase móvil. Así, se debe llegar a un compromiso cromatografía-detección para lo que se puede optar por adiciones directas sobre el extracto de la muestra para preformar el par iónico antes de la cromatografía¹⁶. De esta manera, se puede obtener una correcta retención eliminándose el exceso de reactivo junto a los compuestos no retenidos mediante el giro de una válvula externa colocada antes del detector.

El objetivo de este trabajo, **artículo científico 6**, fue desarrollar y validar, siguiendo las premisas establecidas en la guía SANCO³⁶, un método rápido, sensible y selectivo para la determinación directa de residuos de etefón en diversas muestras vegetales, por debajo de los LMRs establecidos, mediante el empleo de cromatografía por formación de pares iónicos acoplada a espectrometría de masas en tándem. La confirmación fiable de las muestras positivas fue una de las prioridades del trabajo, por lo que se adquirieron hasta cinco transiciones SRM diferentes. También se estudió el efecto de la adición de TBA, tanto en fase móvil como en el extracto a diversas concentraciones, y se optimizó el procedimiento de extracción considerando las características físico-químicas del etefón.

Los resultados obtenidos se muestran en el **artículo científico 6** del presente capítulo. Según la búsqueda bibliográfica realizada, el método desarrollado ha sido el primero en el que se aborda la determinación directa de etefón en muestras vegetales.

Azadiractina y Abamectina

Actualmente, para evitar o minimizar los efectos perniciosos sobre el medio ambiente y la salud humana que provocan los diversos tipos de plaguicidas se está promoviendo el uso de productos naturales, como alternativa a los sintéticos, que actúan de manera selectiva contra las plagas ofreciendo mayor seguridad a consecuencia de su baja toxicidad y poca persistencia, manteniendo la eficiencia³⁷⁻³⁹. Dentro de este grupo, se encuentran tanto la azadiractina como la abamectina.

La azadiractina (Figura 5.2) es un tetraterpenoide que se puede encontrar en la corteza, hojas, frutos y, mayoritariamente, en las semillas del árbol Neem, originario de la India.

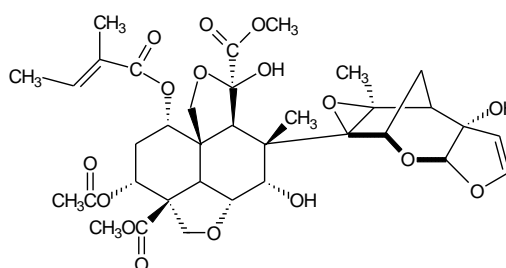


Figura 4.2. Estructura química de la azadiractina

La azadiractina tiene actividad insecticida y actúa sobre más de 200 especies por contacto o ingestión, mostrando acción antialimentaria e inhibidora de la hormona ecdisona de los insectos fitófagos, responsable principal de la muda, regulando el crecimiento e impidiendo la oviposición³⁸. La azadiractina actúa de

modo muy selectivo siendo poco tóxica para el resto de organismos⁴⁰, pudiendo incluso ser utilizada en cultivos ecológicos, tal y como se recoge en el reglamento sobre agricultura ecológica de la Unión Europea (UE), CE 889/2008⁴¹.

La abamectina (Figura 5.3) es una lactona macrocíclica perteneciente a la familia de las avermectinas, las cuales se obtienen por fermentación del actinomiceto del suelo "*Streptomyces avermectitis*", de ahí a que se le conozca como "insecticida antibiótico". La abamectina es una mezcla de dos homólogos, avermectina B_{1a} (>80%) y avermectina B_{1b} (>20%).

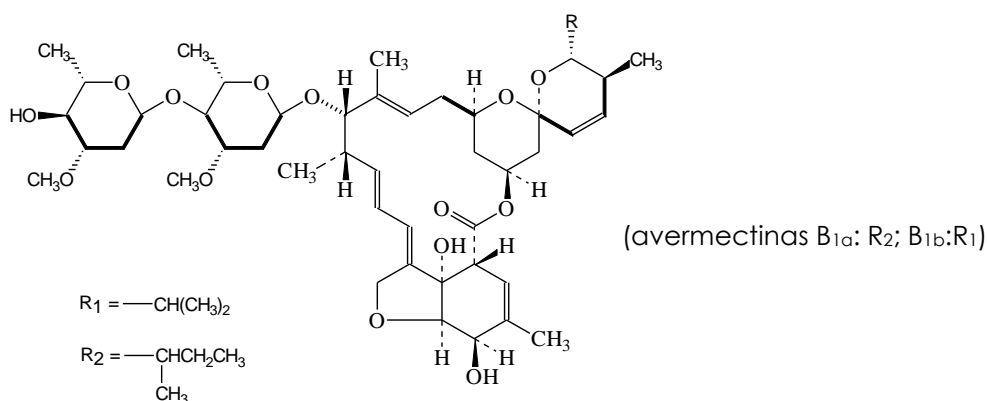


Figura 5.3. Estructura química de la abamectina

La abamectina se incluye dentro de los insecticidas "de cuarta generación", los cuales, pese a utilizarse generalmente en dosis muy bajas, presentan elevada especificidad sobre las plagas y baja toxicidad para los organismos a los que no está dirigida. La abamectina se emplea tanto en el control de los insectos minadores de hojas en cítricos, o de ácaros en cultivos forestales, como a modo de antiparasitario en animales. La acción de la abamectina se basa en bloquear el glutamato de las células nerviosas y hacer más lentos o interrumpir los impulsos nerviosos que intervienen en el movimiento muscular de los artrópodos; de esta manera quedan paralizados y mueren al no poder alimentarse⁴². Pese a lo selectivo de este mecanismo y su inocuidad en mamíferos, la abamectina es tóxica para abejas expuestas

directamente al tratamiento, así como para peces, por lo que se debe regular su presencia en aguas de lagos, ríos o arroyos, y también es tóxica para lombrices de tierra al fijarse fuertemente al suelo⁴³⁻⁴⁴.

Tanto para abamectina como azadiractina, la UE ha fijado sus LMRs para los cultivos a los que están destinadas. Así, para la abamectina en naranjas, el LMR actualmente establecido es de 0.01 mg/Kg, sin embargo, para la azadiractina el LMR actual es de 0.5 mg/Kg, superior a los 0.01 mg/Kg del año 2002³. Los bajos niveles de residuos esperados realizando buenas prácticas agrícolas en los cultivos de naranjas como consecuencia de la rápida degradación de estos insecticidas naturales, junto a la complejidad asociada a la matriz objeto de estudio, hace que sea necesaria una técnica de elevada selectividad y sensibilidad para su determinación. En este sentido, la LC acoplada a MS/MS se posiciona como la técnica ideal ya que aporta la selectividad y sensibilidad necesarias para estos analitos, de puntos de ebullición y peso molecular elevados, con presencia de varios grupos hidroxilo en su estructura.

Previamente a nuestro trabajo, ya se habían desarrollado algunos métodos para determinar residuos de azadiractina en diversas matrices haciendo uso de la LC. Varios de ellos presentaban baja selectividad al estar basados en el uso de detectores UV⁴⁵⁻⁴⁶. Schaaf et al.⁴⁷ determinaron azadiractina en semillas de *Need*, usando un analizador de MS, mejorando así la selectividad y la sensibilidad y obteniendo límites de detección inferiores en hasta 1000 veces respecto a métodos anteriores basados en LC, pero con detectores convencionales. Aún así, la complejidad de la matriz obligó a aplicar sucesivas extracciones con etapas de evaporación y reconstitución.

Los primeros métodos para determinar abamectina basados en LC usaron detectores de fluorescencia y en ellos se precisaba de elevados tratamientos de muestra, con etapas de derivatización con el reactivo 1-metilimidazol^{48,49}. Los primeros métodos por MS fueron desarrollados con analizadores de simple cuadrupolo⁵⁰⁻⁵¹ o de trampa iónica⁵², pero para obtener límites de cuantificación aceptables se requerían excesivas etapas de purificación de los extractos para poder ser inyectados.

Por lo tanto, el objetivo de nuestro trabajo fue desarrollar un método altamente sensible y selectivo para determinar residuos de abamectina y azadiractina en

naranjas a niveles adecuados para los LMRs establecidos. Para ello, se ha usado la LC acoplada a MS/MS mediante ESI con inyección directa de los extractos. Se comparó la posibilidad de determinar los analitos por separado o en un solo método, optimizándose las condiciones de MS, el uso de metanol o acetonitrilo para la extracción y fase móvil, así como la ionización por adición de diversos reactivos (NH₄Ac, NaAc) tanto en la fase móvil como en los extractos.

Los resultados obtenidos se muestran en el **artículo científico 7**, que se presenta a continuación.

4.2 ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

4.2.1 Artículo científico 6

"An ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of ethephon residues in vegetables"

José M. Marín, Óscar J. Pozo, Joaquín Beltrán y Félix Hernández.

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20 (2006) 419-426

4.2.2 Artículo científico 7

"Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry"

O. J. Pozo, J.M. Marín, J.V. Sancho y Félix Hernández.

Journal of Chromatography A, 992 (2003) 133-140

4.2.1 Artículo científico 6

"An ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of ethephon residues in vegetables"

José M. Marín, Óscar J. Pozo, Joaquín Beltrán y Félix Hernández.

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20 (2006) 419-426

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY
Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006; 20: 419-426
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/rcm.2321



An ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of ethephon residues in vegetables

José M. Marín, Óscar J. Pozo, Joaquín Beltrán and Félix Hernández*

Research Institute for Pesticides and water, University Jaume I, P. O. Box 8029 AP, 12071 Castellón, Spain

Received 13 October 2005; Revised 28 November 2005; Accepted 28 November 2005

A rapid, sensitive and selective method has been developed for the direct determination of ethephon residues in vegetables (apple, cherry and tomato). Given the anionic character of ethephon, the use of ion-pairing liquid chromatography (LC) in combination with tandem mass spectrometry (MS/MS, triple quadrupole) allowed its direct determination in these matrices avoiding a derivatisation step and favouring the automation of the method. Samples were extracted with a mixture of dichloromethane/aqueous formic acid (pH 3) (1:1). Then, tetrabutylammonium acetate (TBA) was added as an ion-pairing reagent, and an aliquot of the aqueous extract was directly injected into the LC/MS/MS system. Quantification was performed with matrix-matched standards prepared from blank sample extracts. MS/MS measurements were made in the selected reaction monitoring (SRM) mode, using the most sensitive transition (m/z 107 > 79) for quantification, and up to four additional transitions for confirmation. Quantitative recoveries were obtained for all matrices (between 83% and 96%) at two concentration levels tested (0.05 and 0.5 mg/kg), with relative standard deviations lower than 9% in all cases. The addition of TBA directly into the sample extract contained in the injection vial was found sufficient to obtain satisfactory LC retention for the analyte. Under these conditions, the absence of ion-pairing reagent in the mobile phase minimised the ionisation suppression for ethephon in the MS source, leading to an increase in the sensitivity of the method and reaching limits of detection of 0.02 mg/kg for all matrices investigated. The acquisition of five specific MS/MS transitions for ethephon allowed the simultaneous and reliable quantification and confirmation of the analyte in the samples. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

Ethephon (2-chloroethyl)phosphonic acid) is a plant growth regulator normally used to promote pre-harvest ripening of several vegetable products, to facilitate the harvest of fruit, and to accelerate post-harvest ripening. It decomposes to ethylene, which is the active agent.¹

The presence of a phosphonic acid group in ethephon provides the molecule with high polarity, water solubility and low volatility. These properties make its direct determination difficult either by liquid chromatography (LC) or gas chromatography (GC)-based methods. Moreover, an additional problem for the determination of ethephon comes from its low stability, as it decomposes easily to ethylene at pH higher than 4 or with high temperature or UV radiation.

For these reasons, ethephon has been normally indirectly determined by measurement of the quantity of ethylene released after increasing either pH or temperature,²⁻⁶ obtaining limits of detection (LODs) typically between 0.02–0.1 mg/kg. However, indirect determination presents several drawbacks such as its low specificity, i.e. it

presupposes that all the ethylene produced by the crop is due to the ethephon, and the analytical methodology is normally laborious and time-consuming. Other methods are based on the use of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), after derivatisation,⁷ or capillary electrophoresis or micro-LC coupled to flame photometric detection (CE/FPD or μ LC/FPD).⁸ In GC/MS,⁷ the determination of ethephon involved a double extraction, a subsequent solid-phase extraction after evaporation and a derivatisation with diazomethane before determining the derivative by GC/MS, making it laborious, not easily automated, and not very suitable for routine analysis. In addition, the use of diazomethane is not recommended due to its carcinogenic properties.⁹ On the other hand, the method based on μ LC or CE,⁸ although highly sensitive, is not suitable for residual ethephon analysis in fruits and vegetables due to the complexity of the matrices involved.

Hyphenation of LC with mass spectrometry (LC/MS) has become a powerful tool in recent years for pesticide residue determination in food due to its inherent selectivity and sensitivity.¹⁰ LC/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), where the precursor ion undergoes selective fragmentation achieved by collision-induced dissociation, leads to improved selectivity and sensitivity making this technique

*Correspondence to: F. Hernández, Research Institute for Pesticides and water, University Jaume I, P.O. Box 8029 AP, 12071 Castellón, Spain.

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006; 20: 419–426

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/rcm.2321

An ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of ethephon residues in vegetables

José M. Marín, Óscar J. Pozo, Joaquín Beltrán, Félix Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, P. O. Box 8029 AP, 12071 Castellón, Spain

Received: 13 October 2005; Revised: 28 November 2005; Accepted: 28 November 2005

ABSTRACT

A rapid, sensitive and selective method has been developed for the direct determination of ethephon residues in vegetables (apple, cherry and tomato). Given the anionic character of ethephon, the use of ion-pairing liquid chromatography (LC) in combination with tandem mass spectrometry (MS/MS, triple quadrupole) allowed its direct determination in these matrices avoiding a derivatisation step and favouring the automation of the method. Samples were extracted with a mixture of dichloromethane/aqueous formic acid (pH 3) (1:1). Then, tetrabutylammonium acetate (TBA) was added as an ion-pairing reagent, and an aliquot of the aqueous extract was directly injected into the LC/MS/MS system. Quantification was performed with matrix-matched standards prepared from blank sample extracts. MS/MS measurements were made in the selected reaction monitoring (SRM) mode, using the most sensitive transition (m/z 107>79) for quantification, and up to four additional transitions for confirmation. Quantitative recoveries were obtained for all matrices (between 83% and 96%) at two concentration levels tested (0.05 and 0.5 mg/kg), with relative standard deviations lower than 9% in all cases. The addition of TBA directly into the sample extract contained in the injection vial was found sufficient to obtain satisfactory LC retention for the analyte. Under these conditions, the absence of ion-pairing reagent in the mobile phase minimised the ionisation suppression for ethephon in the MS source, leading to an increase in the sensitivity of the method and reaching limits of detection of 0.02 mg/kg for all matrices investigated. The acquisition of five specific MS/MS transitions for ethephon allowed the simultaneous and reliable quantification and confirmation of the analyte in the samples. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

*Correspondence to: Félix Hernández, Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, P.O. Box 8029 AP, 12071 Castellón, Spain. E-mail address: hernandf@exp.uji.es

1. INTRODUCTION

Ethephon ((2-chloroethyl) phosphonic acid) is a plant growth regulator normally used to promote pre-harvest ripening of several vegetable products, to facilitate the harvest of fruit, and to accelerate post-harvest ripening. It decomposes to ethylene, which is the active agent [1].

The presence of a phosphonic acid group in ethephon provides the molecule with high polarity, water solubility and low volatility. These properties make its direct determination difficult either by liquid chromatography (LC) or gas chromatography (GC)-based methods. Moreover, an additional problem for the determination of ethephon comes from its low stability, as it decomposes easily to ethylene at pH higher than 4 or with high temperature or UV radiation.

For these reasons, ethephon has been normally indirectly determined by measurement of the quantity of ethylene released after increasing either pH or temperature [2-6], obtaining limits of detection (LODs) typically between 0.02-0.1 mg/kg. However, indirect determination presents several drawbacks such as its low specificity, i.e. it presupposes that all the ethylene produced by the crop is due to the ethephon, and the analytical methodology is normally laborious and time-consuming. Other methods are based on the use of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), after derivatization [7], or capillary electrophoresis or micro-LC coupled to flame photometric detection (CE/FPD or μ LC/FPD) [8]. In GC/MS [7], the determination of ethephon involved a double extraction, a subsequent solid-phase extraction after evaporation and a derivatisation with diazomethane before determining the derivative by GC/MS, making it laborious, not easily automated, and not very suitable for routine analysis. In addition, the use of diazomethane is not recommended due to its carcinogenic properties [9]. On the other hand, the method based on μ LC or CE [8], although highly sensitive, is not suitable for residual ethephon analysis in fruits and vegetables due to the complexity of the matrices involved.

Hyphenation of LC with mass spectrometry (LC/MS) has become a powerful tool in recent years for pesticide residue determination in food due to its inherent selectivity and sensitivity [10]. LC/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), where the precursor ion undergoes selective fragmentation achieved by collision-induced dissociation, leads to improved selectivity and sensitivity making this technique very suitable for residue determination at low concentration levels. LC/MS/MS methods have been successfully applied for the determination of pesticides in vegetables samples [11-14], and the technique has strong potential in multiresidue analysis [15-17]. Most of methods usually involve a previous clean-up step, such as size-exclusion chromatography [11], or a solvent switch [12]. However, the high specificity of the LC/MS/MS

technique favours the reduction of sample pretreatment giving satisfactory results without such clean-up [18-20]. In addition, given its excellent sensitivity, the preconcentration of sample extracts is not normally required and, on the contrary, dilution of the extracts is normally feasible before injection into the LC/MS/MS system, minimising the matrix effects but still with satisfactory limits of quantification [20].

Ion-pairing chromatography has been successfully used for the direct LC/MS determination of ionic compounds such as polar aromatic sulfonates [21, 22], polysulfonates [23, 24] and sulphates [22], as well as phosphates [20-25]. In most cases, the ion-pairing reagent is based on alkylammonium cations, e.g. tetrabutylammonium, given the anionic character of the analyte. However, these ion-pairing reagents are not very suitable for MS detection because of their relatively low volatility and the high matrix effect generated when they are introduced continuously by the mobile phase into the atmospheric pressure ionisation (API) source. This situation can be minimised by adding the ion-pairing reagent only in the sample extract, avoiding its presence in the mobile phase [20].

The purpose of this study was to develop a new rapid, sensitive and selective method for the direct determination of ethephon residues in vegetable and fruit samples based on ion-pairing LC coupled to an MS/MS system, using electrospray ionisation (ESI) and a triple quadrupole mass spectrometer. To our knowledge, this is the first method for the direct determination of residue levels of ethephon in vegetables.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents and chemicals

The ethephon reference standard (99%) was purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Tetrabutylammonium acetate (TBA, 97%) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Reagent-grade formic acid (98-100%), dichloromethane for residue analysis, LC-grade acetonitrile, LC-grade methanol and acetone for residue analysis were supplied by ScharLab (Barcelona, Spain). LC-grade water was obtained by purifying demineralised water in a Nanopure II system (Barnstead Newton, MA, USA).

A stock solution of ethephon standard was prepared in acetone at 500 µg/mL dissolving around 50 mg powder, accurately weighed, in 100 mL, and stored in the dark at -20°C. Working standard solutions were prepared by dilution in acetonitrile for concentrations higher than 5 µg/mL, and using aqueous formic acid (pH 3) or acetone for lower concentrations.

TBA was prepared by dissolving 7.77 g of reagent in 50 mL of LC-grade water obtaining a final concentration of 500 mM. Aqueous formic acid (pH 3) was obtained by diluting 5 mL of 10% HCOOH with 500 mL LC-grade water.

2.2 Instrumentation

A Waters Alliance 2795 LC system (Waters, Milford, MA, USA) was interfaced to a Quattro micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters) using an orthogonal Z-spray-electrospray interface. The LC separation was performed using a Discovery C₁₈ column (5 µm, 50 × 2 mm i.d.; Supelco, Bellefonte, PA, USA) at a flow rate of 200 µL/min. The mobile phase used was a water/methanol gradient where the percentage of methanol was changed linearly as follows: 0 min, 5%; 1 min, 5%; 2 min, 10%; 7 min, 35%; 9 min, 35%, 10 min, 5%; 12 min, 5%.

Nitrogen generated from pressurised air in a high-purity nitrogen generator (NM30LA 230Vac gas station; Peak Scientific, Inchinnan, UK) was used as drying and nebulising gas. The desolvation gas and cone gas flows were adjusted to 600 and 60 L/h, respectively. Infusion experiments were performed using the built-in syringe pump, directly connected to the interface.

For operation in MS/MS mode, the collision gas was argon (99.995%; Carburros Metalicos, Valencia, Spain) at a pressure of 2×10^{-3} mbar in the collision cell. Capillary voltages of -3 kV were used in negative ion mode. The interface temperature was set to 350°C and the source temperature to 120°C. Dwell times of 0.3 s/scan were chosen. A solvent delay of 4 min was selected to give an additional clean-up using the built-in divert valve controlled by the Masslynx NT v.4.0 software. The application manager QuanLynx was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from samples.

2.3 Recommended procedure

A homogenised sample (10 g) was accurately weighed (precision 0.1 mg) and extracted with 80 mL of dichloromethane/aqueous formic acid (pH 3) (1:1), using a Ultra-Turrax T25 high-speed blender (Janke & Kunkel Ika-Labortechnik, Staufen, Germany), for 2 min at 8000 rpm. It was then washed with 10 mL of aqueous formic acid (pH 3). Sample extracts were centrifuged at 3500 rpm for 15 min with a laboratory centrifuge (Alvarez Redondo S.A., Madrid, Spain) in order to correctly separate organic and aqueous phases. Then, 1.5 mL of the supernatant aqueous phase was taken with a pipette and added to a vial, which contained 75 µL of a 500 mM TBA solution. Finally, 20 µL were injected into the LC/ESI-MS/MS system.

Calibration was performed by using matrix-matched standards prepared from a blank sample extract as follows: 1 mL of adequate standard solution prepared in aqueous formic acid (pH 3) was added to 9 mL of aqueous supernatant obtained from the blank sample extraction. Then, 1.5 mL of the homogenised solution was added to the vial containing 75 μ L of a 500 mM TBA solution.

Fortification of apple, cherry and tomato blank samples for recovery experiments was performed by delivering 1 mL of 0.5 or 5 μ g/mL standard solutions prepared in aqueous formic acid (pH 3) to 10 g homogenised blank sample in order to yield fortification levels of 0.05 or 0.5 mg/kg, respectively. These fortified samples were aged for 1 h prior to extraction.

2.4 Validation study

In order to fully validate the method developed, a validation scheme based on European Guidelines given by the Directorate General for Health and Consumer Affairs (DG-SANCO) was applied [26]. Precision and accuracy were determined by recovery experiments in the three vegetable matrices, at two levels, 0.05 and 0.5 mg/kg, each one analysed in quintuplicate.

The limit of quantification (LOQ) objective was set as the lowest concentration that was determined (validated) with good precision (established acceptance criteria RSD < 15%) and satisfactory recoveries (between 70-110%).

The specificity of the method was evaluated by analysing a blank procedure, a processed blank sample, and a processed blank sample spiked at the LOQ level. The acceptance criterion was that the procedure and the sample blanks did not present any chromatographic peak at the ethephon transitions selected.

The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration for which a signal-to-noise ratio of 3 is obtained, was estimated from chromatograms of fortified samples at the lowest concentration assayed.

Confirmation of the identity of ethephon was carried out by quantifying the analyte using the quantification (m/z 107 > 79) and confirmation transitions (m/z 143 > 107, 143 > 79, 145 > 107, 145 > 79) and calculating the ratio between all calculated concentrations. Detection should be

considered as positive when at least three of these ratios fall in the range 0.8-1.2 (i.e. ratio deviation of $\pm 20\%$ accepted).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 MS optimisation

The negative electrospray full-scan and MS/MS spectra of ethephon are shown in Fig. 1. All spectra were obtained by infusion of a 2.5 $\mu\text{g/mL}$ standard solution in acetonitrile/water (50:50, v/v) at a flow rate of 10 $\mu\text{L/min}$. The full-scan spectrum shows two abundant ions, at m/z 143 and 145, optimised at a cone voltage of 15 V, that corresponded to the $[\text{M-H}]^-$ ions of ethephon with ^{35}Cl and ^{37}Cl , respectively (Fig. 1(a)). This isotopic pattern is useful in increasing the number of acquired transitions, which is necessary to improve the confirmatory characteristics of the method. With m/z 143 as the precursor ion (Fig. 1(c), bottom), two product ions were obtained. The most abundant, at m/z 107, was optimised at a collision energy of 10 eV and can be explained by the loss of HCl. The other product ion at m/z 79 was optimised at a collision energy of 15 eV and can be explained by the loss of C_2H_4 from m/z 107, as shown in Fig. 2. Both product ions were also obtained from the m/z 145 precursor ion (Fig. 1(c), top), confirming the absence of the chlorine atom in both of them and supporting the fragmentation pathway proposed in Fig. 2.

The low cone voltage needed to optimise the precursor ion (15 V) together with the low collision energy necessary to obtain the most abundant product ion (10 eV) led us to consider the possibility of promoting an in-source fragmentation, and selecting the in-source fragment ion as the precursor ion. By increasing the cone voltage to 25 V the ion at m/z 107 was the most abundant (Fig. 1(b)) ion in the full-scan ESI spectrum. The fragmentation of this in-source ion produced the expected product ion at m/z 79 (also optimised at a collision energy of 10 eV), as can be seen in Fig. 1(d). This transition (m/z 107 > 79) was found to be the most sensitive, possibly because under these conditions all the ethephon was converted into this unique ion, whereas, when using the precursor ion, m/z 143, 33% of the ethephon signal is measured at m/z 145, due to the isotopic pattern of chlorine.

Therefore, in the selected reaction monitoring (SRM) mode, the transition chosen for quantification was m/z 107 > 79, and the transitions m/z 143 > 107, 143 > 79, 145 > 107 and 145 > 79 were selected for confirmation purposes.

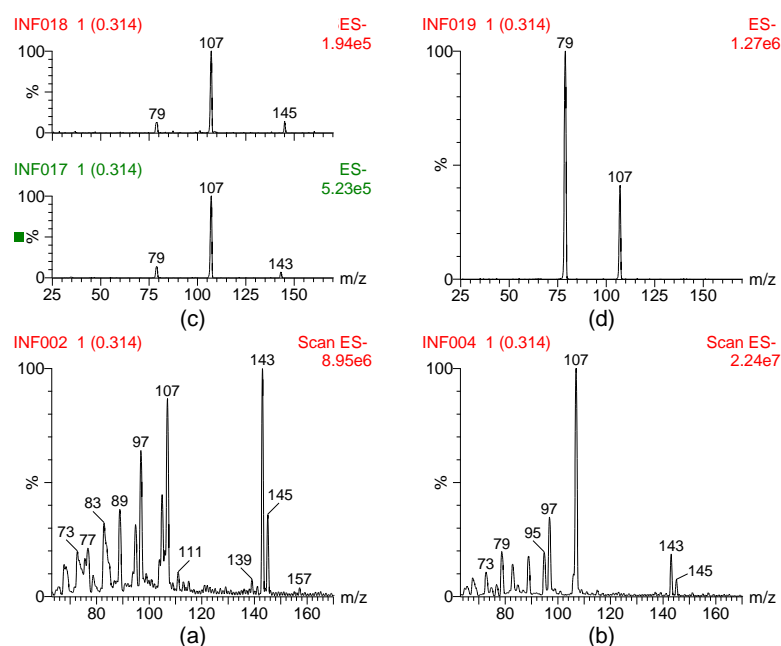


Figure 1. Negative ESI full-scan spectrum of ethephon at cone voltages of (a) 15 V and (b) 25 V. Product ion spectra for (c) m/z 143 (bottom) and 145 (top) at 10 eV and (d) m/z 107 at 10 eV.

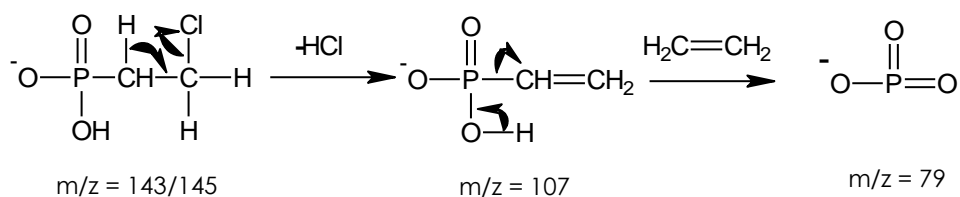


Figure 2. Fragmentation pathway proposed for the [M-H]⁻ ion of ethephon.

3.2 Method optimisation

A direct method based on ion-pairing LC was developed with special attention being paid to achieving adequate method throughput, and to simplifying sample treatment. The main limitation of this type of chromatography when coupled with MS comes from the use of ion-pairing reagents, which normally have low volatility thus inducing analyte ionisation suppression.

This leads to a decrease in the method sensitivity; the analytes might even be undetected if the concentration of the ion-pairing reagent is too high.

In our experience, TBA can be satisfactorily used as an ion-pairing reagent for anionic analytes in LC/MS-based procedures. Concentrations of 1 mM in the mobile phase have been reported for the LC/MS determination of several alkylphosphates in urine samples [25]; moreover, the addition of TBA to the sample vial was an efficient approach for the correct determination of anionic pesticide metabolites in urine [27] and of fosetyl aluminium in lettuce samples, where an important loss of sensitivity was observed when TBA was continuously introduced in the interface [20]. The same effect was obtained in the present work, as the use of TBA in the mobile phase hampered the determination of ethephon at the required concentration level. Thus, although the ion-pairing reagent was necessary for good chromatography, its continuous introduction into the interface of the mass spectrometer reduced drastically the sensitivity of the method.

In order to minimise the ion suppression produced by the TBA without losing chromatographic retention, a methodology based on the pre-formation of the ion pair was developed. In this approach, a high concentration of TBA was introduced into the sample vial avoiding its use in the mobile phase. Thus, the ion pair was pre-formed before the chromatography started, and the presence of this high amount of TBA at the beginning of the gradient was sufficient to assure satisfactory chromatographic retention. In addition, TBA was introduced as a pulse into the chromatographic column and most of the ion-pairing reagent eluted as unretained compound. Using an additional valve post-column to avoid the introduction of the first fraction of the chromatogram into the ESI interface, the ion suppression due to the presence of TBA was minimised leading to adequate sensitivity. The optimised method used 25 mM TBA in the sample vial and a methanol/water gradient without the addition of any modifier. Under these conditions, both chromatographic behaviour and sensitivity were satisfactory for the determination of ethephon at the residue level.

Once the LC/MS/MS determination had been optimised, the extraction of ethephon from vegetable samples was studied. Its high solubility in water suggested the use of an aqueous extraction, but the appearance of emulsions when extracting the selected vegetables made the separation of the extract from the solid matrix difficult, even after filtration and/or centrifugation. In order to obtain cleaner extracts, a mixture of dichloromethane/water was investigated, thus favouring the separation of the aqueous phase containing the analyte. After centrifugation, an aliquot of the clean aqueous supernatant was directly injected into the LC/MS system. Using this approach, where the total volume of the aqueous extract is not measured, the final

concentration of ethephon has to be corrected to take account of the amount of water introduced by the sample. This correction was performed from the information available on the percentage of water for each sample type [28].

It was necessary to keep the pH of the sample extract lower than 4, as ethephon decomposes easily at higher pH values. For this reason, water acidified at pH 3 with formic acid was used, with a 1:1 dichloromethane/acidified water mixture for extracting the samples.

For quantification, the use of calibration curves prepared in pure solvent (water acidified at pH 3 with formic acid) led to poor recoveries (lower than 70%) due to the ion suppression produced by matrix interferences. Thus, because isotopically labelled ethephon was not commercially available, the matrix-matched calibration approach was chosen for the correct quantification of the analyte, using blank vegetable extracts for the preparation of the calibration curves.

3.3 Method validation

The optimised method described was validated following the SANCO guidelines [26]. Linearity was studied by injecting standards in matrix in triplicate at seven different concentrations, in the range 5-500 ng/mL. The linearity of the method was satisfactory, with correlation coefficients higher than 0.995 for all matrices and residuals lower than 30%. Precision (repeatability) and accuracy (expressed as recovery) for all tested matrices are reported in Table 1. The method was found to be precise (RSD < 10%) and accurate at the two levels assayed in all selected matrices with satisfactory recoveries (83-96%). Thus, the LOQ objective was established as 0.05 mg/Kg, with an LOD of 0.02 mg/Kg for all the vegetable matrices studied.

Table 1. Recoveries and relative standard deviations (RSDs, in brackets) of the method at two concentration levels of ethephon in different vegetable samples (n = 5) as well as limits of detection (LOD)

Matrix	Level of fortification		
	0.05 mg/Kg	0.05 mg/Kg	LOD (mg/Kg)
Apple	94 (8)	96 (8)	0.02
Cherry	92 (2)	85 (6)	0.02
Tomato	83 (9)	86 (6)	0.02

Figure 3 shows the chromatograms corresponding to a calibration standard (prepared in blank matrices), a blank sample and a spiked sample at the LOQ level (0.05 mg/Kg) for the three types of samples investigated. It can be seen that the method developed is highly specific as no signal was detected in any of the blank samples. Additionally, the excellent sensitivity of the method allows the quantification of ethephon at the 0.05 mg/Kg level.

As can be seen in Fig. 3, slight changes in retention times were observed depending on the matrix analysed. Thus, the retention time for ethephon in apple matrix was 11% higher than that measured in tomato. This effect might be associated with the addition of TBA to the vial and its absence in the mobile phase, and with the presence of different matrix components which could react with the TBA. This variation in the retention time does not, however, compromise the results obtained by the method as it was corrected for by the use of matrix-matched calibration. The acquisition of five different MS/MS transitions allowed the unequivocal determination of ethephon in vegetable samples despite this variation.

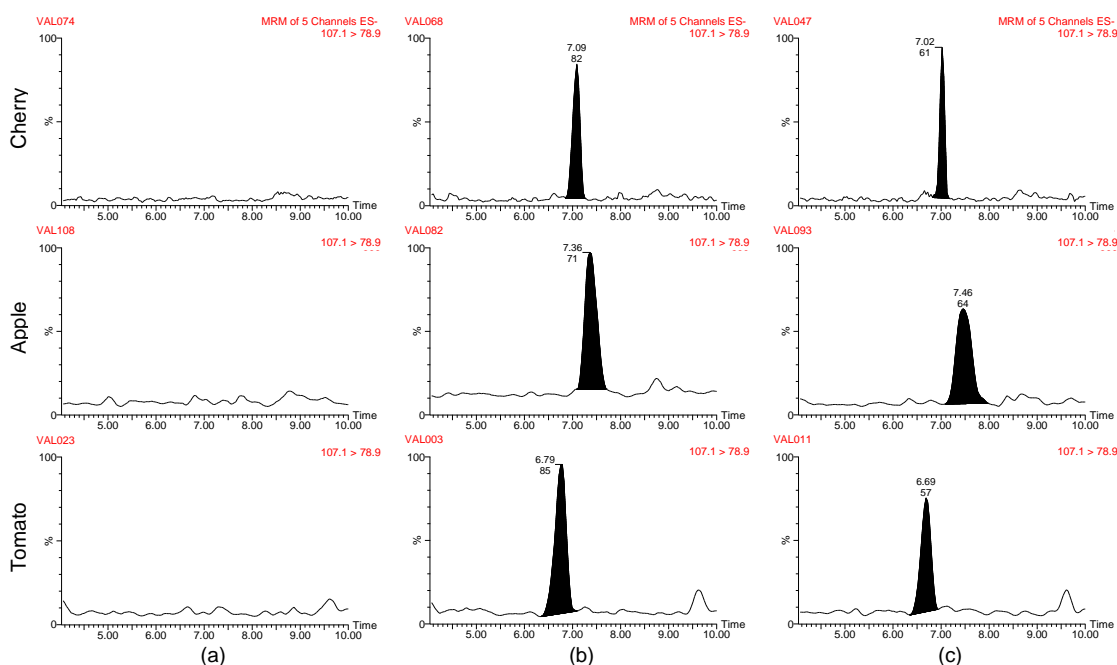


Figure 3. m/z 107>79 SRM chromatograms obtained for all selected matrices (a) blank sample, (b) matrix-matched standard corresponding to the LOQ level, and (c) blank sample spiked at 0.05 mg/Kg.

3.4. Confirmation

The confirmation capability of the method was checked as part of the validation study. All selected transitions were acquired, included that used for quantification (Q) and another four transitions used for confirmation (q). The concentration obtained from every confirmation transition was compared with that calculated from the quantification one. All the concentration ratios obtained in this way varied between 0.9 and 1.1 for the three sample matrices studied (i.e. deviations <10%), showing the applicability of the method for the confirmation of ethephon.

As an example, the confirmation of ethephon at the 0.5 mg/kg level was performed in cherries by the comparison of five transitions (Fig. 4(a)) reaching 10.5 identifications points (IPs), calculated following a recent European decision for low-resolution mass spectrometers [29]. This number of IPs by far surpasses the minimum of three IPs required for a safe confirmation, increasing the confidence of positive findings and making very improbable the reporting of false-positives. This approach, proposed for confirmation of additives and contaminants in food, is also being increasingly applied to the environmental field [30]. In samples with ethephon concentrations close to the LOQ level, the two less sensitive transitions were not detected (Fig. 4(b)), but the number of IPs reached by acquiring the three remaining transitions was 6.5, still higher than the three required. In this way, the simultaneous acquisition of three to five transitions for ethephon allows the unequivocal confirmation of this analyte in all sample matrices studied, obtaining a sufficient number of IPs even at concentrations as low as 0.05 mg/Kg. Therefore, the method developed allows the reliable quantification and confirmation of ethephon residues in one unique injection.

In addition, the acquisition of several transitions leads to a confident confirmation, even in the unusual case of finding matrix components which share one, or even two transitions, with the analyte. The presence of these interferences may affect the confirmation, giving apparent ion ratios different from expected. If only two transitions were acquired, the unacceptable ion ratio would induce the analyst to consider the sample as negative, i.e. reporting a false-negative. However, when acquiring the maximum number of available transitions, the number of acceptable ion ratios would also be maximised, decreasing the possibility of reporting false-negatives. The monitoring of different transitions available for the confirmation greatly minimises this problem.

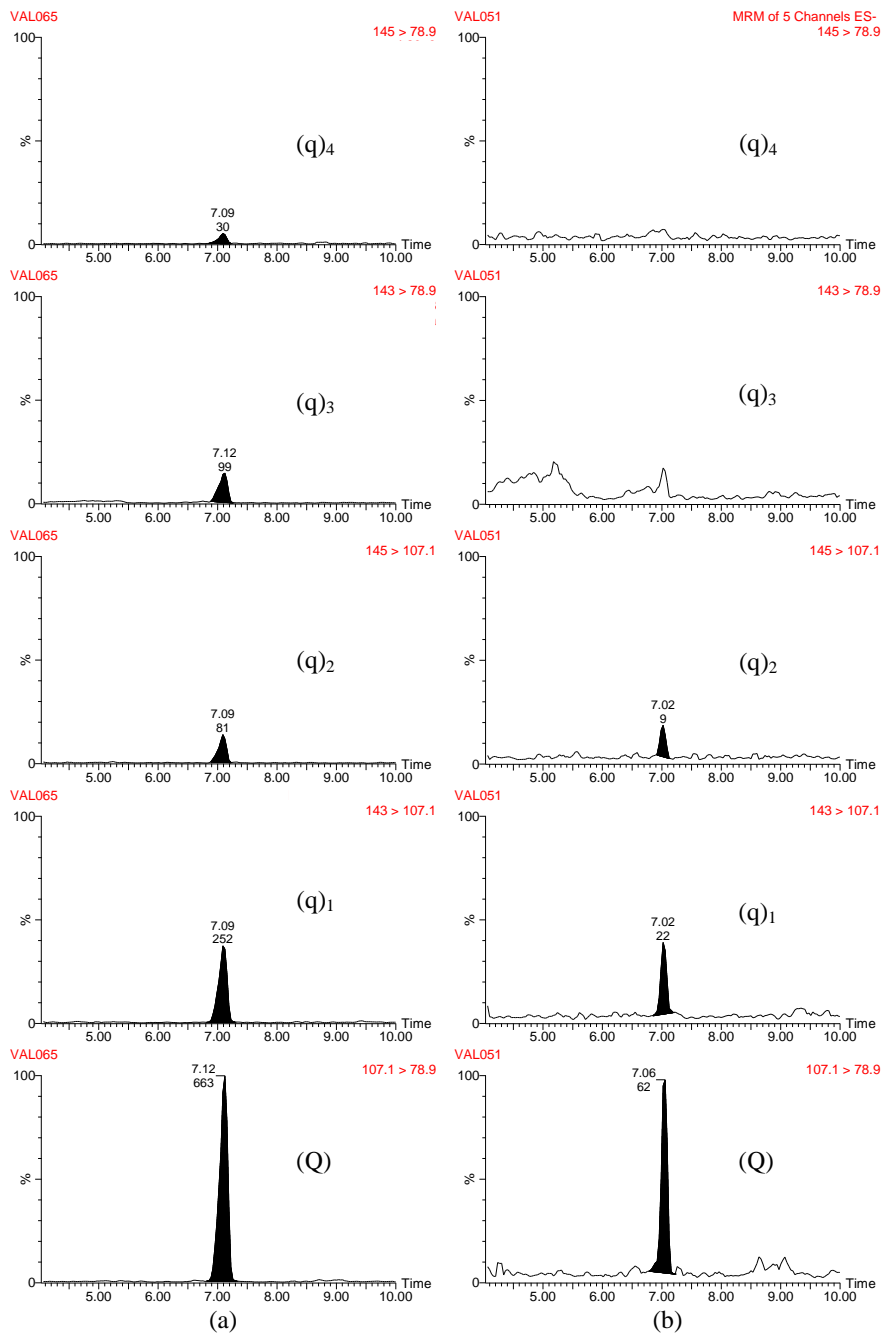


Figure 4. SRM chromatograms of blank cherry samples spiked at (a) 0.5 mg/Kg and (b) 0.05 mg/Kg. (Q) Quantification transition, (q) confirmation transitions.

CONCLUSIONS

This paper reports the first direct method for the determination of ethephon residues in vegetable samples at the residue levels without any derivatisation step. An ion-pairing liquid chromatographic method based on the addition of TBA has been developed for the determination of ethephon in fruit and vegetables at the low $\mu\text{g}/\text{kg}$ level. This approach, based on the use of LC/MS/MS with ESI, allows the direct determination of the analyte, avoiding the use of either an unspecific indirect method to measure ethylene or any derivatisation step. The ion suppression that would be produced by the continuous introduction of the ion-pairing reagent into the interface was minimised by adding TBA only into the sample vial. The methodology described here leads to the rapid, sensitive and selective determination of ethephon residues with reduced sample pretreatment, facilitating its application to control programs where high numbers of samples have to be analysed. Moreover, the simultaneous acquisition of several specific transitions for the analyte (up to five available) allows the simultaneous quantification and unequivocal confirmation of positive samples in one injection.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors really acknowledge J. Armengol for his participation in the sample treatment. The Quattro Micro LC/MS/MS system was funded by the European Union (Fondos Feder-Reino de España, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Ref. UNJM-E004).

REFERENCES

- [1] Roberts TR. *Metabolic Pathways of Agrochemicals, part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1998.
- [2] Chu XG, Yong W, Cai HX, Pang JW. *Se Pu Chin. J. Chromatogr.* 2001; **19**: 286.
- [3] Tseng SH, Chang PC, Chou SS. *J. Food Drug Anal.* 2000; **8**: 213.
- [4] Koppen B. *J. AOAC Int.* 1997; **80**: 289.
- [5] Hemmerling C, Seidl G. *Dtsch-Lebensm-Rundsch.* 1997; **93**: 239.
- [6] Efer J, Mueller S, Engewald W, Knoblock T, Levsen K. *Chomatographia* 1993; **37**: 361.
- [7] Takenaka S. *J. Agric. Food Chem.* 2002; **50**: 7515.
- [8] Hooijschuur EWJ, Kientz CE, Dijksman J, Brinkman UAT. *Chomatographia* 2001; **54**: 295.

- [9] Reid SJ, Watts RR. *J. Anal Toxicol.* 1981; **5**: 126.
- [10] Pico Y, Blasco C, Font G. *Mass Spectrom. Rev.* 2004; **23**: 45.
- [11] Bester K, Bordin G, Rodríguez A, Schimmel H, Pauwels J, Van Vyncht G. *Fresenius J. Anal Chem.* 2001; **371**: 550.
- [12] Mol HGJ, Van Dam RCJ, Steijger OM. *J. Chromatogr. A* 2003; **1015**: 119.
- [13] Zrostlikova J, Hajslova J, Kovalczuk T, Stepan R, Poustka J. *J. AOAC Int.* 2003; **86**: 612.
- [14] Zrostlikova J, Hajslova J, Poustka J, Begany P. *J. Chromatogr. A* 2002; **973**: 13.
- [15] Sannino A, Bolzoni L, Bandini M. *J. Chromatogr. A* 2004; **1036**: 161.
- [16] Taylor J, Hunter K, Hunter KB, Lindsay D, Bouhellec SL. *J. Chromatogr. A* 2002; **982**: 225.
- [17] Hernández F, Pozo OJ, Sancho JV, Bijlsma L, Barreda M, Pitarch E. *J. Chromatogr. A* 2005; submitted.
- [18] Pozo OJ, Marín JM, Sancho JV, Hernández F. *J. Chromatogr. A* 2003; **992**: 133.
- [19] Sancho JV, Pozo OJ, Zamora T, Grimalt S, Hernandez F. *J. Agric. Food Chem.* 2003; **51**: 4202.
- [20] Hernández F, Sancho JV, Pozo OJ, Villaplana C, Ibáñez M, Grimalt S. *J. AOAC Int.* 2003; **86**: 832.
- [21] Socher G, Nussbaum R, Rissler K, Lankmayr E. *Chromatographia* 2001; **54**: 65.
- [22] Reemtsa T. *J. Chromatogr. A* 2003; **1000**: 477.
- [23] Ansorgova D, Holcapek M, Jandera P. *J. Sep. Sci.* 2003; **26**: 1017.
- [24] Holcapek M, Volna K, Jandera P, Kolarova L, Lemr K, Exner M, Cirkva A. *J. Mass Spectrom.* 2004; **39**: 43.
- [25] Hernández F, Sancho JV, Pozo OJ. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002; **16**: 1766.
- [26] SANCO/3029/99 rev.4 (Residues: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-registration data requirements for Annex II and Annex III of Directive 91/414).
- [27] Hernández F, Sancho JV, Pozo OJ. *J. Chromatogr. B* 2004; **808**: 229.
- [28] Pennington JA. *Bowes & Church's Food Values*. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 1994.
- [29] European Commission Decision 2002/657/CE, August 2002.

4.2.2 Artículo científico 7

“Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry”

O. J. Pozo, J.M. Marín, J.V. Sancho y Félix Hernández.

Journal of Chromatography A, 992 (2003) 133-140



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Chromatography A, 992 (2003) 133-140

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry

O.J. Pozo, J.M. Marín, J.V. Sancho, F. Hernández*

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Department, University Jaume I, P.O. Box 8029AP, E-12071, Castellón, Spain

Received 25 January 2002; received in revised form 23 December 2002; accepted 5 February 2003

Abstract

A rapid and sensitive LC–ESI–MS–MS method has been developed for the determination of azadirachtin and abamectin residues in orange samples. Samples were extracted with acetonitrile, in a high-speed blender. After the addition of sodium acetate, an aliquot of extract was directly injected into the LC–ESI–MS–MS system. The highest sensitivity of the method was achieved under MS–MS conditions using $[M+Na]^+$ adducts as precursor ions. Recoveries for both compounds from spiked orange samples at 0.01 and 0.1 mg/kg were above 80%, with good repeatability (<10%). Method detection limits achieved (<0.007 mg/kg) were adequate for the determination of these pesticides in this kind of sample from the regulatory point of view. The importance of the solvent used for extraction, as well as the addition of sodium acetate to the extracts and the selection of adequate chromatographic conditions are discussed.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Food analysis; Fruits; Abamectin; Azadirachtin; Pesticides

1. Introduction

Nowadays, some natural products with antiparasitic effect, and their synthetic analogues, are widely used as pesticides, due to their low toxicity to non-target organisms and their low persistence in the environment.

Azadirachtin (Fig. 1a) is a tetranortriterpenoid pesticide, isolated from the Neem tree, which acts as a strong anti-feedant and causes growth disruption in many insect species [1]. Abamectin (Fig. 1b) belongs

to the family of avermectins, a class of macrocyclic lactones produced by a soil actinomycete, *Streptomyces avermitilis*. Abamectin is a mixture of two homologues containing >80% of avermectin B_{1a} and <20% of avermectin B_{1b}. Azadirachtin, and mainly abamectin, are used in the Valencian area (Mediterranean coast, Spain) for leafminer (*Phyllocnistis citrella*) control in citrus crops, that has been one of the most serious pests in recent years.

From the regulatory point of view, the maximum concentrations allowed in food and vegetables are given by Maximum Residue Levels (MRL). The MRL for abamectin in citric crops is 0.01–0.02 mg/kg and for azadirachtin is 0.01 mg/kg, in most European countries. In some cases, the absence of

*Corresponding author. Tel.: +34-964-728100; fax: +34-964-728066.

E-mail address: hermandf@exp.uji.es (F. Hernández).

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

J. Chromatogr. A 992 (2003) 133-140

Copyright © 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved (doi: 10.1016/S0021-9673(03)00325-X)

Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry

O. J. Pozo, J. M. Marín, J. V. Sancho and F. Hernández*

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Department, University Jaume I, P.O. Box 8029AP, E-12071, Castellón, Spain.

Received 25 January 2002; revised 23 December 2002; accepted 5 February 2003.; Available online 6 May 2003.

ABSTRACT

A rapid and sensitive LC–ESI–MS–MS method has been developed for the determination of azadirachtin and abamectin residues in orange samples. Samples were extracted with acetonitrile, in a high-speed blender. After the addition of sodium acetate, an aliquot of extract was directly injected into the LC–ESI–MS–MS system. The highest sensitivity of the method was achieved under MS–MS conditions using $[M+Na]^+$ adducts as precursor ions. Recoveries for both compounds from spiked orange samples at 0.01 and 0.1 mg/kg were above 80%, with good repeatability (<10%). Method detection limits achieved (<0.007 mg/kg) were adequate for the determination of these pesticides in this kind of sample from the regulatory point of view. The importance of the solvent used for extraction, as well as the addition of sodium acetate to the extracts and the selection of adequate chromatographic conditions are discussed.

Author Keywords: Abamectin; Azadirachtin; Pesticides

*Correspondence to Félix Hernández, Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, P.O. Box 8029 AP, 12071 Castellón, Spain. E-mail address: hernandf@exp.uji.es

1. INTRODUCTION

Nowadays, some natural products with antiparasitic effect, and their synthetic analogues, are widely used as pesticides, due to their low toxicity to non-target organisms and their low persistence in the environment.

Azadirachtin (Fig. 1a) is a tetranortriterpenoid pesticide, isolated from the Neem tree, which acts as a strong anti-feedant and causes growth disruption in many insect species [1]. Abamectin (Fig. 1b) belongs to the family of avermectins, a class of macrocyclic lactones produced by a soil actinomycete, *Streptomyces avermitilis*. Abamectin is a mixture of two homologues containing >80% of avermectin B_{1a} and <20% of avermectin B_{1b}. Azadirachtin, and mainly abamectin, are used in the Valencian area (Mediterranean coast, Spain) for leafminer (*Phyllocnistis citrella*) control in citrus crops, that has been one of the most serious pests in recent years.

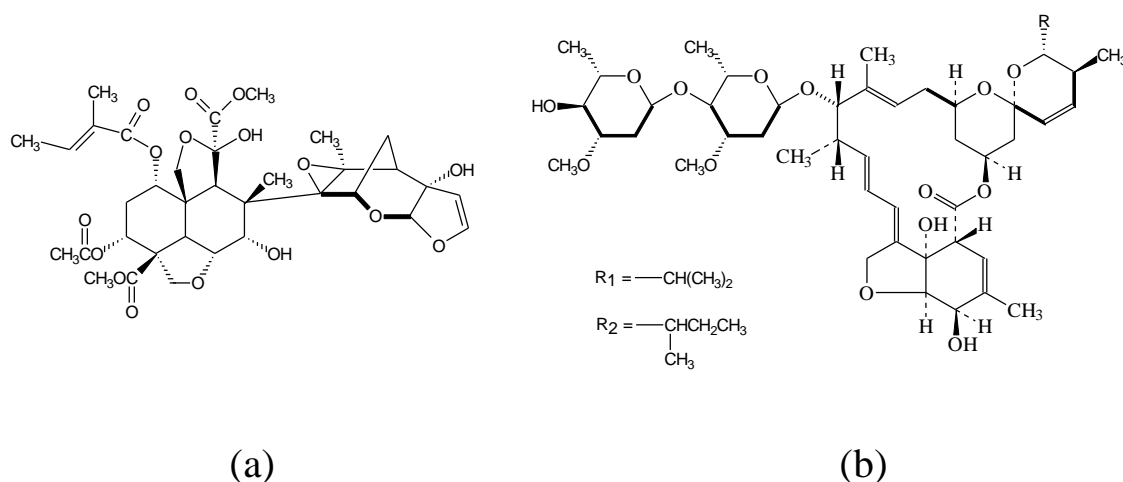


Figure 1. Chemical structures of azadirachtin (a) and abamectin (b). R=R₁ (abamectin B_{1b}); R=R₂ (abamectin B_{1a})

From the regulatory point of view, the maximum concentrations allowed in food and vegetables are given by Maximum Residue Levels (MRL). The MRL for abamectin in citric crops is 0.01–0.02 mg/kg and for azadirachtin is 0.01 mg/kg, in most European countries. In some cases, the absence of data from field residue trials leads to MRLs based on the limit of quantification of the best analytical method. Given the complex nature of the sample matrix along with the low

residues expected as a consequence of the rapid degradation of these "natural" insecticides, sensitivity and selectivity are key issues in the development of methods that would produce adequate field residue trials data. Thus, liquid chromatography (LC) seems to be the technique of choice in combination with mass spectrometry (MS), due to their physico-chemical characteristics, high boiling point, presence of hydroxyl groups and high molecular mass.

Azadirachtin residues have been determined at the mg/kg level in environmental matrices making use of LC–UV [2], and one LC–MS method has been published for the determination of azadirachtin in neem seed extracts [3], where azadirachtin is found at concentration levels in the range of 800–1000 µg/ml.

Most of the methods reported for abamectin residues require extensive sample treatment, and are based on fluorescence detection after derivatization with 1-methylimidazole. In recent years, some methods based on LC–MS have been proposed although the complexity of the matrix along with the use of single-quadrupole MS detectors make an extensive clean-up of the extracts necessary in order to obtain accurate quantitation [4-8]. Howells et al. [9] have recently applied this technique for the residue determination of abamectin in liver samples using ion trap technology, but even applying this selective technique, a previous clean-up step was required in order to achieve an acceptable quantitation, due to the complexity of the matrix.

LC in combination with the use of tandem mass spectrometry (MS–MS) is becoming one of the most powerful techniques for the residue analysis of pesticides and metabolites in different environmental matrices [10-12]. Recently, several applications have described the use of LC–MS–MS with triple quadrupole analyzer in the target analysis of pesticide residues by direct injection of a vegetable extract [13-16], making this no sample-handling approach very attractive.

In this study, we investigate the possibility of carrying out direct injection of orange extracts using LC–MS–MS with electrospray interface (ESI) without any type of sample pre-treatment except for extraction, and using triple quadrupole technology. The aim was the rapid residue analysis of two "difficult" analytes, the natural pesticides azadirachtin and abamectin, in orange samples at the low mg/kg level required by regulatory agencies.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Reagents and chemicals

Azadirachtin and abamectin analytical reference standards were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA) and Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), respectively. HPLC-grade acetonitrile and methanol were purchased from ScharLab (Barcelona, Spain). LC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA, USA). Analytical-grade sodium acetate and ammonium acetate were supplied by Panreac (Barcelona, Spain).

Standard stock solutions were prepared by dissolving abamectin and azadirachtin in acetonitrile to a final concentration of 500 µg/mL. For the LC-MS analysis or for fortification of samples, the stock solutions were mixed and diluted with acetonitrile.

2.2 Instrumentation

A Waters Alliance 2690 (Waters, Milford, MA, USA) HPLC system was coupled to a triple quadrupole Quattro LC mass spectrometer using an orthogonal Z-spray-electrospray interface (Micromass, Manchester, UK).

Drying gas as well as nebulising gas was nitrogen generated from pressurized air in a NG-7 nitrogen generator (Aquila, Effen-Leur, Netherlands). The nebuliser gas flow was set to approximately 80 L/h and the desolvation gas flow to 800–900 L/h. Infusion experiments were carried out using a Model 11 Single Syringe Pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), directly connected to the interface.

For operation in MS-MS mode, the collision gas was argon 99.995% (Carburas Metalicos, Valencia, Spain) with a pressure of 5×10^{-4} mbar in the collision cell. Capillary voltages of 3.5 kV were used in positive ionization mode. The interface temperature was set to 350°C and the source temperature to 120°C. Dwell times of 0.2 s/scan were chosen and the mass spectrometer was tuned to obtain a half height peakwidth about 0.7 Da. A solvent delay of 5 min was chosen in order to obtain an additional clean-up using the built-in divert valve controlled by Masslynx NT v 3.5 software. This software was also used to process the quantitative data obtained from calibration standards and from orange samples.

The LC separation was carried out on a Nucleosil C₁₈ 5 µm, 80×2 mm (Scharlab, Barcelona, Spain) column, at a flow-rate of 300 µL/min, using methanol–water gradient as mobile phase.

Analytical procedure

Orange samples were cut into small pieces without any pre-treatment, such as washing or removing their skin, and were triturated. Homogenised orange sample (25 g) was accurately weighed (precision 0.1 mg) and mixed with 80 ml of acetonitrile. After extraction for 2 min with a high-speed blender Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, Staufen, Germany) at 8000 rpm, the entire extract was filtered through a filter paper and washed with 15 mL of acetonitrile. Finally, the volume was adjusted to 100 mL with acetonitrile.

In order to obtain a sodium concentration of 60 mM, 200 µL of sodium acetate 500 mM were added to a 2-mL vial containing 1.5 mL of the orange extract (or standard solution).

Fortification of homogenised orange samples in recovery experiments was carried out delivering appropriate volumes of mixed standards in acetonitrile (between 0.5 and 2 mL), in order to give fortification levels of 0.01–0.1 mg/Kg. These samples were equilibrated, under dark conditions, for 2 h prior to extraction.

Analyses were carried out using the LC–ESI–MS–MS system described above. The mobile phases used for the multi-residual and individual analysis were methanol–water gradients where the percentage of methanol was changed linearly as shown in Table 1. Quantification of samples was carried out by external calibration, using standards solutions in acetonitrile.

Table 1. HPLC gradients optimized for the multi-residual and individual determination of azadirachtin and abamectin in orange samples

Multi-residual determination		Abamectin determination		Azadirachtin determination	
t (min)	% MeOH	t (min)	% MeOH	t (min)	% MeOH
0	35	0	75	0	35
2	35	6	90	6	60
10	90	8	90	8	60
15	90	9	75	9	35
16	35	12	75	12	35
20	35				

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 MS optimisation

Preliminary experiments showed that neither azadirachtin or abamectin were efficiently deprotonated, as the acidic centers in these molecules, the hydroxyl groups, are not strong enough to lose a proton in the ESI interface (Fig. 1). However, adduct formation with sodium and ammonium was observed, in agreement with other studies [3, 6, 7, 17]. The full-scan (bottom) and the MS–MS spectra (top) of abamectin and azadirachtin adducts are shown in Fig. 2 (ammonium) and Fig. 3 (sodium). After addition of 10 mM ammonium acetate, the full scan spectra also showed peaks at m/z 743.6 (azadirachtin) and 895.8 (abamectin) corresponding to sodium adducts that were formed, possibly due to traces of sodium as impurities in the reagents used (Fig. 2).

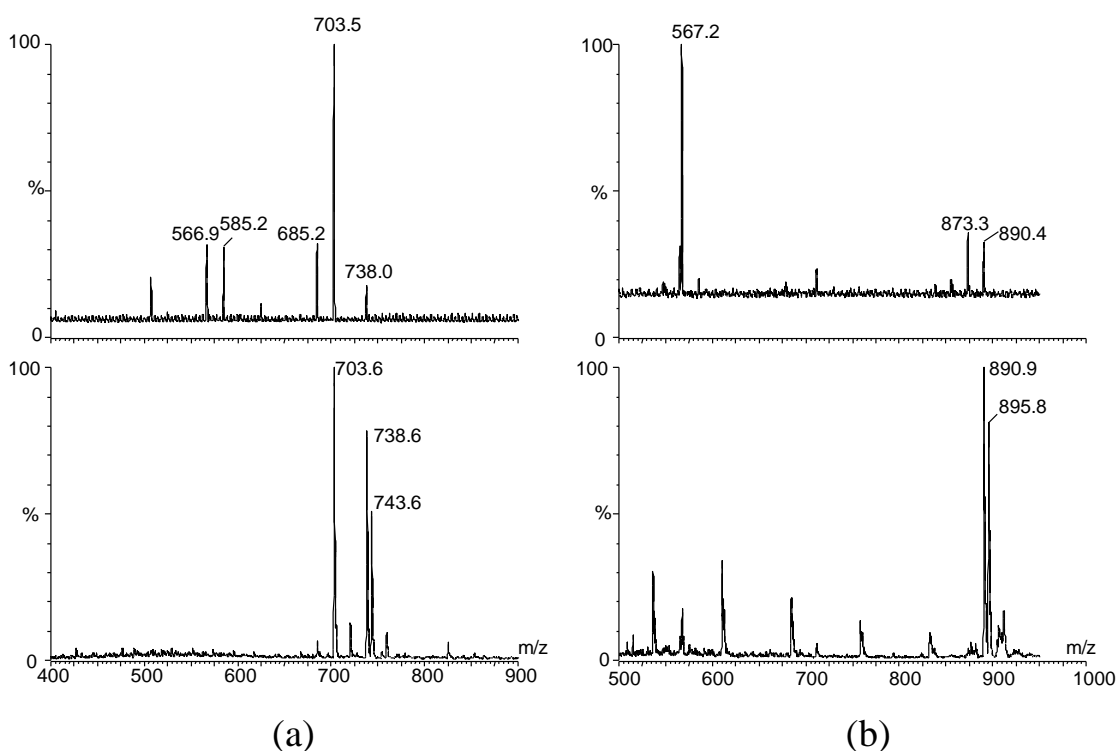


Figure 2. The positive ion electrospray full scan mass spectra (bottom) and product ion spectra of ammonium adduct ion (top) of (a) azadirachtin and (b) abamectin acquired by infusion of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ standard solution (acetonitrile/water, 50:50) with 10 mM of ammonium acetate. Hex: monosaccharide group.

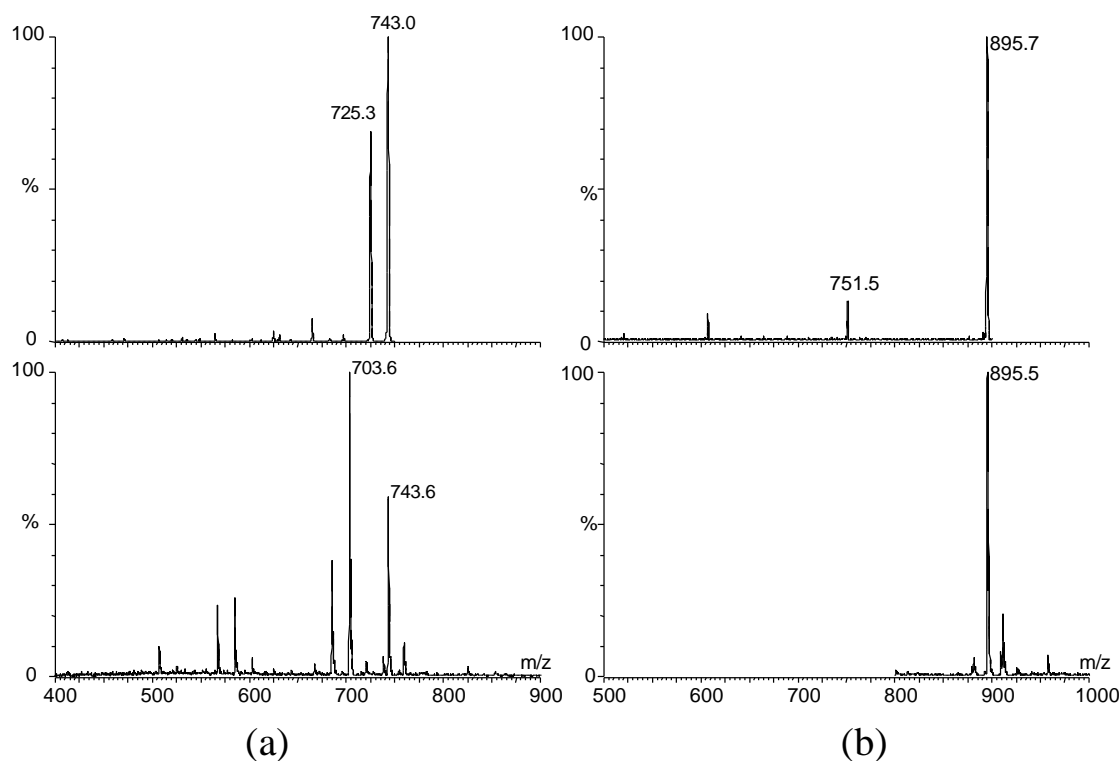


Figure 3. The positive ion electrospray full scan mass spectra (bottom) and product ion spectra of sodium adduct ion (top) of (a) azadirachtin and (b) abamectin acquired by infusion of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ standard solution (acetonitrile/water, 50:50) with 60 mM of sodium acetate. Hex: monosaccharide group.

Fig. 3 shows the fragmentation pattern obtained for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ precursor ions. As expected, low fragmentation was observed in both pesticide MS–MS spectra; azadirachtin fragmentation (Fig. 3a) showed only an abundant fragment at $[\text{M}-18]^+$ due to a water loss reaction, meanwhile abamectin (Fig. 3b) presented a more specific transition $[\text{M}-144]^+$ corresponding to the loss of one monosaccharide residue.

The optimized selected reaction monitoring (SRM) transitions for both analytes were as follows: azadirachtin, 743.6 as precursor ion and 725.3 as product ion, selecting a cone voltage of 50 V and a collision energy of 35 eV; and abamectin, 895.5 as precursor ion and 751.5 as product ion, selecting a cone voltage of 70 V and a collision energy of 50 eV.

3.2 Sample pretreatment optimisation

As ammonium adducts normally present better fragmentation and reproducibility than sodium adducts, different attempts were assayed in this paper in order to enhance the formation of ammonium adducts, such as adding ammonium acetate to the mobile phase [7] or to the sample extract. However, only chromatographic peaks for the sodium adduct transitions were observed, possibly favoured by the presence of a high concentration of this element in the orange extract. Increasing the buffer concentration in the mobile phase up to 50 mM, only led to a 10-fold signal reduction for the sodium adduct due to the effect of these high amounts of ammonium, but no signal for $[M+NH_4]^+$ was observed either for azadirachtin or abamectin. After these results, working with sodium adducts was selected.

Sodium is a non-volatile element than can precipitate in the sampling cone blocking it and, therefore, sodium is not considered an adequate cation to be introduced continuously in the interface with the mobile phase. In order to have constant amounts, the addition of an aliquot of sodium acetate to the sample extracts and to the standard solutions was checked. Thus, working with 30 mM sodium led to relative standard deviations (RSD) (three calibration curves, from 1 to 500 ng/mL, with each point injected in triplicate) between 11 and 24% for azadirachtin, and 9–34% for abamectin. When doubling the sodium amount (60 mM), the RSD dramatically decreased, achieving values lower than 9%, without affecting sensitivity.

In relation to the extraction step, two of the most typical organic eluents in LC were tested (methanol and acetonitrile) bearing in mind the direct injection of the orange extract without any pretreatment or solvent exchange. The recovery of abamectin was similar for both solvents (typically 70–80%). Azadirachtin was poorly recovered when the extraction was carried out with methanol (40%), while acetonitrile led to 80% recovery. In order to explain these differences, a methanol extract blank was spiked with a mixture of standards, obtaining the same results as above. Therefore, low recoveries with methanol should not be due to an inefficient extraction of the analyte, but to the matrix components soluble in methanol that interfered in the MS determination. As acetonitrile led to acceptable recoveries for both compounds, this solvent was finally selected for sample extraction.

3.3 LC optimization

Usually, the use of tandem mass spectrometry does not require optimal chromatographic separation, as is very rare to find molecules that share the same unique transition. However, when non-selective transitions are used (like the neutral loss of H₂O), some matrix components (or their isotopes or cone fragments) are able to present the same transition as the analyte, mainly if analysis without any sample pretreatment is carried out.

This is the case for azadirachtin in oranges samples. A direct injection chromatogram of blank extracts showed several peaks at retention times close to azadirachtin when 743.6→725.3 transition was monitored. Full scan chromatogram of orange extract reveals that these peaks corresponded to several major compounds with $m/z=742.6$, which exhibited a minor M-18 transition. Thus, the protonated molecule containing one ¹³C isotope of these molecules shared the same transition with azadirachtin. Therefore, enough chromatographic resolution between these compounds and azadirachtin was required. To aid during the interference evaluation, an additional 742.6→724.3 transition was monitored.

In order to optimize chromatographic separation, mixtures of water/acetonitrile and water/methanol were assayed as mobile phases. The use of acetonitrile as organic modifier did not improve the selectivity between azadirachtin and co-extracted interferences, in spite of the fact that several gradients were tested. However, the use of methanol achieved the necessary resolution. However, abamectin determination was not affected by the organic modifier.

3.4 Validation study

Calibration curves ($n=9$) with standards in solvent showed good linearity between 1 and 500 µg/L, with correlation coefficients higher than 0.997 for both compounds. The method was precise (RSD<7%) with instrumental limits of detection of 0.5 µg/L for azadirachtin and 2 µg/L for abamectin.

Although initially both compounds were analysed in one run, as they have similar applications in citric crops, better precision and accuracy was achieved by analysing the two compounds in two separate runs (Table 2).

Table 2. Validation study of the developed procedure for the determination of azadirachtin and abamectin in orange samples ($n=5$)

	Multi-residual determination		Individual determination	
	0.01 mg/Kg	0.1 mg/Kg	0.01 mg/Kg	0.1 mg/Kg
Azadirachtin	70 ^a (4) ^b	71 (2)	78 (4) 103 ^c (10)	83 (2) 92 ^c (2)
Abamectin	53 (32)	66 (7)	96 (10)	80 (3)

^a Recovery (%); ^b Relative Standard Deviation (%); ^c Two fold diluted extract

The multi-residue method was found to be precise (RSD<4%) and accurate (around 70%) for azadirachtin determination. However, non satisfactory figures were obtained for abamectin determination, which was more affected by the signal suppression produced by co-eluting interferences.

The chromatographic separation was improved by optimizing fast individual gradients for each compound, minimizing in this way the signal suppression. Additionally, the injection volume for abamectin determination could be increased up to 25 μ L, achieving the objective limit of quantitation (LOQ) of 0.01 mg/Kg and obtaining good peak shape.

Under the experimental conditions shown in Table 1 for single determination, abamectin recoveries increased up to 80–100% and the detection limit decreased down to 0.007 mg/Kg. Precision was also improved as a consequence of lowering the abamectin retention time from 14 to around 7 min. This fact was possibly related to a more reproducible sodium adduct formation, as the amount of sodium in the interface was higher and more reproducible at short retention times, as sodium was introduced only during injection. As a consequence of the good sensitivity for azadirachtin determination (estimated LOD of 0.002 mg/Kg), a twofold dilution of the extract was assayed in order to reduce matrix effects and increase recoveries up to 100% (Table 2). By optimizing chromatographic conditions, the total analysis time in two runs was only 4 min longer (24 instead of 20 min). Changing between the two methods can be done automatically. Typical chromatograms of standard solutions and orange samples (blank and 0.01 mg/kg spiked sample) are shown in Fig. 4.

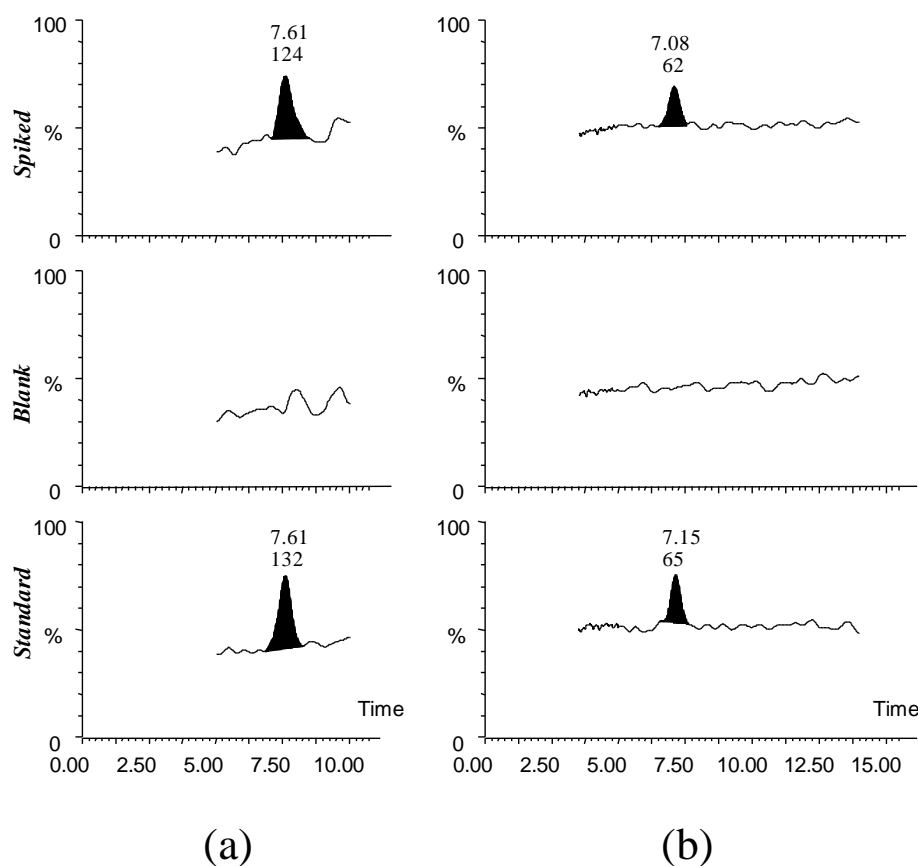


Figure 4. LC-ESI-MS-MS chromatograms from individual analysis of standards (2.5 $\mu\text{g/l}$) and orange extracts (blank and spiked at 0.01 mg/Kg): (a) azadirachtin (twofold dilution); (b) abamectin.

CONCLUSION

This work has shown that LC-ESI-MS-MS is a rapid, sensitive and selective technique for the determination of azadirachtin and abamectin residues in orange samples. The analytical methodology developed allows to reach the quantification limits required for these pesticides in food samples from the regulatory point of view (0.01 mg/Kg), without extensive sample pretreatment. Satisfactory results were obtained using acetonitrile for extraction of samples and methanol as organic modifier in the mobile phase. With a chromatographic run time of 20 min, acceptable results were achieved in the multi-residual analysis of both compounds. By optimizing chromatographic individual conditions, the total analysis time in two runs was only 4 min longer,

with improved recoveries and precisions, mainly for abamectin at the 0.01 mg/Kg concentration level. Addition of sodium acetate to the sample extract has proved to be an efficient way to obtain sodium adducts in LC–ESI–MS–MS, improving the precision and robustness of the analytical method.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using the Quattro LC triple quadruple mass spectrometer.

REFERENCES

- [1] A.J. Mordue (Luntz), M.S.J. Simmonds, S.V. Ley, W.M. Blaney, W. Mordue, M. Nasiruddin, A.J. Nisbet, *Pestic. Sci.* **54** (1998) 277.
- [2] K.M.S. Sundaram and J. Curry. *J. Liq. Chromatogr.* **16** (1993), p. 327
- [3] O. Schaaf, A.P. Jarvis, S.A. van der Esch, G. Giagnacovo and N.J. Oldham. *J. Chromatogr. A* **886** (2000), p. 89.
- [4] A.I. Valenzuela, D.S. Popa, M.J. Redondo and J. Mañes. *J. Chromatogr. A* **918** (2001), p. 59.
- [5] S.B. Turnipseed, J.E. Roybal, H.S. Rupp, S.A. Gonzales, A.P. Pfenning and J.A. Hurlbut. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** (1999), p. 493.
- [6] K. Yoshii, A. Kaihara, Y. Tsumura, S. Ishimitsu and Y. Tonogai. *J. Chromatogr. A* **896** (2000), p. 75.
- [7] M.S. Ali, T. Sun, G.E. McLeroy and E.T. Philippo. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **83** (2000), p. 39.
- [8] Z. Wu, J. Junsuo, L. Zhu, H. Luo and X. Xu. *J. Chromatogr. B* **735** (2001), p. 361.
- [9] L. Howells and M.J. Sauer. *Analyst* **126** (2001), p. 155.
- [10] O. Pozo, E. Pitarch, J.V. Sancho and F. Hernández. *J. Chromatogr. A* **923** (2001), p. 75.
- [11] E. Dijkman, D. Mooibroek, R. Hoogerbrugge, E.A. Hogendoorn, J.V. Sancho, O. Pozo and F. Hernández. *J. Chromatogr. A* **926** (2001), p. 113.
- [12] F. Hernández, J.V. Sancho, O. Pozo, A. Lara and E. Pitarch. *J. Chromatogr. A* **939** (2001), p. 1.
- [13] J.R. Startin, M.D. Sykes, J.C. Taylor, S.J. Hird, K. Jackson, R.J. Fussell and A.R.C. Hill. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **83** (2000), p. 735.
- [14] H.G.J. Mol, R.C.J. Van Dam, R.J. Vreeken and O.M. Steijger. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **83** (2000), p. 742.
- [15] A.C. Hogenboom, M.P. Hofman, S.J. Kok, W.M.A. Niessen and U.A.Th. Brinkman. *J. Chromatogr. A* **892** (2000), p. 379.

- [16] F. Hernández, C. Hidalgo, S. Grimalt and J.V. Sancho. *Quim. Anal.* **20** (2001), p. 81.
- [17] L. Gianelli, G.G. Melleiro, E. Siviero, A. Rossi, W. Cabri and L. Sogli. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14** (2000), p. 1260

4.2.3 Discusión de los resultados de los artículos científicos 6 y 7

Etefón

El espectro de infusión "full-scan" en modo negativo mostró dos iones predominantes, m/z 143 y 145, correspondientes a los iones $[M-H]^-$ de la molécula de etefón con ^{35}Cl y ^{37}Cl cumpliendo la relación de abundancias 3:1 para analitos con un átomo de Cl en su estructura. Tras fragmentar estos iones precursores en la celda de colisión, se obtuvieron mayoritariamente dos iones producto, uno más abundante (m/z 107) correspondiente a la pérdida de HCl, y el otro (m/z 79) tras perder C_2H_2 (Figura 4.1). Como el voltaje óptimo y la energía de colisión necesarios para optimizar los iones precursores y el ion producto m/z 107 fueron relativamente bajos, 15 V y 10 eV respectivamente, se promovió la fragmentación de la molécula en el cono por aumento del voltaje de éste, obteniéndose así un tercer ion precursor, el m/z 107. Este ion resultó ser el más abundante y su transición $107 > 79$ fue la más sensible, por lo que fue elegida para llevar a cabo la cuantificación. Este hecho unido a la disposición de los otros dos posibles iones precursores, fue utilizado para incrementar el número de transiciones adquiridas hasta un total de cinco, asegurando de esta manera la confirmación de los positivos con más puntos de identificación (IPs)⁵³.

Tal y como ya se ha señalado con anterioridad, uno de los principales objetivos del presente trabajo era obtener un método, por cromatografía en fase inversa, sencillo y rápido en el que el extracto crudo pudiera ser inyectado de manera directa sin ningún tipo de tratamiento de muestra adicional. El etefón, debido a su alta polaridad al encontrarse en forma de anión en disolución, apenas se retenía en columnas de relleno apolar C_{18} , eluyendo junto a las sales y los compuestos más polares en la fracción conocida como volumen muerto. Para mejorar la retención del analito, se estudió la adición de diversas cantidades de TBA, tanto en fase móvil como directamente sobre el extracto, con el objetivo de formar pares iónicos con las moléculas de etefón, proporcionándoles así mayor retención en la fase estacionaria. Sin embargo, cuando se usa este tipo de reactivos con analizadores de MS es posible que se produzcan supresiones en la señal a consecuencia de su relativa baja volatilidad

interfiriendo en el proceso de ionización del analito en la interfase. Así, cuando el TBA se introdujo de manera continua en la interfase añadiéndolo a la fase móvil a concentraciones relativamente bajas (≤ 1 mM), se producía una reducción drástica de la sensibilidad hasta llegar a la no detección del analito tras sucesivas inyecciones. Para minimizar este efecto indeseable, y de acuerdo con la experiencia de nuestro grupo de investigación con el uso de este tipo de reactivos^{16,33,54}, se optó por promover la formación del par iónico antes del inicio de la cromatografía, evitando el uso de TBA en la fase móvil. Para ello, se añadió una mayor concentración (25 mM) de TBA directamente en el vial conteniendo el extracto acuoso. La presencia de esta elevada cantidad de TBA fue suficiente para asegurar la correcta retención del analito en la columna de manera reproducible. Además, la mayor parte del TBA, al ser introducido a modo de pulso en la columna, eluía como no retenido evitándose su llegada a la interfase al eliminar la primera fracción cromatográfica mediante el giro de la válvula de seis vías posterior a la columna dispuesta en el espectrómetro de masas. De este modo, se conseguía mantener la sensibilidad a lo largo de numerosas inyecciones.

Tras optimizar las condiciones para cromatografía y detección, se pensó en la mejor estrategia para realizar la extracción del etefón de las muestras a analizar (manzanas, cerezas y tomates). A consecuencia de la gran polaridad y solubilidad en agua del etefón, se probó en primer lugar la extracción con agua acidificada con ácido fórmico (0.1%) a pH 3, ya que pH superiores a 4 el analito se empieza a degradar a etileno. Pese a realizar diversas filtraciones y/o centrifugaciones tras la extracción, se formaban emulsiones que dificultaban la separación del extracto acuoso de la matriz sólida. Para obtener extractos más limpios, que pudieran inyectarse de manera directa en el sistema, se realizó la extracción con una mezcla agua y diclorometano, favoreciendo así la separación de la fase acuosa donde se encontraba el analito. Posteriormente, tras una simple centrifugación y la adición del TBA, el extracto quedaba ya listo para su inyección en el sistema LC-MS/MS.

Las recuperaciones obtenidas para muestras fortificadas al nivel de 0.05 mg/Kg (LOQ) no fueron satisfactorias (<70%) cuando se cuantificó con calibrado en solvente como consecuencia de la supresión de la ionización producida por los compuestos presentes en las matrices vegetales. Al no haber disponibilidad comercial de la

molécula de etefón marcada isotópicamente para ser utilizada como patrón interno, se optó por la preparación de calibrados en matriz, con los que sí se consiguieron buenas recuperaciones. De esta manera, el método fue validado satisfactoriamente para las tres matrices seleccionadas siguiendo las recomendaciones de la guía SANCO³⁶ a dos niveles de fortificación, 0.05 mg/Kg, establecido como el LOQ objetivo del método, y 0.5 mg/Kg. El LOD estimado para las tres matrices fue de 0.02 mg/Kg.

Se observaron pequeñas variaciones en los tiempos de retención del etefón dependiendo de la matriz. Este hecho podría deberse a que el TBA tan sólo fue adicionado en el vial, con lo que otros componentes de cada matriz podrían reaccionar con él, consumiéndose en mayor o menor grado y afectando levemente a la retención del analito. Pese a este hecho, al trabajar con calibrados en matriz y adquirir hasta cinco transiciones SRM, se disipaba cualquier duda en cuanto a la correcta identificación de etefón en estos tres tipos de muestras.

En cuanto al criterio de confirmación, se compararon las concentraciones resultantes al cuantificar con la transición de cuantificación con las obtenidas con cada una de las cuatro transiciones de confirmación. Todas las relaciones de concentración obtenidas de esta manera estuvieron siempre entre 0.9 y 1.1 para las tres matrices (desviaciones <10%), lo cual asegura una correcta confirmación con un criterio incluso más restrictivo que el establecido en la directiva europea referente a confirmación de muestras positivas⁵³. Además, adquiriendo cinco transiciones se pueden evitar tanto falsos positivos como negativos alcanzándose hasta 10.5 IPs, superando ampliamente el mínimo de 3 sugeridos por la Decisión Europea.

De acuerdo con la literatura científica consultada, el trabajo presentado es el primer método para determinar (cuantificar y confirmar) residuos de etefón en muestras vegetales de manera directa y robusta, sin ningún paso de derivatización ni tratamiento de muestra previo o posterior a la extracción.

Azadiractina y Abamectina

Como cabía esperar, para ninguno de estos dos compuestos se observó el ion $[M-H]^-$ en los experimentos de infusión en modo negativo ya que los grupos hidroxilo de sus respectivas moléculas no son lo suficientemente ácidos como para perder un protón en la interfase ESI. En cambio, de acuerdo con otros estudios anteriores y posteriores al nuestro⁵⁵, en modo positivo se observaron mayoritariamente los iones correspondientes a los aductos amoniados $[M+NH_4]^+$ (m/z 738.6 y 890.5 para azadiractina y abamectina respectivamente) y a los sodiados $[M+Na]^+$ (m/z 743.6 y 895.7 para azadiractina y abamectina respectivamente). Generalmente, al trabajar con aductos sodiados se producen pobres fragmentaciones de las moléculas y falta de reproducibilidad, por lo cual se intentó favorecer la formación del aducto amoniado para los dos analitos. Pese a probar diversas concentraciones de acetato de amonio en la fase móvil, no se observaron picos cromatográficos para las transiciones asociadas al aducto amoniado ($738.6 > 703.5$, $890.5 > 567.2$), pero en cambio siempre estuvieron presentes las asociadas al sodiado ($743.6 > 725.3$, $895.7 > 751.5$), probablemente debido a la presencia de altas concentraciones de sodio en el extracto de la naranja. Para conseguir que la cantidad de sodio en la interfase fuera constante y de esta manera favorecer la formación reproducible de sus aductos, se optimizó la adición de acetato de sodio al extracto estableciéndose en 60 mM (se descartó el uso en la fase móvil debido a que su introducción continua junto a su falta de volatilidad podría bloquear, por precipitación, el cono del espectrómetro).

La extracción más eficiente de los dos analitos en las muestras de naranja se obtuvo al usar como disolvente acetonitrilo, obteniéndose recuperaciones para muestras fortificadas a 0.01 mg/Kg de alrededor de un 80% para cada compuesto. La extracción con metanol quedó descartada ya que los componentes de la matriz solubles en este disolvente dificultaban la ionización de la azadiractina, provocando recuperaciones poco satisfactorias.

A pesar de la elevada selectividad generalmente asociada al uso de la detección por MS en tándem, en el caso de la azadiractina se tuvo que trabajar con una transición poco selectiva ($743.6 > 725.3$, pérdida de agua). Ello obligó a mejorar la

resolución cromatográfica para poder separar posibles interferentes que compartieran dicha transición poco selectiva. Por ello, la optimización del gradiente, así como la elección de metanol como modificador orgánico para la fase móvil, fueron parámetros clave en el método desarrollado.

Se desarrollaron y validaron tres métodos, dos individuales y uno multiresiduo. La cuantificación se llevó a cabo mediante calibrados en solvente, cuya linealidad quedó demostrada ($r > 0.99$) para el rango de 1 a 500 $\mu\text{g/L}$. El LOQ objetivo se estableció en el nivel más bajo validado (0.01 mg/Kg), mientras que los LOD se estimaron a partir de muestras fortificadas al LOQ para una relación señal/ruido de 3. Con el método multiresidual el tiempo de análisis fue cuatro minutos inferior al de la suma de los otros dos (20 min.). Sin embargo, se obtuvieron límites de detección inferiores (0.007 mg/Kg para la abamectina y 0.002 mg/Kg para la azadiractina) y mejores y más reproducibles recuperaciones, a los dos niveles ensayados, para los métodos individuales, sobre todo en el caso de la abamectina. Para el caso de la azadiractina, al disponer de suficiente sensibilidad, se pudo disminuir el efecto matriz y mejorar la recuperación realizando una sencilla dilución por dos del extracto.

Este trabajo sirvió a nuestro grupo de investigación como punto de partida para un segundo artículo en el que se estudiaron con profundidad diversas posibilidades para la determinación eficiente de este tipo de analitos, comparando tanto las interfases ESI, APCI y Ion Sabre APCI, promoviendo sus dos modos de ionización, como las distintas posibilidades en cuanto a la formación de diversos aductos (Na, NH_4 , Li, Ni, Co). Además se pudo adquirir una segunda transición para la confirmación más segura de las muestras positivas²⁵.

Recientemente, Sannino⁵⁶ ha desarrollado y validado metodología basada en LC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo para determinar abamectina, azadiractina y spinosad en diversas matrices vegetales. A pesar de aplicar un tratamiento de muestra más complejo, con preparación de calibrados en matriz para la cuantificación, se continúa demostrando el potencial de la técnica para este tipo de analitos. Se alcanzan niveles de cuantificación de unos pocos $\mu\text{g/Kg}$ (de 1 a 10 dependiendo de la matriz), asegurando además la confirmación con la adquisición

de más de una transición por analito. En los dos últimos años, la abamectina ha sido incluida en varios métodos multiresiduo en alimentos basados en el uso de LC con detectores de masas, tanto de triple cuadrupolo^{57,58} como en combinación con trampa iónica (QTrap)⁵⁹.

4.3 Bibliografía

1. Vital Signs 2006-2007, World Watch Institute (www.worldwatch.org/node14344).
2. Directiva 91/414/CEE, Off. J. Eur. Comm., L230 (15 Julio 1991) 1-32.
http://www.mapa.es/app/Condiciona/Documentos/Directiva_91-414-CEE.pdf
3. Reglamento EC 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal.
http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=substance.selection
4. Food & veterinary office: Pesticide Monitoring reports
http://ec.europa.eu/food/fvo/specialreports/pesticide_residues/report_2005_en.pdf
5. A. Sannino, L. Bolzoni, M. Bandini, *Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables*, J. Chromatogr. A, **1036**, 2004, 161-169.
6. C. J., T. Pihlström, B.G. Österdahl, K. E. Markides, *A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*, J. Chromatogr. A, **1023**, 2004, 93-104.
7. F. Hernández, O.J. Pozo, J.V. Sancho, L. Bijlsma, M. Barreda, E. Pitarch, *Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities*, J. Chromatogr. A, **1109**, 2006, 242-252.
8. I. Ferrer, E. M. Thurman, J. A. Zweigenbaum, *Screening and confirmation of 100 pesticides in food samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom., **21**, 2007, 3869-3882.
9. M. Hiemstra, A. de Kok, *Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **1154**, 2007, 3-25.
10. I. R. Pizzutti, A. de Kok, R. Zanella, M. B. Adaimea, M. Hiemstra, C. Wickert, O. D. Prestes, *Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization*, J. Chromatogr. A, **1142**, 2007, 123-136.

11. T. Pihlström, G. Blomkvist, P. Friman, U. Pagard, B.G. Österdahl, *Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 2007, 1773-1789.
12. P. Payá, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tassdelen, J. Oliva, A. Barba, *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*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 2007, 1697-1714.
13. C. Soler, Y. Picó, *Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food*, *Trends Anal. Chem.*, **26**, 2007, 103-115.
14. Y. Picó, G. Font, M.J. Ruiz, M. Fernández, *Control of pesticide residues by liquid chromatography-mass spectrometry to ensure food safety*, *Mass Spectrom. Rev.*, **25**, 2006, 917-960.
15. C. Soler, J. Mañes, Y. Picó, *The role of the liquid chromatography-mass spectrometry in pesticide residue determination in food*, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **38**, 2008, 93-117.
16. F. Hernández, J.V. Sancho, O.J. Pozo, C. Villaplana, M. Ibañez, S. Grimalt, *Rapid determination of Fosetyl-Aluminum residues in lettuce by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry*, *J. AOAC Int.*, **86**, 2003, 832-838.
17. J.V. Sancho, M. Ibañez, S. Grimalt, O.J. Pozo, F. Hernández, *Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry*, *Anal. Chim. Acta*, **530**, 2005, 237-243.
18. B. Li, X. Deng, D. Guo, S. Jin, *Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in foods using high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry*, *Se Pu Chin. J. Chromatogr.*, **25**, 2007, 486-490.

19. J.V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernandez, F.J. López, E.A. Hogendoorn, E. Dijkman, *Rapid determination of glyphosate residues and its main metabolite AMPA in soils sample by liquid chromatography*, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **62**, 1996, 53-63.
20. F. Hernández, C. Hidalgo, J.V. Sancho, *Determination of glyphosate residues in plants by precolumn derivatization and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection*, *J. AOAC Int.*, **83**, 2000, 728-734.
21. M. Ibañez, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, *Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **1081**, 2005, 145-155.
22. M. Ibañez, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, *Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **1134**, 2006, 51-55.
23. K. Granby, S. Johannesen, M. Vahl, *Analysis of glyphosate residues in cereals using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)*, *Food Addit. Contam.*, **20**, 2003, 692-698.
24. A. Sannino, *Determination of three natural pesticides in processed fruit and vegetables using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 2007, 2079-2086.
25. S. Grimalt, O.J. Pozo, J.M. Marín, J.V. Sancho, F. Hernández, *Evaluation of different quantitative approaches for the determination of noneasily ionizable molecules by different atmospheric pressure interfaces used in liquid chromatography tandem mass spectrometry: Abamectin as case of study*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 2005, 1619-1630.
26. C. Barberá, *Pesticidas Agrícolas*, , Ed. Omega, 4ª Edición, 1989.
27. S.H. Tseng, P.C. Chang, S.S. Chou, *A rapid and simple method for the determination of ethephon residue in agricultural products by GC with headspace sampling*, *J. Food Drug Anal.*, **8**, 2000, 213-217.
28. S. Takenaka, *New method for ethephon ((2-chloroethyl) phosphonic acid) residue analysis, and detection of residual levels in the fruit and vegetables of Western Japan*, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2002, 7515-7519.

29. A. Royer, F. Laporte, S. Bouchonnet, P.Y. Communal, *Determination of ethephon residues in water by gas chromatography with cubic mass spectrometry after ion-exchange purification and derivatisation with N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide*, J. Chromatogr. A, **1108**, 2006, 129-135.
30. T. Goto, Y. Ito, S. Yamada, H. Matsumoto, H. Okabe, H. Nagase, *The high throughput analysis of N-methyl carbamate pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry using a short column*, Anal. Chim. Acta, **555**, 2006, 225-230.
31. Y. Hsieh, C. J. G. Duncan, *An ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of cytarabine in mouse plasma*, Rapid Commun. Mass Spectrom., **21**, 2007, 573-578.
32. J.B. Quintana, R. Rodil, T. Reemtsma, *Determination of phosphoric acid mono- and diesters in municipal wastewater by solid-phase extraction and ion-pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Anal. Chem., **78**, 2006, 1644-1650.
33. J. M. Marín, J. V. Sancho, O. J. Pozo, F. J. López, F. Hernández, *Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **1133**, 2006, 204-214.
34. M. Holcapek, K. Volna, P. Jandera, L. Kolarova, K. Lemr, M. Exner, A. Cirkva, *Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulphonated dyes and intermediates*, J. Mass Spectrom, **39**, 2004, 43-50.
35. T. Reemtsma, *Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants*, J. Chromatogr. A, **1000**, 2003, 477-501.
36. SANCO/3029/99 rev. 4, EUROPEAN COMMISSION, Directorate General Health and Consumer Protection, 11 July 2000, Residues: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414. (http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/guidance/wrkdoc12_en.pdf).
37. I. Ishaaya, A. Bazaran, S. Kontsedalov, A. R. Horowitz, *Insecticides with novel modes of action: Mechanism, selectivity and cross-resistance*, Entomol. Res., **37**, 2007, 148-152.

38. O. López, J.G. Fernández-Bolaños, M.V. Gil, *New trends in pest control: The search for greener insecticides*, *Green Chem.*, **7**, 2005, 431-442.
39. M.B. Isman, *Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world*, *Annu. Rev. Entomol.*, **51**, 2006, 45-66.
40. R.B. Raizada, M.K. Srivastava, R.A. Kaushal, R.P. Singh, *Azadirachtin, a neem biopesticide: Subchronic toxicity assessment in rats*, *Food Chem. Toxicol.*, **39**, 2001, 477-483.
41. Reglamento (CE) No 889/2008 de la Comisión Europea, del 5 de septiembre de 2008, sobre la producción, control y etiquetado de productos ecológicos.
(<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:250:0001:0084:ES:PDF>)
42. J. Vercruyse, *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*, Ed. R.S. Rew, 2003, 125-162.
43. T. Tisler, N.K. Erzen, *Abamectin in the aquatic environment*, *Ecotoxicol.*, **15**, 2006, 495-502.
44. L. Kolar, N.K. Erzen, L. Hogerwerf, C.A.M. van Gestel, *Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates*, *Env. Pol.*, **151**, 2008, 182-189.
45. P. Caboni, M. Cabras, A. Angioni, M. Russo, P. Cabras, *Persistence of azadirachtin residues on olives after field treatment*, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2002, 3491-3494.
46. N. Kaushik, *Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of Azadirachta indica seeds by HPLC and GLC*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **374**, 2002, 1199-1204.
47. O. Schaaf, A.P. Jarvis, S.A. van der Esch, G. Giagnacovo, N.J. Oldham, *Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (Azadirachta indica) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **886**, 2000, 89-97.
48. H. Diserens, M. Henzlin, *Determination of abamectin residues in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A*, **833**, 1999, 13-18.
49. K.M.S. Sundaram, J. Curry, *Determination of abamectin in some forest matrices by liquid chromatography with fluorescence detection*, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **20**, 1997, 1757-1772.

50. A.I. Valenzuela, M.J. Redondo, Y. Pico, G. Font, *Determination of abamectin in citrus fruits by liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **871**, 2000, 57-65.
51. A.I. Valenzuela, D.S. Popa, M.J. Redondo, J. Mañes, *Comparison of various liquid chromatographic methods for the analysis of avermectin residues in citrus fruits*, J. Chromatogr. A, **918**, 2001, 59-65.
52. L. Howells, M.J. Sauer, *Multi-residue analysis of avermectins and moxidectin by ion-trap LC-MSn*, Analyst, **126**, 2001, 155-160.
53. Decisión de la UE 2002/657/CE, Off. J. Eur. Commun., **L221**, 12 Agosto 2002, 8-36.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:ES:PDF>
54. F. Hernández, J.V. Sancho, O.J. Pozo, *An estimation of the exposure to organophosphorus pesticides through the simultaneous determination of their main metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. B, **808**, 2004, 229-239.
55. M. Danaher, L.C. Howells, S. R.H. Crooks, V. Cerkenik-Flajs, M.O'Keeffe, *Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices*, J. Chromatogr. B, **844**, 2006, 175-203.
56. A. Sannino, *Determination of three natural pesticides in processed fruit and vegetables using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom., **21**, 2007, 2079-2086.
57. M.J. Hengel, M. Miller, *Analysis of pesticides in dried hops by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, J. Agric. Food Chem., **56**, 2008, 6851-6856.
58. R. Sheridan, L. Desjardins, *Determination of abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, and moxidectin in milk by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry*, J. AOAC Int., **89**, 2006, 1088-1094.
59. M.D. Hernando, J.M. Suárez-Barcena, M.J.M. Bueno, J.F. Garcia-Reyes, A.R. Fernández-Alba, *Fast separation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food*, J. Chromatogr. A, **1155**, 2007, 62-73.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES GENERALES

La **conclusión general** derivada de las investigaciones realizadas en la Tesis es que la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo es una técnica muy adecuada para la rápida determinación (cuantificación y confirmación) de residuos de contaminantes orgánicos en aguas y vegetales. La elevada robustez de los métodos desarrollados, así como su excelente sensibilidad y selectividad, hacen que la LC-MS/MS QqQ sea la técnica de elección en este campo para la gran mayoría de contaminantes orgánicos, excluyendo aquellos de alta volatilidad y baja polaridad, cuya determinación se lleva a cabo, preferentemente, con GC-MS(MS).

Adicionalmente, se establecen conclusiones **específicas** relacionadas con cada uno de los trabajos realizados:

1. El acoplamiento LC-MS/MS QqQ con interfase electrospray (ESI) es una herramienta poderosa para la determinación de plaguicidas de polaridades medio-altas y sus TPs (difícilmente abordables por GC-MS) en diferentes tipos de aguas.
2. La aplicación de una etapa de preconcentración SPE "on-line" (acoplamiento SPE-LC) permite mejorar los límites de cuantificación (LOQs), alcanzándose valores del orden de unos pocos ng/L, además de disminuir considerablemente los tiempos de análisis y el consumo de disolventes.
3. La posibilidad de inyectar directamente muestras acuosas en el sistema LC-MS/MS permite disminuir el tratamiento de muestra y, en consecuencia, los posibles errores y pérdidas asociadas a este proceso. Además, la sensibilidad que aporta la detección por MS/MS contribuye a reducir el volumen de muestra necesario para el análisis.
4. El uso de un analizador de triple cuadrupolo permite la adquisición simultánea de varias transiciones SRM por compuesto, de modo que en una sola inyección es posible cuantificar y confirmar (cumplimiento de Q/q

ratios) su presencia en las muestras analizadas a muy bajos niveles de concentración.

5. El elevado número de productos de transformación (TPs) encontrado en las muestras de agua analizadas, en muchas ocasiones con mayor frecuencia que los plaguicidas precursores y, generalmente, a mayores concentraciones, aconseja su inclusión en los programas de control de la contaminación. Es conveniente profundizar en la investigación de TPs, ya que por sus características físico-químicas pueden alcanzar las aguas más fácilmente que sus precursores.
6. Los herbicidas, mayoritariamente triazinas y sus TPs, bromacilo y MCPA, son los plaguicidas que más frecuentemente se detectan en las aguas subterráneas de la Comunidad Valenciana. A ello contribuye su elevada polaridad, que les confiere mayor movilidad, y su aplicación directa al suelo. Esta tendencia se ha observado también en las aguas superficiales analizadas.
7. Los análisis de aguas de lixiviado antes y después de su depuración con un sistema de ósmosis inversa en una planta de tratamiento de RSU, han demostrado la eficiencia de este proceso ya que las concentraciones encontradas en las muestras tratadas disminuyen drásticamente respecto a las muestras brutas de lixiviado.
8. El uso de reactivos formadores de pares iónicos (HFBA y TBA) ha resultado ser una solución rápida y eficaz para la retención de compuestos muy polares (presentes en forma iónica) en cromatografía en fase inversa. Su adición directa en el vial de inyección, evitando su uso en la fase móvil, permite alcanzar reproducibilidades satisfactorias sin derivas excesivas en la señal.

9. Las respuestas cromatográficas obtenidas cuando la ionización de los analitos se produce por ESI sufren, generalmente, exaltaciones o inhibiciones en presencia de matriz. La disminución de la carga de la matriz de la muestra mediante una simple dilución, la cuantificación mediante calibrado en matriz, o el empleo de compuestos marcados isotópicamente como patrones internos, han sido utilizados para corregir satisfactoriamente este indeseable efecto.
10. El uso del propio analito marcado isotópicamente como patrón interno es la mejor aproximación para la corrección del efecto matriz. Esta opción está supeditada a la disponibilidad de compuestos marcados (difícil en métodos multiresiduos), además del elevado coste de los mismos. Aunque el empleo de otros marcados distintos puede ser, en ocasiones, una solución satisfactoria, no puede generalizarse su uso, ya que la variabilidad de comportamiento analito/matriz obliga a estudiar cuidadosamente cada caso, con el fin de conseguir una correcta cuantificación.
11. El empleo de la interfase APCI Sabre de Waters ha posibilitado la determinación de analitos muy polares, como la acrilamida, a niveles de concentración muy bajos (sub-ppb) aventajando en sensibilidad a la APCI convencional y superando también a la ESI al no verse afectada por el efecto matriz.
12. La utilización de sales sodiadas y amoniadas es una buena alternativa para mejorar la ionización de macromoléculas con ausencia de centros fácilmente ionizables, como azadiractina y abamectina. Pese a la típica falta de reproducibilidad y escasa fragmentación de los aductos sodiados, éstos pueden ser utilizados con resultados satisfactorios, al menos en los casos estudiados.
13. La cromatografía de ultra presión (UHPLC) acoplada a espectrómetros de masas con analizador de triple cuadrupolo con elevada velocidad de barrido (de hasta 5 ms) ha demostrado ser una herramienta muy poderosa

en la determinación multirresidual de plaguicidas, disminuyendo notablemente el tiempo de análisis y aumentando a su vez la resolución cromatográfica así como la sensibilidad y capacidad confirmatoria, al permitir la adquisición de hasta tres transiciones SRM por compuesto, en una misma inyección.

Artículos científicos relacionados con la Tesis

1. S. Grimalt, O.J. Pozo, J.M. Marín, J.V. Sancho, F. Hernández, *Evaluation of different quantitative approaches for the determination of noneasily ionizable molecules by different atmospheric pressure interfaces used in liquid chromatography tandem mass spectrometry: Abamectin as case of study*, J. Am. Soc. Mass Spectrom., **16**, 2005, 1619-1630.
2. F. Hernández, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, J.M. Marín, M. Ibáñez, *Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS² using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers*, TrAC Trends Anal. Chem., **24**, 2005, 596-612.
3. E. Pitarch, F.J. López, J.M. Marín, F. Hernández, F. Albarrán, *Estrategia analítica para el control de contaminantes orgánicos prioritarios en aguas de lixiviado en plantas de tratamiento de residuos sólidos urbanos*, Residuos, **95**, 2007, 46-55.
4. C. Ripollés, J.M. Marín, F.J. López, J.V. Sancho, F. Hernández, *Determination of sub-ppb epichlorohydrin levels in water by on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom., **23**, 2009, 1841-1848.
5. F. Benvenuto, J.M. Marín, J.V. Sancho, S. Canobbio, V. Mezzanotte, F. Hernández, *Simultaneous determination of triazines and their main transformation products in surface and urban wastewater by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem, DOI 10.1007/s00216-010-3712-x.
6. E. Pitarch, T. Portolés, J.M. Marín, M. Ibáñez, F. Albarrán, F. Hernández, *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, *Anal. Bioanal. Chem.*, DOI 10.1007/s00216-010-3692-x.

7. C. Ripollés, J.M. Marín, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, *Analytical study on ethephon residue determination in water by ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, Enviado.

