

Tesis Doctoral

**Aplicación de técnicas de
espectrometría de masas de baja y alta
resolución para el estudio de
plaguicidas y sus metabolitos en
muestras alimentarias y ambientales**

Universidad de Almería

Departamento de Química y Física

Marta Vargas Pérez

Almería, Junio 2021



**Aplicación de técnicas de espectrometría de
masas de baja y alta resolución para el
estudio de plaguicidas y sus metabolitos en
muestras alimentarias y ambientales**

Application of low and high resolution mass spectrometry
techniques for the study of pesticides and their
metabolites in food and environmental samples

*Memoria presentada por Marta Vargas Pérez para optar
al grado de Doctora en Ciencias Químicas
Programa de Doctorado en Química Avanzada*

Fdo. Marta Vargas Pérez

Directora de Tesis

Codirector de Tesis

Fdo: Antonia Garrido Frenich

Fdo: Francisco J. Egea González



AGRADECIMIENTOS

OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral se llevó a cabo con dos objetivos principales: el primero desarrollar métodos de análisis para la determinación de plaguicidas y sus metabolitos en matrices alimentarias y ambientales, y el segundo estudiar el comportamiento de disipación y degradación de plaguicidas, incluyendo la detección de metabolitos, tras ser aplicados en muestras alimentarias y ambientales en estudios de campo o laboratorio.

Para alcanzar estos objetivos principales se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar, validar y aplicar un método QuEChERS para la determinación de propoxicarbazona y su metabolito 2-hidroxi-propoxicarbazona en harina de soja, lechuga, remolacha y miel mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). **Publicación I.**
- Desarrollar, validar y aplicar un método QuEChERS para la determinación de 200 plaguicidas en plátano, sandía, pera y fresa mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con analizador Orbitrap (GC-Orbitrap-MS). Asimismo, aplicar una estrategia de análisis no dirigido para la elucidación de otros compuestos presentes en las muestras. **Publicación II.**
- Desarrollar y validar un método analítico para la determinación de propoxicarbazona y su metabolito en suelo y agua mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con analizador Orbitrap (LC-Orbitrap-MS). Estudiar el comportamiento de disipación y degradación de propoxicarbazona en estudios de laboratorio en muestras de suelo y agua con la identificación de nuevos metabolitos mediante análisis no dirigido. **Publicación III.**

OBJETIVOS

- Desarrollar y validar un método analítico para la determinación de fluopyram en tomate y pepino mediante LC-Orbitrap-MS. Estudiar el comportamiento de disipación y degradación de fluopyram en estudios de campo en invernadero en cultivos de pepino y tomate con la identificación de nuevos metabolitos mediante análisis no dirigido.

Publicación IV.

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral titulada “Aplicación de técnicas de espectrometría de masas de baja y alta resolución para el estudio de plaguicidas y sus metabolitos en muestras alimentarias y ambientales” ha profundizado en la resolución de problemas analíticos relacionados con la seguridad de los alimentos y del medioambiente desde dos perspectivas: (i) el potencial de las técnicas de GC y LC acopladas a espectrometría de masas de baja y alta resolución en estrategias de análisis dirigido y no dirigido de plaguicidas, y (ii) el conocimiento del comportamiento cinético en suelo, agua y hortalizas de plaguicidas tras ser aplicados como productos fitosanitarios, con especial atención a los correspondientes productos de degradación.

El potencial de transferencia de los resultados de la investigación contenida en esta Tesis a laboratorios de rutina también se ha tenido en especial consideración. Prueba de ello es que los métodos analíticos han sido validados acorde a guías internacionales y teniendo en cuenta factores limitantes como la disponibilidad de patrones o la identificación tentativa realizada a través de la comparación de señales espectrométricas con bibliotecas espectrales. En todos los estudios realizados en muestras agroalimentarias o ambientales se optimizan métodos de extracción basados en el procedimiento.

Los trabajos realizados en esta Tesis se han estructurado en dos bloques en función de la temática tratada, evaluación de la seguridad alimentaria y cinética de disipación y/o degradación.

En un primer bloque se aborda el desarrollo y validación de métodos analíticos, mono y multirresiduo, en diferentes matrices alimentarias utilizando LC-MS/MS y GC-HRMS:

- En primer lugar, se desarrolla y valida un método analítico basado en LC-MS/MS para la cuantificación y confirmación del herbicida

RESUMEN

propoxicarbazona y su metabolito, 2-hidroxi-propoxicarbazona, en alimentos de características muy diferentes como miel, lechuga, harina de soja y remolacha.

- A continuación, se ha evaluado el potencial de la técnica GC-HRMS para el control de residuos de plaguicidas en muestras alimentarias con analizador Q-Orbitrap con el desarrollo de un método multiresiduo de análisis dirigido con 200 plaguicidas de diversas familias, en combinación con un método de análisis no-dirigido. El método de análisis dirigido ha sido validado en fresa, plátano, pera y sandía y posteriormente aplicado a 31 muestras reales. El método de análisis no-dirigido es aplicado a 114 muestras reales incluyendo, además de las 31 anteriores, otras tan diversas como champiñón, espárrago, pimiento o ciruela.

En un segundo bloque se profundiza en el conocimiento sobre el comportamiento cinético de disipación y degradación de dos plaguicidas que son el ingrediente activo de dos productos fitosanitarios; uno de los estudios se ha realizado en matrices agroalimentarias y el otro en dos matrices ambientales, empleando para ello LC-HRMS. Los estudios de disipación y degradación incluidos en este bloque fueron los siguientes:

- Ensayos de laboratorio en suelo y agua, escenario en el que se pueden controlar las condiciones ambientales durante el estudio. El plaguicida objeto de la investigación fue el herbicida propoxicarbazona, que es aplicado sobre el suelo y que puede llegar tanto al agua subterránea (percolación) como a la superficial (escorrentía); por ello se consideraron ambas matrices. El estudio incluye la identificación tentativa de metabolitos de propoxicarbazona generados en el proceso de degradación.
- Ensayos realizados en campo, en concreto en invernadero sobre cultivos de tomate cherry y pepino, y por tanto expuestos a condiciones reales del

RESUMEN

medio. El plaguicida en estudio fue el fungicida fluopyram, autorizado en ambos cultivos y aplicado mediante el agua de riego. El estudio incluye la identificación tentativa de metabolitos de fluopyram generados en el proceso de degradación.

ABSTRACT

The Thesis herein entitled "Application of low and high resolution mass spectrometry techniques for the study of pesticides and their metabolites in food and environmental samples" has explored the resolution of analytical problems related to food and environmental safety from two perspectives: (i) the potential of GC and LC techniques coupled to low and high resolution mass spectrometry in targeted and non-targeted pesticide analysis strategies; (ii) the knowledge of the kinetic behaviour in soil, water and vegetables of pesticides after application as plant protection products, with special attention to the corresponding degradation products.

The potential for transferring the results of the research contained in this Thesis to routine laboratories has also been taken into special consideration. Proof of this is that the analytical methods have been validated according to international guidelines and taking into account limiting factors such as the availability of standards or methods in which the identification is carried out through the comparison of spectrometric signals with spectral libraries. In all the studies carried out on agri-food or environmental samples, extraction methods based on the QUECHERS procedure are optimized.

The work carried out in this Thesis has been structured in two blocks according to the subject matter, food safety assessment and dissipation and/or degradation kinetics.

The first section deals with the development and validation of single and multi-residue analytical methods in different food matrices using LC-MS/MS and GC-HRMS; the following aspects are highlighted:

- Firstly, an analytical method based on LC-MS/MS is developed and validated for the quantification and confirmation of the herbicide propoxycarbazone and its metabolite, 2-hydroxy-propoxycarbazone, in foods with very different characteristics such as honey, lettuce,

ABSTRACT

soybean meal and beetroot. The method was applied to real samples, although none of these compounds were found above the maximum residue limit (MRL) in any of them.

- Secondly, the potential of the GC-HRMS technique for pesticide residues monitoring in food samples with Orbitrap analyser was then evaluated with the development of a multi-residue targeted analysis method with 200 pesticides from different pesticide families, in combination with a non-targeted analysis method. The targeted analysis method has been validated on strawberry, banana, pear and watermelon and subsequently applied to 31 real samples. The non-targeted analysis method is applied to 114 real samples including, in addition to the 31 samples, other samples as diverse as mushrooms, asparagus, peppers and plums.

In a second section, the kinetic behaviour of dissipation and degradation of two pesticides that are the active ingredient of two plant protection products is studied in depth; one of the studies has been carried out in agri-food matrices and two others have been carried out in environmental matrices, using LC-HRMS. The dissipation and degradation studies included in this block were as follows:

- Laboratory tests on soil and water, scenario in which environmental conditions can be controlled during the study. The pesticide under investigation was the herbicide propoxycarbazone, which is applied on soil and can reach both groundwater (percolation) and surface water (runoff); therefore both matrices were considered. The study includes the tentative identification of propoxycarbazone metabolites generated in the degradation process.
- Field tests, specifically in greenhouses on cherry tomato and cucumber crops, and therefore exposed to real environmental

ABSTRACT

conditions. The pesticide under study was the fungicide fluopyram, authorised for both crops and applied via irrigation water. The study includes the tentative identification of fluopyram metabolites generated in the degradation process.

LISTA DE PUBLICACIONES

A continuación, se muestra la lista de publicaciones derivadas de la presente Tesis:

- **Publicación I:** Optimization and establishment of QuEChERS based method for determination of propoxycarbazone and its metabolite in food commodities by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

Marta Vargas-Pérez, Jesús Marín-Sáez, Francisco Javier Egea González, Antonia Garrido Frenich. *Food Chemistry*, 274 (2019) 429–433 C.

- **Publicación II:** Application of full scan gas chromatography high resolution mass spectrometry data to quantify targeted-pesticide residues and to screen for additional substances of concern in fresh-food commodities.

Marta Vargas-Pérez, Irene Domínguez, Francisco Javier Egea González, Antonia Garrido Frenich. *Journal of Chromatography A*, 1622 (2020) 461118.

- **Publicación III:** Evaluation of the behaviour of propoxycarbazone herbicide in soils and water under different conditions. Post-targeted study.

Marta Vargas-Pérez, Irene Domínguez, Francisco Javier Egea González, Antonia Garrido Frenich. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183 (2019) 109506.

- **Publicación IV:** Dissipation and residue determination of fluopyram and its metabolites in greenhouse crops.

Marta Vargas-Pérez, Irene Domínguez, Francisco Javier Egea González, Antonia Garrido Frenich. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100 (2020) 4826-4833.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AIF	Fragmentación de todos los iones
AOAC	Asociación oficial de químicos analíticos
DAD	Detector de diodo-array
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
ECD	Detector de captura de electrones
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EM	Estados miembros
EN	Norma europea
FAO	Organización para la agricultura y la alimentación.
FOMC	Modelo de compartimentos múltiples de primer orden
FS	Escaneo completo
GBC	Carbón negro grafitizado
GC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
HRF	Filtrado de alta resolución
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
IUPAC	Unión internacional de Química pura y aplicada
LC	Cromatografía de líquidos
LLE	Extracción líquido-líquido
LLP	Partición líquido-líquido
LMR	Límite máximo de residuos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LRMS	Espectrometría de masas de baja resolución
m/z	Masa/carga
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

NIST	Instituto Nacional de estándares y tecnología de Estados Unidos
NPD	Detector de nitrógeno-fosforo
NP	Fase normal
off-line SPE	Extracción en fase sólida fuera de línea
on-line SPE	Extracción en fase sólida en línea
PAC	Política agraria común
PCB	Bifenilos policlorados
PSA	Amina primaria secundaria
Q	Cuadrupolo
Q-Orbitrap	Cuadrupolo-Orbitrap
QqQ	Triple cuadrupolo
Q-Trap	Cuadrupolo-trampa de iones lineal
QuEChERS	Acrónimo de rápido, fácil, barato, robusto y seguro
RASFF	Sistema de alerta rápida para alimentos y piensos
RSD	Desviación estándar relativa
SANTE	Dirección General de salud y consumidores
SFO	Cinética de primer orden
SLE	Extracción sólido-líquido
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
TIC	Cromatograma de iones totales
TOF	Tiempo de vuelo
TP	Producto de transformación
UE	Unión Europea
UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alto rendimiento
UNE	Una norma europea
UV	Ultravioleta

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. PLAGUICIDAS: EVOLUCIÓN HISTÓRICA E IMPORTANCIA	1
1.1. Definición, clasificación, consumo y usos de los plaguicidas	6
1.2. Problemática asociada al uso de plaguicidas	8
1.3. Productos de transformación de plaguicidas: mecanismos	11
1.4. Estudios de disipación y de degradación de plaguicidas	13
2. LEGISLACIÓN EN MATERIA DE PLAGUICIDAS EN EL MARCO DE LA UE	20
2.1. Legislación en alimentos	21
2.2. Legislación en el ámbito medioambiental	22
3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	25
3.1. Preparación de muestras	26
3.1.1. Extracción con disolventes o sólido-líquido	28
3.1.2. Extracción en fase-sólida (SPE)	30
3.2. Aplicación de los métodos de extracción a plaguicidas	31
4. MÉTODOS DE ANÁLISIS. DETERMINACIÓN INSTRUMENTAL	35
4.1. Cromatografía de gases y líquidos	35
4.2. Espectrometría de masas	36
4.2.1. Espectrometría de masas de baja resolución	37
4.2.2. Espectrometría de masas de alta resolución	37
4.2.3. Estrategias para la determinación de plaguicidas: monorresiduo y multirresiduo	43
4.2.3.1. Métodos monorresiduo	43
4.2.3.2. Métodos multirresiduo	44
4.2.4. Determinación de plaguicidas mediante LRMS	45
4.2.5. Determinación de plaguicidas mediante HRMS	50

5. REFERENCIAS	54
CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA MEDIANTE CROMATOGRÁFÍA DE LÍQUIDOS Y DE GASES ACOPLADAS A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	76
1. INTRODUCCIÓN	79
2. REFERENCIAS	82
PUBLICACIÓN I. Optimization and establishment of QuEChERS based method for determination of propoxycarbazone and its metabolite in food commodities by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.	84
PUBLICACIÓN II. Application of full scan gas chromatography high resolution mass spectrometry data to quantify targeted-pesticide residues and to screen for additional substances of concern in fresh-food commodities.	92
CAPÍTULO III. APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN EN ESTUDIOS DE DISIPACIÓN / DEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS EN EL ÁMBITO MEDIOAMBIENTAL Y ALIMENTARIO	
1. INTRODUCCIÓN	111
2. REFERENCIAS	113
PUBLICACIÓN III. Evaluation of the behaviour of propoxycarbazone herbicide in soils and water under different conditions. Post-targeted study.	114
PUBLICACIÓN IV. Dissipation and residue determination of Fluopyram and its metabolites in greenhouse crops.	126

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN INTEGRADA	
1. INTRODUCCIÓN	140
2. DESARROLLO DE MÉTODOS PARA EL CONTROL DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA	142
2.1 Método monorresiduo para propoxicarbazona y su metabolito 2-hidroxi-propoxicarbazona mediante LC-MS/MS	143
2.1.1. Separación y detección por cromatografía de líquidos acoplada al analizador de masas QqQ	143
2.1.2. Método de extracción	146
2.1.3. Validación del método	149
2.1.4. Aplicación del método desarrollado a muestras reales: lechuga, remolacha, harina de soja y miel	151
2.2. Método multirresiduo mediante GC-Q-Orbitrap-MS	152
2.2.1. Separación y detección por cromatografía de gases acoplada al analizador Q-Orbitrap	152
2.2.2. Método de extracción	156
2.2.3. Validación del método	157
2.2.4. Aplicación a muestras reales	158
2.2.5. Desarrollo de un método de análisis no dirigido	161
3. ESTUDIOS DE DISIPACIÓN Y DEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS E IDENTIFICACIÓN DE SUS METABOLITOS EN MUESTRAS AMBIENTALES Y ALIMENTARIAS	
3.1. Disipación y degradación del herbicida propoxicarbazona en muestras ambientales	172
3.1.1. Separación por cromatografía de líquidos. Detección mediante espectrometría de masas de alta resolución con el analizador Orbitrap	172

ÍNDICE

3.1.2. Métodos de extracción	176
3.1.3. Validación de los métodos	177
3.1.4. Diseño de experimentos de laboratorio para el estudio de la disipación y degradación en muestras ambientales	178
3.1.5. Estudio cinético de disipación y degradación de propoxicarbazona	179
3.1.6. Análisis retrospectivo de metabolitos de propoxicarbazona	182
3.2. Disipación y degradación del fungicida fluopyram en muestras alimentarias	187
3.2.1. Separación por cromatografía de líquidos. Detección mediante espectrometría de masas de alta resolución con el analizador Orbitrap	187
3.2.2. Método de extracción	189
3.2.3. Validación del método	190
3.2.4. Planificación de experimentos de campo para estudios de disipación y degradación en muestras alimentarias	191
3.2.5. Estudio cinético de disipación y degradación de fluopyram	191
3.2.6. Análisis retrospectivo de metabolitos de fluopyram	193
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES	197
ANEXO. DERECHOS DE AUTOR	203

CAPÍTULO

1

INTRODUCCIÓN

1. Plaguicidas: evolución histórica e importancia

La estrategia europea sobre bioeconomía [1] plantea entre sus cinco objetivos principales que los sistemas alimentarios y agrícolas son actualmente una parte fundamental de la misma. Estos objetivos vienen motivados, en gran parte, por las demandas cambiantes de los consumidores en relación a prácticas sostenibles de producción y consumo de alimentos. El documento señala la necesidad de intensificar los esfuerzos para apoyar la transformación hacia sistemas agroalimentarios sostenibles, sanos y eficientes en el uso de los recursos. Con esta estrategia el tratamiento de los cultivos con plaguicidas de forma racional cobra mayor relevancia al ser éstos un modo efectivo para garantizar la protección de las cosechas antes y después de la recolección. Ello está en línea con la opinión de Gero Vaagt, experto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en gestión de plaguicidas, que indica: "El uso de plaguicidas seguirá siendo un factor clave en la producción agraria. Sin embargo, la distribución inadecuada y el empleo de plaguicidas y compuestos de elevada toxicidad, está causando problemas para la salud y el ambiente" (Roma, 4 de noviembre de 2002. Nota de prensa: se adopta un nuevo Código de conducta sobre plaguicidas).

Los plaguicidas son sustancias que surgieron por la necesidad de combatir plagas desde el comienzo de la agricultura. Hasta la primera mitad del siglo XX, se utilizaban principalmente productos de fuentes naturales con propiedades efectivas para combatir plagas y enfermedades de las plantas. Fue en la década de 1940, a raíz de la Segunda Guerra Mundial, cuando Europa se enfrentaba a escasez de alimentos y al racionamiento, donde la protección de los cultivos y su rendimiento cobraron mayor importancia si cabe. Surgieron los insecticidas orgánicos sintéticos que proporcionaron un control casi completo a un coste reducido debido a la alta eficacia contra las plagas

y/o persistencia [2]. El descubrimiento de las propiedades del insecticida de síntesis dicloro difenil tricloroetano (DDT), realizado por Muller P. y por el cual obtuvo el premio Nobel en 1948 [3], supuso un hito en el control de plagas. Desde entonces, los avances científicos han permitido un mayor conocimiento sobre los posibles efectos negativos derivados del uso de plaguicidas en el medioambiente, biodiversidad y salud humana, que si bien no cuestionan su efectividad para el control de plagas, constituyen un aspecto esencial de la legislación relativa a la autorización de productos fitosanitarios en todo el mundo basada en la evaluación de riesgos.

Aunque los avances respecto al control de plagas han incorporado el uso de insectos beneficiosos y microorganismos como control biológico, los plaguicidas continúan siendo una pieza indispensable para proteger los cultivos de las plagas y los datos así lo confirman. Según Eurostat, oficina de estadística de la Unión Europea (EU), durante el período 2011-2018, las ventas de plaguicidas se mantuvieron estables en torno a los 360 millones de kilogramos/año en la EU. Prácticamente dos tercios de estas ventas de plaguicidas en la EU se realizaron en cuatro países (Francia, España, Italia y Alemania). Estos países representan a las principales áreas agrícolas, con el 51% de la superficie agrícola total utilizada en la EU [4].

Dado el interés que suscita el estudio de los posibles efectos de los plaguicidas sobre la salud humana y el medioambiente, esta Tesis pretende contribuir al conocimiento del comportamiento de las sustancias activas de algunos productos fitosanitarios tras su aplicación en campo, así como al desarrollo y validación de métodos analíticos para su control.

1.1. Definición, clasificación, consumo y usos de los plaguicidas

En general el término plaguicida engloba a cualquier sustancia o conjunto de productos de variada composición y propiedades cuyo fin es combatir alguna plaga [5]. Según el *Codex Alimentarius* [6] se define plaguicida como *“cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga de los cultivos, incluidos los vectores de enfermedades humanas o de animales y las especies no deseadas en plantas o animales que causen perjuicio o interfieran de cualquier forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera, productos de la madera o alimentos para animales, o aquellos que puedan administrarse a los animales para combatir ectoparásitos”*. Este término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. Quedarían excluidos los fertilizantes, aditivos alimentarios, fármacos y nutrientes de origen vegetal o animal.

Establecer una única clasificación para los plaguicidas es bastante complicado debido a la gran variedad existente con propiedades muy diversas. Se podrían clasificar atendiendo a diversos criterios: ámbito de aplicación (uso fitosanitario, ganadero, industria alimentaria, ambiental, higiene o doméstico), toxicidad, naturaleza química (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretrinas, etc.), modo de acción u origen. Una forma útil es hacer una clasificación mixta de las principales clases de plaguicidas (herbicidas, insecticidas y fungicidas), como por ejemplo en función de la naturaleza química y acción biológica (**Tabla 1**) [7].

Tabla 1. Clasificación mixta de los plaguicidas en función de la naturaleza química y acción biológica.

Herbicidas	Insecticidas	Fungicidas
Organoclorados	Piretroides	Azoles / Triazoles
Carbamatos/Tiocarbamatos	Carbamatos	Anilino piridinas
Dinitroanilinas	Organoclorados	Benzimidazoles
Fenoxiácidos	Organofosforados	Carboxiamidas
Piridínicos /Bipiridínicos	Microbiológicos	Fenilamidas
Triazinas		
Ureas		

Los datos de la estadística de comercialización de productos fitosanitarios, considerada una herramienta fundamental dentro del Plan de Acción Nacional (PAN) para el uso sostenible de productos fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, indica un incremento del 1,6 % en el año 2018 [8] respecto al año anterior. El grupo con mayor comercialización ha sido el de los fungicidas con el 52%, seguido de herbicidas con el 23% y de insecticidas que han supuesto el 9%.

Los fungicidas presentan diferentes modos de acción como destruir el micelio y las esporas del hongo, detener su desarrollo e impedir la geminación de las esporas o impedir la reproducción del hongo. Se clasifican en: preventivos (impiden la germinación de esporas) y curativos (penetran en los tejidos vegetales y detienen el crecimiento del micelio del hongo).

La acción de los herbicidas es la de detener el crecimiento no deseado de las malas hierbas, mientras dejan el cultivo relativamente intacto [9]. Debido a que muchos herbicidas al igual que eliminan la mala hierba, también pueden hacerlo con el cultivo o provocarle daños, es importante realizar su aplicación correctamente. Los herbicidas se pueden clasificar según la vegetación afectada (selectivos y no selectivos), según el momento de aplicación

(preemergencia y post-emergencia), según la movilidad dentro de la planta (sistémico o de translocación interna y de contacto) y por último según el proceso fisiológico (hormonales y no hormonales).

Los insecticidas actúan sobre los insectos mediante la inhibición de enzimas vitales del sistema nervioso o muscular, del crecimiento y desarrollo del insecto, de la respiración y del sistema digestivo. Dentro de la gran variedad de compuestos con acción insecticida, se pueden destacar los organofosforados, carbamatos, piretroides e insecticidas microbiológicos.

1.2. Problemática asociada al uso de plaguicidas

Si bien ya se ha mencionado que el uso de plaguicidas en los cultivos ha permitido un incremento de la productividad de las cosechas, no se puede obviar que son considerados compuestos contaminantes. Su uso desproporcionado puede ocasionar la presencia de residuos no deseables de los mismos, tanto en muestras alimentarias (frutas, hortalizas) como ambientales (agua, suelo, aire) suponiendo un riesgo de exposición, que puede dar lugar a problemas relevantes en los ámbitos de la salud pública y laboral. Este riesgo se debe a una combinación de factores como la toxicidad de las materias activas, la concentración de los residuos de plaguicidas y el tiempo de exposición a los mismos. Se puede distinguir entre exposición aguda a una concentración de residuos alta durante un corto periodo de tiempo, o crónica cuando se trata de una exposición a baja concentración de residuos durante periodos de tiempo prolongados. La **Figura 1** muestra un esquema con los posibles destinos que puede tener un plaguicida una vez aplicado [10].

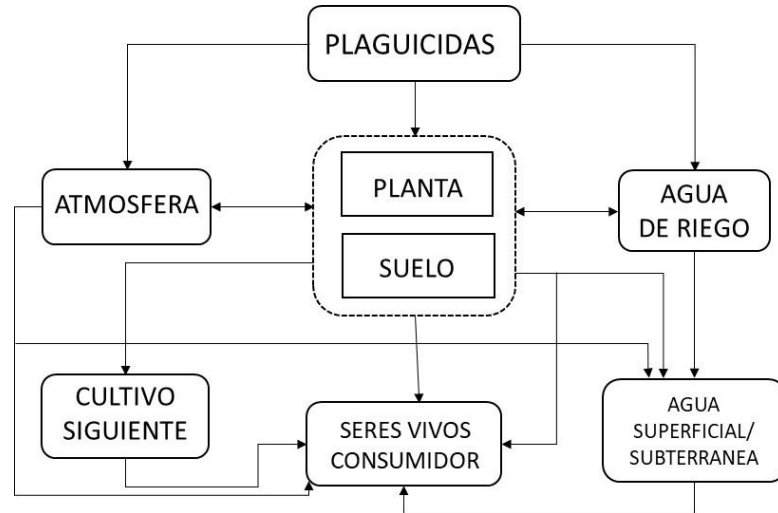


Figura 1. Movimiento de los plaguicidas. Adaptado de Gavrilescu [10]

Como se puede observar en la **Figura 1**, el movimiento de los plaguicidas es muy complejo pudiendo llegar además de al cultivo objetivo, a otros destinos no deseados a través de distintas vías. A modo de ejemplo se puede citar la contaminación del suelo o sustrato en el que se cultiva la planta y el riesgo de exposición de zonas más o menos próximas a la zona donde se aplica debido a la deriva de gotas o de vapor de la aplicación del plaguicida que son transportadas por el aire. Este último proceso, junto a la contaminación de aguas superficiales debido a escorrentías, puede ocasionar la contaminación de ríos y lagos. Por otro lado, las aguas subterráneas pueden ser contaminadas mediante lixiviación (sobre todo de plaguicidas polares), con el consiguiente riesgo de contaminación de acuíferos subterráneos.

La **Figura 2** esquematiza la ruta que pueden seguir los plaguicidas presentes en el medio ambiente, así como los residuos que entran en la cadena alimentaria hasta llegar a los consumidores, lo cual supone un riesgo para la salud humana.

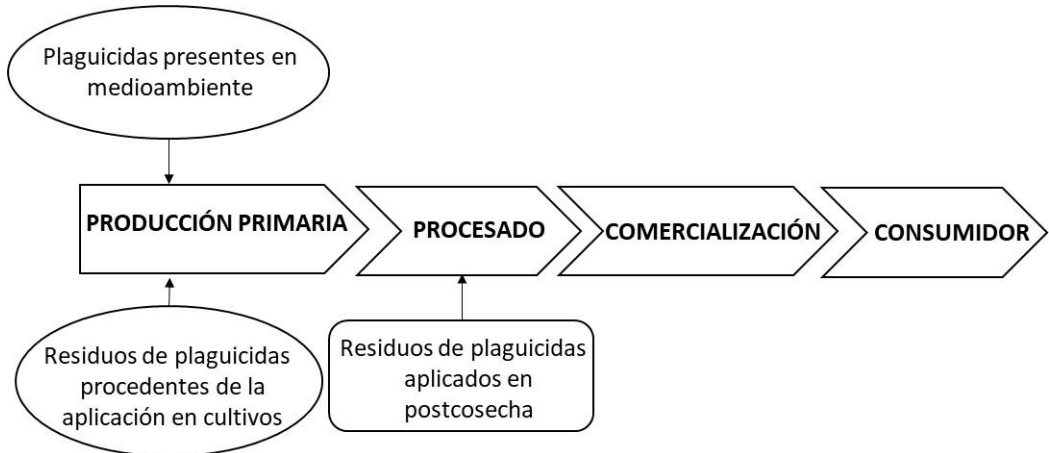


Figura 2. Incorporación de residuos de plaguicidas a la cadena alimentaria

Cabe citar que el riesgo asociado a la presencia de residuos de plaguicidas en alimentos está muy relacionado con su toxicidad, persistencia y mecanismos de degradación, disipación o dilución que tienen lugar en la planta. En función de ello es necesario establecer plazos de seguridad basados en datos científicos que permitan al agricultor cosechar con la garantía de que los niveles de residuos están dentro de lo permitido por la legislación vigente relativa a Límites Máximos de Residuos (LMR). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) fue creada en 2002 como organismo independiente de la Comisión Europea para llevar a cabo, entre otras funciones, la evaluación de riesgos asociados a la utilización de fitosanitarios en la UE [11]. Los consumidores y el medio ambiente pueden verse expuestos a plaguicidas por numerosas rutas, ocasionando una lógica preocupación en la población general por el medioambiente y la inocuidad de los alimentos. La UE tiene registrados alrededor de 1400 plaguicidas, de los cuales 478 disponen de autorización para su uso [12], de composición química muy variada. Por tanto, los efectos tóxicos y los problemas ambientales derivados de su utilización se presentan muy complejos y de diferente naturaleza, lo cual demanda disponer de métodos analíticos que permitan su control.

Es de destacar el papel que juega la Química Analítica en la resolución de problemas ambientales y de salud pública mediante el desarrollo de nuevos métodos analíticos que permiten obtener datos fiables sobre la presencia de plaguicidas en distintos compartimentos ambientales y alimentos y, por tanto, la toma de decisiones soportadas sobre bases científicas [13]. El número de publicaciones científicas en este campo de estudio no ha parado de crecer en las últimas décadas, prueba de la necesidad de conocer todo lo relacionado con posibles efectos adversos del uso de plaguicidas. Los avances tecnológicos han permitido el poder afrontar retos cada vez más complejos, cuya dificultad se incrementa al poner en juego factores como, por ejemplo, la necesidad de bajar cada vez más los límites inferiores de los métodos analíticos para responder a una legislación cada vez más exigente, la de ampliar el alcance de métodos de análisis multiresiduo para determinar de forma rápida, fiable y a un precio razonable el mayor número posible de materias activas con propiedades físico-químicas muy diferentes entre sí y que pueden encontrarse en muestras de naturaleza y composición muy distinta, así como la necesidad de controlar los metabolitos o productos de transformación de los plaguicidas.

1.3. Productos de transformación de plaguicidas: mecanismos

La mayor parte de los estudios realizados para conocer los niveles de plaguicidas tanto en alimentos como en medio ambiente se han centrado en la determinación y control del plaguicida inalterado, siendo menos estudiados los productos de transformación de dicho plaguicida que pueden derivarse del mismo una vez que se aplica el producto fitosanitario por efecto de la luz solar (fotodegradación), biotransformación u otros procesos. El fitosanitario una vez realizado el tratamiento, con el paso del tiempo, va disminuyendo la cantidad de materia activa presente en el medio. Ello puede explicarse a través de dos procesos principales:

a) Procesos de disipación: debido a factores climatológicos como lluvia, humedad, temperatura ambiente o viento, absorción por las plantas o por crecimiento de éstas y sus frutos tratados. Como consecuencia de este proceso va disminuyendo la concentración de la sustancia activa.

b) Procesos de degradación: producidos como consecuencia de la transformación del compuesto original en otros de estructura más sencilla originados por la degradación biológica (metabolismo), o química a través de reacciones de oxidación, hidroxilación, hidrólisis o alquilaciones. Los compuestos derivados de los originales se conocen como productos de transformación (TPs), aunque pueden usarse otros términos como metabolitos [14–16], término que utilizaremos en adelante y por simplificación en esta Tesis. Es importante resaltar que los TPs o metabolitos son en muchos casos más estables y persistentes que el plaguicida del que proceden, incluso pueden llegar a ser más tóxicos que la materia activa inalterada de la que proceden. Si bien el proceso de autorización de las materias activas en la EU es exhaustivo y exige información de metabolitos que potencialmente pueden suponer un riesgo para la salud humana, medioambiente y biodiversidad, los estudios de degradación de productos fitosanitarios aportan una información muy relevante, por ejemplo, de cara a una posterior reevaluación de las autorizaciones. Este tipo de estudios no es muy frecuente y debe considerar la combinación plaguicida-cultivo-agroecosistema en las zonas donde se autoriza la aplicación del fitosanitario [17]. La inclusión de metabolitos no es frecuente en programas de control debido principalmente a dos razones: la escasa disponibilidad comercial de patrones, la falta de información relativa a rutas de degradación o incluso a la falta de métodos de análisis que permitan su determinación.

1.4. Estudios de disipación y de degradación de plaguicidas

Realizar el estudio del comportamiento de un plaguicida mediante estudios de disipación y/o degradación tras su aplicación supone un reto necesario para comprender su destino, identificar los metabolitos y además obtener información útil para la evaluación de riesgos. Los objetivos principales de este tipo de estudios son dos: (i) conocer la variación de la concentración del compuesto original con el tiempo mediante el estudio de disipación, para lo cual, a la información analítica obtenida se aplicarán diferentes modelos cinéticos, y (ii) la elucidación de las rutas de degradación junto a la identificación de aquellos compuestos en los que se ha transformado el plaguicida original.

Para explicar el comportamiento de los datos obtenidos en un estudio de disipación se dispone de expresiones matemáticas o modelos cinéticos que describen y permiten interpretar el cambio en la concentración del plaguicida en función del tiempo. Entre los modelos disponibles, descritos en el informe final del Grupo de Trabajo de la EU sobre cinética de degradación de plaguicidas [14], se diferencian los básicos, como el modelo único de primer orden, otros que pueden describir la cinética de segundo orden y por último los que son adecuados para describir los patrones de degradación con una fase de retardo o degradación bifásica. En el modelo de cinética de primer orden (SFO), el tiempo requerido para una disminución de la concentración en un cierto porcentaje es constante durante todo el experimento e independiente de la concentración inicial del plaguicida. Aunque es el modelo más simple, la disipación no siempre puede ser descrita mediante el mismo.

Otro comportamiento representa una disminución rápida en la concentración inicial de plaguicida, seguida por una disminución más lenta. Este modelo se conoce como modelo bifásico de degradación del plaguicida. Gustafson y Holden (1990) [18] plantearon la hipótesis de que el suelo se trata

de un medio heterogéneo y, por lo tanto, es poco probable que la disipación de un plaguicida ocurra a la misma velocidad dentro de las regiones individuales de la muestra bajo investigación. Este modelo también se conoce como modelo de compartimentos múltiples de primer orden (FOMC). Por último, en el modelo con fase de retardo se mantiene constante la concentración del plaguicida, esta es la fase denominada de retardo, y posteriormente adquiere, bien una cinética de primer orden o un modelo de patrón bifásico (Hockey-Stick Model). En la **Tabla 2** se reúnen las ecuaciones matemáticas para cada uno de los modelos cinéticos.

Tabla 2. Modelos cinéticos de ajuste para la disipación de plaguicidas

Modelo	Ecuación
Cinética de primer orden (<i>Single first order, SFO</i>)	$C=C_o * e^{-kt}$
Cinética de segundo orden (<i>First-Order Multi-Compartment, FOMC</i>)	$C = \frac{C_o}{\left(\frac{t}{\beta} + 1\right)^\alpha}$
Patrón bifásico (<i>Hockey-Stick Model Bi-phase, HS</i>)	$C=C_o * e^{-kt}$ cuando $t \leq t_b$ $C = C_o e^{-k_1 t_b} * e^{-k_2 (t-t_b)}$ cuando $t > t_b$ t_b tiempo al que cambia de fase

C: Cantidad total de plaguicida presente a tiempo t

C_o: Cantidad total de plaguicida presente en el tiempo t = 0

k: Constante

α: Parámetro de forma determinado por el coeficiente de variación de los valores k

β: Parámetro de localización

k₁: Constante hasta que t=t_b

k₂: Constante desde que t=t_b

En cualquier caso, de entre todos los modelos disponibles, se debe de elegir el más simple y que mejor describa el comportamiento de disipación con los datos experimentales obtenidos. Los innumerables estudios de disipación realizados en plaguicidas en diversos escenarios como en campo abierto, bajo el abrigo de un invernadero, en laboratorio simulando las condiciones reales de campo, además de la combinación campo y laboratorio, permiten concluir que el modelo más común para explicar el comportamiento

de un plaguicida es el SFO o modelo simple, tanto en muestras de alimentos como ambientales [19,20]. Aunque algunos plaguicidas han mostrado un comportamiento que se ajusta al modelo FOMC [21–24]. Incluso existe algún estudio de disipación donde los resultados experimentales obtenidos pueden justificarse con ambas cinéticas, SFO y FOMC, como son los casos de Álvarez-Martin et al. en su estudio con cimoxanilo y Mantzos et al. con quizalofop-p [25,26]. Estos estudios se han realizado tanto en matrices ambientales, agua [27–30] y suelo [19–22,24,26,28–35], como alimentarias, cacahuete [32], leguminosas [23,36], cítricos [37,38], hortalizas [33,34,39–42], fruta como uva [31], manzana [35], verdura de hoja como pak choi [19], repollo [43], maíz [44], trigo [30,45], arroz [20] o incluso girasol [25]. En la **Tabla 3** se reúnen ejemplos de estudios de disipación publicados de plaguicidas específicos en distintas matrices ambientales y de alimentos, así como los modelos cinéticos a los que se ajusta su comportamiento de disipación.

En general, en todos estos trabajos el objetivo principal ha sido el estudio del proceso de disipación del plaguicida original, sin incluir sus metabolitos. Para ello es necesario utilizar técnicas modernas y con alta capacidad de identificación, en especial los analizadores de espectrometría de masas (MS).

Tabla 3. Estudios de disipación de plaguicidas y modelo cinético de ajuste en matrices ambientales y alimentarias.

Plaguicida	Matriz	Ensayo	Cinética	Ref.
Anilofos	Arroz, suelo	Campo abierto	SFO	[20]
Metaldehido	Pak choi, suelo	Campo abierto	SFO	[19]
Mecoprop-P, isoproturon, Bentazona, S-metolaclo-ro	Suelo	Campo abierto	FOMC	[21]
Azoxistrobina	Suelo	Laboratorio	FOMC	[22]
Imidacloprid	Frijol	Campo abierto	FOMC	[23]
Atrazina	Suelo	Laboratorio	FOMC	[24]
Cimoxanilo, tebuconazol	Suelo	Laboratorio	SFO y FOMC	[26]
Quizalofop-p etil	Girasol	Campo abierto	SFO y FOMC	[25]
Quizalofop-P	Agua	Laboratorio	SFO	[27]
Azoxistrobina	Uva, suelo	Campo abierto	SFO	[31]
Pirazosulfuron etil	Agua, suelo	Campo abierto y laboratorio	SFO	[28]
Acetamiprid	Suelo y agua	Laboratorio	SFO	[29]
Pendimetalina	Trigo, paja, suelo, agua	Campo abierto y laboratorio	SFO	[30]
Picoxistrobina	Cacahuete, suelo	Campo abierto	SFO	[32]
Spinosad	Frijol	Campo abierto	SFO	[36]
Forclorfenuron	Cítricos	Campo abierto	SFO	[37]
Tiametoxam	Cítricos, suelo	Campo abierto	SFO	[38]
Etoxazol	Pimiento rojo	Invernadero	SFO	[39]
Metalaxilo	Pepino	Invernadero	SFO	[40]
Piridaben, dinotefuran	Berenjena, suelo	Campo abierto	SFO	[33]
Spinosad	Calabacín	Campo abierto	SFO	[41]
Spinetoram	Tomate	Campo abierto	SFO	[42]
Bromotalonil	Manzana, suelo	Campo abierto	SFO	[35]
Flubendiamida	Repollo	Campo abierto	SFO	[43]
Tifluzamida	Maíz	Campo abierto	SFO	[44]
Bifentrina	Trigo	Campo abierto	SFO	[45]
Fluazinam, dimetomorf	Patata, suelo	Campo abierto	SFO	[34]

SFO: Cinética de primer orden.

FOMC: Cinética de segundo orden

En la **Tabla 4** se reúnen estudios en los que, además de los compuestos originales, se han tenido en cuenta metabolitos conocidos cuyos patrones se encuentran disponibles. Estos estudios de disipación y degradación se han realizado tanto en campo/invernadero [46–52] como en laboratorio [51,53–

55], en matrices ambientales de agua o suelo [49,51–56] y alimentarias como frutas, uva [46] o fresa [52], hortalizas, pepino [49] y pimiento [48], arroz [57] y espinaca [47].

Adicionalmente es posible una mayor profundización en los estudios de disipación y degradación no limitándose a la búsqueda de metabolitos conocidos. A tal fin, se ha explorado el potencial de la MS de alta resolución (HRMS), junto con programas informáticos capaces de procesar toda la información obtenida por estos equipos, para estudiar las posibles rutas de degradación de un plaguicida, poniendo especial énfasis en la correcta identificación y confirmación de los compuestos detectados y confirmados, siguiendo criterios de guías europeas. Las metodologías aplicadas permiten el estudio de compuestos desconocidos de los cuales se carece de patrones para poder confirmar su presencia. En la **Tabla 5** se muestran estudios de disipación y degradación de plaguicidas, tanto de matrices ambientales [56,58–62] como alimentarias [62–64], en los cuales se incluye la búsqueda de metabolitos, identificados como desconocidos.

La determinación conjunta de plaguicidas y metabolitos supone un reto, tanto en lo que se refiere a su análisis debido a que están presentes en concentraciones muy bajas, como en lo referente a su extracción y análisis, ya que normalmente poseen una mayor polaridad y por lo tanto una solubilidad diferente a los plaguicidas de los que proceden. Sin embargo, las técnicas analíticas y los actuales avances informáticos permiten hoy día afrontar estos retos que son de sumo interés para caracterizar la exposición del medioambiente y población general y evaluar los riesgos del uso de fitosanitarios, teniendo en cuenta un horizonte de información analítica cada vez más extenso y completo.

Tabla 4. Estudios de disipación y degradación de plaguicidas y metabolitos conocidos junto al modelo cinético en matrices ambientales y alimentarias

Plaguicida	Metabolito	Matriz	Ensayo	Cinética	Ref.
Spiromesifen	Spiromesifen-enol	Tomate, suelo	Campo abierto, Invernadero	SFO	[50]
Amicarbazona	Amicarbazona des-amino Amicarbazona N-metil des-amino	Suelo	Campo abierto, Laboratorio	SFO	[51]
Triadimenol	Triadimefon	Suelo	Laboratorio	SFO	[55]
Isoproturon	Mono-desmetil-isoproturon Didesmetil-isoproturon	Suelo	Laboratorio	SFO	[54]
Famoxadona	1-acetil-2-fenilhidracina 4-fenoxibenzoico ácido	Agua, suelo	Laboratorio	SFO	[56]
Quizalofop-p	Quizalofop-p-etil Quizalofop-tefuril Propaquizafop 2,3-dihidroxiquinoxalina PPA	Suelo	Laboratorio	SFO	[53]
Piraclostrobina, Ciazofamida	CCIM	Uva	Campo abierto	SFO	[46]
Triflumizol	FM-6-1	Fresa, suelo	Invernadero	SFO	[52]
Fluopicolida	2,6-diclorobenzamida	pepino, Suelo	Campo abierto	SFO	[49]
Piraclostrobina Picoxistrobina	BF500-3	Pimiento	Campo abierto	SFO	[48]
Spirotetramat	B-enol, B-keto B-mono, B-glu	Espinaca, suelo	Campo abierto	SFO	[47]

SFO: Cinética de primer orden

Tabla 5. Estudios de disipación y degradación de plaguicidas que incluyen la identificación tentativa de metabolitos “desconocidos”.

Plaguicida	Matriz	Metabolito	Ensayo	Cinética	Ref.
Famoxadona	Agua, suelo	Conocidos + desconocidos	Laboratorio	SFO	[56]
Cletodim	Suelo	Desconocidos	Laboratorio	SFO	[58]
Setoxidim	Suelo	Desconocidos	Laboratorio	SFO	[59]
Prometrina	Suelo	Desconocidos	Laboratorio	SFO	[59]
Dimetaclor	Agua, suelo	Conocidos + desconocidos	Laboratorio	SFO	[60]
Fenamidona	Agua y suelo	Conocidos + desconocidos	Laboratorio	SFO	[61]
Propamocarb	Agua y suelo	Conocidos + desconocidos	Laboratorio	SFO	[61]
Tebufenozida	Repollo	Desconocidos	Campo abierto	SFO	[63]
Quinalfos	Agua, suelo, Tomate, rábano	Desconocidos	Laboratorio Campo abierto	SFO	[62]
Fenamidona	Tomate,	Conocidos + desconocidos	Invernadero	Bifásico	[64]
Propamocarb	pepino, calabacín	Conocidos + desconocidos	Invernadero	Bifásico	[64]

SFO: Cinética de primer orden.

Con todo lo expuesto, una parte de esta Tesis se centra en el problema analítico que plantea la incorporación de metabolitos a la caracterización de procesos de degradación de fitosanitarios en matrices ambientales, como suelo y agua, y alimentarias como frutas y hortalizas. Para ello ha sido necesario: (i) la planificación de ensayos en laboratorio y en campo; (ii) el desarrollo y validación de métodos analíticos para plaguicidas y sus metabolitos conocidos, y (iii) el tratamiento de los datos para conocer el comportamiento de los productos fitosanitarios después de su aplicación en agroecosistemas, incluyendo el estudio de metabolitos desconocidos.

2. Legislación en materia de plaguicidas en el marco de la UE

La protección de la salud de la población general y del medioambiente es un aspecto prioritario para los responsables gubernamentales, de ahí que muchos países dispongan de políticas en materia de seguridad alimentaria implementadas a fin de controlar los niveles de residuos de plaguicidas en productos destinados al consumo humano y animal. La FAO y la Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada (IUPAC) definen el término residuo de plaguicida como *“sustancia especificada presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida. El término incluye cualquier derivado de un plaguicida, como productos de conversión, metabolitos, productos de reacción e impurezas que se consideran de importancia toxicológica”* [5,6]. Los residuos de plaguicidas constituyen una preocupación no sólo para la salud sino también para el comercio por ser una barrera a la comercialización de productos. Esto ha llevado a convertirlo en un problema ambiental y sanitario que despierta un gran interés en el ámbito científico. Los organismos oficiales internacionales han regulado las concentraciones máximas admisibles de plaguicidas en productos agroalimentarios y en aguas, y en menor medida en suelos. La IUPAC [5] define el LMR como la *“concentración máxima de un residuo legalmente permitido o reconocido como aceptable en un alimento, producto agrícola o alimento para animales según lo establecido por el Codex o una autoridad reguladora nacional”*. Los organismos oficiales que regulan los valores de LMRs se basan en datos obtenidos de buenas prácticas agrícolas en el uso de los fitosanitarios. En definitiva y según su definición, aquellos alimentos cuyo contenido en residuos de plaguicidas sea inferior a los valores de LMR serían toxicológicamente aceptables. Por todo ello es necesario la realización de controles del contenido de plaguicidas y sus metabolitos tanto en muestras alimentarias como ambientales y de esta forma verificar que se

encuentran libres de estos compuestos o que su concentración sea inferior al LMR establecido por la legislación.

2.1. Legislación en alimentos

La UE es un mercado único y como tal las mercancías, y por tanto los alimentos, pueden circular y comercializarse libremente en todo su territorio. Las normas, criterios de calidad y seguridad alimentaria aplicables para todos los alimentos destinados al consumo dentro del territorio de la UE están armonizados. La única legislación a escala europea donde se recogen los LMR comunitarios es el Reglamento (CE) nº 396/2005 [65] aplicable desde el 1 de septiembre de 2008, para todos los productos agrícolas destinados a la alimentación humana y a piensos animales, estableciendo el LMR para 381 productos frescos. Los valores de LMR en muchos casos incluyen en su definición la suma de sus metabolitos, en aquellos casos cuya toxicidad está demostrada y supongan riesgo para la salud y el medio ambiente. El Reglamento se refiere a los plaguicidas utilizados en la agricultura dentro o fuera de la UE, en la actualidad o previamente, de manera que, si un plaguicida no se menciona específicamente, se aplica un LMR general por defecto de 0,01 mg/Kg. La UE ha dispuesto una página web que se encuentra actualizada para la consulta de los LMR en vigor: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database> [12]. La evaluación de la seguridad de los consumidores en la UE corresponde a la EFSA [66] que ofrece asesoramiento científico independiente sobre los riesgos relacionados con los alimentos ya sean existentes o emergentes. Su asesoramiento es tenido en cuenta y se aplica en la legislación y en las políticas europeas.

Los agricultores, comerciantes e importadores son responsables de seguir las recomendaciones dadas para la conformidad con los LMRs, mientras

que los Estados Miembros (EM) son responsables del control y cumplimiento de los LMRs de forma coordinada estableciendo:

- Un programa de control oficial donde se establece para cada EM las combinaciones plaguicidas - cultivos que serán supervisadas, así como el número mínimo de muestras a realizar.
- Los resultados de dichos controles serán comunicados al resto de los EM en un informe anual.
- Cuando los resultados de dichos controles incumplen los requisitos, éstos deben ser notificados dentro del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) [67] y se comunican al punto de contacto nacional del RASFF. Este verifica y completa la notificación del RASFF cuando es necesario, la envía a la Comisión Europea y adopta medidas para la protección de los consumidores.

2.2. Legislación en el ámbito medioambiental

Los suelos son la base de la vegetación que allí se cultiva. Así, su preservación es esencial para la seguridad alimentaria y para un futuro sostenible [68], puesto que los cultivos de plantas y por tanto los alimentos producidos en suelos contaminados pueden verse afectados. La calidad del suelo se define como “la capacidad continua del suelo para funcionar como un sistema vivo vital, dentro de las fronteras del ecosistema y del uso de la tierra, para el mantenimiento de la productividad biológica, promover la calidad del aire y del agua y mantener la salud de las plantas, los animales y los seres humanos” [69]. La calidad del suelo es variable y éstos responden de forma distinta conforme a las prácticas implementadas sobre él, pero lo que siempre prevalece es el hecho de que su conservación es fundamental.

Aunque no existe una legislación que regule LMRs de plaguicidas en suelos, sí que existen estrategias para su protección evitando su

contaminación al tratarse de un medio esencial en la naturaleza. La estrategia planteada en el año 2002 por la Comisión Europea sitúa al suelo en el mismo plano que el agua y el aire [70] con un enfoque pragmático en la que adapta las políticas vigentes en materia de suelo, con criterios preventivos e integradores respecto a las políticas de otros sectores que también se ven implicados en el mismo. Los procesos que permiten la formación del suelo y su regeneración son extremadamente lentos, lo que lo convierte en un recurso no renovable [71].

En 1972 la UE redactó la “Carta Europea de Suelos” donde se declaró que el suelo debe ser protegido contra la erosión, contaminación y daños causados por el desarrollo urbano y las prácticas agrícolas [72].

Además de las que tratan específicamente a los suelos, en la UE existen otras políticas que velan por la protección de este medio. Estas políticas afectan fundamentalmente al medio ambiente y a la agricultura (política agroambiental), contribuyendo a la lucha contra el cambio climático y la gestión sostenible de los recursos naturales. Entre ellas citar, la política agraria común (PAC) [73] o normativas sobre agricultura ecológica [74] y sistemas agrícolas de producción integrada [75] que pueden tener un efecto positivo sobre el estado y conservación de los suelos. En general las disposiciones adoptadas para la protección del suelo también tienen como objetivo la protección de otros medios naturales. Concretamente la Directiva sobre responsabilidad medioambiental [76] que establece un marco armonizado para el régimen de responsabilidad aplicable cuando la contaminación del suelo provoque un riesgo grave para la salud humana. A nivel nacional, el Real Decreto 9/2005 [77] establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. En dicho Real Decreto se incluyen niveles genéricos de

referencia de un limitado listado de sustancias químicas peligrosas, con los que se realiza la evaluación de la contaminación del suelo.

En cambio, la protección de las aguas juega un papel importante en la política comunitaria de medio ambiente de la UE. El marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas viene regulado en la Directiva 2000/60/CE [78]. Mediante esta Directiva marco, la UE organiza la evaluación, vigilancia y gestión de las aguas superficiales, continentales, de transición, aguas costeras y subterráneas en relación con su condición ecológica y química, con el fin de prevenir y reducir su contaminación, fomentar su uso sostenible, proteger el medio acuático, mejorar la situación de los ecosistemas acuáticos y paliar los efectos de las inundaciones y de las sequías. La concentración máxima o valor paramétrico de plaguicidas permitida en aguas está regulada para evitar la contaminación de los ecosistemas acuáticos, evitando así el riesgo para la salud humana. La Directiva 98/83/CE [79] establece que la concentración individual de plaguicidas en agua potable no puede exceder la concentración de 0,1 µg/L, y la suma de todos los plaguicidas detectados de 0,5 µg/L; estos valores son aplicables al agua superficial cuando esta va a ser utilizada como agua de bebida. La Directiva 2000/60/CE fue modificada por las Directivas 2008/105/CE [80] y 2013/39/UE [81] en las que se establecieron límites para 45 sustancias en diferentes masas de agua continentales, aguas superficiales continentales, aguas de transición, aguas costeras y aguas subterráneas.

La exigencia de la legislación, cada vez más restrictiva respecto a la presencia de residuos de plaguicidas en cualquier compartimento ambiental o en alimentos, ha tenido respuesta en el desarrollo de técnicas y métodos analíticos, cada vez más robustos, sensibles y fiables que garantizan el cumplimiento de los requisitos legales.

Considerando la importancia ambiental de los suelos y aguas, así como su relación con la producción de frutas y hortalizas, ambos compartimentos ambientales han sido objeto de estudio en esta Tesis.

3. Métodos de extracción

Uno de los problemas más frecuentes en el campo del análisis de plaguicidas es que existen una gran variedad de familias de sustancias activas con diferentes propiedades físicas y químicas. La optimización de un único método que permita la extracción de todas ellas no es posible. La estrategia más frecuente para abordar este problema es la de recurrir a métodos genéricos que permitan la extracción de un gran número de compuestos de distintas familias. Sin embargo también son necesarios métodos específicos para compuestos que no se extraen con métodos genéricos o son difíciles de analizar, como pueden ser plaguicidas ácidos, o plaguicidas y sus metabolitos, entre otros [82]. En la presente Tesis, en primer lugar, se realizó la optimización de métodos de extracción para plaguicidas específicos, incluyendo metabolitos conocidos, mediante cromatografía de líquidos (LC) acoplada a MS (LRMS y HRMS) y, en segundo lugar, se ha explorado el potencial de un método de extracción genérico para la extracción de un elevado número de plaguicidas y su análisis mediante cromatografía de gases (GC) acoplada a HRMS.

Una vez se da entrada a la muestra en el laboratorio, el esquema general de procedimiento para la determinación de residuos de plaguicidas en distintas matrices comprende generalmente las siguientes etapas: (i) preparación de la muestra, (ii) determinación cromatográfica y (iii) cuantificación/confirmación de los analitos.

3.1. Preparación de muestras

La determinación de plaguicidas en alimentos y muestras ambientales a bajas concentraciones es siempre un desafío [83]. La preparación de muestra suele ser una etapa lenta y tediosa, estimándose que representa dos tercios del tiempo total de análisis y, lo que es más importante, se considera la principal fuente de errores. Sin embargo, esta etapa es fundamental para la posterior de separación cromatográfica. La finalidad de la preparación de la muestra es el aislamiento de los analitos de interés evitando, en la mayor medida posible, los componentes de la matriz que actuarán como interferentes en la determinación. Otro objetivo es la concentración de los mismos en el extracto mediante etapas de preconcentración, sobre todo cuando se encuentran a concentraciones muy bajas, evitando cualquier pérdida o degradación del analito. Durante la preparación de muestras son frecuentes operaciones como reducción del tamaño de las mismas, trituración, homogeneización, diferentes tipos de extracción, limpieza y concentración [84]. De forma general, la mayoría de estos métodos de preparación de muestra requieren de las siguientes etapas:

a) Homogeneización. Se trata del proceso de transformación de la muestra en una parte representativa y homogénea del total de la misma. Las muestras sólidas son sometidas a un triturado con el fin de aumentar su área superficial y facilitar la siguiente etapa, en el caso de suelos se tamizarán con tamiz de tamaño de rejilla 0.2 mm para retirar restos de plantas y piedras.

b) Extracción de analitos de interés. En matrices sólidas alimentarias o ambientales esta etapa suele realizarse adicionando a la muestra el disolvente o mezcla de disolventes de extracción, aplicando algún proceso (agitación) con el cual se favorece la migración de los analitos desde la matriz a la mezcla de extracción [83]. Existen distintas técnicas de extracción en función del estado de la muestra, si es sólida (vegetales, suelo), líquida (agua, zumo) o gaseosa

(aire). En el caso de muestras sólidas, la extracción con un disolvente orgánico o sólido-líquido (SLE) [85–88], es la más común. Para muestras líquidas, las técnicas de extracción más frecuentes son extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE) [89,90] y microextracción en fase sólida (SPME) [91,92].

c) Limpieza. Etapa cuyo objetivo es eliminar compuestos co-extraídos de la matriz que actúan como interferentes en la cuantificación de los analitos de interés. La SPE, en su versión en línea (*on-line SPE*) y convencional (*off-line SPE*), se emplea tanto para la preconcentración de los analitos como para la limpieza del extracto. Asimismo se aplica la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE), que constituye una alternativa a la SPE convencional puesto que no se produce dilución del extracto y proporciona extractos limpios [93]. En extractos con escasa presencia de interferentes de la matriz, la etapa de limpieza no sería necesaria; también es prescindible en aquellos casos en los que se puede conseguir la selectividad suficiente en la misma etapa de medida, cuando el detector es capaz de distinguir el compuesto o los compuestos de interés del resto de componentes de la matriz, como ocurre en determinados modos de trabajo en MS.

En lo que sigue nos centraremos en las técnicas de extracción para muestras sólidas con disolventes orgánicos o SLE y líquidas mediante SPE por ser las utilizadas en esta Tesis. Un reto importante abordado ha sido la extracción conjunta de compuesto progenitor y metabolitos debido principalmente a las diferentes propiedades físico-químicas que presentan.

3.1.1. Extracción con disolventes o sólido-líquido

Es el método de extracción más utilizado para la extracción de plaguicidas de muestras sólidas ya que resulta ser simple, robusto y eficaz. El factor clave de su éxito es la selección del disolvente orgánico, puesto que los analitos deben de ser solubles en el mismo, aunque la elección se hará en función de la combinación matriz-analito de interés. Además, se ha de tener en cuenta la técnica cromatográfica a aplicar para inyectar la muestra directamente y evitar cambiar de disolvente. Merece especial mención el método de extracción QuEChERS, acrónimo que indica sus principales características: rápido, fácil, barato, robusto y seguro (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe), publicado por primera vez en 2003 por Anastasiades et al. [93]. El método QuEChERS se basa en una primera etapa de SLE, básicamente se trata de poner en contacto la muestra con el disolvente apropiado. Dicho método permite extraer plaguicidas con un amplio rango de polaridades. El uso de acetonitrilo como disolvente está muy extendido al tratarse de un disolvente miscible con el agua con lo cual puede penetrar en la parte acuosa de la muestra y a la vez es relativamente fácil de separar de ésta. La etapa siguiente de partición líquido-líquido (LLP), en la que los analitos de interés se distribuyen entre dos fases inmiscibles (fase orgánica y acuosa), permite eliminar el agua procedente de la matriz con la adición de sales como sulfato magnésico anhidro ($MgSO_4$), que produce una reacción exotérmica lo que facilita la extracción de los plaguicidas. Otra sal como el cloruro sódico (NaCl) favorece en esta etapa la extracción de los analitos más polares. Tras eliminar la fase acuosa, previa centrifugación, se aplica una etapa de limpieza para eliminar agua residual y otros interferentes de la matriz presentes. Esta limpieza se realiza mediante dSPE con adsorbentes como $MgSO_4$ y amina primaria secundaria (PSA) o incluso C18, los cuales se adicionan directamente al extracto de la muestra y mediante agitación y posterior centrifugación se realiza la limpieza. Finalmente, el extracto se encuentra listo para el análisis

cromatográfico, aunque todavía puede ser necesario el cambio de disolvente para adaptarse a las condiciones del método de análisis.

El procedimiento QuEChERS, originalmente fue desarrollado para la extracción de plaguicidas en frutas y hortalizas, se ha extendido hasta llegar a ser el más usado en el campo de análisis de residuos de plaguicidas, tras introducir modificaciones que han permitido ampliar y mejorar su alcance. Entre las modificaciones más extendidas citar las dos siguientes. La versión QuEChERS tamponada, que utiliza acetonitrilo acidificado al 1% con ácido fórmico y acetato de sodio como tampón que sustituye la sal de NaCl; versión adoptada como método oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) de Estados Unidos [94]. Por otro lado, la modificación conocida como QuEChERS tamponado con citrato o método europeo porque se trata del método de la norma UNE-EN 15662:2019 [95]. En esta norma se describe la utilización de acetonitrilo, pero para la partición LLE, además de $MgSO_4$ y NaCl, se adiciona hidrogenocitrato disodio sesquihidratado y citrato trisodio dihidratado. En la **Figura 3** se puede observar una comparación de estos tres métodos oficiales.

	QuEChERS original	QuEChERS Tamponado (AOAC 2007)	QuEChERS Tamponado (EN 15662)
Extracción	10 g muestra 10 mL Acetonitrilo Agitar vigorosamente 1 min	15 g muestra 15 mL Acetonitrilo acidificado al 1% con ácido fórmico Agitar vigorosamente 1 min	10 g muestra 10 mL Acetonitrilo Agitar vigorosamente 1 min
	4 g $MgSO_4$ 1 g NaCl Agitar vigorosamente 1 min Centrifugar 5 min	6 g $MgSO_4$ 1,5 g Acetato sódico Agitar vigorosamente 1 min Centrifugar 5 min	4 g $MgSO_4$ 1 g Citrato trisodio dihidrato 3,5 g Hidrogenocitrato disodio sesquihidratado Agitar vigorosamente 1 min Centrifugar 5 min
Limpieza	1 mL sobrenadante 25 mg PSA 150 mg $MgSO_4$ Agitar 30 s Centrifugar 1 min	1 mL sobrenadante 50 mg PSA 150 mg $MgSO_4$ 50 mg C18 (opcional) Agitar 30 s Centrifugar 1 min	1 mL sobrenadante 25 mg PSA 150 mg $MgSO_4$ Agitar 30 s Centrifugar 1 min

Figura 3. Comparativa de métodos QuEChERS

El método es tan versátil que permite flexibilidad en los pasos a seguir para adaptarse tanto a la naturaleza química del analito a extraer o a la complejidad de la matriz como pueden ser las que tienen alto contenido en grasa [96,97]. Además, la adición de patrones o estándares internos permiten minimizar los posibles errores que tienen lugar en las distintas etapas del procedimiento.

3.1.2. Extracción en fase-sólida (SPE)

Esta técnica empezó a usarse de forma creciente a partir de 1980, fundamentalmente debido a los problemas ambientales que generaba el uso de grandes volúmenes disolventes orgánicos en técnicas como la LLE [97,98]. Su aplicación más frecuente es como técnica de extracción de muestras líquidas, ejerciendo un doble papel en la extracción/concentración de analitos y limpieza del extracto. Se basa en la retención selectiva de analitos en un adsorbente sólido que está dispuesto en un cartucho o en un disco de extracción y su posterior elución con un pequeño volumen de disolvente adecuado.

El procedimiento consta de 4 etapas: (i) acondicionamiento donde se activa el material adsorbente haciendo pasar por el cartucho/disco que lo contiene un disolvente o mezcla de disolventes; (ii) carga de la muestra en el cartucho/disco, los analitos de interés quedan retenidos en el material adsorbente junto con otros componentes de la matriz; (iii) etapa de lavado con la que se consigue eliminar interferentes retenidos en el cartucho/disco y (iv) elución de los analitos de interés con un volumen pequeño de un disolvente adecuado.

3.2. Aplicación de los métodos de extracción a plaguicidas

El método de extracción de plaguicidas más empleado, al menos desde el 2003, es el QuEChERS. En la **Tabla 6** se resumen distintas combinaciones plaguicida-matriz sólida en las que se ha utilizado QuEChERS en muestras similares a las consideradas en esta Tesis, tanto en métodos monoresiduo como multiresiduo. El acetonitrilo ha sido el disolvente de extracción más ampliamente utilizado, en matrices de alimentos con métodos monoresiduo [37,40,43,45], multiresiduo [48,64,99–102], también en suelo [51], así como en la combinación de matrices alimentarias y ambientales en métodos monoresiduo [41,44,47,49] como multiresiduo [34,103]. También se ha utilizado acetonitrilo tamponado con ácido acético en muestras de alimentos, en métodos multiresiduo [104–108], monoresiduo [109], y de suelo y agua [56], así como en el estudio para la extracción tanto en muestras ambientales como vegetales [50]. Asimismo se ha usado acetonitrilo tamponado con ácido fórmico [32,57] en distintas proporciones en métodos monoresiduo en matrices vegetales y ambientales. En menor medida también se han utilizado otros disolventes, como acetato de etilo [35,86,110,111] o acetona [29,31,112]. En muestras ambientales destaca el uso de metanol como disolvente de extracción tanto en estudios de extracción de plaguicidas de suelos como de aguas [54,58,60,61].

Como puede observarse, estas combinaciones son muy diversas, aplicándose a matrices con alto contenido en ácido, como son los cítricos [37]; matrices con bajo contenido en agua como trigo y arroz [49,57]; con alto contenido en grasa como cacahuete [62]; vegetales de hoja con alto contenido en clorofila como son espinacas [47] e incluso, fuera del ámbito alimentario, en suelos [51].

En la **Tabla 7** se reúnen diferentes estudios en los que se ha empleado la técnica de SPE para la extracción de plaguicidas en agua. Puede observarse

que hay estudios cuyo objetivo es la extracción de un solo plaguicida [25], o un grupo de ellos [113], así como otros en los que se incluyen además del plaguicida principal sus metabolitos [27,56,60,61].

Tabla 6. Aplicación del QuEChERS para la extracción de plaguicidas y metabolitos en muestras alimentarias y ambientales.

Plaguicida	Matriz	Disolvente	Ref.
Forclorfenuron	Cítricos	Acetonitrilo	[37]
Metalaxilo	Pepino	Acetonitrilo	[40]
Flubendiamida + metabolitos	Repollo	Acetonitrilo	[43]
Bifentrina	Trigo	Acetonitrilo	[45]
Amicarbazona + metabolitos	Suelo	Acetonitrilo	[51]
Spinosad	Calabacín, suelo	Acetonitrilo	[41]
Tifluzamida	Maíz, suelo	Acetonitrilo	[44]
Fluopicolida + metabolitos	Pepino, suelo	Acetonitrilo	[49]
Spirotetramat + metabolitos	Espinaca, suelo	Acetonitrilo	[47]
Fluazinam, dimetomorf	Patatas, suelo	Acetonitrilo	[34]
Piraclostrobina, picoxistrobina + metabolitos	Pimiento	Acetonitrilo	[48]
Triflumizol, boscalida + metabolitos	Fresa, suelo	Acetonitrilo	[103]
Fenamidona, Propamocarb + metabolitos	Tomate, pepino, calabacín	Acetonitrilo	[64]
9 plaguicidas + metabolitos	Uvas	Acetonitrilo	[99]
448 plaguicidas	Manzana, plátano, uva, naranja, fresa	Acetonitrilo	[100]
210 plaguicidas	Frutas, vegetales	Acetonitrilo	[101]
15 plaguicidas	Comida infantil	Acetonitrilo	[102]
317 plaguicidas	Frutas, vegetales	Acetonitrilo + 1% ácido acético	[105]
Kresoxim metil	Manzana	Acetonitrilo + 1% ácido acético	[109]
Spiromesifen + metabolitos	Tomate, Suelo	Acetonitrilo + 1% ácido acético	[50]
569 plaguicidas	Madreselva	Acetonitrilo + 1% ácido acético	[104]
Plaguicidas, medicamentos veterinarios, contaminantes de envases de alimentos	Comida infantil	Acetonitrilo + 0.1% ácido acético	[107]

Plaguicida	Matriz	Disolvente	Ref.
86 plaguicidas y 8 PCBs	Trigo, legumbres, harina de semillas de girasol, cáscaras de soja, maíz	Acetonitrilo + 1% ácido acético	[106]
Plaguicidas, medicamentos veterinarios, contaminantes de envases de alimentos, micotoxinas y otros contaminantes + metabolitos	Tomate, naranja, comida infantil	Acetonitrilo + 0.1% ácido acético	[108]
Famoxadona + metabolitos	Suelo, agua	Acetonitrilo + 1% ácido acético	[56]
Picoxistrobina	Cacahuete, suelo	Acetonitrilo + Agua-0.1% ácido fórmico	[32]
Trifloxistrobina + metabolitos	Arroz, suelo	Acetonitrilo + 0.01% ácido fórmico	[57]
Bromotalonil	Manzana, suelo	Acetato de etilo	[35]
Azoxistrobina	Granada	Acetato de etilo	[86]
Carbendazima			
Difenoconazol			
Fluopyram	Pimiento picante	Acetato de etilo	[110]
Tebuconazol			
Plaguicidas	Frutas cítricas	Acetato de etilo	[111]
Azoxistrobina	Uva, suelo	Acetona	[31]
Acetamiprid	Suelo	Acetona	[29]
Clorpirifos, cipermetrin	Pimiento rojo	Acetona	[112]
Isoproturon + metabolitos	Suelo	Metanol	[54]
Cletodim, setoxidim	Suelo	Metanol	[58]
Dimetaclor + metabolitos	Suelo, agua	Metanol	[60]
Fenamidona, propamocarb + metabolitos	Suelo	Metanol	[61]

PCBs: Bifenilos policlorados

Tabla 7. Extracción SPE para plaguicidas y metabolitos en agua.

Plaguicida	Matriz	Extracción SPE	Ref.
Quizalofop-p etil	Agua	Cartuchos OASIS-HLB	[25]
Quizalofop-p + metabolitos	Agua	Cartuchos OASIS-HLB	[27]
Famoxadona + metabolitos	Agua	Cartuchos OASIS-HLB	[56]
Dimetaclor + metabolitos	Agua	Cartuchos OASIS-HLB	[60]
Fenamidona, propamocarb + metabolitos	Agua	Cartuchos OASIS-HLB	[61]
6 plaguicidas	Agua	Cartuchos OASIS-HLB	[113]

4. Métodos de análisis. Determinación instrumental

La elección de la técnica instrumental para la determinación de plaguicidas va a depender de factores como propiedades de los analitos, efectividad, rapidez, fiabilidad, selectividad y sensibilidad, coste, disponibilidad o capacidad de análisis. Durante mucho tiempo la técnica cromatográfica más empleada para el análisis de plaguicidas ha sido la GC, dada su elevada sensibilidad y selectividad en la detección de este tipo de compuestos. Sin embargo, debido a la incompatibilidad de algunos plaguicidas con la técnica de GC, como son los compuestos de mayor polaridad, baja volatilidad e inestabilidad térmica, en los últimos años se ha incrementado el uso de LC; siendo ésta también la técnica más utilizada para la determinación de metabolitos.

4.1. Cromatografía de gases y líquidos

El fundamento básico de las técnicas cromatográficas es la de hacer pasar una fase que contiene la muestra (fase móvil) a través de otra fase que se encuentra inmovilizada (fase estacionaria) en una dirección definida, lo cual provocará la separación de los analitos a distintos tiempos de elución.

En GC la muestra líquida tras ser volatilizada se inyecta en la columna cromatográfica y posteriormente es arrastrada por la fase móvil, que es un gas inerte por lo que no interacciona con el analito.

En LC la muestra líquida se inyecta y es arrastrada hacia la columna por la fase móvil, que en este caso es líquida y normalmente está constituida por una mezcla de disolventes. La elección de la fase estacionaria (relleno, longitud y tamaño de partícula) y de la fase móvil son los factores determinantes en la eficacia de la separación. Los avances en LC se han centrado fundamentalmente en obtener separaciones rápidas con adecuada sensibilidad y selectividad. En este sentido la cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) ha permitido el aumento de la resolución y la disminución de los tiempos de análisis con el uso de columnas relativamente cortas y empaquetadas con fases estacionarias de tamaño de partícula inferior a 2,0 μm [114].

4.2. Espectrometría de masas

Al final de la columna cromatográfica, ya sea en sistemas de GC o LC, los analitos ya separados van llegando al sistema de detección. En las últimas décadas, los detectores utilizados para la determinación de plaguicidas a niveles de concentración traza, ya sea en muestras de alimentos como ambientales, han ido evolucionando desde los clásicos, como son el de captura de electrones (ECD), nitrógeno-fosforo (NPD), diodo-array (DAD) o ultravioleta (UV), cuya selectividad y sensibilidad están muy alejadas de las que se consiguen actualmente con los analizadores de MS.

El acoplamiento de la cromatografía con la MS combina el poder de separación de la primera junto con la información estructural que proporciona la segunda, permitiendo la separación, cuantificación e identificación de analitos en un solo análisis. Los analizadores de MS realizan la separación de los iones en función de su relación masa/carga, expresada como m/z . Existen

varios tipos de analizadores de MS que pueden agruparse en dos grandes grupos, en función del poder de resolución: los analizadores de LRMS y los de HRMS. Los primeros permiten separar iones que se diferencien en, al menos, una unidad de m/z , mientras que los de HRMS permiten discriminar entre iones con una diferencia menor a una unidad de m/z .

4.2.1. Espectrometría de masas de baja resolución

Los analizadores de LRMS son muy adecuados para el análisis de plaguicidas, siendo asequibles para los laboratorios de control y suficientemente sensibles y robustos para cuantificar residuos de plaguicidas en concentraciones acordes a la legislación vigente. Sin embargo, su uso en la determinación de metabolitos y compuestos desconocidos es más limitado, sobre todo para aquellos casos en los que no hay disponibilidad de patrones. En relación a los analizadores usados LC-MS, hay una gran variedad, entre los que se encuentran: cuadrupolo simple (Q), triple cuadrupolo (QqQ), híbridos como cuadrupolo-trampa de iones lineal (Q-TRAP) y para el caso de GC-MS destacar el de Q y QqQ.

4.2.2. Espectrometría de masas de alta resolución

La HRMS se ha considerado una herramienta complementaria de los analizadores convencionales de QqQ. Lehotay et al. [115] ya la describían en 2002 como una técnica rápida, muy interesante y que sería ampliamente utilizada en el futuro en aplicaciones alimentarias. La mayoría de artículos científicos en los que se menciona la HRMS destacan su potencial para la determinación de una gran cantidad de plaguicidas y metabolitos a niveles traza en muestras complejas, debido fundamentalmente a su elevada selectividad comparada con otros sistemas de detección, incluyendo los de LRMS. No obstante su principal problema ha sido el alto coste y la complejidad de su manejo [53]. Entre los analizadores más utilizados en análisis de

plaguicidas, tanto en GC como LC, destacan los de tiempo de vuelo (TOF) [116], Orbitrap [117], e híbridos como cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) [118] o Q-Orbitrap [119].

En 2005 se publicó el primer método multirresiduo que utilizó LC-TOF-MS (tiempo de vuelo) para la determinación de 15 plaguicidas en alimentos con fines cuantitativos [120]. A partir de ahí la mejora de nuevas generaciones de instrumentos incrementaron considerablemente su sensibilidad y selectividad. De igual forma el desarrollo de herramientas de *software* de procesado de la información generada en escaneo completo o *full scan* (FS) sin fragmentación, es decir *software* avanzado de deconvolución y detección en bases de datos o bibliotecas espectrales, ha permitido aumentar el potencial y la robustez de este enfoque y aplicarlo a la determinación de plaguicidas en muestras vegetales [120].

El analizador de HRMS de desarrollo más reciente es el Orbitrap. El principio básico del mismo es emplear la captura de iones en campos electrostáticos, junto con un sofisticado proceso de inyección de iones, que permite alta resolución, precisión de masas y excelente sensibilidad para abordar numerosas aplicaciones analíticas tanto en investigación como en análisis de rutina [15]. La primera versión comercializada constaba de una trampa de iones lineal acoplada al Orbitrap por medio de un cuadrupolo (LTQ-Orbitrap). Más tarde se comercializó el modelo Exactive-Orbitrap, más sencillo y que eliminaba la trampa lineal. Posteriormente, desde 2011 se comercializan analizadores híbridos Q-Orbitrap acoplados a LC, conocidos como Q-Exactive. Dicho analizador incorpora un filtro de masas cuadrupolar, que permite realizar una selección de iones precursores con detección de masa exacta de alta resolución y también permite la adquisición simultánea de MS en escaneo completo y MS/MS con lo que se mejora la selectividad. El gran potencial de estos analizadores es la posibilidad de

realizar análisis retrospectivos, es decir, una vez realizado el análisis y, gracias a la adquisición en modo FS, es posible extraer datos de masa exacta y fragmentación de todo el registro sin tener que realizar una adquisición instrumental adicional. Ello asimismo posibilita la detección de un número ilimitado de compuestos. Esta posibilidad es muy útil cuando se trata de realizar búsquedas de compuestos cuya presencia no es frecuente en las muestras y que por tanto no se encuentran incluidos en los alcances habituales de métodos de rutina.

Los equipos de GC acoplados al analizador Q-Orbitrap se comercializan desde 2015 [15], adquiriendo desde entonces una gran importancia en el análisis de residuos de plaguicidas en muestras alimentarias.

El empleo de la HRMS ha permitido el desarrollo de distintas estrategias analíticas para poder hacer frente a los desafíos actuales en materia de control de plaguicidas. Estas estrategias que pueden ser combinadas entre sí son [121]:

i) Análisis dirigidos (*target*): se trata del modo “convencional” de trabajo, que ha sido y sigue siendo el más utilizado en el campo del análisis de residuos de plaguicidas. Consiste en seleccionar previamente una lista de compuestos objetivo a determinar en las muestras, plaguicidas para los cuales se tiene conocimiento de su uso, se detectan con frecuencia o bien se tiene interés en su control. Se realiza la caracterización espectrométrica y cromatográfica de los compuestos con el uso de patrones puros de los analitos objeto de estudio, obteniéndose información de masa exacta, tiempo de retención, fragmentos y perfil isotópico de los mismos. La Guía SANTE [122] indica los criterios de identificación mediante el uso de los analizadores de HRMS, requiriéndose un mínimo de dos iones diagnóstico (el ion quasi molecular y un fragmento) con un error de masa inferior a 5 ppm.

ii) Análisis no dirigido (*non-target*), que puede ser de dos tipos:

- a) Análisis de sospechosos (*suspect screening*): se basa en el uso de bibliotecas espectrales que contienen una lista de compuestos (plaguicidas, metabolitos, etc.) más o menos extensa y de interés a buscar en las muestras objeto de estudio. Existen bibliotecas comerciales, pero también pueden construirse a partir de estándares o incluso a partir de datos encontrados en bibliografía. La base de datos contiene información de la masa exacta del ion precursor, iones fragmento (dependientes de la energía de colisión), aductos y el modo de ionización utilizado.
- b) Análisis de desconocidos (*unknown*): se basa en la búsqueda de cualquier compuesto no esperado o desconocido que pueda estar presente en las muestras. A tal fin se requiere el uso de bases de datos espectrales, realizando la elucidación a partir de la masa exacta y el perfil isotópico de fragmentación del compuesto candidato.

Tanto el análisis de sospechosos como el de desconocidos realizan la identificación tentativa de compuestos a partir de los registros obtenidos en FS de interés, tras ser procesados con programas informáticos específicos y uso de bases de datos. La identificación definitiva requiere disponer de patrones para realizar la confirmación de dichos compuestos.

Por otro lado, una de las ventajas de la HRMS es que permite hacer análisis retrospectivo (*retrospective o post-target*), se trata de la posibilidad de realizar una nueva búsqueda de compuestos sobre los datos de adquisición obtenidos en FS. La ventaja de esta estrategia es que no es necesario volver a inyectar la muestra. Los compuestos serán seleccionados a posteriori, se podría decir que se trata de un análisis dirigido pero realizado a posteriori.

El uso del análisis retrospectivo se ha centrado principalmente en la identificación de metabolitos [123,124]. A través del conocimiento adquirido sería posible plantear dos estrategias de análisis retrospectivo que podrían emplearse en el futuro; una para la detección de metabolitos de plaguicidas que evidenciaría la utilización de tratamientos no permitidos por ejemplo en agricultura ecológica [99], y otra en estudios de biomonitorización donde la presencia de éstos se consideraría como marcadores de exposición a los plaguicidas de los que provienen [125].

En la **Figura 4** se representa de forma esquemática las distintas estrategias en el procesado de datos que se pueden dar con la HRMS.

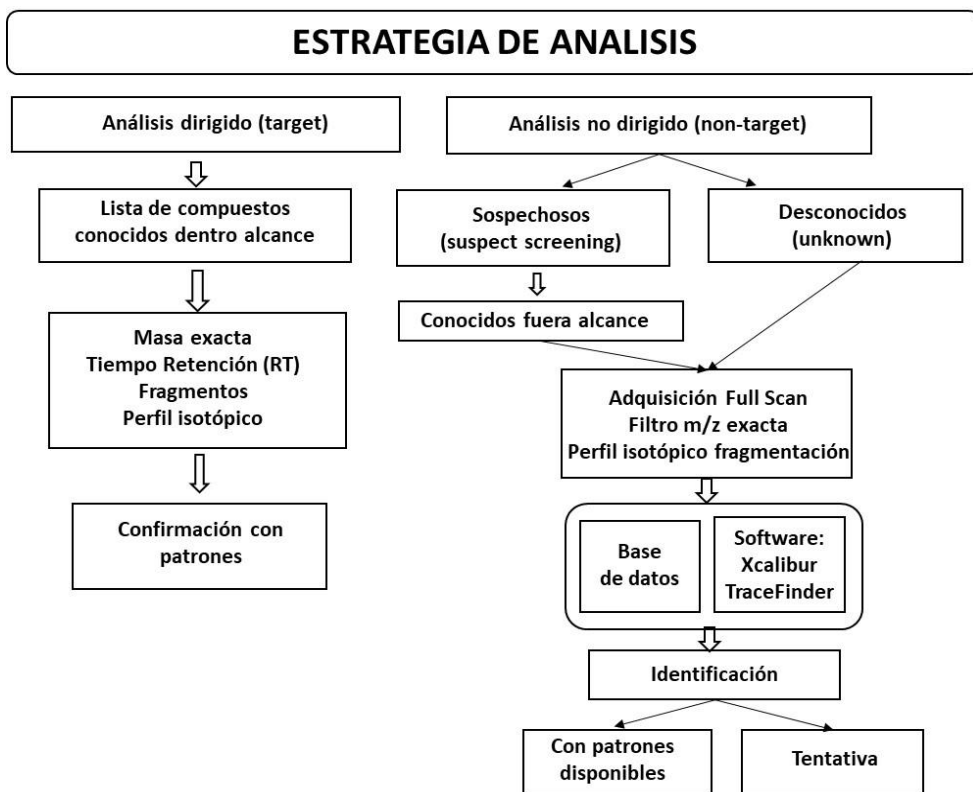


Figura 4. Estrategias de análisis en HRMS (adaptado de la referencia [126])

Haciendo una simplificación del flujo de trabajo en el análisis no dirigido podemos decir que se trata de la adquisición de señales en alta resolución, procesamiento de dichas señales con softwares específicos y posterior elucidación molecular frente a bases de datos que permitirán asignar una estructura y una puntuación en función del grado de coincidencia. Aunque se trata de una herramienta muy útil, va a generar una gran cantidad de coincidencias de compuestos con la fórmula molecular asignada por lo que se requerirá realizar una búsqueda manual entre los posibles compuestos candidatos. La asignación de un compuesto a partir de un conjunto de señales de MS no es trivial, al contrario, es tediosa y requiere un procesamiento de datos complejo que consume mucho tiempo y destreza del analista. Por estas razones es de gran importancia desarrollar flujos de trabajo automatizados en los que se optimicen parámetros con los que reducir el número de coincidencias, minimizando en lo posible la siempre necesaria revisión manual de los resultados obtenidos. Las herramientas de *software* disponibles comercialmente, están haciendo un buen progreso en la automatización del análisis no dirigido, pero estos avances no son todavía suficientes y aún se necesita procesar y revisar manualmente los datos generados ya que la confianza de las identidades químicas asignadas es un tema crucial.

La estrategia no dirigida también presenta algunas limitaciones en cuanto que se carece generalmente de los patrones de los compuestos, pero permite una identificación tentativa de analitos potencialmente presentes en las muestras, que sirven como base para que el laboratorio pueda seleccionar qué patrones adquirir en el futuro, contribuyendo, por ejemplo, a la reducción de costes en esta partida tan importante [127]. El conocimiento de los procesos de degradación, disipación, incluyendo la generación de metabolitos, en diversos cultivos y sustratos ambientales ha sido abordado en esta Tesis, basándonos en las estrategias anteriormente descritas y teniendo como

técnica fundamental la GC y LC acopladas a analizadores de LRMS como QqQ y de HRMS tipo Orbitrap y Q-Orbitrap.

4.2.3. Estrategias para la determinación de plaguicidas: monorresiduo y multirresiduo

Los métodos de análisis de plaguicidas han ido evolucionando con el tiempo, desde métodos monorresiduo o monofamilia, hasta la tendencia actual en métodos multirresiduo en análisis dirigido [128].

4.2.3.1. Métodos monorresiduo

Los métodos monorresiduo (*single residue method* [82]) se llaman así por haber sido desarrollados y optimizados para el análisis de un solo plaguicida o un número limitado de ellos. Dichos métodos han sido aplicados principalmente en estudios cuya finalidad ha consistido en evaluar aspectos cinéticos del proceso de disipación del plaguicida, sin elucidar los metabolitos formados en este proceso [129–131]. En otros estudios el objetivo ha sido el de obtener información sobre los metabolitos, es decir, resultado de la degradación del plaguicida original, ya sea en matrices alimentarias [132,133] o ambientales [27,134,135]. En algunos de estos estudios también se incluye el desarrollo y validación del método para el análisis del plaguicida junto a sus metabolitos tanto en muestras ambientales [136,137] como para alimentos tan variados como leche [97], lúpulo [138], polen [139], frutas [140,141] y vegetales [142,143]. Los analizadores de HRMS se han utilizado principalmente en estudios de análisis no dirigido, elucidación de los metabolitos [27,132–134] u otros aspectos de la cinética del proceso [131].

4.2.3.2. Métodos multiresiduo

En los últimos años la estrategia analítica ha puesto el foco tanto en aumentar el alcance de los métodos analíticos como en la fiabilidad de los resultados. Todo ello con el fin de asegurar los datos que se obtienen acerca de la presencia de plaguicidas, dadas las posibles consecuencias económicas o sociales que se pueden derivar de los resultados analíticos en dichos campos. En el caso de plaguicidas, los nuevos desarrollos tanto en instrumentación como en métodos van encaminados a abordar la detección de un número cada vez más elevado de compuestos en una sola inyección, de forma que la evaluación de la exposición a estos compuestos sea lo más completa posible. Los instrumentos LC y GC acoplados a QqQ son los más utilizados en análisis multiresiduo de plaguicidas. Sin embargo, además de las debilidades ya comentadas, hay que añadir que en análisis multiresiduo son necesarias mezclas de patrones que contengan todas las sustancias activas incluidas en el alcance del método. Estos patrones son utilizados tanto para el control de calidad como para la cuantificación, lo cual supone un incremento de costes, además de requerir de condiciones especiales de conservación y aun así no son estables durante largos periodos de tiempo [144]. Todo esto añadido a que estas técnicas no permiten realizar análisis retrospectivo. Por consiguiente, desarrollar métodos analíticos que no requieran de la presencia física de patrones de referencia constituye un importante avance en este campo de estudio.

En este sentido los analizadores de HRMS van ganando popularidad y se van sentando las bases de su aplicabilidad al análisis de rutina en el futuro en el campo de los métodos multiresiduo, permitiendo, además de la búsqueda de plaguicidas conocidos a priori a bajos niveles de concentración, realizar el análisis de desconocidos que puedan estar presentes.

4.2.4. Determinación de plaguicidas mediante LRMS

Los plaguicidas son compuestos de muy variadas propiedades físicas, por lo tanto, han sido analizados tanto GC como por LC (**Tablas 8, 9 y 10**).

La **Tabla 8** reúne estudios de métodos monorresiduo publicados de diversos plaguicidas, analizados por GC acoplados a LRMS, en matrices de alimentos y ambientales, detallando el tipo de columna y los analizadores empleados. Este tipo de estudios requiere de la disponibilidad tanto de patrones de los compuestos originales como de sus metabolitos. Las columnas utilizadas en las referencias citadas en la **Tabla 8** son generalmente de polaridad media o incluso inertes, con una longitud de 30m, tamaño de partícula de 0,32 mm [45] y 0,25 mm [52]. Las fases estacionarias utilizadas han sido metilpolisiloxano con distintos porcentajes de fase fenilo: 5% (VF-5MS, SLB-5MS)[25,45,52,145] y 35% (RTX-35MS)[35,141].

Con respecto a la LC-LRMS, en la **Tabla 9** se reúnen estudios de métodos mono o multirresiduo de familias concretas de plaguicidas en suelo [19,22,26,32,34], agua [136], vegetales [26,34,40,44], cacahuete [32] y legumbres [26]. Mientras que en la **Tabla 10** se incluye además el control de metabolitos en diversas matrices vegetales [33,47,50,143,146–149], fruta [38,46,52,140], arroz [150], cacahuete [151] y suelo [33,38,50–52,151].

Como puede observarse en las publicaciones de las **Tablas 9 y 10** se suele trabajar en fase reversa con columnas de fase estacionaria no polar de sílice químicamente modificada. Las columnas más empleadas son las de C18. Se han encontrado aplicaciones con columnas de diferentes longitudes que varían desde 50 mm hasta 150 mm. Respecto a la fase estacionaria, los tamaños de partícula más utilizados van desde 1,7 μm hasta 5 μm , estando el diámetro interno de la columna está entre 2,1 mm y 4,6 mm.

Tabla 8. Métodos monoresiduo de plaguicidas en alimentos y suelo usando GC-LRMS.

Plaguicida	Matriz	Técnica	Columna	Ref.
Bifentrina	Trigo	GC-Q-MS	VF-5MS 30 m x 0.32 mm, 0.25 µm	[45]
Quizalofop-p etil	Girasol	GC-Q-MS	SLB™ 5MS 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm	[25]
Amitraz	Leche	GC-Q-MS	RTX-35 MS 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm	[141]
Fipronil	Coliflor	GC-Q- MS/MS	HP-5 30 m x 0.32 mm, 0.25 µm	[145]
Bromotalonil	Manzana, suelo	GC-QqQ- MS/MS	RTX-35 MS 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm	[35]
Triflumizol	Fresa, suelo	GC-QqQ- MS/MS	DB5-columna 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm	[52]

En relación a la fase móvil, se suele emplear una mezcla binaria compuesta de un disolvente orgánico y agua. El disolvente orgánico más usado es acetonitrilo [33,38,47,52,143,148,152] y en menor número de estudios metanol [48,51,146]. El pH de la fase móvil normalmente es modificado, tanto el de la fase acuosa con ácido fórmico [47,48,52,143,146,152], formiato amónico [51,140,147,148] o con ambos [33,50]. Asimismo el pH de la fase orgánica se modifica en algunos estudios, por ejemplo la acidificación de acetonitrilo con ácido fórmico [46,151], utilizando una mezcla de ácido fórmico y formiato amónico con acetonitrilo [150] o metanol [50], o bien metanol con formiato amónico [140]. En alguna ocasión en la fase acuosa conteniendo ácido fórmico se ha adicionado acetamida [41]. Menos habitual ha sido el uso de una única fase móvil de acetonitrilo [19,32,33,38], metanol [139] o acetonitrilo con ácido fórmico [153].

Tabla 9. Métodos mono y multiresiduo para la determinación de plaguicidas en alimentos, suelo y agua mediante LC-LRMS.

Plaguicida	Matriz	Técnica	Columna	Fase Móvil	Ref.
Azoxistrobina	Suelo	LC-Q-MS	C18 75 x 4.6 mm, 3.5 µm	A: HCO ₂ H en H ₂ O (0.1%, v/v) B: CH ₃ OH	[22]
Cimoxanilo, Tebuconazol	Suelo	LC-Q-MS	Luna C18 150 x 4.6 mm; 3.0 µm	A: CH ₃ CN B: H ₂ O	[26]
Metalaxil	Pepino	LC-QqQ-MS/MS	Zorbax C18 XDB C18 50 x 4.6 mm, 1.8 µm	A: HCO ₂ H en H ₂ O (0.1%, v/v) B: CH ₃ CN	[40]
Metaldehido	Pak choi, suelo	LC-QqQ-MS/MS	Zorbax SB-C18 50 x 3.0 mm, 2.7 µm	A: CH ₃ CN B: H ₂ O	[19]
S-Triazina	Agua	LC-QqQ-MS/MS	Atlantis T3 150 x 4.6 mm; 3.0 µm	A: CH ₃ OH B: H ₂ O	[136]
Picoxistrobina	Cacahuete, suelo	LC-QqQ-MS/MS	C18 50 x 2.1 mm, 3.5 µm	A: CH ₃ CN B: HCO ₂ H en H ₂ O (0.1%, v/v)	[32]
Spinosad	Calabacín	LC-QqQ-MS/MS	C18 50 x 2.1 mm, 1.8 µm	A: HCO ₂ H en CH ₃ OH (0.1%, v/v) B: HCO ₂ H (0.1%, v/v) en 5 mM C ₂ H ₅ NO	[41]
Fluazinam, Dimetomorf	Patata, suelo	LC-QqQ-MS/MS	Acquity BEH C18 100 x 2.1 mm, 1.7 µm	A: CH ₃ CN B: HCO ₂ H en H ₂ O (0.2%, v/v)	[34]
Spinosad	Frijol	LC-QqQ-MS/MS	Kinetex C18 100 x 2.1 mm, 2.6 µm	A: CH ₃ CN B: HCO ₂ H en H ₂ O (0.1%, v/v)	[36]
Tifluzamida	Maíz	LC-QqQ-MS/MS	Zorbax Eclipse XBD-C18 150 x 2.1 mm, 5 µm	A: HCO ₂ H en H ₂ O (0.1%, v/v) B: HCO ₂ H en CH ₃ CN (0.1%, v/v)	[44]

HCO₂H: ácido fórmico; CH₃OH: metanol; CH₃CN: acetonitrilo; C₂H₅NO: Acetamida; H₂O: agua

Tabla 10. Métodos mono y multiresiduo para la determinación de plaguicidas y sus metabolitos en alimentos y suelo mediante LC-LRMS.

Plaguicida	Metabolito	Matriz	Técnica	Columna	Fase Móvil	Ref.
Tiametoxam	Clotianidina	Cítricos, suelo	LC-QTrap-MS/MS	Zorbax Eclipse XDB-C18 150 x 4.6 mm, 5 µm	A: CH ₃ CN B: H ₂ O	[38]
Spirotetramat	B-enol, B-keto B-mono, B-glu	Espinaca, suelo	LC-QqQ-MS/MS	Zorbax Eclipse Plus C18 150 x 4.6 mm, 5 µm	A: HCO ₂ H en H ₂ O (0.5 % v/v) B: CH ₃ CN	[47]
Amitraz	DMA DMPF DMF ⁽¹⁾	Pera	LC- QTrap-MS/MS	Synergi Hydro RP 100 x 2.1 mm, 2.5 µm	A: 5 mM NH ₄ CO ₂ H en H ₂ O B: 5 mM NH ₄ CO ₂ H en 5% CH ₃ OH	[140]
Piridaben, Dinotefuran	DN UF ⁽²⁾	Berenjena, suelo	LC-QqQ-MS/MS	C18 50 x 3.0 mm, 2.7 mm	A: 10 mM NH ₄ CO ₂ CH ₃ en HCO ₂ H (0.1% v/v) en H ₂ O B: CH ₃ CN	[33]
Spiromesifen	Spiromesifen-enol	Tomate, suelo	LC-QqQ-MS/MS	Zorbax Eclipse Plus C18 100 x 2.1 mm, 3.5 µm	A: 5 mM NH ₄ CO ₂ CH ₃ y HCO ₂ H (0.1%, v/v) en H ₂ O B: 5 mM NH ₄ CO ₂ CH ₃ y HCO ₂ H (0.1% v/v) en CH ₃ OH	[50]
Amicarbazona	DA, Ipr-2-OH-DA-AMZ ⁽³⁾	Suelo	LC-QqQ-MS/MS	Poroshell EC-C18 100 x 3.0 mm, 2.7 µm	A: 5 mM NH ₄ CO ₂ CH ₃ en H ₂ O B: CH ₃ COH	[51]
Piraclostrobina Ciazofamida	CCIM ⁽⁴⁾	Uva	LC-QqQ-MS/MS	Zorbax Eclipse Plus C18 100 x 2.1 mm, 1.8 µm	HCO ₂ H en CH ₃ CN (0.5 %,v/v)	[46]
Fonicamida	TFNA, TFNA-AN TFNG ⁽⁵⁾	Pimiento	LC-QqQ-MS/MS	X-bridge C18 150 x 3.5 mm, 2.1 µm	A: HCO ₂ H (0.1% v/v) en H ₂ O B: CH ₃ CN	[143]
Triflumizol	FM-6-1 ⁽⁶⁾	Fresa, suelo	LC-QqQ-MS/MS	C18 50 x 3.0 mm, 2.7 µm	A: HCO ₂ H (0.2% v/v) en H ₂ O B: CH ₃ CN	[52]
Piraclostrobina Picoxistrobina	BF-500-3	Pimiento	LC-QqQ-MS/MS	ACQUITY UPLC™ BEH C18 50 x 2.1 mm, 1.7 µm	A: HCO ₂ H en H ₂ O (0.1% v/v) B: CH ₃ COH	[48]

Plaguicida	Metabolito	Matriz	Técnica	Columna	Fase Móvil	Ref.
Amisulbrom	IT-4 ⁽⁷⁾	Pepino	LC-QqQ-MS/MS	Hypersil GOLD C18 100 x 2.1 mm, 3 µm	A: HCO ₂ H en H ₂ O (0.1% v/v) B: CH ₃ OH	[146]
Tembotriona	M5 ⁽⁸⁾	Maíz	LC-QqQ-MS/MS	Zorbax SB-C18 50 x 3.0 mm, 2.7 µm	A: HCO ₂ H en H ₂ O (0.2% v/v) B: CH ₃ CN	[152]
Fipronil	Fipronil-sulfona Fipronil-sulfuro Fipronil-disulfisilo	Cacahuete, suelo	LC-QqQ-MS/MS	Zorbax Rx-SIL 50 x 2.1 mm, 3.5 µm	A: 0.1% HCO ₂ H en CH ₃ CN B: H ₂ O	[151]
Protioconazol	Protioconazol-Destio	Arroz	UHPLC-QqQ-MS/MS	Shim pack XR-ODS-III 50 x 2.1 mm, 1.6 µm	A: 10 mM NH ₄ CO ₂ CH ₃ , HCO ₂ H en H ₂ O (0.1%, v/v) B: 10 mM NH ₄ CO ₂ CH ₃ , HCO ₂ H en CH ₃ CN (0.1%, v/v)	[150]
Fluopyram	Fluopyram benzamida	Pepino	UHPLC-QqQ-MS/MS	ACQUITY UPLC BEH C18 100 x 2.1 mm, 1.7 µm	A: 5 mM NH ₄ CO ₂ H en H ₂ O B: CH ₃ CN: CH ₃ OH (50:50 v/v)	[147]
Ciantraniliprol	J9Z38 ⁽⁹⁾	Pepino, tomate	UHPLC-QqQ-MS/MS	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2.1 mm, 1.7 µm	A: 2 mM NH ₄ CO ₂ H en H ₂ O B: CH ₃ CN	[148]

HCO₂H: ácido fórmico; CH₃OH: metanol; CH₃CN: acetonitrilo; NH₄CO₂H: formiato amónico; NH₄CO₂CH₃: acetato amónico; H₂O: agua

⁽¹⁾ DN: (1-metil-3- (tetrahidro-3-furilmetil) guanidina; UF (1-metil-3- (tetrahidro-3-furilmetil) urea

⁽²⁾ DMA: 2,4-dimetilanilina; DMPF: N-[2,4-(dimetilfenil)-N'-metilformamidina; DMF: 2,4-dimetilformamidina

⁽³⁾ DA: desamino amicarbazona; lpr-2-OH-DA-AMZ: isopropil-2-hidroxi-desamino amicarbazona

⁽⁴⁾ CCIM: 4-cloro-5-p-tolilimidazola-2-carbonitrilo

⁽⁵⁾ TFNA: ácido 4-trifluorometilnicotínico; TFNA-AN: 4-trifluorometilnicotinamida; TFNG: N-(4-trifluorometilnicotinoyl) glicina

⁽⁶⁾ FM-6-1: N-[4-Cloro-2-(trifluorometil)fenil]-n-propoxiacetamida

⁽⁷⁾ IT-4: 3-bromo-6-fluoro-2-metil-1-(1H-1,2,4-triazol-3-ylsulfonyl)

⁽⁸⁾ M5: A1417268

⁽⁹⁾ J9Z38: 2-[3-bromo-1-(3-chloropiridin-2-yl)-1H-pirazol-5-yl]-3, 8-dimetil-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina-6-carbonitrilo}

4.2.5. Determinación de plaguicidas mediante HRMS

Los métodos desarrollados en HRMS pueden aplicar la estrategia de análisis dirigido, no dirigido o bien ambas. En la **Tabla 11** se reúne un resumen de métodos monoresiduo mediante LC-HRMS, utilizando un enfoque dirigido, en estudios de disipación y/o degradación de plaguicidas en alimentos. Generalmente la fase móvil es una mezcla de un disolvente orgánico, metanol [90,132] o acetonitrilo [133,149] y agua, que normalmente se encuentra modificada con ácido fórmico y/o formiato amónico [90,132,133,149]. Las columnas cromatográficas empleadas han sido C18 a excepción de un caso en el que se ha utilizado la columna de interacción hidrofílica (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) para el estudio de cartap [149], por tanto todas trabajan en fase reversa a excepción de esta última que lo haría en fase normal (*Normal Phase*, NP). Respecto a la longitud de columna utilizada varía desde 50 mm hasta 150 mm, presentando mayor variabilidad en el tamaño de partícula (1.8 – 5 μm), con diámetro interno entre 1.9 y 2.1 mm. En relación con los analizadores utilizados en LC han sido Exactive-Orbitrap [132], Q-Orbitrap [133,149] y QTOF [90].

Las primeras aplicaciones de GC-HRMS (**Tabla 12**) se focalizan en el desarrollo y validación de métodos multiresiduo con una estrategia de análisis dirigido a fin de confirmar y cuantificar la presencia de plaguicidas en frutas y hortalizas. Así en el estudio de Portolés et al. [154] utilizan el analizador TOF y en el de Mol et al. el Q-Orbitrap [155]. Otros estudios que aplican GC-Q-Orbitrap se focalizan en comida infantil y frutas y vegetales [101,102]. En lo referente a métodos multiresiduo en matrices alimentarias mediante LC-HRMS, citar la aplicación de LC-QTOF a 317 plaguicidas [105] y LC-Q-Orbitrap con métodos de 448 y 569 plaguicidas respectivamente [100,104].

Sin embargo, se han comenzado a desarrollar métodos de análisis que combinan la estrategia dirigida y no dirigida. Schusterova et al. desarrollaron un método de 9 plaguicidas [99] en uva usando un analizador Q-TOF, ampliando el estudio con la búsqueda de metabolitos u otros plaguicidas a fin de obtener evidencias de la presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes. Feng et al. basaron su estudio en la estrategia dirigida con una base de datos de 805 plaguicidas y la no dirigida en la búsqueda de metabolitos [153] en limón, maíz, avena, judía verde y col roja, mediante LC con analizador Q-Orbitrap.

El potencial de HRMS también ha sido explorado en el análisis simultáneo de contaminantes de diferentes clases además de plaguicidas, como contaminantes de envases alimentarios con micotoxinas [108] o medicamentos veterinarios [107,156]. Otras aplicaciones como son los plaguicidas con PCB [106] (**Tabla 12**). El trabajo de Eyken et al. [157] únicamente ha usado la estrategia no dirigida / desconocidos, con la ayuda de bases de datos, para la búsqueda de cualquier residuo químico en miel por ejemplo plaguicidas o medicamentos veterinarios, ha demostrado que la HRMS es una herramienta muy útil al desarrollar un método de tratamiento de datos basado en puntuaciones. Cabe destacar que el número de estudios que realizan análisis no dirigido es aún muy limitado.

Tabla 11. Métodos monoresiduo de plaguicidas incluyendo metabolitos conocidos en alimentos mediante LC-HRMS

Plaguicida	Metabolitos	Matriz	Técnica	Columna	Fase Móvil	Ref.
Famoxadona	1-acetil-2-fenilhidrazina Ácido 4-fenoxibenzoico	Tomate, pepino, calabacín	UHPLC-Orbitrap	Zorbax Eclipse Plus C18 100 x 2.1 mm, 1.8 µm	A: 0.1% HCO ₂ H/ 4 mM NH ₄ CO ₂ H en H ₂ O B: CH ₃ OH	[132]
Ometoato	Dimetil fosfato	Trigo	UPLC-QTOF	ACQUITY UPLC HSS T3 100 x 2.1 mm, 1.8 µm	A: CH ₃ OH B: 10 mM NH ₄ CO ₂ CH ₃ en H ₂ O	[90]
Imidacloprid	Imidacloprid-6-CNA	Tomate	UHPLC-Q-Orbitrap	aQ C18 50 x 1.9 mm, 2.5 µm	A: 7.5 mM NH ₄ CO ₂ CH ₃ , HCO ₂ H en H ₂ O (0.1% v/v) B: HCO ₂ H en CH ₃ CN (0.1% v/v)	[133]
Cartap	Cartap monotiol, Cartap ditiol Nereistoxina	Te	UPLC-Q-Exactive-Orbitrap	ZIC-HILIC 150 x 2.1 mm, 5 µm	A: 5 mM NH ₄ CO ₂ H, 0.1% HCO ₂ H en H ₂ O B: CH ₃ CN	[149]

HCO₂H: ácido fórmico; NH₄CO₂H: formiato amónico; CH₃OH: metanol; NH₄CO₂CH₃: acetato amónico; CH₃CN: acetonitrilo; C₂H₅NO: Acetamida; H₂O: agua

Tabla 12. Métodos multiresiduo de plaguicidas y otros contaminantes en alimentos mediante LC y GC-HRMS

Estrategia	Compuestos	Matriz	Técnica	Ref.
Dirigido	569 plaguicidas	Madreselva	UHPLC-Q-Orbitrap	[104]
Dirigido	210 plaguicidas	Frutas y vegetales	GC-Orbitrap-MS/MS	[101]
Dirigido	15 plaguicidas	Comida infantil	GC- Orbitrap-MS	[102]
Dirigido	448 plaguicidas	Manzana, plátano, uva, naranja y fresa	UHPLC-Q-Orbitrap	[100]
Dirigido	317 plaguicidas	Frutas y vegetales	HPLC-Q-TOF-MS	[105]
Dirigido	132 plaguicidas	Frutas y vegetales	GC-Q-TOF-MS	[154]
Dirigido	54 plaguicidas	Puerro	GC-Q-Orbitrap-MS	[155]
Dirigido	9 plaguicidas	Uvas y vino	LC-QTOF-MS	[99]
No dirigido				
Dirigido	Plaguicidas	Limón, maíz, avena, judía verde y col roja	GC-MS/MS	[153]
No dirigido			LC-Q-Orbitrap	
Dirigido	Plaguicidas, medicamentos veterinarios, contaminantes de envases de alimentos	Comida infantil	UHPLC-Q-TOF-MS	[107]
Dirigido	86 plaguicidas y 8 PCB	Trigo, legumbres harina de semillas de girasol, cáscaras de soja y maíz	GC-Q-Orbitrap-MS	[106]
Dirigido	Plaguicidas y medicamentos veterinarios	Leche de fórmula infantil	UHPLC-Q-Orbitrap	[156]
Dirigido	Plaguicidas, medicamentos veterinarios, contaminantes de envases de alimentos, micotoxinas y otros contaminantes	Tomate, naranja y comida infantil	UHPLC-QTOF-MS	[108]
No dirigido	Plaguicidas, medicamentos veterinarios y otros contaminantes	Miel	LC-QTOF-MS	[157]

5. Referencias

1. European Commission. Directorate-General for Research and Innovation. Unit F – Bioeconomy. Bioeconomy: the European way to use our natural resources. Action plan 2018. **2018**, 1–26, doi:10.2777/79401.
2. Casida, J.E. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environ. Health Perspect.* **1980**, *34*, 189–202, doi:10.2307/3428960.
3. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1948/summary/>.
4. Eurostat Statistics Explained Available online: <https://ec.europa.eu/eurostat> (accessed on Feb 14, 2021).
5. Stephenson, G.R.; Ferris, I.G.; Holland, P.T.; Nordberg, M. Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 2006). *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 2075–2154, doi:10.1351/pac200678112075.
6. [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/glossary/es/No Title](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/glossary/es/No%20Title).
7. Bartual, J.; Berenguer, M.J. NTP 143: Pesticidas: clasificación y riesgos principales. *Minist. Trab. y Asuntos Soc. España* **1983**, *4*.
8. Ministerios de Agricultura, P. y A. *Estadística anual de consumo de productos fitosanitarios 2019*;
9. Lee, Y.J.; Rahman, M.M.; Abd El-Aty, A.M.; Choi, J.H.; Chung, H.S.; Kim, S.W.; Abdel-Aty, A.M.; Shin, H.C.; Shim, J.H. Detection of three herbicide, and one metabolite, residues in brown rice and rice straw using various versions of the QuEChERS method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2016**, *210*, 442–450, doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.005.
10. Gavrilescu, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Eng. Life Sci.* **2005**, *5*, 497–526, doi:10.1002/elsc.200520098.
11. Zomer, P.; Mol, H.G.J. Simultaneous quantitative determination,

- identification and qualitative screening of pesticides in fruits and vegetables using LC-Q-OrbitrapTM-MS. *Food Addit. Contam. - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* **2015**, *32*, 1628–1636, doi:10.1080/19440049.2015.1085652.
12. Comisión Europea. EU pesticides database Available online: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> (accessed on Feb 14, 2021).
 13. Barceló, D.; Petrovic, M. Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 2–11, doi:10.1016/j.trac.2006.11.006.
 14. Guidance document on estimating persistence and degradation kinetics from environmental fate studies on pesticides in EU registration. *Rep. Focus Work Gr. Degrad. Kinet. EC Doc. Ref. Sanco/10058/2005 version 2.0* **2005**, 1–434.
 15. Romero-Gonzalez, R.; Garrido-Frenich, A. *Applications in high resolution mass spectrometry. Food safety and pesticide residue analysis*; Elsevier, Ed.; 2017; ISBN 9780128094648.
 16. Martínez Vidal, J.L.; Plaza-Bolaños, P.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A. Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 6767–6788, doi:10.1016/j.chroma.2009.08.013.
 17. Fantke, P.; Juraske, R. Variability of pesticide dissipation half-lives in plants. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 3548–3562, doi:10.1021/es303525x.
 18. Gustafson, D.I.; Holden, L.R. Nonlinear pesticide dissipation in soil: A new model based on spatial variability. *Environ. Sci. Technol.* **1990**, *24*, 1032–1038, doi:10.1021/es00077a013.
 19. Dong, B.; Shao, X.; Lin, H.; Hu, J. Dissipation, residues and risk

- assessment of metaldehyde and niclosamide ethanolamine in pakchoi after field application. *Food Chem.* **2017**, *229*, 604–609, doi:10.1016/j.foodchem.2017.02.117.
20. Tandon, S. Degradation kinetics of anilofos in soil and residues in rice crop at harvest. *Pest Manag. Sci.* **2014**, *70*, 1706–1710, doi:10.1002/ps.3707.
21. Gluhar, S.; Kaurin, A.; Grubar, T.; Prosen, H.; Lestan, D. Dissipation of mecoprop-P, isoproturon, bentazon and S-metolachlor in heavy metal contaminated acidic and calcareous soil before and after EDTA-based remediation. *Chemosphere* **2019**, *237*, 124513, doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124513.
22. Herrero-Hernández, E.; Marín-Benito, J.M.; Andrades, M.S.; Sánchez-Martín, M.J.; Rodríguez-Cruz, M.S. Field versus laboratory experiments to evaluate the fate of azoxystrobin in an amended vineyard soil. *J. Environ. Manage.* **2015**, *163*, 78–86, doi:10.1016/j.jenvman.2015.08.010.
23. Memarizadeh, N.; Ghadamyari, M.; Talebi, K.; Torabi, E.; Adeli, M.; Jalalipour, R. Residues and dissipation kinetics of two imidacloprid nanoformulations on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under field conditions. *Pollution* **2019**, *5*, 871–878, doi:10.22059/poll.2019.275929.582.
24. Swarcewicz, M.K.; Gregorczyk, A. Atrazine degradation in soil: Effects of adjuvants and a comparison of three mathematical models. *Pest Manag. Sci.* **2013**, *69*, 1346–1350, doi:10.1002/ps.3510.
25. Mantzos, N.; Karakitsou, A.; Nikolaki, S.; Leneti, E.; Konstantinou, I. Dissipation and transport of quizalofop-p-ethyl herbicide in sunflower cultivation under field conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 3481–3490, doi:10.1007/s11356-015-5572-6.
26. Álvarez-Martín, A.; Sánchez-Martín, M.J.; Pose-Juan, E.; Rodríguez-Cruz,

- M.S. Effect of different rates of spent mushroom substrate on the dissipation and bioavailability of cymoxanil and tebuconazole in an agricultural soil. *Sci. Total Environ.* **2016**, *550*, 495–503, doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.151.
27. López-Ruiz, R.; Romero-González, R.; Martínez Vidal, J.L.; Garrido Frenich, A. Behavior of quizalofop-p and its commercial products in water by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *157*, 285–291, doi:10.1016/j.ecoenv.2018.03.094.
28. Singh, S.B.; Sharma, R.; Singh, N. Persistence of pyrazosulfuron in rice-field and laboratory soil under Indian tropical conditions. *Pest Manag. Sci.* **2012**, *68*, 828–833, doi:10.1002/ps.2331.
29. Pitam, S.; Mukherjee, I.; Kumar, A. Evaluation of environmental fate of acetamiprid in the laboratory. *Environ. Monit. Assess.* **2013**, *185*, 2807–2816, doi:10.1007/s10661-012-2750-6.
30. Chopra, I.; Chauhan, R.; Kumari, B. Persistence of pendimethalin in/on wheat, straw, soil and water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2015**, *95*, 694–699, doi:10.1007/s00128-015-1607-4.
31. Gajbhiye, V.T.; Gupta, S.; Mukherjee, I.; Singh, S.B.; Singh, N.; Dureja, P.; Kumar, Y. Persistence of azoxystrobin in/on grapes and soil in different grapes growing areas of India. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2011**, *86*, 90–94, doi:10.1007/s00128-010-0170-2.
32. Zhu, K.; Li, P.; Feng, M.; Hao, X.; Han, L. Dissipation and residues of picoxystrobin in peanut and field soil by QuEChERS and HPLC–MS/MS. *Environ. Monit. Assess.* **2015**, *187*, doi:10.1007/s10661-015-4773-2.
33. Chen, X.; Liu, X.; Dong, B.; Hu, J. Simultaneous determination of pyridaben, dinotefuran, DN and UF in eggplant ecosystem under open-field conditions: Dissipation behaviour and residue distribution. *Chemosphere* **2018**, *195*, 245–251,

- doi:10.1016/j.chemosphere.2017.12.011.
34. Chen, L.; Jia, C.; Li, F.; Jing, J.; Yu, P.; He, M.; Zhao, E. Dissipation and residues of fluazinam and dimethomorph in potatoes, potato plants, and soil, determined by QuEChERS ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 32783–32790, doi:10.1007/s11356-018-3281-7.
 35. Liu, H.; Guo, B.; Wang, H.; Li, J.; Zheng, L. Determination of bromothalonil residues and degradation in apple and soil by QuEChERS and GC-MS/MS. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2014**, *92*, 451–454, doi:10.1007/s00128-014-1224-7.
 36. Huan, Z.; Luo, J.; Xu, Z.; Xie, D. Residues, dissipation, and risk assessment of spinosad in cowpea under open field conditions. *Environ. Monit. Assess.* **2015**, *187*, doi:10.1007/s10661-015-4942-3.
 37. Chen, W.; Jiao, B.; Su, X.; Zhao, Q.; Qin, D.; Wang, C. Dissipation and residue of forchlorfenuron in citrus fruits. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2013**, *90*, 756–760, doi:10.1007/s00128-013-0979-6.
 38. Gui, T.; Jia, G.F.; Xu, J.; Ge, S.J.; Long, X.F.; Zhang, Y.P.; Hu, D.Y. Determination of the residue dynamics and dietary risk of thiamethoxam and its metabolite clothianidin in citrus and soil by LC-MS/MS. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* **2019**, *54*, 326–335, doi:10.1080/03601234.2019.1571361.
 39. Jang, J.; Rahman, M.M.; Abd El-Aty, A.M.; Ko, A.Y.; Park, J.H.; Choi, J.H.; Park, K.H.; Yang, A.; Seo, Y.M.; Shim, J.H. Analysis of etoxazole in red pepper after major modification of QuEChERS for gas chromatography-nitrogen phosphorus detection. *Biomed. Chromatogr.* **2014**, *28*, 767–773, doi:10.1002/bmc.3130.
 40. Ramezani, M.K.; Shahriari, D. Dissipation behaviour, processing factors and risk assessment for metalaxyl in greenhouse-grown cucumber. *Pest Manag. Sci.* **2015**, *71*, 579–583, doi:10.1002/ps.3859.

41. Liu, Y.; Sun, H.; Wang, S. Dissipation and residue of spinosad in zucchini under field conditions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2013**, *91*, 256–259, doi:10.1007/s00128-013-1050-3.
42. Malhat, F.M. Simultaneous determination of spinetoram residues in tomato by high performance liquid chromatography combined with QuEChERS method. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2013**, *90*, 222–226, doi:10.1007/s00128-012-0885-3.
43. Paramasivam, M.; Banerjee, H. Dissipation of flubendiamide residues in/on cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Environ. Monit. Assess.* **2013**, *185*, 1577–1581, doi:10.1007/s10661-012-2652-7.
44. Ma, C.; Liu, Z.; Qi, Y.; Wang, S.; Cao, X.; Wang, J.; She, Y.; Shao, Y.; Shen, J.; Zhang, C.; et al. Residue behavior and risk assessment of thifluzamide in the maize field ecosystem. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 21195–21204, doi:10.1007/s11356-018-2211-z.
45. You, X.; Jiang, N.; Liu, F.; Liu, C.; Wang, S. Dissipation and residue of bifenthrin in wheat under field conditions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2013**, *90*, 238–241, doi:10.1007/s00128-012-0903-5.
46. Pang, N.; Dou, X.; Hu, J. Residue behaviours, dissipation kinetics and dietary risk assessment of pyraclostrobin, cyazofamid and its metabolite in grape. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 6167–6172, doi:10.1002/jsfa.9877.
47. Chen, X.; Meng, Z.; Zhang, Y.; Gu, H.; Ren, Y.; Lu, C. Degradation kinetics and pathways of spirotetramat in different parts of spinach plant and in the soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 15053–15062, doi:10.1007/s11356-016-6665-6.
48. Gao, Y.; Yang, S.; Li, X.; He, L.; Zhu, J.; Mu, W.; Liu, F. Residue determination of pyraclostrobin, picoxystrobin and its metabolite in pepper fruit via UPLC-MS/MS under open field conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *182*, 109445, doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109445.
49. Shi, K.; Li, W.; Yuan, L.; Li, L.; Liu, F. Dissipation, terminal residues and

- risk assessment of fluopicolide and its metabolite in cucumber under field conditions. *Environ. Monit. Assess.* **2015**, *187*, 1–8, doi:10.1007/s10661-015-4924-5.
50. Siddamallaiah, L.; Mohapatra, S.; Buddidathi, R. Dissipation of spiromesifen and spiromesifen-enol on tomato fruit, tomato leaf, and soil under field and controlled environmental conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24*, 23559–23570, doi:10.1007/s11356-017-9954-9.
51. Dong, M.; Han, W.; Ediage, E.N.; Fan, L.; Tang, H.; Wang, W.; Han, L.; Zhao, Z.; Song, W.; Han, Z. Dissipation kinetics and degradation mechanism of amicarbazone in soil revealed by a reliable LC-MS/MS method. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 17518–17526, doi:10.1007/s11356-015-4899-3.
52. Yu, J.; Xu, Z.; Zhang, C.; Chen, L.; Hu, X.; Yu, R.; Wang, X.; Zhao, X. Dissipation behavior, residue distribution, and risk assessment of triflumizole and FM-6-1 in greenhouse strawberries and soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 15165–15173, doi:10.1007/s11356-020-08034-6.
53. López-Ruiz, R.; Romero-González, R.; Martínez Vidal, J.L.; Fernández-Pérez, M.; Garrido Frenich, A. Degradation studies of quizalofop-p and related compounds in soils using liquid chromatography coupled to low and high resolution mass analyzers. *Sci. Total Environ.* **2017**, *607–608*, 204–213, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.261.
54. Mamy, L.; Vrignaud, P.; Cheviron, N.; Perreau, F.; Belkacem, M.; Brault, A.; Breuil, S.; Delarue, G.; Pétraud, J.P.; Touton, I.; et al. No evidence for effect of soil compaction on the degradation and impact of isoproturon. *Environ. Chem. Lett.* **2011**, *9*, 145–150, doi:10.1007/s10311-009-0273-3.
55. Li, Z.; Zhang, Y.; Li, Q.; Wang, W.; Li, J. Enantioselective degradation, abiotic racemization, and chiral transformation of triadimefon in soils.

- Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 2797–2803, doi:10.1021/es103830z.
56. López-Ruiz, R.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A. Residues and dissipation kinetics of famoxadone and its metabolites in environmental water and soil samples under different conditions. *Environ. Pollut.* **2019**, *252*, 163–170, doi:10.1016/j.envpol.2019.05.123.
57. Li, P.; Wang, L.; Hao, X.; Han, L. Dissipation and residues of trifloxystrobin and its metabolite in rice under field conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* **2014**, *33*, 2654–2660, doi:10.1002/etc.2731.
58. Sandín-España, P.; Sevilla-Morán, B.; López-Goti, C.; Mateo-Miranda, M.M.; Alonso-Prados, J.L. Rapid photodegradation of clethodim and sethoxydim herbicides in soil and plant surface model systems. *Arab. J. Chem.* **2016**, *9*, 694–703, doi:10.1016/j.arabjc.2015.04.007.
59. Jiang, C.; Li, X.J.; Wang, Y.R.; Ma, L.Y.; Wang, Y.K.; Lu, Y.C.; Yang, H. Assessment of photodegradation of herbicide prometryn in soil. *Water, Air Soil Pollut* **2017**, *228*, 1–14, doi:10.1007/s11270-017-3307-7.
60. López-Ruiz, R.; Romero-González, R.; Ortega-Carrasco, E.; Martínez Vidal, J.L.; Garrido Frenich, A. Degradation studies of dimethachlor in soils and water by UHPLC-HRMS: putative elucidation of unknown metabolites. *Pest Manag. Sci.* **2020**, *76*, 721–729, doi:10.1002/ps.5570.
61. López-Ruiz, R.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A. Dissipation kinetics of fenamidone, propamocarb and their metabolites in ambient soil and water samples and unknown screening of metabolites. *J. Environ. Manage.* **2020**, *254*, 1–9, doi:10.1016/j.jenvman.2019.109818.
62. Gupta, B.; Rani, M.; Kumar, R.; Dureja, P. Decay profile and metabolic pathways of quinalphos in water, soil and plants. *Chemosphere* **2011**, *85*, 710–716, doi:10.1016/j.chemosphere.2011.05.059.
63. Liu, J.; Rashid, M.; Qi, J.; Hu, M.; Zhong, G. Dissipation and metabolism of tebufenozide in cabbage and soil under open field conditions in South China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2016**, *134*, 204–212,

- doi:10.1016/j.ecoenv.2016.09.002.
64. López-Ruiz, R.; Romero-González, R.; Serra, B.; Garrido Frenich, A. Dissipation kinetic studies of fenamidone and propamocarb in vegetables under greenhouse conditions using liquid and gas chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Chemosphere* **2019**, *226*, 36–46, doi:10.1016/j.chemosphere.2019.03.118.
 65. European Commission. Regulation (EU) No 396/2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin, and amending Council Directive 91/414/EEC. *Off. J. Eur. Union* **2005**, *L70*, 1–16.
 66. European Food Safety Authority Available online: <http://www.efsa.europa.eu/>.
 67. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF Portal), 2018: Available online: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList> (accessed on March 15, 2021).
 68. FAO Soils portal Available online: <http://www.fao.org/soils-2015/about/key-messages/en/>.
 69. FAO Soils portal Available online: <http://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/soil-properties/en/>.
 70. Hacia una estrategia temática para la protección del suelo. *Com. las Comunidades Eur.* **2002**, *COM (2002)*, 1–4.
 71. Estrategia temática para la protección del suelo. *Com. las Comunidades Eur.* **2006**, *COM (2016)*, 1–13.
 72. Carta de los suelos del Consejo de Europa. *Cons. Estrasburgo.* **1972**.
 73. La política agraria común en pocas palabras (PAC). Available online: https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/key-policies/common-agricultural-policy/cap-glance_es (accessed on Feb 14, 2021).

74. Unión Europea. Reglamento (UE) 2018/848 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº 834/2007 del Consejo. *D. Of. la Unión Eur.* **2018**, L 150, 1–92.
75. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Real decreto 1201/2002, de 20 de noviembre, por el que se regula la producción integrada de productos agrícolas. *Boletín Of. del Estado.* **2002**, 42028–42040.
76. Comisión Europea. Directiva (UE) 2004/35/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre responsabilidad ambiental en relación con la prevención y reparación de daños medioambientales. *D. Of. la Unión Eur.* **2004**, L143, 56–75.
77. Ministerio de Presidencia. Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. *Boletín Of. del Estado.* **2005**, 15, 1833–1843.
78. Comisión Europea. Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. *D. Of. las Comunidades Eur.* **2000**, L60, 1–93.
79. Comisión Europea. Directiva 98/83/CE del Consejo relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. *D. Of. las Comunidades Eur.* **1998**, L 330, 32–54.
80. Parlamento Europeo. Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican. *D. Of. la Unión Eur.* **2008**, L384, 84–97.
81. Parlamento Europeo. Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y

- del Consejo por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. *D. Of. la Unión Eur.* **2013**, L226, 1–17.
82. EU Reference Laboratorie for Residues of Pesticides Available online: <https://www.eurl-pesticides.eu/>.
83. Tadeo, J.L. *Analysis of pesticides in food and environmental samples*; Group, T.& F., Ed.; CRC Press, 2008; ISBN 9780849375521.
84. Ramos, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *J. Chromatogr. A* **2012**, 1221, 84–98, doi:10.1016/j.chroma.2011.11.011.
85. Residues trials and MRL calculations. Proposals for a harmonised approach for the selection of the trials and data used for the estimation of MRL, STMR and HR. *EFSA J.* **2015**, 1–10.
86. Utture, S.C.; Banerjee, K.; Dasgupta, S.; Patil, S.H.; Jadhav, M.R.; Wagh, S.S.; Kolekar, S.S.; Anuse, M.A.; Adsule, P.G. Dissipation and distribution behavior of azoxystrobin, carbendazim, and difenoconazole in pomegranate fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 7866–7873, doi:10.1021/jf200525d.
87. Mol, H.G.J.; Plaza-Bolaños, P.; Zomer, P.; De Rijk, T.C.; Stolker, A.A.M.; Mulder, P.P.J. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 9450–9459, doi:10.1021/ac801557f.
88. Martinello, M.; Borin, A.; Stella, R.; Bovo, D.; Biancotto, G.; Gallina, A.; Mutinelli, F. Development and validation of a QuEChERS method coupled to liquid chromatography and high resolution mass spectrometry to determine pyrrolizidine and tropane alkaloids in honey. *Food Chem.* **2017**, 234, 295–302, doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.186.

89. Vargas-Pérez, M.; Marín-Sáez, J.; Egea González, F.J.; Garrido Frenich, A. Optimization and establishment of QuEChERS based method for determination of propoxycarbazone and its metabolite in food commodities by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2019**, *274*, 429–433, doi:10.1016/j.foodchem.2018.08.135.
90. Yu, L.; Wang, L.; Zhao, Y.; Wang, B. Identification and dissipation of omethoate and its main metabolite DMP in wheat determined by UPLC-QTOF/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 5891–5898, doi:10.1021/acs.jafc.8b06799.
91. Sapahin, H.A.; Makahleh, A.; Saad, B. Determination of organophosphorus pesticide residues in vegetables using solid phase micro-extraction coupled with gas chromatography–flame photometric detector. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12*, 1934–1944, doi:10.1016/j.arabjc.2014.12.001.
92. Naccarato, A.; Tagarelli, A. Recent applications and newly developed strategies of solid-phase microextraction in contaminant analysis: Through the environment to humans. *Separations* **2019**, *6*, 1–44, doi:10.3390/separations6040054.
93. Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412–431, doi:10.1371/journal.pone.0029268.
94. Official Method 2007.01: Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. *J. AOAC Int.* **2007**, 1–9.
95. UNE Normalización Española Available online: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu->

- norma/norma/?Tipo=N&c=N0061576.
96. Kaczyński, P. Large-scale multi-class herbicides analysis in oilseeds by rapid one-step QuEChERS-based extraction and cleanup method using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2017**, *230*, 411–422, doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.076.
 97. Jeong, I.S.; Kwak, B.M.; Ahn, J.H.; Jeong, S.H. Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology. *Food Chem.* **2012**, *133*, 473–481, doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.004.
 98. Nordmeyer, K.; Thier, H.P. Solid-phase extraction for replacing dichloromethane partitioning in pesticide multiresidue analysis. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *208*, 259–263, doi:10.1007/s002170050413.
 99. Schusterova, D.; Suchanova, M.; Pulkrabova, J.; Kocourek, V.; Urban, J.; Hajslova, J. Can occurrence of pesticide metabolites detected in crops provide the evidence on illegal practices in organic farming? *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 6102–6115, doi:10.1021/acs.jafc.8b06999.
 100. Wang, J.; Chow, W.; Chang, J.; Wong, J.W. Development and validation of a qualitative method for target screening of 448 pesticide residues in fruits and vegetables using UHPLC/ESI Q-Orbitrap based on data-independent acquisition and compound database. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 473–493, doi:10.1021/acs.jafc.6b05034.
 101. Uclés, S.; Uclés, A.; Lozano, A.; Martínez Bueno, M.J.; Fernández-Alba, A.R. Shifting the paradigm in gas chromatography mass spectrometry pesticide analysis using high resolution accurate mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1501*, 107–116, doi:10.1016/j.chroma.2017.04.025.
 102. Lozano, A.; Uclés, S.; Uclés, A.; Ferrer, C.; Fernández-Alba, A.R. Pesticide residue analysis in fruit-and vegetable-based baby foods using GC-Orbitrap MS. *J. AOAC Int.* **2018**, *101*, 374–382, doi:10.5740/jaoacint.17-

- 0413.
103. Niu, J.; Hu, J. Dissipation behaviour and dietary risk assessment of boscalid, triflumizole and its metabolite (FM-6-1) in open-field cucumber based on QuEChERS using HPLC–MS/MS technique. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 4501–4508, doi:10.1002/jsfa.8975.
 104. Zhou, H.; Cao, Y.M.; Miao, S.; Lan, L.; Chen, M.; Li, W.T.; Mao, X.H.; Ji, S. Qualitative screening and quantitative determination of 569 pesticide residues in honeysuckle using ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1606*, 460374, doi:10.1016/j.chroma.2019.460374.
 105. Wang, Z.; Chang, Q.; Kang, J.; Cao, Y.; Ge, N.; Fan, C.; Pang, G.F. Screening and identification strategy for 317 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight high resolution mass spectrometry. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 6385–6402, doi:10.1039/c5ay01478f.
 106. Tienstra, M.; Mol, H.G.J. Application of gas chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for pesticide residue analysis in cereals and feed ingredients. *J. AOAC Int.* **2018**, *101*, 342–351, doi:10.5740/jaoacint.17-0408.
 107. Pérez-Ortega, P.; Lara-Ortega, F.J.; García-Reyes, J.F.; Gilbert-López, B.; Trojanowicz, M.; Molina-Díaz, A. A feasibility study of UHPLC-HRMS accurate-mass screening methods for multiclass testing of organic contaminants in food. *Talanta* **2016**, *160*, 704–712, doi:10.1016/j.talanta.2016.08.002.
 108. Pérez-Ortega, P.; Lara-Ortega, F.J.; Gilbert-López, B.; Moreno-González, D.; García-Reyes, J.F.; Molina-Díaz, A. Screening of over 600 pesticides, veterinary drugs, food-packaging contaminants, mycotoxins, and other chemicals in food by ultra-high performance liquid chromatography

- quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QTOFMS). *Food Anal. Methods* **2017**, *10*, 1216–1244, doi:10.1007/s12161-016-0678-0.
109. Malhat, F.; Kamel, E.; Saber, A.; Hassan, E.; Youssef, A.; Almaz, M.; Hassan, A.; Fayz, A.E.S. Residues and dissipation of kresoxim methyl in apple under field condition. *Food Chem.* **2013**, *140*, 371–374, doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.050.
110. Saha, S.; Jadhav, M.R.; Ahammed Shabeer, T.P.; Banerjee, K.; Sharma, B.K.; Loganathan, M.; Raj, A.B. Safety assessment and bioefficacy of fluopyram 20 %+tebuconazole 20 %-40 SC in chilli, capsicum annum L. against anthracnose disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B - Biol. Sci.* **2016**, *86*, 359–366, doi:10.1007/s40011-014-0450-4.
111. Besil, N.; Cesio, V.; Heinzen, H.; Fernandez-Alba, A.R. Matrix effects and interferences of different citrus fruit coextractives in pesticide residue analysis using ultrahigh-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4819–4829, doi:10.1021/acs.jafc.7b00243.
112. Jyot, G.; Mandal, K.; Battu, R.S.; Singh, B. Estimation of chlorpyrifos and cypermethrin residues in chilli (*Capsicum annum* L.) by gas-liquid chromatography. *Environ. Monit. Assess.* **2013**, *185*, 5703–5714, doi:10.1007/s10661-012-2977-2.
113. Mantzos, N.; Karakitsou, A.; Zioris, I.; Konstantinou, I. QuEChERS and solid phase extraction methods for the determination of energy crop pesticides in soil, plant and runoff water matrices. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2013**, *93*, 1566–1584, doi:10.1080/03067319.2013.803282.
114. Nováková, L.; Solichová, D.; Solich, P. Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: Comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 2433–2443, doi:10.1002/jssc.200600147.

115. Lehotay, S.J.; Hajšlová, J. Application of gas chromatography in food analysis. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 686–697, doi:10.1016/S0165-9936(02)00805-1.
116. Cervera, M.I.; Portolés, T.; Pitarch, E.; Beltrán, J.; Hernández, F. Application of gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for target and non-target analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1244*, 168–177, doi:10.1016/j.chroma.2012.04.063.
117. Zhang, A.; Chang, J.S.; Gu, C.; Sanders, M. Non-targeted screening and accurate mass confirmation of 510 pesticides on a high resolution LC-MS orbitrap system. *Brazilian J. Anal. Chem.* **2010**, *1*, 60–74.
118. Meng, X.; Zhang, N.; Sun, X.; Niu, Z.; Deng, Y.; Xu, J.; Bai, H.; Ma, Q. Suspect screening of 200 hazardous substances in plastic toys using ultra-high-performance liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1617*, 460830, doi:10.1016/j.chroma.2019.460830.
119. Wang, J.; Chow, W.; Chang, J.; Wong, J.W. Ultrahigh-performance liquid chromatography electrospray ionization Q-Orbitrap mass spectrometry for the analysis of 451 pesticide residues in fruits and vegetables: Method development and validation. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 10375–10391, doi:10.1021/jf503778c.
120. Ferrer, I.; García-Reyes, J.F.; Fernandez-Alba, A. Identification and quantitation of pesticides in vegetables by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 671–682, doi:10.1016/j.trac.2005.04.004.
121. García-Reyes, J.F.; Hernando, M.D.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 828–841, doi:10.1016/j.trac.2007.06.006.

122. European Comision. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANTE/12682/2019. *Dir. Gen. Heal. Food Saf.* **2019**, 1–53.
123. Casado, J.; Santillo, D.; Johnston, P. Multi-residue analysis of pesticides in surface water by liquid chromatography quadrupole-Orbitrap high resolution tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1024*, 1–17, doi:10.1016/j.aca.2018.04.026.
124. León, N.; Pastor, A.; Yusà, V. Target analysis and retrospective screening of veterinary drugs, ergot alkaloids, plant toxins and other undesirable substances in feed using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Talanta* **2016**, *149*, 43–52, doi:10.1016/j.talanta.2015.11.032.
125. López-García, M.; Romero-González, R.; Frenich, A.G. Determination of rodenticides and related metabolites in rabbit liver and biological matrices by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *137*, 235–242, doi:10.1016/j.jpba.2017.01.043.
126. Krauss, M.; Singer, H.; Hollender, J. LC-high resolution MS in environmental analysis: From target screening to the identification of unknowns. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 943–951, doi:10.1007/s00216-010-3608-9.
127. Moschet, C.; Piazzoli, A.; Singer, H.; Hollender, J. Alleviating the reference standard dilemma using a systematic exact mass suspect screening approach with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10312–10320, doi:10.1021/ac4021598.
128. Kaufmann, A.; Walker, S. Post-run target screening strategy for ultra high performance liquid chromatography coupled to Orbitrap based veterinary drug residue analysis in animal urine. *J. Chromatogr. A* **2013**,

- 1292, 104–110, doi:10.1016/j.chroma.2012.09.019.
129. Dong, B.; Hu, J. Photodegradation of the novel fungicide fluopyram in aqueous solution: kinetics, transformation products, and toxicity evolution. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 19096–19106, doi:10.1007/s11356-016-7073-7.
130. Guan, W.; Ma, Y.; Zhang, H. Residue and dissipation dynamics of fluopyram in cucumber and soil. *Adv. Mater. Res.* **2012**, *347–353*, 2255–2259, doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.347-353.2255.
131. Monika; Srivastava, A.; Suyal, A.; Srivastava, P.C. Persistence behavior of penoxsulam herbicide in two different soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2017**, *99*, 470–474, doi:10.1007/s00128-017-2171-x.
132. López-Ruiz, R.; Romero-González, R.; Ortega-Carrasco, E.; Garrido Frenich, A. Dissipation studies of famoxadone in vegetables under greenhouse conditions using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry: putative elucidation of a new metabolite. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 5368–5376, doi:10.1002/jsfa.9794.
133. Li, J.; Jiang, Y.; Li, D. Determination of imidacloprid and its relevant metabolites in tomato using modified QuEChERS combined with ultrahigh-pressure liquid chromatography/Orbitrap tandem mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 5211–5218, doi:10.1002/jsfa.9769.
134. Sevilla-Morán, B.; López-Goti, C.; Alonso-Prados, J.L.; Sandín-España, P. Aqueous photodegradation of sethoxydim herbicide: Qtof elucidation of its by-products, mechanism and degradation pathway. *Sci. Total Environ.* **2014**, *472*, 842–850, doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.065.
135. Dulov, A.; Dulova, N.; Veressinina, Y.; Trapido, M. Degradation of propoxycarbazone-sodium with advanced oxidation processes. *Water Sci. Technol. Water Supply* **2011**, *11*, 129–134,

- doi:10.2166/ws.2011.019.
136. Beale, D.J.; Kaserzon, S.L.; Porter, N.A.; Roddick, F.A.; Carpenter, P.D. Detection of s-triazine pesticides in natural waters by modified large-volume direct injection HPLC. *Talanta* **2010**, *82*, 668–674, doi:10.1016/j.talanta.2010.05.030.
 137. Kurz, M.H.S.; Martel, S.; Goncalves, F.F.; Prestes, O.D.; Martins, M.L.; Zanella, R.; Adaime, M.B. Development of a fast method for the determination of the insecticide fipronil and its metabolites in environmental waters by SPE and GC-ECD. *J. Brazilian Chem Soc.* **2013**, *24*, 631–638, doi:10.5935/0103-5053.20130078.
 138. Henge, M. j.; Miller, M. Analysis of flonicamid and its metabolites in dried hops by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8033–8039, doi:10.1021/jf0719297.
 139. Kadar, A.; Faucon, J.-P. Determination of traces of fipronil and its metabolites in pollen by liquid chromatography with electrospray ionization – tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9741–9746.
 140. Hepperle, J.; Mack, D.; Sigalov, I.; Schöler, S.; Anastassiades, M. Analysis of “amitraz (sum)” in pears with incurred residues - Comparison of the approach covering the individual metabolites via LC-MS/MS with the approach involving cleavage to 2,4-dimethylaniline. *Food Chem.* **2015**, *166*, 240–247, doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.003.
 141. Caldow, M.; Fussell, R.J.; Smith, F.; Sharman, M. Development and validation of an analytical method for total amitraz in fruit and honey with quantification by gas chromatography – mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* **2007**, *23*, 280–284, doi:10.1080/02652030601013638.
 142. Bonnechère, A.; Hanot, V.; Van Loco, J. A rapid and environmental friendly determination of the dithiocarbamate metabolites ethylenethiourea and propylenethiourea in fruit and vegetables by ultra

- high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 4627–4631, doi:10.1016/j.chroma.2011.04.083.
143. Ko, A.; El-aty, A.M.A.; Rahman, M.; Jang, J.; Kim, S.; Choi, J.; Shim, J. A modified QuEChERS method for simultaneous determination of flonicamid and its metabolites in paprika using tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2014**, *157*, 413–420, doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.038.
144. Ng, B.; Quinete, N.; Gardinali, P.R. Assessing accuracy, precision and selectivity using quality controls for non-targeted analysis. *Sci. Total Environ.* **2020**, *713*, 136568, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136568.
145. Duhan, A.; Kumari, B.; Duhan, S. Determination of residues of fipronil and its metabolites in cauliflower by using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2015**, *94*, 260–266, doi:10.1007/s00128-014-1447-7.
146. Xue, J.; Pan, D.; Li, M.; Wu, X.; Wang, X.; Hua, R. Degradation of amisulbrom and its metabolite IT-4 in cucumber under field conditions and processing. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2018**, *98*, 67–81, doi:10.1080/03067319.2018.1430793.
147. Chawla, S.; Patel, D.J.; Patel, S.H.; Kalasariya, R.L.; Shah, P.G. Behaviour and risk assessment of fluopyram and its metabolite in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit and in soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 11626–11634, doi:10.1007/s11356-018-1439-y.
148. Dong, F.; Liu, X.; Xu, J.; Li, J.; Li, Y.; Shan, W. Determination of cyantraniliprole and its major metabolite residues in vegetable and soil using ultra - performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **2012**, *26*, 377–383, doi:10.1002/bmc.1669.
149. Dai, J.; Jiang, C.; Gao, G.; Zhu, L.; Chai, Y.; Chen, H.; Liu, X. Dissipation

- pattern and safety evaluation of cartap and its metabolites during tea planting, tea manufacturing and brewing. *Food Chem.* **2020**, *314*, 126165, doi:10.1016/j.foodchem.2020.126165.
150. Dong, X.; Tong, Z.; Chu, Y.; Sun, M.; Wang, M.; Gao, T.; Duan, J. Dissipation of prothioconazole and its metabolite prothioconazole-desthio in rice fields and risk assessment of its dietary intake. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 6458–6465, doi:10.1021/acs.jafc.8b06788.
151. Li, M.; Li, P.; Wang, L.; Feng, M.; Han, L. Determination and dissipation of fipronil and its metabolites in peanut and soil. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 4435–4443, doi:10.1021/jf5054589.
152. Su, Y.; Wang, W.; Hu, J.; Liu, X. Dissipation behavior, residues distribution and dietary risk assessment of tembotrione and its metabolite in maize via QuEChERS using HPLC-MS/MS technique. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *191*, 110187, doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110187.
153. Feng, C.; Xu, Q.; Qiu, X.; Jin, Y.; Ji, J.; Lin, Y.; Le, S.; Wang, G.; Lu, D. Comprehensive strategy for analysis of pesticide multi-residues in food by GC–MS/MS and UPLC-Q-Orbitrap. *Food Chem.* **2020**, *320*, 126576, doi:10.1016/j.foodchem.2020.126576.
154. Portolés, T.; Mol, J.G.J.; Sancho, J. V.; López, F.J.; Hernández, F. Validation of a qualitative screening method for pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *838*, 76–85, doi:10.1016/j.aca.2014.06.006.
155. Mol, H.G.J.; Tienstra, M.; Zomer, P. Evaluation of gas chromatography – electron ionization – full scan high resolution Orbitrap mass spectrometry for pesticide residue analysis. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *935*, 161–172, doi:10.1016/j.aca.2016.06.017.
156. Zhang, L.Q.; Zhang, X.M.; Zhang, H.W.; Wang, H.; Xu, H.; Wang, F.M.;

- Lin, C.; Xiao, J.; Xu, W.Y. Multiclass and multiresidue screening of veterinary drugs and pesticides in infant formula using Quadrupole-Orbitrap MS with PRM scan mode. *J. Mass Spectrom.* **2020**, *55*, doi:10.1002/jms.4497.
157. von Eyken, A.; Bayen, S. Optimization of the data treatment steps of a non-targeted LC-MS-based workflow for the identification of trace chemical residues in honey. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2019**, *30*, 765–777, doi:10.1007/s13361-019-02157-y.

CAPÍTULO

2

**EVALUACIÓN DE LA
SEGURIDAD
ALIMENTARIA
MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA DE
LÍQUIDOS Y DE GASES
ACOPLADAS A
ESPECTROMETRIA DE
MASAS**

1. Introducción

La mejora en el nivel de vida ha dejado patente que las personas se preocupan cada vez más por su salud y prestan más atención a la seguridad alimentaria, lo que incluye tener conocimiento de aquellas fuentes de exposición a residuos de plaguicidas que pueden tener un riesgo potencial para la salud humana. Los consumidores pueden exponerse a los plaguicidas por varias vías, siendo el consumo de frutas y verduras una de las que presenta un mayor riesgo, ya que se consumen principalmente en forma cruda o semiprocesada, representando el 30% de la ingesta diaria [1].

El uso de plaguicidas para la protección de plantas es lo que origina los denominados residuos de plaguicidas en productos alimenticios. Estos residuos son una mezcla de diversos compuestos que consta de la sustancia activa, sus isómeros y metabolitos. Los metabolitos se producen desde el mismo momento de la aplicación del plaguicida, por procesos metabólicos de las plantas o transformaciones causadas por microorganismos del suelo [2]. La definición de residuo de plaguicida suele basarse únicamente en el compuesto original. Sin embargo, una definición de residuo destinada a la evaluación de riesgos debe incluir todos los compuestos con acción toxicológica que puedan encontrarse en los alimentos cuyo origen son las plantas, tal y como se indica en la guía de la EFSA [3]. Con esta premisa cobra mayor importancia tener conocimiento de los metabolitos que se generan desde una sustancia activa y disponer de métodos para su análisis.

La gran mayoría de los métodos analíticos publicados están enfocados en la detección y cuantificación de la presencia de uno o más compuestos previamente seleccionados mediante los métodos de análisis dirigido [4–6]. En consecuencia, estos métodos sólo dan información del listado de estos compuestos seleccionados a priori. A tal fin las técnicas de análisis más utilizadas son LC y GC acopladas al analizador QqQ por su alta sensibilidad.

Sin embargo, a fin de ampliar el alcance de los métodos e incluir los potenciales compuestos procedentes de la transformación de los plaguicidas originales, así como la detección de otros compuestos no incluidos en el método de análisis, es necesario el uso de estrategias de análisis no dirigido, las cuales requieren del uso de analizadores de HRMS [7–11]. Dichos analizadores, al realizar adquisiciones en modo barrido completo no requieren del establecimiento de una lista de compuestos, permitiendo por tanto la detección de un número ilimitado de plaguicidas sin necesidad de reanalizar las muestras.

Por todo lo expuesto anteriormente, el control de residuos de plaguicidas se realiza generalmente mediante la aplicación de métodos de análisis en modo dirigido. Aunque, cada vez más se están introduciendo estrategias en modo no dirigido, que requieren del uso de bases de datos de plaguicidas y *software* específico, que permiten la identificación tentativa de otros compuestos presentes en las muestras sin la necesidad de estándares.

En este capítulo se presentan los trabajos centrados en el desarrollo y la validación de métodos para la determinación de un plaguicida y su metabolito en alimentos mediante LC-MS/MS (**Publicación I**), así mismo incluye el desarrollo y validación de un método multiresiduo para unos 200 plaguicidas, aplicando además el modo de análisis no dirigido para detectar otros compuestos de interés presentes en alimentos mediante GC-HRMS (**Publicación II**).

Las publicaciones incluidas en este capítulo, referentes a la determinación de plaguicidas, son las siguientes:

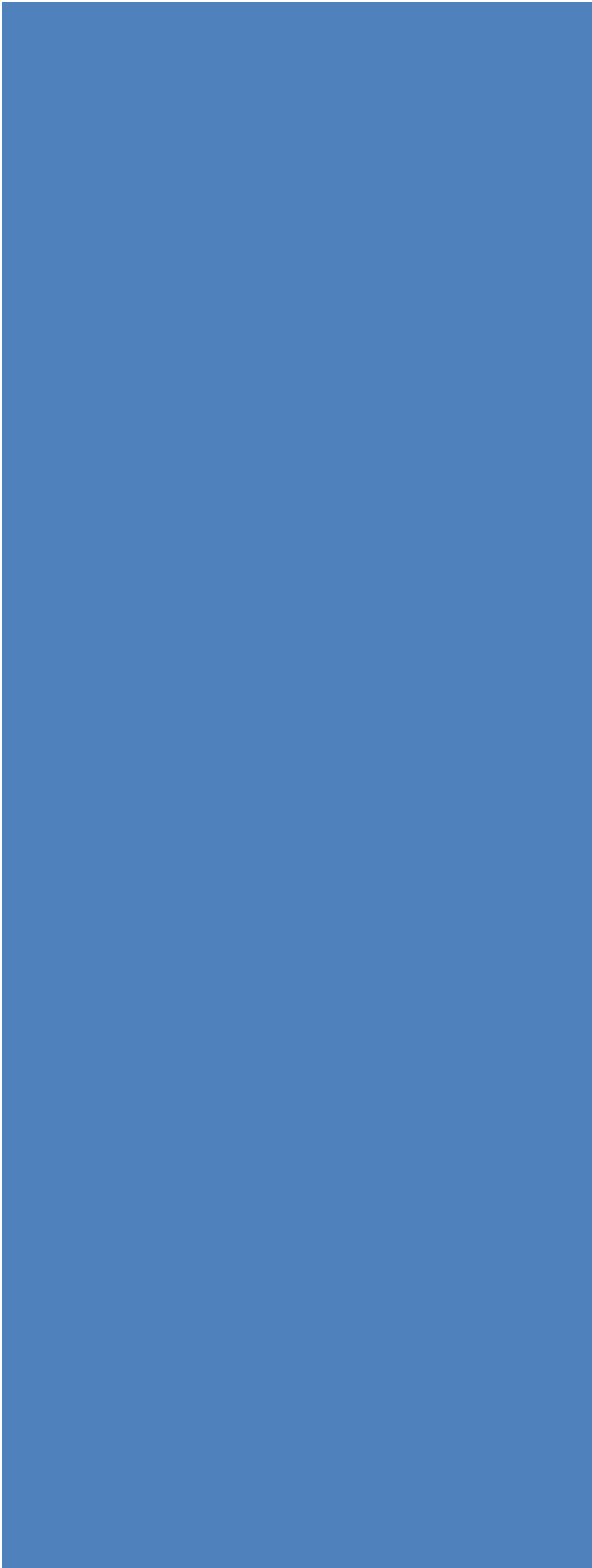
- **Publicación I.** Optimization and establishment of QuEChERS based method for determination of propoxycarbazone and its metabolite in food commodities by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Marta Vargas-Pérez**, Jesús Marín-Sáez, Francisco Javier Egea González, Antonia Garrido Frenich. *Food Chemistry*, 274, (2019), 429–433.
- **Publicación II.** Application of full scan gas chromatography high resolution mass spectrometry data to quantify targeted pesticide residues and to screen for additional substances of concern in fresh-food commodities. **Marta Vargas-Pérez**, Irene Domínguez, Francisco Javier Egea González, Antonia Garrido Frenich. *Journal of Chromatography A*, 1622 (2020) 461118.

2. Referencias

1. Fan, X.; Zhao, S.; Hu, J. Dissipation behavior and dietary risk assessment of lambda-cyhalothrin, thiamethoxam and its metabolite clothianidin in apple after open field application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2019**, *101*, 135–141, doi:10.1016/j.yrtph.2018.11.003.
2. Czaja, K.; Struciński, P.; Korcz, W.; Minorczyk, M.; Hernik, A.; Wiadrowska, B. Alternative toxicological methods for establishing residue definitions applied for dietary risk assessment of pesticides in the European Union. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *137*, doi:10.1016/j.fct.2020.111120.
3. European food safety authority. Guidance on the establishment of the residue definition for dietary risk assessment. *EFSA J.* **2016**, *14*, doi:10.2903/j.efsa.2016.4549.
4. Meghesan-Breja, A.; Cimpoiu, C.; Hosu, A. Identification and quantification of some pesticide metabolites from vegetables by GC-TOF-MS and LC-MS-QQQ. *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem.* **2017**, *62*, 19–34, doi:10.24193/subbchem.2017.3.02.
5. Chen, X.; Liu, X.; Dong, B.; Hu, J. Simultaneous determination of pyridaben, dinotefuran, DN and UF in eggplant ecosystem under open-field conditions: Dissipation behaviour and residue distribution. *Chemosphere* **2018**, *195*, 245–251, doi:10.1016/j.chemosphere.2017.12.011.
6. Dong, B.; Yang, Y.; Pang, N.; Hu, J. Residue dissipation and risk assessment of tebuconazole, thiophanate-methyl and its metabolite in table grape by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2018**, *260*, 66–72, doi:10.1016/j.foodchem.2018.03.062.
7. Saito-Shida, S.; Hamasaka, T.; Nemoto, S.; Akiyama, H. Multiresidue determination of pesticides in tea by liquid chromatography-high-

- resolution mass spectrometry: Comparison between Orbitrap and time-of-flight mass analyzers. *Food Chem.* **2018**, *256*, 140–148, doi:10.1016/j.foodchem.2018.02.123.
8. Feng, C.; Xu, Q.; Qiu, X.; Jin, Y.; Ji, J.; Lin, Y.; Le, S.; Wang, G.; Lu, D. Comprehensive strategy for analysis of pesticide multi-residues in food by GC–MS/MS and UPLC-Q-Orbitrap. *Food Chem.* **2020**, *320*, 126576, doi:10.1016/j.foodchem.2020.126576.
 9. Manzano-Sánchez, L.; Martínez-Martínez, J.A.; Domínguez, I.; Vidal, J.L.M.; Frenich, A.G.; Romero-González, R. Development and application of a novel pluri-residue method to determine polar pesticides in fruits and vegetables through liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Foods* **2020**, *9*, doi:10.3390/foods9050553.
 10. Scarpone, R.; Rosato, R.; Chiumiento, F.; Cipolletti, C.; Sergi, M.; Compagnone, D. Preliminary study to develop an alternative method for the non-targeted determination of xenobiotics in food by means of ultra high performance liquid chromatography coupled to high resolution and accuracy mass spectrometry. *Food Anal. Methods* **2020**, *13*, 1099–1110, doi:10.1007/s12161-020-01727-1.
 11. Chiarello, M.; Moura, S. Multi-pesticide residue analysis by high resolution mass spectrometry in complementary matrices: wheat flour, lettuce and apple samples. *Anal. Methods* **2018**, *10*, 3958–3967, doi:10.1039/c8ay01083h.

Publicación I



Optimization and establishment
of QuEChERS based method for
determination of
propoxycarbazone and its
metabolite in food commodities
by liquid chromatography
coupled to tandem mass
spectrometry

Marta Vargas-Pérez, Jesús

Marín-Sáez, Francisco Javier Egea González

& Antonia Garrido Frenich

Food Chemistry 274 (2019) 429–433



Analytical Methods

Optimization and establishment of QuEChERS based method for determination of propoxycarbazone and its metabolite in food commodities by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry



Marta Vargas-Pérez, Jesús Marín-Sáez, Francisco Javier Egea González, Antonia Garrido Frenich*

Research Group "Analytical Chemistry of Contaminants", Department of Chemistry and Physics, Research Centre for Agricultural and Food Biotechnology (BITAL), University of Almería, Agrifood Campus of International Excellence, CeiA3, E-04120 Almería, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Propoxycarbazone
Metabolite
2-Hydroxy-propoxycarbazone
QuEChERS
UHPLC-MS/MS

ABSTRACT

This study reports a method for propoxycarbazone pesticide determination including its metabolite in food commodities (lettuce, beetroot, soybean meal and honey). Both compounds were extracted, and samples cleaned using a buffered QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method based on the AOAC Official Method, followed by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Both matrix-matched calibration curves showed good linearity ($R^2 = 0.99$) within the tested ranges. Method performance was assessed on the basis of recovery and intra/inter-day precision studies at spiked concentrations of 10 (25) and 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n = 5$). Mean recovery rates were between 73 and 110%, while precision studies, assessed by relative standard deviation (RSD), were $\leq 20\%$. The limits of quantification (LOQ) were established as 10 or 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, depending on the matrix, which are low enough for monitoring residues at regulated maximum residue levels.

1. Introduction

Steady growth of the world's population necessitates increased food production, which in turn places the onus upon the international chemical industry to find new pesticides to protect crops against pests and other biological threats (Ciéslik, Sadowska-Rociek, Molina-Ruiz, & Surma-Zadora, 2011). Vegetables are essential components of a healthy diet, since they constitute a major source of vitamins, minerals and fibers. However, a consequence of pesticides use is the presence of their residues in food commodities, which could cause significant harm to consumers (Garrido Frenich, Martín-Fernández, Díaz-Moreno, Martínez Vidal, & López-Gutiérrez, 2012; Sohair, Gad, Naglaa-M, Amr-H, & Mohamed-Tawfic, 2015).

Herbicides are used mainly during pre-harvest stages. They are weed killers that can stop unwanted plant growth, while leaving the crop relatively unharmed (Lee et al., 2016). However, these chemicals can be transferred from plants to animals along the food chain (LeDoux, 2011). In 2004, Bayer developed propoxycarbazone, which is very effective in controlling many significant grass weeds in winter wheat as well as downy brome, cheat, Japanese brome, and soft chess and a multitude of broadleaf weeds, such as wild and tumble mustards (EFSA, 2016; Yilmaz & Dane, 2013).

It is important to evaluate foods for the presence of parent compounds but also potential metabolites, otherwise the effects of chemicals use could be under-estimated. Consequently, new analytical methods are needed to determine metabolite concentrations in different matrices and other environmental media (Li et al., 2013). Based on the wheat metabolism studies of propoxycarbazone sodium, the European Food Safety Authority (EFSA) has proposed the definition of monitoring and risk assessment in cereal crops as the sum of propoxycarbazone, its salts and 2-hydroxy-propoxycarbazone, expressed as propoxycarbazone (EFSA, 2016).

The maximum residue level (MRL) of propoxycarbazone in foods has been regulated by EU in the range 0.02–0.05 mg/kg , depending on the matrix, in agreement with the reasoned opinion on MRL (EFSA, 2013). In recent years, the presence of pesticides, parent compounds and their major metabolites or conversion products, has become a serious environmental concern. Determination of pesticide residues and their metabolites in food matrices is a challenge, especially with low concentrations of analytes and the large number of interfering substances that can be coextracted with target analytes. These factors lead, in most of cases, to biased quantifications and, thus, affect the accuracy of analytical results (Abdel-Ghany, Hussein, El Azab, El-Khatib, & Linscheid, 2016; Rizzetti et al., 2016).

* Corresponding author.

E-mail address: agarrido@ual.es (A. Garrido Frenich).

The development of analytical methods for determination of the presence and concentrations of propoxycarbazono and its metabolite is of great significance for risk assessment in humans, animals, and the environment. To date, only two studies have been published addressing the determination of propoxycarbazono in environmental matrices; one in soil using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (De Gaetano et al., 2016) and the other in sewage using liquid chromatography with diode array detector (LC-DAD) (Rouchaud, Neus, Eelen, & Bulcke, 2002). Also, several studies have been published regarding determination of propoxycarbazono in foodstuffs, but none includes the analysis of its metabolite (Kaczynski, 2017a, 2017b; Karise et al., 2017; Kiljanek et al., 2016) by LC with tandem MS (LC-MS/MS).

QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) has been proposed as a reference methodology for pesticide extraction. In recent years, QuEChERS methods have been developed as alternatives for pesticide residue analysis in different food matrices, but neither propoxycarbazono nor its metabolite were included.

The aim of this study was, therefore, to optimize and validate an analytical method for the simultaneous determination of propoxycarbazono and its metabolite in foodstuffs, specifically lettuce, beetroot, soybean meal and honey. The acetate-buffering AOAC Official QuEChERS Method (AOAC, 2007) was modified with this purpose in mind. Subsequently, ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry triple quadrupole (UHPLC-MS/MS) was used for determination and confirmation of target compounds. The clean-up step was optimized by evaluating the effects of several sorbents as well as matrix effects on the quantification. Finally, the method was applied to the analysis of food samples obtained from local markets of Almería (Spain).

2. Material and methods

2.1. Reagents and chemicals

The reference standard for propoxycarbazono sodium (> 98.0%) was supplied by Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), while the reference standard for 2-hydroxy-propoxycarbazono (> 98.7%) was supplied by Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Stock solutions of propoxycarbazono sodium and 2-hydroxy-propoxycarbazono (200 mg/L) were prepared individually in methanol (HPLC grade, Sigma Aldrich) and stored at -20°C in the dark. A working standard solution containing both compounds was prepared by diluting accurate volumes of the above solutions in a volumetric flask to obtain a concentration of 1 mg/L, which was also stored at -20°C in the dark. Magnesium sulphate (MgSO_4) and acetic acid for HPLC were obtained from Panreac AppliChem (Barcelona, Spain). Sodium acetate anhydrous, ammonium acetate and HPLC grade acetonitrile were supplied by Sigma Aldrich. Primary secondary amine (PSA) was purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). C18 (octadecyl) bonding was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Formic acid (Optima LC-MS) was supplied by Fisher Scientific (Geel, Belgium). Ultra-pure water was prepared using a gradient Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Syringe filters (Econofit Nylon 0.2 μm , 13 mm) were obtained from Agilent Technologies (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

2.2. Instrument and apparatus

An Agilent series 1290 RRLC system (Agilent) was used for pesticide analysis. This instrument was equipped with a binary pump model G4220A, an autosampler model G4226A, an autosampler thermostat model G1330B and a column compartment thermostat mod G1316C. It was coupled to an Agilent triple quadrupole mass spectrometer model G6460 with a Jet Stream electronic spray ionization (ESI) source model G1958-65138. A Zorbax plus C18 column (2.1 \times 100 mm 1.8 μm particle size) from Agilent was used for chromatographic separation of the target compounds. Data acquisition and processing were performed

using MassHunter 8.02 (Agilent) software.

Samples were homogenized thoroughly using an automatic blender (Sammic S.L., Azkoitia, Spain), and a WX vortex from Velp Scientifica (Usmate, Italy). Centrifugation was carried out in a Consul 21 from Orto Alresa (Madrid, Spain). An analytical balance AB204-S (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) was used.

2.3. Samples

Samples of lettuce, beetroot, honey and soybean meal, used during development and validation of the method, were obtained from organic local markets located in Almería (Spain). However, verification of the method was done using five conventionally growth foods purchased from other local markets in Almería.

Samples were taken according to the method established in Directive 2002/63/EC. These were chopped and homogenized prior to analysis. Blank samples (no food) were used for the preparation of spiked samples, which were used as in-house reference materials for optimizing sample extraction and performing method validation (Chen, Marín-Sáez, Romero-González, & Garrido Frenich, 2017; Grande-Martínez, Arrebola-Liébanas, Martínez-Vidal, Hernández-Torres, & Garrido-Frenich, 2015).

2.4. Samples preparation

Three QuEChERS procedures were optimized, based on the matrix:

Lettuce and beetroot: 10 g of sample were weighed in a 50 mL polypropylene centrifuge tube and 10 mL of acetonitrile containing 1% (v/v) of acetic acid added. The mixture was homogenized for 2 min using the vortex before 4 g MgSO_4 and 1 g sodium acetate anhydrous were added. The mixture was vortexed for 2 min and the tube centrifuged for 5 min at 2516 g before 1 mL of the supernatant was transferred to a 15 mL centrifuge tube containing 150 mg of MgSO_4 and 50 mg of PSA. This tube was again vortexed for 1 min, centrifuged for 5 min at 2516 g, and the supernatants passed through a 0.22 μm nylon syringe filter and transferred to a vial prior LC analysis.

Soybean meal: 5 g of sample were weighed in a 50 mL polypropylene centrifuge tube and hydrated with 10 mL of Milli-Q water. The tube was mixed by vortexed for 1 min and 10 mL of acetonitrile containing 1% (v/v) of acetic acid added before the mixture was homogenized for 2 min. The mixture was homogenized with 4 g of MgSO_4 and 1 g ammonium acetate by vortex for 2 min. Afterwards, the sample was centrifuged for 5 min at 2516g and 1 mL of supernatant transferred to a 15 mL centrifuge tube containing 25 mg of PSA and 25 mg of C18. The tube was again vortexed for 1 min and then centrifuged for 5 min at 2516g. The supernatant was passed through a 0.22 μm nylon syringe filter and transferred to a vial for LC analysis.

Honey: 5 g of sample were weighed in a 50 mL polypropylene centrifuge tube and mixed with 7.5 mL of Milli-Q water by vortex for 1 min. 10 mL of acetonitrile containing 1% (v/v) of acetic acid was added and the mixture homogenized for 2 min. In this case, 6 g of MgSO_4 and 1g sodium acetate anhydrous were added, and the mixture vortexed for 2 min. The sample was centrifuged for 5 min at 251 g and 1 mL of the supernatant transferred to a 15 mL centrifuge tube containing 50 mg of PSA, 50 mg of C18 and 150 mg MgSO_4 . The tube was again vortexed for 1 min and then centrifuged for 5 min at 2516g. Finally, the supernatant was passed using a 0.22 μm nylon syringe filter and transferred into a vial for LC analysis.

2.5. UHPLC-MS/MS analyses

Chromatographic determination of propoxycarbazono and 2-hydroxy-propoxycarbazono was carried out using a binary mobile phase with methanol (A) and an aqueous solution of formic acid (0.1%, v/v) (B). A flow rate of 0.2 mL/min was set for separation of the selected compounds by UHPLC. The gradient elution started at 90% of B held for

Table 1
Retention time windows (RTWs) and MS/MS parameters of propoxycarbazone sodium and 2-hydroxy-propoxycarbazone.

Compound	RTW (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z) ^a	Ion ratio (%)
Propoxycarbazone sodium	6.73–6.84	415.0 (95) ^b	174.0 (10) ^c	40
			116.0 (20)	
2-Hydroxy-propoxycarbazone	7.20–7.31	399.0 (95)	199.0 (10)	32
			184.1 (10)	
			158.0 (10)	
			116.0 (20)	

^a Transition in bold was used for quantification.

^b Fragmentor voltage (V) is given in brackets.

^c Collision energy (eV) is given in brackets.

2 min and was reduced to 0% in successive steps: 70% for 1 min, 50% for another 1 min, 20% for 1 min and, finally, to 0% over 1 min and held for 2 min. Subsequently, it was returned to the initial composition (90% B) over 2 min. The total running time was 10 min. Column temperature was set at 25 °C and the injection volume at 5 µL.

Propoxycarbazone and its metabolite were ionized in the positive ESI mode and detected using multiple reaction monitoring (MRM). ESI parameters were as follows: drying gas temperature: 325 °C, curtain gas temperature: 400 °C, curtain gas flow: 10 mL/min, drying gas flow: 5 mL/min, nebulizer: 45 psi, capillary: +3500 V. Retention time and MS/MS parameters are shown in Table 1. Optimization of UHPLC–MS/MS parameters was performed by direct infusion of individual standard solutions, each at 1 mg/L in methanol and at a flow rate of 0.2 mL/min. MassHunter Optimizer (Agilent) software was used for quantification of the pesticide and its metabolite.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of UHPLC–MS/MS

Modification of the mobile phase gradient profile is often performed to improve both chromatographic separation and ionization efficiency in UHPLC–MS/MS protocols. In this study, a range of mobile phase flow-rates, between 0.1 and 1 mL/min, was tested. Propoxycarbazone and its metabolite were well resolved with the gradient profile set at the flow-rate indicated in Section 2.5. Optimization of the separation conditions was carried out by injecting working standard solutions, containing a mixture of both compounds at 100 µg/L.

Concerning spectrometric optimization, both ESI positive and negative modes were tested. Results showed a better performance for both target compounds using ESI in the positive mode, because it offered higher precursor ion signal intensities and better fragmentation patterns. Fig. 1 shows the mass spectra and MS/MS transitions obtained after fragmentation of the protonated molecule. The fragmentor voltages and collision energy were also optimized. The most intense transitions for propoxycarbazone and its metabolite *m/z* were selected for quantification, and other transitions were used for confirmation purposes (Table 1).

3.2. Optimization of the extraction and clean up procedures

Prior validation, the extraction and clean-up steps were optimized, checking recovery rates of target compounds using blank spiked samples for each commodity at 50 µg/kg, as in-house reference samples.

The QuEChERS approach has proven versatile and serves as a template for modification depending on the analyte properties, matrix composition, equipment and analytical technique available (Lehotay et al., 2010). The AOAC Official Method (AOAC, 2007) was used as a starting point. The original method, which used acetonitrile containing

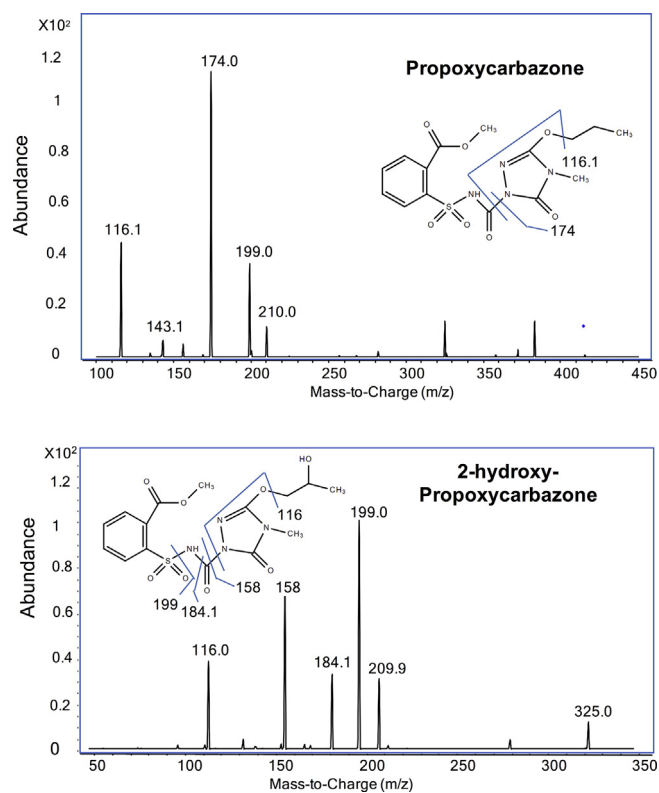


Fig. 1. MS/MS spectra of the protonated molecule $[M+H]^+$ of the target compounds using multiple reaction monitoring. Note: Mass spectra obtained from standard solution at 100 µg/L.

1% (v/v) of acetic acid as for extraction, performed well in terms of recovery rates for both analytes in lettuce and beetroot (Table 2). However, some modifications were necessary in the case of soybean meal and honey, since their low water content influenced recovery rates and it was necessary to add water prior to the extraction. In addition to the methods described in Section 2.4, recovery rates for the target compounds in soybean meal were evaluated using either methanol with formic acid (Martínez-Domínguez, Nieto-García, Romero-González, & Garrido-Frenich, 2015) or methanol-water with formic acid (Kaczynski, 2017a, 2017b). However, poor recovery rates, less than 35%, were obtained.

Clean up stages were also optimized in terms of recovery rates and precision. The following sorbents were tested: PSA + C18; PSA + GBC and PSA + C18 + GBC. As it stated in Section 2.4, clean up using PSA + C18 performed best with soybean meal, while it was necessary to add MgSO₄ for the clean-up of honey (Calatayud-Vernicha, Calatayud, Simó, & Picó, 2016). In all cases, quantification was performed using matrix-matching calibration.

3.3. Method validation

Suitability of the method for analysis of target compounds in the different commodities was validated prior to application in food samples to ensure the results obtained were reliable (Martínez-Domínguez et al., 2015). Validation of the method was carried out according to DG SANTE documentation (SANTE, 2017).

3.3.1. Linearity and matrix effect

Linearity was evaluated using matrix-matched standard calibration and analyzed spiked blank samples for each matrix at six concentrations (from 5 to 200 µg/kg). Overall, determination coefficients (*R*²) were 0.99 for all the samples (Table 2) and the relative standard deviation of response factor (RSD) for each calibration was less than ± 20%.

Table 2
Performance characteristics of the optimized method.

Compound	Matrix	R ²	Concentration (µg/kg)	R (%)	%RSD _{intra}	%RSD _{inter}	LOQ (µg/kg)
Propoxycarbazone	Lettuce	0.99	10	73	10	9	10
			50	104	19	8	
	Beetroot	0.99	10	77	4	9	10
			50	86	4	5	
	Soybean meal	0.99	25	82	9	20	25
			50	88	13	12	
	Honey	0.99	25	101	9	18	25
			50	107	8	18	
2-Hydroxy-propoxycarbazone	Lettuce	0.99	10	78	12	17	10
			50	74	11	6	
	Beetroot	0.99	10	75	5	15	10
			50	70	7	7	
	Soybean meal	0.99	25	89	7	13	25
			50	107	14	16	
	Honey	0.99	25	108	10	17	25
			50	110	19	13	

R: Recovery; %RSD_{intra}: Intra-day precision; %RSD_{inter}: Inter-day precision.

Matrix effects (ME) are a significant drawback of LC–ESI–MS/MS, due to the presence of co-eluting components, which may enhance or reduce the chromatographic signal of analytes (Egea González, Hernández Torres, Almansa López, Cuadros-Rodríguez, & Martínez Vidal, 2002). ME in each target food was studied by comparison between calibration curves prepared in pure solvent and those obtained in matrix-matched blank sample extracts, which were spiked at different calibration levels. The percentage of ME affecting quantification of each compound was calculated as: %ME = (slope matrix/slope solvent) – 1) × 100. Signal suppression occurs if the percentage is negative, while a positive result indicates signal enhancement. ME occur when |ME| > 20% but there is no ME when |ME| ≤ 20% (Kaczynski, 2017a, 2017b). Considering the proposed operating conditions, there were no ME in lettuce and beetroot, where %ME was less than 20%, which means propoxycarbazone and its metabolite could be quantified reliably using solvent calibration standards. However, honey and soybean meal showed a strong matrix-effect resulting in |ME| > 20%. As a consequence, matrix-matched calibration was necessary to obtain reliable quantification of both compounds in honey and soybean meal samples.

3.3.2. Precision and trueness

Precision and trueness of the analytical method were obtained from in-house reference samples. These were prepared by spiking with a working standard solution, containing both compounds, different batches of five blank samples from each commodity, at two concentrations, specifically their respective limits of quantification (LOQ) and 50 µg/kg (Table 2). Trueness was calculated as % recovery rates for each batch (%R). Precision was calculated either intra- or inter-day values (Calatayud-Vernicha et al., 2016; Grande-Martínez et al., 2015). More specifically, the first precision value was obtained by analysing one batch of five spiked samples on the same day, keeping conditions as most stable as possible throughout. Inter-day precision was calculated by analysing a batch of spiked samples on different days over two weeks. Quantification was addressed by including in each batch of samples a matrix-matching calibration solution prepared from blank samples of soybean meal and honey. In the case of lettuce and beetroot, pure solvent calibration solutions were enough since ME did not occur. Acceptable mean recoveries were those within the range 70–120%, with an associated repeatability RSD ≤ 20% (Martínez-Domínguez et al., 2015). Table 2 shows recovery rates (73–110%), intra-day precision (4–19%) and inter-day precision (5–20%) values were within these limits, fulfilling the quality criteria included in SANTE (2017) guidelines.

3.3.3. Limits of quantification and limits of detection

Monitoring residues in foodstuffs requires analytical methods with LOQs low enough to comply with the MRL established by regulations. As a consequence, the analytical method was optimized to yield LOQs at concentrations below or equal to the MRL set for each matrix, but also good performance for trueness and precision studies, according to the SANTE (2017) guidelines. Based on these criteria, the analytical method was able to quantify 10 µg/kg of propoxycarbazone and its metabolite in lettuce and beetroot, and 25 µg/kg in soybean meal and honey, which correspond to values below the required MRLs. The limit of detection (LOD) is defined as the lowest concentration of analyte and its metabolite that can be differentiated from the matrix signal with a signal-to-noise ratio (S/N) ratio of three times the background chromatographic noise. The LOD for propoxycarbazone and its metabolite was determined experimentally using spiked blanks and for both compounds, varied from 3 µg/kg to 6 µg/kg in all matrices (Table 2).

3.4. Analysis of food samples

The proposed method was applied to determine the magnitude of pesticide residues in food samples. Five conventionally grown foods (lettuce, beetroot, soybean meal and honey) were purchased from local markets in Almería (Spain). A quality control procedure was to ensure the reliability of results, namely – for soybean meal and honey-matrix-matching calibration solutions in the range 25–150 µg/kg, a blank sample to be monitored for accidental contamination, and a spiked blank sample at respective LOQs. In the case of lettuce and beetroot, the procedure was the same, except the calibration was performed in pure solvent and the range of concentrations was set between 10 and 150 µg/kg, since the LOQ was lower than for soybean meal and honey. Fig. 2 shows a typical chromatogram for a blank beetroot sample spiked at 75 µg/kg.

Results obtained for either propoxycarbazone or 2-hydroxy-propoxycarbazone residues were below the LODs in all samples, which corresponds with most published data, where the occurrence of herbicide residues in this kind of samples is occasional, and supports the safety of these commodities for consumption.

4. Conclusions

In the present study, a UHPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of the herbicide propoxycarbazone and its metabolite in lettuce, beetroot, soybean meal and honey was developed and validated successfully. A modified QuEChERS approach for each matrix followed by clean-up in combination with the UHPLC–MS/MS analysis provided

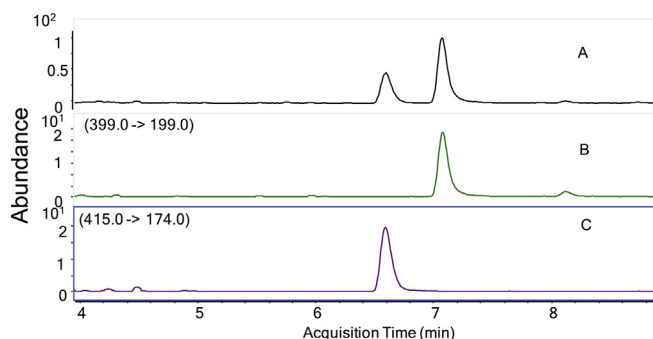


Fig. 2. UHPLC–MS/MS chromatogram of a blank beetroot sample spiked at 75 µg/kg with propoxycarbazono and its metabolite (A), and extracted ion chromatograms of propoxycarbazono (B) and 2-hydroxy-propoxycarbazono (C) in the same sample.

sufficient selectivity and sensitivity for the simultaneous determination of these target compounds. The method is appropriate for routine monitoring of propoxycarbazono and its metabolite residues in vegetables, cereals and food samples to ensure food safety. In the environment, the method could be used for environmental risk assessment, to study likely transference among rotational crops, and assess exposure of pollinators using the presence of either the parent compound or its metabolite in honey.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abdel-Ghany, M. F., Hussein, L. A., El Azab, N. F., El-Khatib, A. H., & Linscheid, M. W. (2016). Simultaneous determination of eight neonicotinoid insecticide residues and two primary metabolites in cucumbers and soil by liquid chromatography–tandem mass spectrometry coupled with QuEChERS. *Journal of Chromatography B*, *1031*, 15–28.
- AOAC Official Method (2007). *Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate*.
- Calatayud-Vermicha, P., Calatayud, F., Simó, E., & Picó, Y. (2016). Efficiency of QuEChERS approach for determining 52 pesticide residues in honey and honey bees. *Methods X*, *3*, 452–458.
- Chen, H., Marín-Sáez, J., Romero-González, R., & Garrido Frenich, A. (2017). Simultaneous determination of atropine and scopolamine in buckwheat and related products using modified QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *218*, 173–180.
- Ciéslik, E., Sadowska-Rociek, A., Molina-Ruiz, J. M., & Surma-Zadora, M. (2011). Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. *Food Chemistry*, *125*, 773–778.
- Commission Directive 2002/63/EC (2002). Establishing community methods of sampling for the official control of pesticide residues in and on products of plant and animal origin. *Official Journal of the European Communities*.
- De Gaetano, Y., Hubert, J., Mohamadou, A., Boudesocque, S., Plantier-Royon, R., Renault, J. H., & Dupont, L. (2016). Removal of pesticides from wastewater by ion pair centrifugal partition extraction using betaine-derived ionic liquids as extractants. *Chemical Engineering Journal*, *285*, 596–604.
- EFSA (2013). Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for propoxycarbazono according to article 12 of regulation (EC) No. 396/2005. *The EFSA Journal*, *11*, 3164–3194.
- EFSA (2016). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance propoxycarbazono (variant evaluated propoxycarbazono-sodium). *The EFSA Journal*, *14*, 4612–4637.
- Egea González, F. J., Hernández Torres, M. E., Almansa López, E., Cuadros-Rodríguez, L., & Martínez Vidal, J. L. (2002). Matrix-effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis. *Journal of Chromatography A*, *966*, 155–165.
- European Commission. SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
- Garrido Frenich, A., Martín-Fernández, M. M., Díaz-Moreno, L., Martínez Vidal, J. L., & López-Gutiérrez, N. (2012). Multiresidue pesticide analysis of tuber and root commodities by QuEChERS extraction and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, *95*, 1319–1330.
- Grande-Martínez, A., Arrebola-Liébana, F. J., Martínez-Vidal, J. L., Hernández-Torres, M. L., & Garrido-Frenich, A. (2015). Optimization and validation of a multiresidue pesticide method in rice and wheat flour by modified QuEChERS and GC–MS/MS. *Food Analytical Methods*, *9*, 548–563.
- Kaczynski (2017a). Clean-up and matrix effect in LC–MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. *Food Chemistry*, *230*, 524–531.
- Kaczynski, P. (2017b). Large-scale multi-class herbicides analysis in oilseeds by rapid one-step QuEChERS-based extraction and cleanup method using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *230*, 411–422.
- Karise, R., Raimets, R., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Pihlik, P., Keres, I., ... Mänd, M. (2017). Are pesticide residues in honey related to oilseed rape treatments? *Chemosphere*, *188*, 389–396.
- Kiljanek, T., Niewiadomska, A., Semeniuk, S., Gawel, M., Borzęcka, M., & Posylniak, A. (2016). Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry – Honeybee poisoning incidents. *Journal of Chromatography A*, *1435*, 100–114.
- LeDoux, M. (2011). Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *Journal of Chromatography A*, *1218*, 1021–1036.
- Lee, Y. J., Rahman, M. M., Abd-El-Aty, A. M., Choi, J. H., Chung, H. S., Kim, S. W., ... Shim, J. H. (2016). Detection of three herbicides, and one metabolite, residues in brown rice and rice straw using various versions of the QuEChERS method and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *210*, 442–450.
- Lehotay, S. J., Son, K. A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., ... Leepipatiboon, N. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, *1217*, 2548–2560.
- Li, M., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Kong, Z., Li, Y., & Zheng, Y. (2013). Simultaneous determination of cyflumetofen and its main metabolite residues in samples of plant and animal origin using multi-walled carbon nanotubes in dispersive solid-phase extraction and ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1300*, 95–103.
- Martínez-Domínguez, G., Nieto-García, A. J., Romero-González, R., & Garrido-Frenich, A. (2015). Application of QuEChERS based method for the determination of pesticides in nutraceutical products (*Camellia sinensis*) by liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *177*, 182–190.
- Rizzetti, T. M., Kemmerich, M., Martins, M. L., Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R. (2016). Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC–MS/MS. *Food Chemistry*, *196*, 25–33.
- Rouchaud, J., Neus, O., Eelen, H., & Bulcke, R. (2002). Persistence and movement of the herbicide propoxycarbazono-sodium in winter wheat crops. *Toxicological and Environmental Chemistry*, *82*, 99–111.
- Sohair, A., Gad, A., Naglaa-M, L., Amr-H, S., & Mohamed-Tawfic, A. (2015). Hazard index, a tool for a long-term risk assessment of pesticide residues in some commodities, a pilot study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *73*, 985–991.
- Yilmaz, G., & Dane, F. (2013). Phytotoxic effects of herbicide Attribut and surfactant BioPower on the root, stem, and leaf anatomy of *Triticum aestivum* 'Pehlivan'. *Turkish Journal of Botany*, *37*, 886–893.

Publicación II

Application of full scan gas chromatography high resolution mass spectrometry data to quantify targeted-pesticide residues and to screen for additional substances of concern in fresh-food commodities

Marta Vargas-Pérez, Francisco Javier Egea

González & Antonia Garrido Frenich

Journal of Chromatography A 1622 (2020)

461118



Application of full scan gas chromatography high resolution mass spectrometry data to quantify targeted-pesticide residues and to screen for additional substances of concern in fresh-food commodities

Marta Vargas-Pérez, Irene Domínguez, Francisco Javier Egea González, Antonia Garrido Frenich*

Research Group "Analytical Chemistry of Contaminants", Department of Chemistry and Physics, Center for Research in Mediterranean Intensive Agrosystems and Agri-Food Biotechnology (CIAIMBITAL), University of Almería, Agrifood Campus of International Excellence, CeIA3, E-04120 Almería Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2020

Revised 24 March 2020

Accepted 6 April 2020

Available online 13 April 2020

Keywords:

Q-Exactive Orbitrap
Gas chromatography
HRMS
Full-scan
Deconvolution
Pesticide residues monitoring

ABSTRACT

A novel application, which combines targeted and non-targeted approaches, using gas chromatography high-resolution mass spectrometry (GC-HRMS) for multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables is proposed; the aim is to add information to that obtained from targeted methods to be used in pesticide residues monitoring laboratories.

Extract from fruit samples obtained with QuEChERS method are analysed with two different approaches: a first step in targeted mode in full scan, and a second step in non-targeted mode with HRMS deconvolution. The targeted method was validated for 191 pesticides, in banana, watermelon, pear and strawberry, with recoveries within 70–120%, precision-RSD <20%, linearity between 1–100 µg/kg (5–100 µg/kg in strawberry) and quantification limits (LOQs) of 5 µg/kg. For targeted method, 12 different pesticides in 14 samples were detected. The non-targeted approach allowed the corroboration of all the results obtained through targeted method, in addition other compounds were tentatively identified.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

International trade allows the accessibility to a wide range of fruits and vegetables that are produced worldwide. These foods of plant origin, whether consumed fresh or as processed foods, may contain pesticide residues. Food safety and the protection of consumer's interests is of increasing concern to the general public, non-governmental organizations, professional associations, international trading partners and trade organizations. Some European countries have adopted horizontal legislation on food safety. However these countries apply different basic criteria for establishing whether a food is safe. Given these different approaches, and in the absence of horizontal legislation in other countries, barriers to trade in foods are liable to arise [1]. Although efforts are being made to harmonize legislations [2], for example related with maximum residue limits (MRLs) and plant protection products authorization, there are still differences between non-European and European countries. Food safety incidents [3] have demonstrated the need to establish appropriate methods that cover the great-

est amount of pesticides to ensure that all foods are subject to common measures in the event of a risk for human health. Either public health related authorities as producers and retailers are concerned by this issue and demand analytical methods with a broader scope that provide greater sensitivity, improved response time and costs

Traditionally, gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS and LC-MS) in tandem MS/MS using triple quadrupole (QQ) have been widely used for pesticide residue analysis. These techniques combine good performance, in terms of sensitivity and selectivity, with the ability to detect many analytes in one run [4] using a targeted compound approach, being scopes ranging 150–200 active ingredients quite usual [5]. Therefore, with the aim of increasing the ability to detect a greater number of compounds, in complex sample matrices, accurate high-resolution mass spectrometry (HRMS) coupled to chromatographic separation systems are increasingly being incorporated to the routine workflow in pesticide residue monitoring laboratories. As a result of the availability of advanced instrumentation that provides more robust, sensitive and selective methods, in recent years, there is an increasing demand for non-targeted measurements by LC and GC coupled to full-scan (FS) MS; this means that there is no limitation on the number of analytes that can be monitored in one run.

* Corresponding author.

E-mail address: agarrido@ual.es (A.G. Frenich).

In the last few years, the use of HRMS analyzers, such as time-of-flight (TOF) and Orbitrap MS, has experienced tremendous growth due to their high selectivity and robustness [6–11]. When trace quantities of hundreds of target compounds must be determined in complex samples, highly selective analyzers are required. In this regard, HRMS analyzers show unique capabilities for unequivocal identification mainly based on the accurate mass measurements [8]. Numerous applications for LC–HRMS analysis of residues and contaminants in fruits and vegetables can be found in the literature [12–17], however the applications involving the use of GC–HRMS are limited [4,18–21]. GC–Q–Orbitrap system, operating in FS MS, has been used for pesticide residue analysis in cereals and feed ingredients [4], baby foods [18] and fruits and vegetables [19–21]. In all these studies analytical methods have been developed and validated for quantitative pesticide residue analysis in targeted mode. Although neither of them includes the non-targeted approach in the studies, Mol et al. [20] already highlighted the potential of GC–Orbitrap–MS for an additional screening for other analytes. The great potential of FS MS mode in HRMS analyzers is the ability of performing retrospective analysis by searching in the raw data. The later allows the determination of analytes, which were non-targeted when the sample was analyzed, or there were not available standards. Although single analyzers, such as quadrupole (GC–MS) can be used for the detection of pesticides using nominal spectral libraries, HRMS is the most suitable technique for a screening purpose [22]. Retrospective analysis is also very useful when a given residue is found in some commodity and there are suspects addressing that it could be also present in similar samples analyzed time ago. Finally, HRMS is a powerful tool for semitarget or non-targeted screening, while not only enabling the analyst to detect suspected peaks, but also helping in identifying and confirming the underlying chemical structure [6].

Cervera et al. [23] proposed the application of GC–TOF MS for targeted and non-targeted pesticide residue analysis in foodstuffs. However, recent technological advances allowed us, in this study, to go deeper than the previous ones to propose specific conditions that can be reproduced in the laboratory, with improved conditions. Without a doubt, if this systematic for food control was adopted, the study of contaminants in fruits and vegetables would be more complete, even for the control of baby food or organic products. In addition, the development and use of pesticide databases, as well as adequate software and strategies for non-targeted analysis, would allow the detection of a large number of compounds without the need for standards.

In summary, the aim of the study is to propose a novel analytical application based on the combination of targeted and non-targeted approaches by GC–Q–Orbitrap MS for the detection and quantification of low levels of pesticides in fruits and vegetables. As the main feature, it is a reliable strategy in order to guarantee food safety, and so significantly minimize pollutant consumers' exposure. Two hundred GC-amenable pesticides were selected for targeted analysis evaluation; then a non-targeted method will be used, tentative identification of unknown compounds was performed by comparison with libraries that have more than 200.000 spectra.

2. Material and methods

2.1. Reagents and chemicals

The chemicals and solvents were purchased as follows: 200 pesticides standards from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) or Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) and were stored at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$; isotope-labelled internal standard of propoxur-d7 (injection internal standard) from Sigma Aldrich; tri-sodium citrate dehydrate, sodium chloride and sodium citrate dibasic sesquihydrate from

Panreac AppliChem (Barcelona, Spain), Scharlab (Barcelona, Spain) and Sigma Aldrich, respectively; acetonitrile (Gradient grade) was acquired from Honeywell (Seelze, Germany) and ethyl acetate (PAR grade) from Fluka (St. Louis, MO, USA); magnesium sulfate (MgSO_4) and primary secondary amine (PSA) from Scharlab. Individual pesticide standard stock solutions were prepared in a suitable solvent (mostly ethyl acetate or acetonitrile) at a concentration of 1000 mg/L, and were stored in amber screw-capped glass vials in the darkness at 4.5 mg/L. From individual pesticide standard stock solutions, three mix-standards were prepared in ethyl acetate and used for the calibration, as needed. Injection internal standard (propoxur-d7) was added to all prepared vials at 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ final concentration. Stock and intermediate solutions were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2. GC–Orbitrap–MS parameters

A GC–Q–Orbitrap system composed of a TriPlus RSH autosampler, a TRACE 1300 gas chromatograph and a Q-Exactive Orbitrap mass analyzer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) was used. The injector was equipped with a single taper liner (78.5 mm \times 4 mm ID) (Thermo Fisher Scientific). Hot splitless injection was performed (1 μL , 280 $^{\circ}\text{C}$, splitless time 1 min). Helium (99.999%) was used as carrier gas at a constant flow of 1 mL/min. GC separation was performed on a column VF-5 ms column (Agilent, Santa Clara, CA) whose characteristics were 30 m \times 0.25 mm ID, 0.25 μm . The oven program, of 29.00 min in total, was initially at 50 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, and then, the temperature increased to 170 $^{\circ}\text{C}$ at the rate of 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in 6 min, increased to 310 $^{\circ}\text{C}$ at the rate of 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in 14 min, and was held for 8 min to 310 $^{\circ}\text{C}$. The Q Exactive–Orbitrap was operated in electron ionization (EI) with 50 μA emission current and 70 eV electron energy. The filament on delay was set for 5 min, and the runtime was from 5 to 29 min. The ion source and the MS transfer line temperatures were 250 $^{\circ}\text{C}$. The FS MS acquisition mode was used in positive polarity with a scan range of m/z 40 to 500 with 1 μs scan maximum injection time, a resolution power of 60.000 full width at half maximum (FWHM) and 1e6 ions AGC (automatic gain control) target. The chromatograms were processed using Xcalibur version 4.1, with Quanbrowser and Qualbrowser. Non-targeted analyses were performed by using TraceFinder 4.1 software (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France).

2.3. Sample extraction

Watermelon, strawberry, banana and pear fruits used during development and validation of the method, as well as the rest of the samples used for the non-targeted analysis, were purchased directly from local markets in the city of Almería (Spain). Before homogenization, samples were chopped according to the method established in Directive 2002/63/EC [24]. The samples were processed following a citrate buffered QuEChERS. In brief, 10 g portion of sample were weighed in a 50 mL polypropylene centrifuge tube. Next, 10 mL of acetonitrile were added to the sample and this was vortexed for 2 min. Afterwards, 4 g of magnesium sulfate, 1 g of sodium chloride, 1 g of trisodium citrate dehydrate and 0.5 g of sodium hydrogencitrate sesquihydrate were added, again the sample was vortexed for 2 min. The tube was centrifuged for 6 min at 5000 rpm (4136 g). Then, a clean-up procedure was carried out. For this, 5 mL of the extract was transferred to a 15 mL centrifuge tube containing 750 mg of magnesium sulfate and 125 mg of PSA; again the sample was vortexed for 1 min. The tube was then centrifuged for 5 min at 3700 rpm (3061 g). Finally, 1 mL aliquot of the clean extract was evaporated with a nitrogen stream to dryness and redissolved with 950 μL of ethyl acetate and 50 μL of

propoxur-d7. The final extract contained 1 g of sample per mL of extract. Finally, one μL was injected in the system.

2.4. Method validation

The method was validated in four matrices (pear, banana, watermelon and strawberry), according to the criteria established in DG SANTE documentation [24]. Linearity was studied for each matrix; standard calibration solutions were prepared at 1, 5, 10, 20, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and determination coefficients (R^2) were calculated. Mass accuracy was studied from data obtained in the linearity study. Base peak of each compound was acquired at different concentration levels in the four matrices; data was accumulated and compared with the results obtained in solvent. Trueness was determined through the recoveries of pesticides at two different spiking levels (5 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Intraday precision, expressed as relative standard deviation (% RSD), was estimated by analyzing blank samples spiked at two concentrations (5 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Interday precision was estimated in the same way that intraday precision but analyzing samples in five different days. LOQs have been calculated following the recommendation of SANTE guide by spiking blank samples of the four matrices, with decreasing concentrations, and setting them as the "lowest concentration of the analytes that can be validated with acceptable accuracy".

3. Results and discussion

3.1. Optimization of GC-Orbitrap-MS

The 200 pesticides included in the present study (see the Supporting Information) were chromatographically separated within 29 min with a hot splitless injection mode. Initially, different injector inlet temperatures were tested, 220, 250 and 280 °C. Greater areas were observed in the peaks of the quantification ions in most of the 200 pesticides at the temperature of 280 °C. The splitless time parameter, i.e. the time required to transfer the vaporized sample from the injector to the column was also tested in order to achieve low LODs. The behavior of compounds was tested at 1, 2 and 3 min. The best beneficial effect in the peak shape and in the LODs was achieved with the conditions at 1 min from splitless time.

3.2. Optimization of the extraction procedure

For the optimization of the sample extraction and considering that the commodities were in the group of high-water content [24], and the potential enhanced selectivity and sensitivity of GC-Orbitrap-MS full-scan acquisition mode, two different sample extraction methods were tested. All types of fruits selected were extracted following the method described on "Sample extraction" section but without clean up stage. All extracts had the characteristic color of their own fruit. Moreover, they showed no acceptable recoveries in any of the test performed. So it was decided to try the cleaning stage, and in this way clearer sample extracts were obtained.

Concentration factor was studied by evaluating the instrument sensitivity with blank extracts obtained at 1:1 and 1:2 solvent:matrix rate (v/v). As a result, no concentration factor was chosen to set adequate instrument sensitivity.

Finally, the effect of the injection volume was also studied in terms of interfering compounds. After testing 1 and 2 μL , the total ion chromatogram (TIC) of the first volume, showed low amount of matrix co-extractives. Thus, to minimize these interferences and improve TIC, 1 μL was selected as optimum injection volume.

3.3. Validation data

Nine of the 200 initial target compounds presented extraction difficulties, in the four matrices studied (biphenyl, dimethomorph, ethoxyquin, fenamiphos, fenamiphos sulphoxide, fenamiphos sulphone, methamidophos, oxyfluorfen and sulprofos). These extraction difficulties were as a consequence of interactions of the matrix or even ionization mode (EI). Therefore, they were not taken into account in the validation study. The validation results obtained in the watermelon, banana, pear and strawberry matrices for the 191 compounds are summarized in Table 1. Recoveries ranged from 70 to 120% and intraday and interday precision ($\leq 20\%$) values were obtained at the studied concentrations (5 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) for all the matrices. The exceptions were: 4-chloro-methylphenol, fenitrothion and tetrachlorvinphos in watermelon; azoxystrobin, bifentoxin, fenitrothion and isocarbophos in strawberry; and 4-chloro-methylphenol, chinomethionat, chlorothalonil, fenitrothion and tetrachlorvinphos in banana. Isotopically labeled internal standard propoxur-d7 was used for controlled any factor affecting the injection and chromatographic analysis.

The linear range of the method was established between 1–100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to banana, watermelon and pear with six calibration levels, and in the range 5–100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to strawberry with five calibration levels. The correlation coefficients (R^2) were always higher than 0.99, except for isocarbophos in strawberry, with residual values for each concentration $\leq 20\%$. LODs were established at 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for all compounds in banana, watermelon and pear and 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for strawberry, whereas LOQs were reported at 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in the four matrices, all providing acceptable trueness and precision values. LOQs values were below the MRLs set in the EU for any pesticide without a tolerance, and even below the previously published LOQs for the determination of pesticides in fruits and vegetables by GC-HRMS [4,19–21], revealing the high sensitivity of the proposed targeted method.

3.4. Application of the method to real samples: targeted analysis

In order to verify the applicability of the method, 31 fruit samples obtained from local shops were analysed: strawberry ($n = 8$), pear ($n = 12$), banana ($n = 6$) and watermelon ($n = 5$). An internal quality control procedure was applied to ensure reliability of results. It consisted in including in the batch of samples: two blank samples and two replicates of spiked blank samples of each commodity at 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, therefore recovery rates and absence of accidental cross contamination were monitored. In addition, a matrix-matched calibration curve to quantify the positive results was injected.

A summary of the pesticides found in samples are shown in Table 2. The detected pesticides were fungicides (61.5%) and insecticides (38.5%). There were 12 different detected pesticides in 14 samples, 26 pesticides residues were quantified in the total of the samples analyzed, representing 45% of the samples with a least one pesticide, which is distributed as follows: 40% watermelon samples with 2 pesticide residues, 33% banana samples with 5 pesticide residues, 37% strawberry with 5 pesticide residues and 67% pear samples with 16 pesticide residues. These cases were boscalid (watermelon), azoxystrobin, bifenthrin, buprofezin (banana), lambda-cyhalothrin (strawberry and pear), tebuconazole, deltamethrin, difenoconazole, fenvalerato, fludioxonil, iprodione and pyrimethanil (pear), myclobutanil (strawberry) and chlorothalonil (watermelon and pear). On the contrary, 55% of the samples did not contain any pesticide. The results were evaluated according to the MRLs established by the European regulation [2]. It is important to note that only two results exceeded the MRLs, fenvalerato (139 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in pear and azoxystrobin in banana (254.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Table 1

Summary of data obtained for validation tests performed to fruits matrices.

Compounds	STRAWBERRY							BANANA							WATERMELON							PEAR						
	Linearity (R ²)	Recovery		Precision			Linearity (R ²)	Recovery		Precision			Linearity (R ²)	Recovery		Precision			Linearity (R ²)	Recovery		Precision						
		R (%)		Intraday (%)		Interday (%)		R (%)		Intraday (%)		Interday (%)		R (%)		Intraday (%)		Interday (%)		R (%)		Intraday (%)		Interday (%)				
		10 5 ppb	10 ppb	10 5 ppb	10 ppb	10 5 ppb		10 ppb	10 5 ppb	10 ppb	10 5 ppb	10 ppb		10 5 ppb	10 ppb	10 5 ppb	10 ppb	10 5 ppb		10 ppb	10 5 ppb	10 ppb	10 5 ppb	10 ppb	10 5 ppb	10 ppb		
2,4,6-trichloro-phenol	0.99	71	76	18	8	15	13	0.99	73	76	10	8	20	7	1.00	71	75	11	4	13	12	1.00	75	76	2	7	12	10
2-Phenylphenol	0.99	113	96	16	9	19	8	0.99	80	75	10	1	15	13	0.99	112	79	19	7	10	14	1.00	74	78	7	11	18	11
4,4'-Diclorobenzofenona	0.99	99	102	6	12	11	9	0.99	93	73	13	7	14	12	0.99	88	79	7	12	13	11	1.00	91	87	8	11	11	9
4-chloro-3-methyl phenol	0.99	106	100	3	11	6	19	<0.97	<45	<25	>25	>25	>25	>25	<0.97	<60	<60	>25	>25	>25	>25	0.99	100	73	10	14	11	12
Aclonifen	0.99	118	93	16	14	19	9	0.99	81	72	6	5	18	18	0.99	70	76	7	5	20	6	1.00	87	70	13	16	12	7
Acrinathrin	0.99	116	104	9	12	12	16	0.99	77	80	10	3	18	12	0.99	70	83	18	6	11	11	1.00	80	77	11	7	9	9
Alachlor	1.00	105	91	8	20	2	11	0.99	86	74	10	7	13	12	0.99	88	82	9	4	8	6	1.00	91	89	4	8	12	5
Aldrin	0.99	102	99	6	13	8	6	0.99	97	71	7	4	8	12	0.99	87	80	7	4	11	7	1.00	86	80	3	5	11	6
Azoxystrobin	0.99	>120	>120	>25	>25	>25	>25	0.99	85	75	18	15	18	16	0.99	75	90	15	13	13	14	1.00	77	82	12	20	12	8
Benalaxyl	0.99	105	99	18	18	8	9	0.99	94	77	5	6	6	14	0.99	90	78	12	2	5	8	1.00	76	86	9	9	11	7
Benalaxyl-M	0.99	116	100	6	18	11	13	0.99	81	74	6	4	14	17	0.99	90	77	12	2	9	7	1.00	90	90	5	9	10	6
Benfluralin	0.98	106	100	11	13	9	12	0.99	85	77	11	6	18	6	0.99	78	77	9	4	10	7	1.00	92	82	3	9	5	8
Benfluresate	0.99	119	100	8	16	12	14	0.99	77	72	17	2	14	16	0.99	81	77	8	4	19	9	1.00	83	85	7	9	13	9
Bifenoxy	0.99	>120	>120	>25	>25	>25	>25	0.99	70	71	9	6	20	12	0.99	86	70	17	10	11	14	1.00	77	87	20	16	13	16
Bifenthrin	0.99	113	97	7	18	9	7	0.99	70	71	5	5	9	9	0.99	100	90	18	5	14	6	1.00	89	88	7	9	13	7
Biphenyl	0.99	<50	<50	>23	>23	>23	>23	0.99	80	70	13	8	11	12	0.99	81	70	10	3	7	7	1.00	94	87	16	7	18	19
Boscalid	0.99	102	113	16	15	14	16	0.99	77	74	11	6	15	12	0.99	75	77	12	5	15	16	1.00	77	86	13	14	20	13
Bromacil	0.99	105	96	6	16	13	6	0.99	82	70	7	2	4	7	0.99	89	80	6	4	11	10	1.00	84	92	5	8	19	6
Bromociclen	0.99	95	95	6	11	10	8	0.99	96	72	9	3	12	14	0.99	88	78	8	2	7	6	1.00	83	78	3	7	14	9
Bromophos	0.99	104	98	11	18	13	7	0.99	73	79	10	4	17	18	1.00	86	87	2	15	15	11	1.00	82	79	6	13	16	12
Bromophos-ethyl	0.99	107	103	6	19	7	11	0.99	98	73	9	2	18	16	0.99	84	80	8	4	6	12	1.00	104	74	12	16	12	12
Bromopropylate	0.99	120	98	8	17	9	6	0.99	100	70	4	4	13	7	0.99	98	70	17	13	5	14	1.00	90	87	8	11	12	8
Bupirimate	0.99	118	116	6	16	20	10	0.99	77	88	7	16	11	13	0.99	88	70	6	9	19	15	1.00	92	90	5	10	12	10
Buprofezin	0.99	114	96	6	22	20	8	0.99	80	84	6	20	14	12	0.99	72	70	13	6	12	16	1.00	90	89	5	8	10	9
Butafenacil	0.99	116	112	9	13	14	16	0.99	73	75	11	9	14	14	0.99	89	77	20	2	12	11	1.00	80	88	9	13	12	10
Butralin	0.99	101	98	4	20	5	13	0.99	72	70	10	2	19	17	0.99	85	78	11	3	8	6	1.00	85	81	7	10	12	7
Cadusafos	0.99	104	108	11	13	2	11	0.99	73	76	10	6	12	14	0.99	87	94	8	5	11	9	1.00	82	82	4	9	8	8
Carbophenothion	0.99	120	98	7	16	9	14	0.99	73	73	7	3	16	18	0.99	92	84	12	2	9	8	1.00	87	85	18	9	7	9
Chinomethionate	0.99	96	98	7	14	7	19	0.99	<65	<65	>27	>27	>27	>27	0.99	77	76	16	10	20	11	1.00	80	75	18	13	15	13
Chlorbenside	0.99	117	111	10	13	15	20	0.99	79	70	20	14	19	20	0.99	83	102	17	9	11	12	1.00	108	92	18	10	8	7
Chlordane (cis+trans)	0.99	109	110	6	16	9	6	0.99	98	95	3	12	14	7	0.99	75	95	18	17	11	14	1.00	86	87	3	10	17	8
Chlorfenapyr	0.99	112	101	14	15	19	14	0.99	88	76	8	17	11	8	0.99	73	72	20	14	16	3	1.00	117	89	11	11	14	7
Chlorfenson	0.99	114	105	8	13	6	9	0.99	81	86	5	13	9	15	0.99	71	77	14	7	15	14	1.00	94	85	6	8	15	7
Chlorfenvinphos	0.99	114	105	7	12	8	16	0.99	96	77	11	5	14	9	0.99	73	78	9	6	13	7	1.00	88	86	6	12	8	9
Chlormephos	0.99	84	70	19	9	8	4	0.99	82	71	16	9	17	6	0.99	77	70	11	5	9	15	1.00	70	73	16	11	14	15
Chloroneb	0.99	82	83	12	8	5	5	0.99	91	71	9	6	10	13	0.99	72	74	8	3	14	8	1.00	78	77	16	7	13	9
Chloropropylate	0.99	113	111	8	12	7	5	0.99	83	77	5	15	18	12	0.99	120	78	15	2	11	11	1.00	91	90	4	9	11	8
Chlorothalonil	0.99	71	72	6	7	20	11	0.99	<65	<65	>30	>30	>30	>30	1.00	80	70	10	7	17	20	1.00	76	70	13	15	20	10
Chlorpropham	0.99	104	96	7	20	5	15	0.99	95	76	9	3	20	14	0.99	81	78	6	4	12	9	1.00	83	88	3	10	12	12
Chlorpyrifos	0.99	111	102	7	11	9	7	0.99	98	80	11	5	20	14	1.00	90	78	8	3	8	8	1.00	80	88	6	9	15	7
Chlorpyrifos-methyl	0.99	119	103	7	11	10	7	0.99	88	75	10	3	18	17	0.99	91	85	8	3	10	8	1.00	86	84	3	10	12	8
Chlortal dimethyl	0.99	111	107	7	16	9	9	0.99	108	76	10	7	16	14	0.99	93	79	8	2	9	10	1.00	90	89	4	7	12	9
Chlozolinate	0.99	105	100	10	15	12	12	0.99	90	70	8	5	18	12	0.99	81	77	7	3	10	1	1.00	93	88	7	9	12	4
Cinidon-ethilo	0.99	116	112	9	13	13	17	0.99	92	76	11	9	18	13	0.99	83	75	19	6	6	11	1.00	80	87	9	13	11	10
Cis-Tetrahydrophthalimide	0.99	90	91	13	20	18	19	0.99	111	100	20	14	13	14	0.99	95	70	10	4	11	12	0.97	89	77	20	12	18	6
Clodinafop-propargyl	0.99	118	101	10	17	15	9	0.99	78	70	8	4	12	16	0.99	70	80	10	4	7	6	1.00	74	73	12	5	11	6

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Compounds	STRAWBERRY								BANANA						WATERMELON						PEAR							
	Linearity (R ²)	Recovery		Precision				Linearity (R ²)	Recovery		Precision				Linearity (R ²)	Recovery		Precision				Linearity (R ²)	Recovery		Precision			
		R (%)		Intraday (%)		Interday (%)			R (%)		Intraday (%)		Interday (%)			R (%)		Intraday (%)		Interday (%)			R (%)		Intraday (%)		Interday (%)	
		5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb		5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb		5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb		5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb
Crimidine	0.99	98	101	9	11	15	8	0.99	72	71	9	4	12	15	0.99	77	76	8	3	14	8	1.00	74	83	2	8	17	7
Cyanofenphos	0.99	114	100	11	19	11	13	0.99	87	77	7	4	17	16	0.99	88	80	8	3	8	10	0.98	90	89	8	10	10	9
Cycloate	0.99	92	93	12	11	12	12	0.99	104	72	9	4	10	15	0.99	77	79	8	4	10	7	1.00	79	77	5	6	16	9
Cyflufenamid	0.99	117	92	8	19	7	15	0.99	75	85	6	20	18	14	0.99	70	75	14	4	17	7	1.00	85	85	5	8	17	9
Cyfluthrin	0.99	120	106	19	8	19	6	0.99	87	73	12	3	12	14	0.99	88	80	19	3	16	2	1.00	70	78	14	9	15	9
Cypermethrin	1.00	117	96	6	11	19	14	0.99	99	74	9	3	17	17	0.99	75	81	14	4	12	7	1.00	87	83	15	12	10	10
Cyproconazole	0.99	112	101	13	10	20	10	0.99	80	70	6	12	20	16	0.99	74	77	13	3	15	9	1.00	71	75	14	14	18	13
Deltamethrin	0.99	114	104	12	4	12	7	0.99	86	70	6	9	15	19	0.99	70	83	20	5	16	10	1.00	72	84	10	13	15	17
Diazinone	0.99	110	93	7	18	8	7	0.99	97	76	11	5	17	13	0.99	87	80	10	3	11	6	1.00	89	87	10	11	11	9
Dichlobenil	1.00	83	70	14	9	14	19	0.99	79	70	12	6	9	18	0.99	101	72	7	4	9	7	1.00	71	70	14	7	16	8
Dichlofenthion	0.99	105	89	5	16	10	10	0.99	97	74	10	6	12	18	0.99	86	80	7	4	12	6	1.00	86	83	4	9	9	7
Dichloran	0.99	105	103	7	11	14	15	0.99	93	81	11	6	18	11	1.00	85	80	6	6	14	7	1.00	94	90	5	6	7	6
Dichlorvos	0.99	91	94	14	9	17	13	0.99	82	73	11	2	15	15	1.00	78	75	6	4	14	7	1.00	71	73	11	9	12	12
Dicofol	0.99	109	106	11	10	11	3	0.99	80	86	4	18	11	19	0.99	84	78	10	4	8	13	1.00	74	82	4	8	18	9
Dieldrin	0.99	111	98	7	12	7	5	0.99	79	81	6	16	17	12	0.99	86	83	11	4	10	12	1.00	87	88	5	9	10	8
Difenoconazole	0.99	113	102	16	18	20	16	0.99	109	73	10	7	17	20	0.99	76	84	17	6	19	12	1.00	119	92	14	16	15	13
Diffufenican	0.99	91	114	20	13	8	10	0.99	119	101	4	7	18	16	0.99	84	95	7	5	18	17	1.00	116	97	12	8	13	18
Diphenamid	0.99	114	100	6	20	17	7	0.99	90	71	9	1	13	19	0.99	85	77	12	4	16	8	1.00	92	82	8	9	6	7
Diphenylamine	0.99	100	95	7	17	11	4	0.99	98	76	8	1	19	18	0.99	85	76	9	2	13	3	1.00	77	74	3	6	16	7
Ditalimfos	0.99	119	105	8	11	12	7	0.99	113	98	7	15	18	12	0.99	73	72	11	1	16	11	1.00	85	85	5	10	14	7
Endosulfan alfa	0.99	95	95	6	11	10	13	0.99	96	72	9	3	13	13	0.99	85	79	7	2	12	6	1.00	83	79	2	8	13	8
Endosulfan beta	0.99	109	90	13	20	11	8	0.99	90	70	13	3	16	15	0.99	87	83	15	10	14	13	0.99	120	94	17	17	14	19
Endosulfan sulfate	0.99	116	97	13	20	6	13	0.99	89	77	5	4	17	18	1.00	85	87	15	3	16	6	1.00	91	86	2	12	11	8
Endrin	0.99	114	93	8	13	15	11	0.99	80	70	6	7	12	20	0.99	82	78	10	4	12	8	1.00	96	73	14	17	13	11
EPTC	0.99	74	76	11	9	19	14	0.99	79	107	11	5	19	12	0.99	70	73	9	2	14	7	1.00	75	74	16	10	14	6
Ethion	0.99	120	94	8	19	5	3	0.99	82	75	5	12	11	14	0.99	86	78	9	4	10	8	1.00	84	82	5	9	7	8
Ethoprophos	0.99	108	99	7	20	12	7	0.99	74	77	11	3	11	18	1.00	79	76	7	20	13	11	1.00	88	81	5	7	6	10
Etridiazole	0.99	75	70	12	10	20	8	0.99	73	83	9	7	15	14	1.00	79	72	11	10	14	14	1.00	79	78	17	7	9	10
Etrimfos	0.99	102	102	10	14	11	10	0.99	92	74	10	5	11	19	1.00	87	80	7	3	11	7	1.00	86	84	11	8	8	7
Fenarimol	0.99	114	101	14	13	14	4	0.99	81	89	5	19	20	18	0.99	86	77	9	4	10	15	1.00	73	81	4	9	19	9
Fenchlorphos	0.99	110	105	7	13	6	8	0.99	86	77	10	5	12	18	1.00	86	78	6	3	10	7	1.00	82	81	6	10	15	9
Fenitrothion	0.99	116	104	7	12	5	12	<0.98	>120	>120	>30	>30	>30	>30	0.99	>120	>120	>29	>29	>29	>29	1.00	74	82	7	17	19	12
Fenoxycarb	0.99	120	100	12	9	7	15	0.99	72	70	7	4	17	14	0.99	97	95	15	6	5	11	1.00	73	77	8	11	16	11
Fenpropathrin	0.99	116	98	10	13	6	4	0.99	95	71	5	1	20	16	0.99	103	79	7	4	12	6	1.00	96	88	7	10	8	9
Fenson	0.99	113	95	3	15	8	8	0.99	102	76	11	4	13	11	0.99	115	89	17	15	10	11	1.00	106	100	20	11	17	9
Fenthion	0.99	>125	>125	>50	>60	>50	>60	0.99	101	80	10	3	19	8	0.99	114	107	11	5	2	5	1.00	118	110	7	15	17	8
Fenvalerato+ Esfenvalerato	0.99	112	107	11	13	20	8	0.99	86	70	11	4	13	18	0.99	87	82	9	3	14	8	1.00	92	81	12	10	7	9
Fipronil	0.99	108	110	18	20	9	12	0.99	81	76	10	2	5	16	1.00	72	78	11	5	9	14	1.00	98	84	11	10	10	10
Fipronil sulfone	0.99	111	104	11	9	16	11	0.99	114	91	7	13	8	19	0.99	79	74	20	8	9	16	1.00	96	89	14	10	12	7
Fluchloralin	0.99	116	95	9	17	8	13	0.99	88	74	12	7	14	12	0.99	81	79	8	5	10	6	1.00	90	87	6	10	8	8
Flucythrinate	0.99	114	107	6	11	18	9	0.99	89	73	9	5	17	17	0.99	83	84	11	4	9	5	1.00	95	79	11	10	10	13
Fludioxonil	0.99	111	108	11	17	17	12	0.99	117	89	5	16	9	8	0.99	107	70	10	3	7	17	1.00	96	85	3	13	19	10
Flumetralin	0.99	117	99	7	14	9	15	0.99	80	76	16	7	6	12	0.99	94	83	12	5	9	9	1.00	90	88	7	10	12	6
Flumioxazin	0.99	120	114	15	11	20	11	0.99	80	71	10	13	16	13	0.99	120	100	18	9	8	11	1.00	108	105	9	20	16	5
Fluotrimazole	0.99	112	97	7	19	6	12	0.99	95	74	6	2	19	16	0.99	86	80	7	2	8	8	1.00	91	90	5	8	11	8
Fonofos	0.99	109	102	7	12	14	12	0.99	85	74	10	4	11	16	0.99	84	80	7	4	10	7	1.00	83	83	3	8	6	7
Formothion	0.99	112	101	8	9	14	9	0.99	86	82	11	6	17	15	1.00	82	75	9	3	11	9	1.00	70	78	8	12	19	8
Furalaxyl	0.99	104	97	20	13	16	16	0.99	101	72	13	5	14	8	0.99	88	81	9	4	5	8	1.00	93	120	20	20	19	17
Furthiocarb	0.99	119	100	9	16	10	6	0.99	87	72	7	2	11	16	0.99	81	77	8	4	10	9	1.00	83	85	7	10	13	8

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Compounds	StrAWBERRY						BANANA						WATERMELON						PEAR									
	Linearity (R ²)	Recovery		Precision		Linearity (R ²)	Recovery		Precision		Linearity (R ²)	Recovery		Precision		Linearity (R ²)	Recovery		Precision									
		R (%)	Intraday (%)		Interday (%)		R (%)	Intraday (%)		Interday (%)		R (%)	Intraday (%)		Interday (%)		R (%)	Intraday (%)		Interday (%)								
		5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb					
HCH-alfa	0.99	96	94	12	18	11	8	0.99	97	72	7	6	19	17	0.99	88	78	8	2	12	9	1.00	89	81	3	7	6	8
HCH-beta	0.99	108	95	9	17	7	13	0.99	102	77	9	6	18	12	0.99	95	82	8	2	13	8	1.00	87	87	4	9	11	7
HCH-delta	0.99	99	90	8	14	11	10	0.99	87	74	8	4	18	13	1.00	98	83	7	2	10	9	1.00	89	89	5	8	14	9
Heptachlor	0.99	119	96	13	20	7	4	0.99	77	70	10	2	17	13	0.99	118	106	17	11	8	4	1.00	108	92	14	18	9	10
Heptachlor-epoxide-cis	0.99	108	92	6	16	6	8	0.99	82	74	9	2	16	17	0.99	89	80	9	2	9	8	1.00	94	89	3	7	12	8
Heptachlor-epoxide-trans	0.99	117	100	7	19	9	10	0.99	75	72	8	1	18	14	0.99	95	78	13	5	5	13	1.00	84	90	15	8	14	5
Heptenophos	0.99	93	100	12	16	20	11	0.99	74	83	13	8	19	11	1.00	94	70	20	6	11	11	1.00	81	91	3	8	7	7
Hexachlorobenzene	0.99	79	75	8	7	12	4	0.99	78	70	7	3	8	7	0.99	77	73	9	3	8	7	1.00	71	70	3	5	14	7
Hexaconazole	0.99	114	112	11	13	20	10	0.99	112	95	6	20	13	12	0.99	77	72	15	7	14	18	1.00	91	86	4	9	11	11
Hexazinone	0.99	111	97	6	16	12	9	0.99	88	72	6	3	11	15	0.99	79	76	10	4	11	8	1.00	76	83	6	10	14	7
Iodofenphos	0.99	117	107	11	12	14	6	0.99	95	86	6	19	16	12	0.99	79	74	18	7	12	11	1.00	77	81	9	14	19	11
Iprodione	0.99	120	106	11	7	20	14	0.99	77	85	6	13	14	16	1.00	71	78	11	4	12	9	1.00	81	89	9	12	13	10
Isocarbophos	<80	95	120	>30	>30	>30	>30	0.99	87	75	15	10	1	20	0.99	97	70	10	6	18	17	1.00	88	104	15	19	18	20
Isodrin	0.99	106	96	5	19	9	4	0.99	81	71	8	2	18	12	0.99	84	81	9	2	9	5	1.00	87	83	3	8	12	7
Isofenphos	0.99	119	120	18	19	16	17	0.99	89	83	12	8	16	18	0.99	77	77	8	5	11	12	1.00	117	90	9	14	7	12
Isofenphos methyl	0.99	118	101	7	20	5	12	0.99	95	76	10	2	14	11	0.99	70	74	12	7	13	9	1.00	93	90	7	10	9	8
Isopropalin	0.99	111	98	6	19	9	13	0.99	83	72	10	3	11	16	0.99	113	72	12	9	15	9	1.00	90	83	6	9	7	9
Isoprothiolane	0.99	112	92	8	20	7	8	0.99	74	85	6	18	17	16	0.99	74	76	14	6	13	10	1.00	89	90	4	10	13	8
Kresoxim-methyl	0.99	116	95	7	13	7	10	0.99	119	88	5	20	18	17	0.99	94	74	11	5	10	18	1.00	90	92	5	8	9	7
Lambda-cyhalothrin	0.99	116	98	4	12	7	9	0.99	86	73	8	4	13	15	0.99	104	82	15	3	8	10	1.00	86	82	9	10	8	8
Leptophos	0.99	120	96	9	16	13	9	0.99	95	73	7	2	12	14	0.99	87	77	8	3	7	9	1.00	78	80	9	11	12	9
Lindane	0.99	101	97	8	20	14	7	0.99	88	78	2	4	10	18	1.00	93	79	8	2	11	12	1.00	88	87	6	11	8	13
Malathion	0.99	107	94	7	13	6	12	0.99	83	83	12	8	11	7	0.99	100	80	14	5	6	8	1.00	83	84	7	11	10	9
Metalaxyl	0.99	93	102	19	14	17	13	0.99	89	83	14	12	14	1	0.99	74	77	6	4	19	4	1.00	79	117	5	18	13	20
Methidathion	0.99	115	105	10	9	16	7	0.99	99	81	11	5	18	8	1.00	78	76	12	5	15	9	1.00	70	77	10	13	15	17
Methoxychlor	0.99	116	101	8	20	5	13	0.99	89	75	6	8	11	7	0.99	76	80	9	2	12	7	1.00	87	88	6	8	9	5
Mevinphos	0.99	98	100	8	11	13	9	0.99	80	79	9	6	17	14	1.00	74	77	7	3	12	7	1.00	73	83	6	11	10	7
Mirex	0.99	100	89	7	16	6	4	0.99	80	70	4	4	13	12	0.99	113	88	15	5	11	7	1.00	90	83	8	7	13	6
Myclobutanil	0.99	118	93	9	14	20	4	0.99	75	85	5	14	11	8	0.99	78	85	18	8	5	14	1.00	87	89	4	10	10	12
Nitrofen	0.99	110	110	5	11	3	6	0.99	82	77	7	12	16	13	0.99	89	79	11	5	10	8	1.00	83	78	7	6	10	6
Nitrothal isopropyl	0.99	119	97	8	19	10	13	0.99	81	75	12	5	12	17	0.99	87	86	16	6	11	7	1.00	88	96	8	11	10	8
Norflurazon	0.99	115	95	14	14	15	14	0.99	82	70	7	6	12	12	0.99	81	84	20	4	16	7	1.00	86	80	10	10	14	9
Nuarimol	0.99	104	101	13	13	17	4	0.99	81	87	5	18	20	18	0.99	84	77	9	4	8	15	1.00	73	81	4	9	10	13
o,p'-DDD	0.99	100	100	7	12	13	3	0.99	84	79	5	15	13	11	0.99	87	81	10	3	9	7	1.00	88	86	5	9	11	7
o,p'-DDE	0.99	107	111	6	14	7	7	0.99	77	94	13	19	20	3	0.99	101	91	20	13	20	8	1.00	89	90	6	10	15	7
o,p'-DDT	0.99	100	100	7	12	5	5	0.99	84	79	5	15	14	11	0.99	85	81	11	3	9	10	1.00	88	86	5	9	7	7
p,p'-DDD	0.99	108	90	6	18	10	6	0.99	73	77	4	19	17	9	0.99	104	74	12	3	13	9	1.00	91	88	5	8	10	7
p,p'-DDE	0.99	102	104	7	15	12	5	0.99	79	79	4	14	18	12	1.00	70	74	19	3	11	10	1.00	89	86	4	9	12	6
p,p'-DDT	0.99	82	82	7	7	20	6	0.99	94	79	6	6	12	14	0.99	112	81	16	20	12	14	0.99	70	80	16	18	20	14
Oxadiazone	0.99	115	91	6	18	8	7	0.99	74	84	5	19	13	17	0.99	71	75	13	1	7	14	1.00	96	86	7	12	9	7
Oxadixyl	0.99	110	98	8	20	15	13	0.99	88	73	6	2	6	10	0.99	116	84	15	9	11	7	1.00	71	84	7	12	18	9
Paraoxon methyl	0.99	109	104	14	8	20	11	0.99	94	85	9	6	11	19	0.99	74	72	13	4	14	11	1.00	70	79	13	17	17	6
Parathion	0.99	108	103	6	17	9	15	0.99	86	75	13	8	11	9	1.00	92	75	14	4	9	8	1.00	79	85	5	11	17	9
Parathion-methyl	0.99	113	95	18	13	12	16	0.99	87	80	11	10	15	13	1.00	81	75	6	3	13	6	1.00	77	79	6	11	13	10
Penconazole	0.99	114	97	6	17	10	13	0.99	86	74	10	2	13	14	0.99	78	79	9	3	12	7	1.00	89	86	7	8	7	7
Pendimethalin	0.99	117	96	19	17	11	11	0.99	76	72	8	4	17	10	0.99	70	73	11	2	15	11	1.00	88	77	6	9	6	9
Pentachloroaniline	0.99	96	89	14	19	19	10	0.98	78	70	7	8	19	10	0.99	89	80	7	4	14	16	1.00	103	84	7	9	10	9
Pentachloroanisole	0.99	86	80	9	10	13	5	0.99	84	70	8	4	19	11	0.99	82	78	9	2	13	7	1.00	77	76	6	7	19	8
Permethrin	0.99	115	102	7	13	11	13	0.99	85	70	9	4	13	18	0.98	106	70	20	10	6	15	1.00	81	82	11	12	12	5

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Compounds	LINEARITY (R ²)						LINEARITY (R ²)						LINEARITY (R ²)						LINEARITY (R ²)									
	RAWBERRY						BANANA						WATERMELON						PEAR									
	Recovery		Precision				Recovery		Precision				Recovery		Precision				Recovery		Precision							
	R (%)		Intraday (%)		Interday (%)		R (%)		Intraday (%)		Interday (%)		R (%)		Intraday (%)		Interday (%)		R (%)		Intraday (%)		Interday (%)					
	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb	5 ppb	10 ppb				
Perthane	0.99	119	76	11	14	14	16	0.99	75	90	8	19	1	15	0.99	81	78	12	3	8	16	1.00	70	88	20	20	13	18
Phenothrin	0.99	118	91	19	10	10	13	0.99	103	74	8	4	16	13	0.99	95	82	13	4	13	12	1.00	81	82	8	13	11	8
Phenthoate	0.99	110	93	10	14	10	8	0.99	86	78	11	4	14	15	1.00	85	77	8	5	13	10	1.00	82	79	7	10	13	11
Phosalone	0.99	112	104	20	12	16	17	0.99	85	80	10	5	12	10	0.99	73	76	5	4	16	6	1.00	70	78	14	13	19	15
Phosmet	0.99	114	93	20	8	16	5	0.99	80	95	5	11	13	9	0.99	70	70	20	19	14	7	1.00	73	82	18	20	17	16
Phthalimide	0.99	70	114	15	15	12	19	0.99	100	70	10	15	5	11	0.99	102	75	13	4	12	17	1.00	79	87	5	10	18	18
Pirimiphos-ethyl	0.99	74	81	17	17	16	11	0.99	85	73	11	4	16	15	0.99	81	79	6	4	14	8	1.00	91	84	4	10	10	7
Pirimiphos-methyl	0.99	115	106	6	13	15	13	0.99	109	70	14	3	2	6	0.99	87	76	9	4	17	6	1.00	120	79	11	7	20	12
Prochloraz	0.99	103	106	12	8	14	18	0.99	81	75	12	8	12	13	0.99	70	71	11	2	11	9	1.00	70	71	17	17	12	7
Procymidone	0.99	120	114	6	16	13	11	0.99	87	99	20	12	8	16	0.99	100	95	8	7	11	11	0.99	103	120	13	11	10	17
Profenofos	0.99	115	102	8	11	16	9	0.99	119	86	7	14	17	11	0.99	88	78	13	13	12	16	1.00	78	86	8	12	16	10
Profluralin	0.99	86	85	20	15	16	15	0.99	79	94	10	6	5	8	0.99	85	80	9	4	11	15	1.00	82	103	5	14	15	12
Propachlor	0.99	110	105	7	13	11	9	0.99	89	75	10	6	17	14	1.00	92	80	13	5	11	6	1.00	84	88	3	8	9	9
Propanil	0.99	100	105	12	18	12	19	0.99	77	70	9	2	13	16	0.99	82	79	7	3	3	5	1.00	92	90	7	10	11	8
Propargite	0.99	102	91	9	18	5	11	0.99	81	74	5	5	11	17	0.99	104	80	15	2	14	9	1.00	87	87	6	10	7	11
Propham	0.99	91	97	15	14	14	3	0.99	83	71	6	6	19	16	1.00	80	80	5	5	12	10	1.00	84	87	4	6	11	15
Propiconazole	0.99	103	99	8	17	16	7	0.99	83	71	7	2	13	10	0.99	97	77	14	4	14	9	1.00	87	91	5	7	9	10
Propoxur	0.99	81	118	15	18	16	13	0.99	84	79	10	4	3	11	1.00	83	75	8	3	11	16	1.00	81	84	5	10	7	9
Prothiofos	0.99	120	108	7	14	12	6	0.99	73	90	6	16	14	16	0.99	70	78	5	2	18	18	1.00	84	84	6	10	5	8
Pyrazophos	0.99	110	102	15	12	10	19	0.99	85	88	10	9	13	7	1.00	113	79	8	8	13	7	1.00	70	79	11	14	20	10
Pyridaben	0.99	112	106	8	11	17	17	0.99	89	76	9	5	14	11	0.99	117	91	15	10	15	8	1.00	83	82	7	11	9	7
Pyridalyl	0.99	120	108	8	13	9	20	0.99	86	70	11	4	14	17	0.99	82	78	5	3	8	8	0.99	92	80	14	11	8	10
Pyridaphenthion	0.99	112	94	12	15	10	13	0.99	105	82	20	10	16	7	1.00	83	82	19	8	12	10	1.00	100	82	20	18	39	19
Pyrifenoxy	0.99	108	107	6	11	15	9	0.99	84	71	11	3	17	18	0.99	71	74	5	3	17	8	1.00	110	117	1	2	16	3
Pyrimethanil	0.99	109	96	8	20	13	14	0.99	89	76	11	5	12	11	0.99	85	79	7	3	11	7	1.00	89	89	5	10	9	10
Pyriproxyfen	0.99	112	100	9	13	10	11	0.99	88	72	8	2	17	14	0.99	89	81	9	4	7	8	1.00	84	79	5	8	10	10
Quinalphos	0.99	120	98	7	15	13	15	0.99	88	76	11	5	14	8	0.99	87	76	9	5	7	3	1.00	70	80	20	11	17	18
Quintozene	0.99	96	92	11	12	13	12	0.99	80	70	9	7	16	15	0.99	77	77	8	3	13	7	1.00	84	77	5	7	5	3
S421	0.99	111	97	12	7	15	7	0.99	85	74	6	9	18	17	0.99	120	79	19	19	16	15	0.99	71	70	20	16	14	14
Silafluofen	0.99	120	96	11	16	13	16	0.99	79	70	8	7	18	7	0.99	90	70	13	7	14	12	1.00	104	75	19	9	8	9
Sulfotep	0.99	95	98	11	13	8	12	0.99	85	75	11	4	19	14	0.99	92	80	11	6	9	7	1.00	85	79	3	8	7	6
Tau Fluvalinato	0.99	117	104	14	16	16	18	0.99	81	75	7	3	16	20	0.99	92	83	9	2	9	6	1.00	80	87	11	11	10	11
Tebuconazole	0.99	107	100	8	14	8	15	0.99	86	72	7	2	11	16	0.99	83	79	7	4	6	8	1.00	91	88	9	7	5	10
Tecnazene	0.99	95	111	17	17	9	12	0.99	87	70	17	4	17	15	0.99	72	74	1	2	17	9	1.00	74	71	5	9	15	10
Tefluthrin	0.99	108	104	7	14	10	12	0.99	87	75	9	4	19	6	0.99	87	102	8	4	11	13	1.00	89	86	4	8	9	7
Terbutryn	0.99	113	96	9	20	18	10	0.99	83	71	15	5	11	13	0.99	94	81	10	3	12	14	1.00	90	90	7	11	10	9
Tetrachlorvinphos	0.99	118	108	7	16	12	8	0.99	>125	>125	>40	>41	>37	>37	0.99	<60	<60	>35	>40	>40	>40	1.00	74	89	8	14	16	8
Tetraconazole	0.99	73	101	17	15	15	10	0.99	120	80	20	14	19	19	0.99	87	81	16	5	18	6	0.99	98	89	10	11	10	20
Tetradifon	0.99	108	90	7	17	8	10	0.99	82	73	5	3	20	14	0.99	100	76	14	3	7	10	1.00	88	92	5	8	10	6
Tetrasul	0.99	103	103	7	15	9	3	0.99	118	70	4	14	17	10	0.99	87	79	7	2	8	9	1.00	86	82	5	7	12	7
Thiobencarb	0.99	112	106	5	13	5	11	0.99	76	77	9	5	13	15	0.99	87	79	8	4	12	8	1.00	85	85	3	9	7	8
Thiofanox	0.99	90	78	12	13	13	11	0.99	70	80	18	12	15	19	0.99	113	72	13	17	9	20	1.00	75	70	16	13	11	20
Tolclofos-methyl	0.99	102	93	10	11	6	16	0.99	100	74	10	3	17	8	0.99	87	79	6	3	12	7	1.00	89	86	5	8	6	9
Transfluthrin	0.99	115	98	7	17	9	8	0.99	88	74	9	3	18	10	0.99	92	82	7	3	11	7	1.00	87	89	3	9	10	7
Trichloronat	0.99	114	95	6	15	10	6	0.99	83	72	10	1	19	13	0.99	89	80	8	3	14	5	1.00	82	83	3	10	6	6
Trifluralin	0.99	97	104	13	7	14	13	0.99	89	71	14	6	11	17	0.99	79	79	10	2	13	7	1.00	87	83	5	10	12	16
Vinclozolin	1.00	113	107	4	15	10	16	0.99	86	77	9	5	18	13	0.99	90	78	9	3	8	6	1.00	85	87	4	9	7	8

Table 2

Summary of pesticides found in samples using target method.

Matrix	No. of samples detectable residues	Pesticide found	Frequency of detection	Classification	Concentration range ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	MRL EU ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	No. of samples >MRL
Strawberry	3	Lambda-Cyhalothrin	3	Insecticide	4.2–8.1	10	
Pear	7	Myclobutanil	2	Fungicide	2.6–3.8	50	
		Chlorothalonil	1	Fungicide	10.1	2000	
		Difenoconazol	1	Fungicide	445.8	800	
		Fenvalerate	1	Insecticide	139.0	100	1
		Fludioxonil	2	Fungicide	554.4–653.0	1000	
		Lambda-Cyhalothrin	3	Insecticide	7.5–20.5	80	
Banana	2	Pyrimethanil	3	Fungicide	3.1–678.1	1500	
		Tebuconazole	3	Fungicide	6.7–57.2	300	
		Azoxystrobin	2	Fungicide	48.7–254.5	200	1
		Bifenthrin	2	Insecticide	10.9–18.0	100	
Watermelon	2	Buprofezin	1	Insecticide	3.7	100	
		Boscalid	1	Fungicide	27.4	300	
		Chlorothalonil	1	Fungicide	16.2	1000	

Fig. 1 shows the identification of these positives. The rest of results were below the corresponding MRLs established.

3.5. Application of the method to real samples: non-targeted analysis

There are generally four components in a non-targeted workflow: sample preparation, instrumental analysis, post-analysis data

treatment, and data interpretation [25]. Once completed the two first steps, in order to provide a standardized approach to confirm the identity of chemical contaminants, a post-analysis data treatment, which allows to monitor all the pesticides included in databases. Other additional factors to consider in these last two steps are the quality of the chromatographic and spectral data,

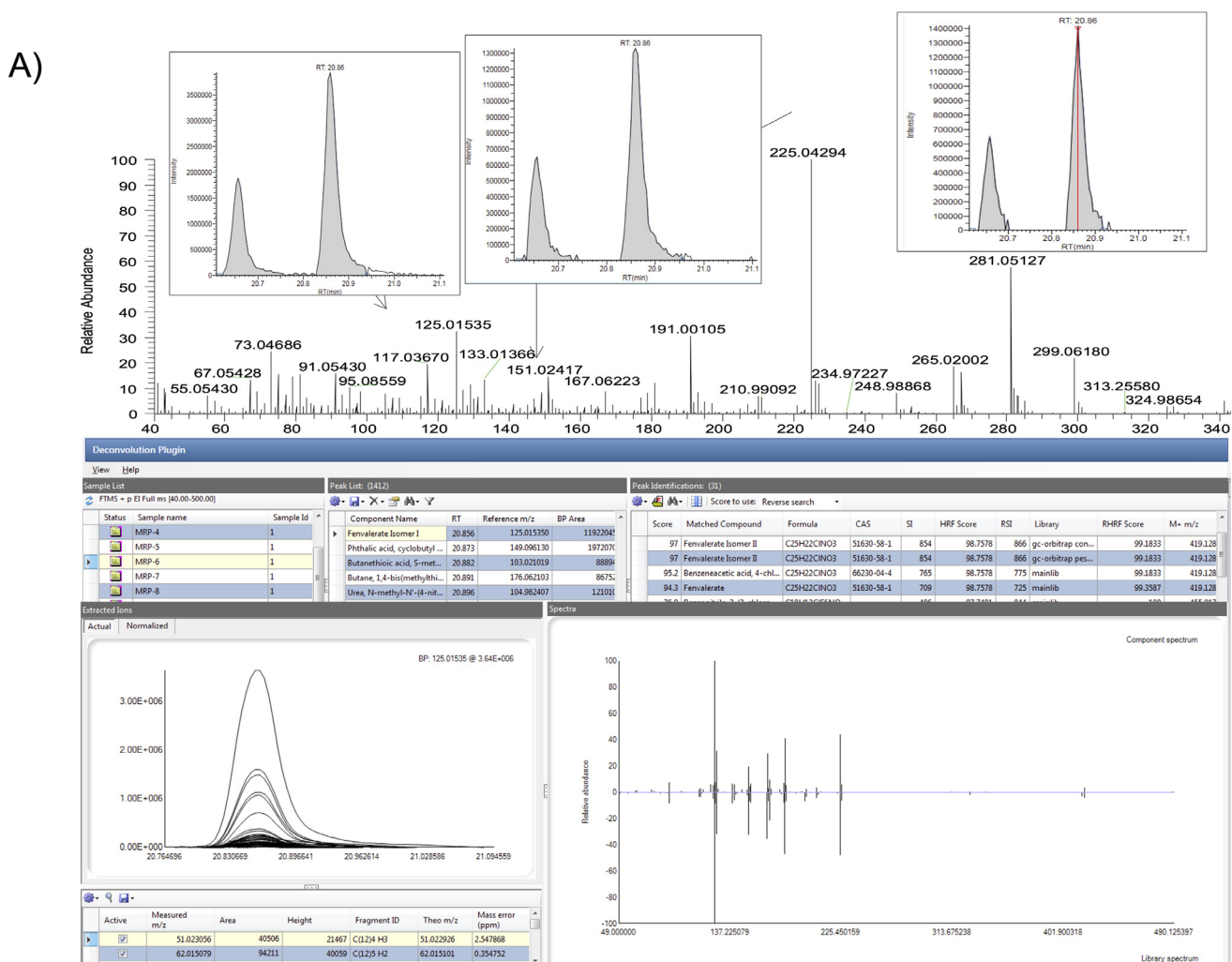


Fig. 1. Identification of A) fenvalerate in pear and B) azoxystrobin in banana by the targeted approach combined with the tentative identification by the non-targeted approach.

B)

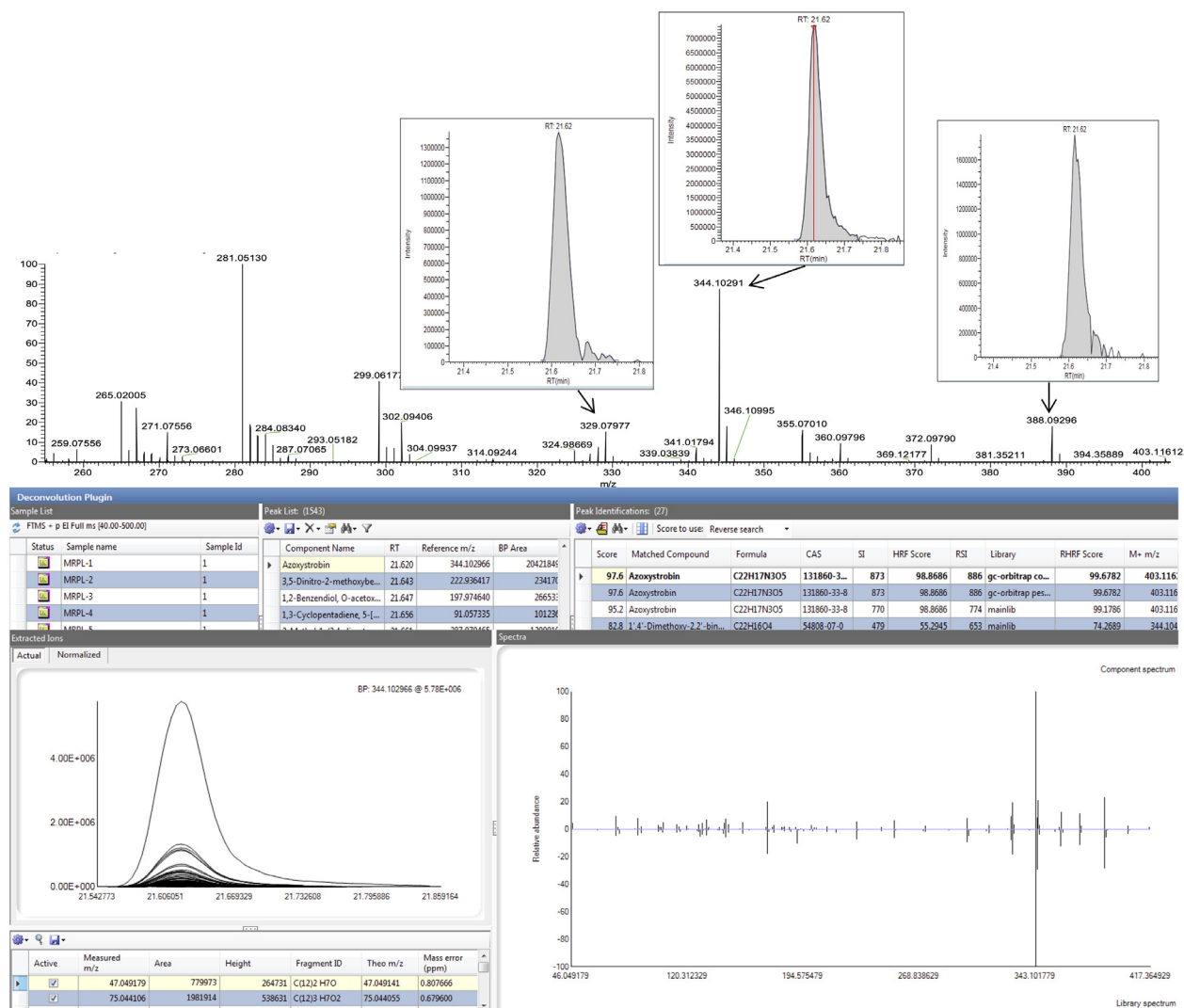


Fig. 1. Continued

data processing capacity and the analyst's expertise directly related to time. In any case, the time required to process and report the results for each sample is one of the main bottlenecks in untargeted methods, reaching several hours.

Thanks to the potential of the GC-Orbitrap-MS system is possible to carry out a retrospective study of samples, which have been already analyzed in targeted mode. To this purpose, a total of 114 real samples were analyzed, including the 31 samples already used in the previous section. Table 3 summarizes the commodities and number of samples covered in the study. These samples were analysed by GC-HRMS-Q-Orbitrap setting the working conditions described in the "Optimization of GC-Orbitrap-MS" section. TraceFinder 4.0 software was used, with the "Deconvolution Plugin" application. The deconvolution consists of a search process of those ions with higher signal intensity and the grouping of those spectrums with the same retention time, which is supposed to come from the same compound. Deconvolution will provide cleaner spectra and improve library matching that can be beneficial for identification and confirmation purposes [20]; in this point the individual peaks of the TIC were extracted. Then the peaks obtained in each file of each sample were processed using the "all ions" option, which uses all ions in the library search, an accurate mass tolerance window of 5 ppm and an ion overlap window of 98%. In addition, other characteristic information provided

Table 3
Number of samples.

Fruit and vegetables samples	No of samples
Apricot	4
Asparagus	1
Aubergine	2
Banana	6
Bean	3
Cherry	1
Cucumber	8
Garlic	1
Melon	6
Mushroom	1
Nectarine	4
Paraguayan	4
Peach	5
Pear	12
Pepper	5
Plum	2
Potatoe	5
Strawberry	8
Sweet potato	1
Tomato	4
Watermelon	25
Zucchini	6

by GC-MS such as the Kovats retention index was used for tentative compound identification. For this, the retention index data in the submitted spectrum from deconvolution was compared to that value in the library spectrum with a tolerance set to 10. The algorithm used for the detection of peaks was Genesis and detection method as the nearest retention time. One tentative identification was done by comparison of the spectrum for each peak obtained with the NIST spectral library (version 2.0) and with the Food & Environmental contaminants library (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) containing more than 200.000 spectra. This tentative list of results is based on search index score for each compound detected returned by a library search (SI) and the percentage of the total ion chromatogram of the spectrum that can be explained by the chemical formula in the library search (HRF). This score indicated quality of match between library hit and deconvolved experimental spectrum. For each sample, in the chromatographic deconvolution between 1000 and 1700 peaks are detected, this involved a large amount of data. Taking into account that minimum setting score was established at 70, SI >700 and HRF >80 each of the peaks is checked to obtain those that meet these criteria.

First, the non-targeted strategy was applied to the 31 analyzed samples in the previous section, and all the results obtained through targeted method have been tentatively identified

by this approach. In addition, other compounds have been tentatively identified: the tebufenpyrad insecticide in watermelon; the bendiocarb and fenobucarb insecticides, and the imazalil, isoprocarb and thiabendazole fungicides in banana; the metalaxyl and triadimenol fungicides and the tetramethrin insecticide in strawberry, and the furmecyclox, imazalil and dinocap fungicides in pear. Fig. 1 shows the identification of fenvalerate in pear and azoxystrobin in banana by the targeted method with TraceFinder by QualBroser of Xcalibur by the non-targeted approach.

For the rest of the samples analyzed, the cyprodinil, fenhexamide, flutriafol and pirimicarb fungicides, and the chlorpyrifos-methyl, spiromexifen, methidathion, cypermethrin and tebufenpyrad insecticides met the requirements. Fig. 2 shows the tentative identification resulting from deconvolution of A) cypermethrin in mushroom and B) pirimicarb in pepper. Table 4 shows the pesticides that met the established criteria after carrying out the deconvolution. The 5 most detected pesticides were lambda-cyhalothrin (5.26%), triadimenol (4.38%) and imazalil, pyrimethanil and tebuconazol (2.63% each one), all of them are fungicides except lambda-cyhalothrin which is an insecticide. Tebuconazol is a wide spectrum systemic fungicide even in post-harvest. There have been 5 alert for tebuconazol residues since 2014 in fruit and vegetable in the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) [3]. Also, 1 alert

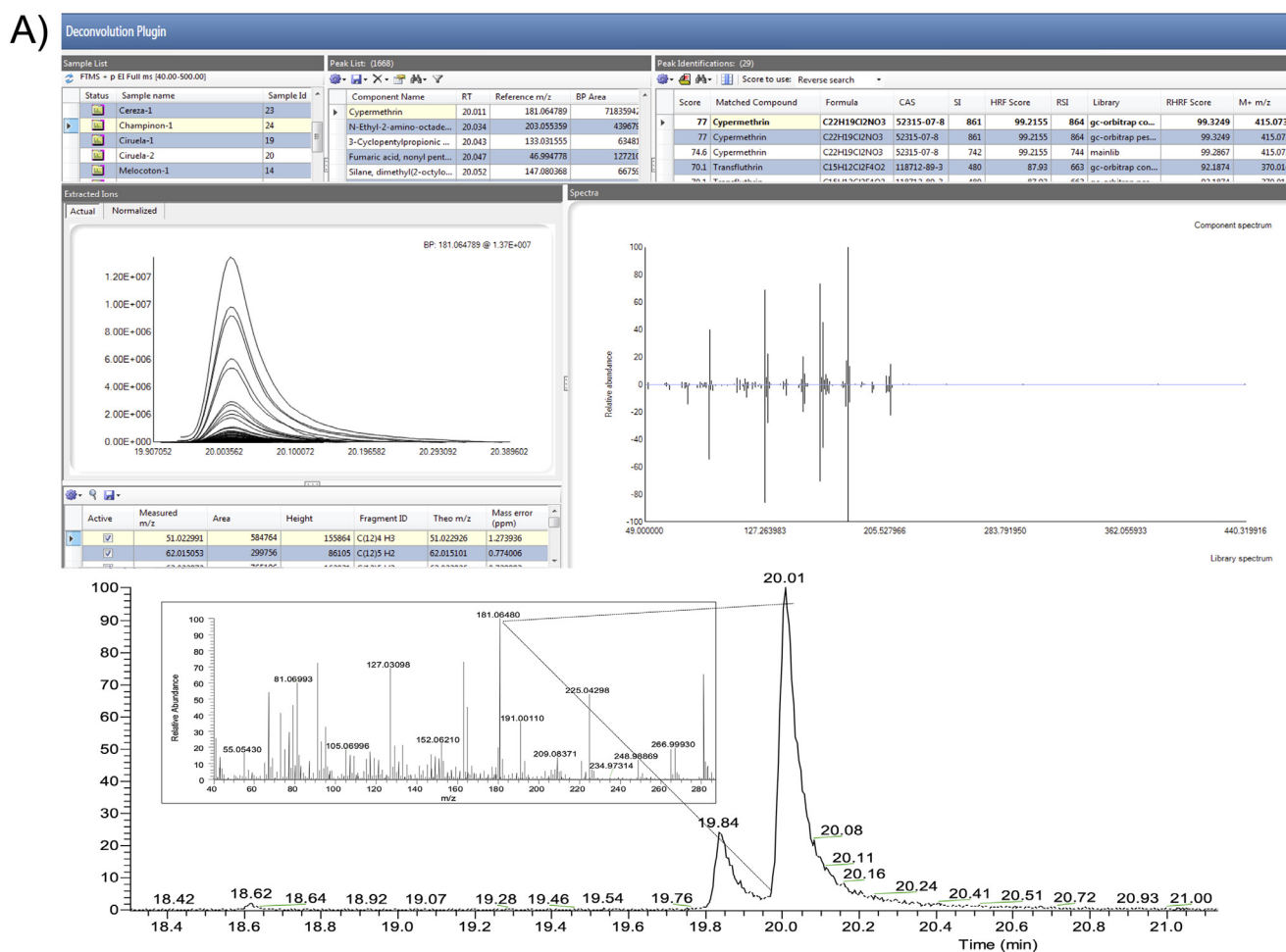


Fig. 2. Tentative identification of A) cypermethrin in mushroom and B) pirimicarb in pepper as a result of the deconvolution.

B)

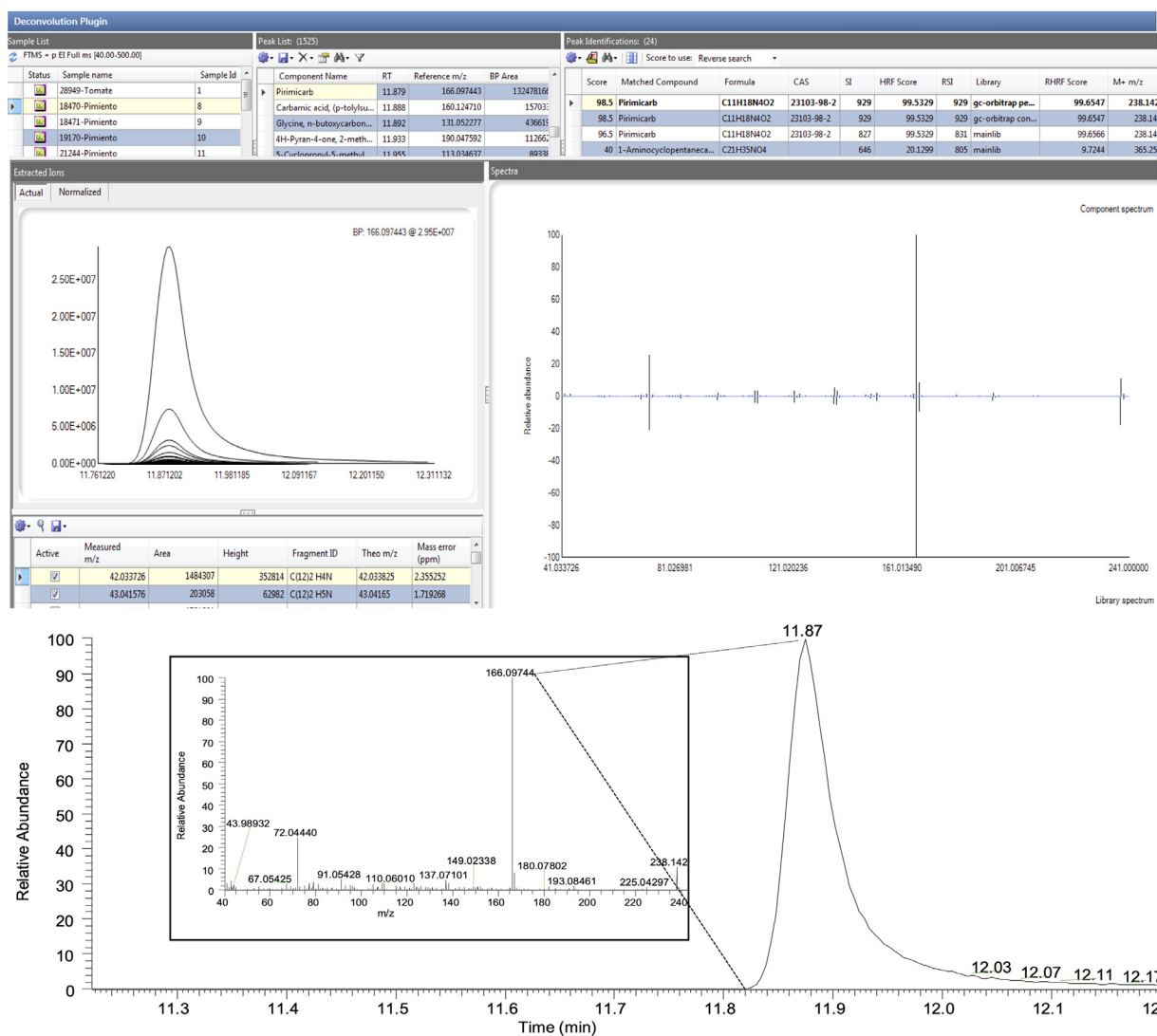


Fig. 2. Continued

for lambda-cyhalothrin, pyrethroid insecticide and another one for imazalil, compound especially suitable for incorporating wax as a fungicidal memory treatment.

Conclusions

In conclusion, combining targeted and non-targeted approaches using GC-FS-HRMS has proved to be a powerful and practical tool

to perform food safety control of fruits and vegetables. In addition, the proposed targeted method allows obtaining LOQ at very low level (5 µg/kg), values lower than the MRLs established in current legislation. This is very relevant regarding its applicability to samples such as infant food or organic products where it is important to achieve as lowest concentrations as possible.

Table 4
Tentative identification of pesticides by non-targeted method.

Matrix	Pesticide	RT	Score	SI	HRF score	
Garlic	Methidathion	13,52	76,4	780	94,05	
	Cypermethrin	20,01	77,0	861	99,22	
Mushroom	Lambda-Cyhalothrin	18,03	76,4	808	90,87	
	Lambda-Cyhalothrin	18,04	74,4	756	97,29	
Strawberry	Lambda-Cyhalothrin	18,03	74,5	725	97,02	
	Metalaxyl	12,38	76,5	784	92,91	
Melon	Myclobutanil	14,92	74,8	749	97,95	
	Myclobutanil	14,92	74,4	727	99,48	
	Tetrametrin	17,16	75,6	744	96,27	
	Triadimenol	13,96	76,5	815	99,70	
	Triadimenol	13,95	76,6	831	99,66	
	Triadimenol	13,96	75,3	762	99,11	
	Triadimenol	13,96	77,0	852	99,66	
	Triadimenol	13,96	76,7	840	99,35	
	Tebuconazole	17,53	94,8	779	96,76	
	Pear	Chlorothalonil	11,52	94,8	837	94,98
		Difenoconazole	21,21	77,0	900	95,48
	Pepper	Dinocap	6,01	77,5	821	98,27
		Fenvalerate	20,65	97,0	854	98,76
		Fludioxonil	14,69	96,5	860	95,66
		Fludioxonil	14,70	93,3	830	87,90
		Furmecycloz	9,54	71,9	807	98,44
		Imazalil	14,66	99,0	940	99,61
		Imazalil	14,68	98,3	915	98,84
		Lambda-Cyhalothrin	18,03	77,0	850	100,00
		Lambda-Cyhalothrin	18,02	76,2	807	100,00
Lambda-Cyhalothrin		18,03	75,6	749	98,88	
Pyrimethanil		11,39	96,1	806	94,16	
Pyrimethanil		11,37	97,5	914	97,58	
Pyrimethanil		11,38	97,6	913	97,48	
Tebuconazole		16,56	78,0	897	99,28	
Tebuconazole		16,58	75,1	775	94,47	
Tebuconazole		16,56	77,9	897	99,47	
Banana		Flutriafol	14,71	78,4	920	98,27
		Pirimicarb	11,87	98,5	929	99,53
Banana		Azoxystrobin	21,63	74,2	707	96,05
		Azoxystrobin	21,62	97,6	873	98,87
	Bendiocarb	8,74	73,3	810	87,77	
	Bendiocarb	8,75	72,9	802	91,24	
	Bifenthrin	17,05	70,3	780	91,09	
	Bifenthrin	17,05	70,6	892	96,43	
	Buprofezin	14,92	74,4	728	97,40	
	Fenobucarb	11,23	75,0	743	97,77	
	Fenobucarb	11,23	75,4	756	98,93	
	Imazalil	14,70	77,7	872	99,77	
	Isoprocarb	11,23	75,0	743	97,77	
	Isoprocarb	11,23	75,0	747	98,83	
Watermelon	Thiabendazole	14,09	98,0	901	99,10	
	Boscalid	19,94	94,0	718	90,37	
	Chlorothalonil	11,53	93,5	777	80,49	
	Tebuconazole	17,38	93,4	706	90,54	
Tomato	Clorpyrifos methyl	12,38	71,5	728	90,24	
	Cyprodinil	13,82	95,1	754	90,73	
	Fenhexamide	16,70	73,9	732	95,05	
	Spiromexifen	17,14	76,5	831	98,21	

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.chroma.2020.461118](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461118).

CRediT authorship contribution statement

Marta Vargas-Pérez: Formal analysis, Investigation, Validation, Writing - original draft, Visualization. **Irene Domínguez:** Soft-

ware, Data curation. **Francisco Javier Egea González:** Conceptualization, Methodology, Supervision. **Antonia Garrido Frenich:** Resources, Writing - review & editing, Funding acquisition, Project administration.

References

- [1] European Parliament and Council, Regulation (EC) n° 178/2002 of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European food safety authority and laying down procedures in matters of food safety, Off. J. Eur. Communities L 31 (2002) 1–24 <https://doi.org/2004R0726> - v.7 of 05.06.2013.
- [2] Regulation (EC) 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, Off. J. Eur. Union (2007) 20.07(n.d.).
- [3] Rapid alert system for food and feed (RASFF portal), 2018, available on: (n.d.). <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>.

- [4] M. Tienstra, H.G.J. Mol, Application of gas chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass spectrometry for pesticide residue analysis in cereals and feed ingredients, *J. AOAC Int.* 101 (2018) 342–351, doi:[10.5740/jaoacint.17-0408](https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0408).
- [5] T. Portolés, J.G.J. Mol, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, Validation of a qualitative screening method for pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization, *Anal. Chim. Acta.* 838 (2014) 76–85, doi:[10.1016/j.aca.2014.06.006](https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.006).
- [6] A. Kaufmann, The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1233–1249, doi:[10.1007/s00216-011-5629-4](https://doi.org/10.1007/s00216-011-5629-4).
- [7] E.L. Schymanski, J. Jeon, R. Gulde, K. Fenner, M. Ruff, H.P. Singer, J. Hollender, Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 2097–2098, doi:[10.1021/es5002105](https://doi.org/10.1021/es5002105).
- [8] R. Romero-Gonzalez, A. Garrido-Frenich, Applications in high resolution mass spectrometry, 2017.
- [9] M. Vargas-Pérez, F.J. Egea González, A. Garrido Frenich, Evaluation of the behaviour of propoxycarbazone herbicide in soils and water under different conditions, Post-Targeted Study Ecotoxicol. Environ. Saf. (2019) 183, doi:[10.1016/j.ecoenv.2019.109506](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109506).
- [10] M. Gaugain, S. Mompelat, M.P. Fourmond, J. Manceau, J.G. Rolland, M. Laurentie, E. Verdon, L. Bellanger, D. Hurtaud-Pessel, A non-targeted LC-HRMS approach for detecting exposure to illegal veterinary treatments: the case of cephalosporins in commercial laying hens, *J. Chromatogr. A.* 1599 (2019) 161–171, doi:[10.1016/j.chroma.2019.04.022](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.022).
- [11] A. Goon, Z. Khan, D. Oulkar, R. Shinde, S. Gaikwad, K. Banerjee, A simultaneous screening and quantitative method for the multiresidue analysis of pesticides in spices using ultra-high performance liquid chromatography-high resolution (Orbitrap) mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1532 (2018) 105–111, doi:[10.1016/j.chroma.2017.11.066](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.066).
- [12] P. Zomer, H.G.J. Mol, Simultaneous quantitative determination, identification and qualitative screening of pesticides in fruits and vegetables using LC-Q-OrbitrapTM-MS, *Food Addit. Contam. - Part A.* 32 (2015) 1628–1636, doi:[10.1080/19440049.2015.1085652](https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1085652).
- [13] J. Wang, W. Chow, D. Leung, J. Chang, Application of ultrahigh-performance liquid chromatography and electrospray ionization quadrupole orbitrap high-resolution mass spectrometry for determination of 166 pesticides in fruits and vegetables, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 12088–12104, doi:[10.1021/jf303939s](https://doi.org/10.1021/jf303939s).
- [14] J. Wang, W. Chow, J. Chang, J.W. Wong, Ultrahigh-performance liquid chromatography electrospray ionization Q-Orbitrap mass spectrometry for the analysis of 451 pesticide residues in fruits and vegetables: method development and validation, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 10375–10391, doi:[10.1021/jf503778c](https://doi.org/10.1021/jf503778c).
- [15] J. Wang, W. Chow, J. Chang, J.W. Wong, Development and validation of a qualitative method for target screening of 448 pesticide residues in fruits and vegetables using UHPLC/ESI Q-Orbitrap based on data-independent acquisition and compound database, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 473–493, doi:[10.1021/acs.jafc.6b05034](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05034).
- [16] N. Besil, V. Cesio, H. Heinzen, A.R. Fernandez-Alba, Matrix effects and interferences of different citrus fruit coextractives in pesticide residue analysis using ultrahigh-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 4819–4829, doi:[10.1021/acs.jafc.7b00243](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00243).
- [17] J.W. Wong, J. Wang, W. Chow, R. Carlson, Z. Jia, K. Zhang, D.G. Hayward, J.S. Chang, Perspectives on liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide screening in foods, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 9573–9581, doi:[10.1021/acs.jafc.8b03468](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03468).
- [18] A. Lozano, S. Uclés, A. Uclés, C. Ferrer, A.R. Fernández-Alba, Pesticide residue analysis in fruit-and vegetable-based baby foods using GC-Orbitrap MS, *J. AOAC Int.* 101 (2018) 374–382, doi:[10.5740/jaoacint.17-0413](https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0413).
- [19] S. Uclés, A. Uclés, A. Lozano, M.J. Martínez Bueno, A.R. Fernández-Alba, Shifting the paradigm in gas chromatography mass spectrometry pesticide analysis using high resolution accurate mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1501 (2017) 107–116, doi:[10.1016/j.chroma.2017.04.025](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.025).
- [20] H.G.J. Mol, M. Tienstra, P. Zomer, Evaluation of gas chromatography – electron ionization – full scan high resolution Orbitrap mass spectrometry for pesticide residue analysis, *Anal. Chim. Acta.* 935 (2016) 161–172, doi:[10.1016/j.aca.2016.06.017](https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.017).
- [21] D. Roberts, S. Uclés Duque, A. Fernández-Alba, P. Silcock, Routine quantitative method of analysis for pesticides using gc orbitrap mass spectrometry in accordance with SANTE/11945/2015 guidelines, *Brazilian J. Anal. Chem.* 4 (2017) 53–65.
- [22] M.M. Gómez-Ramos, S. Ucles, C. Ferrer, A.R. Fernández-Alba, M.D. Hernando, Exploration of environmental contaminants in honeybees using GC-TOF-MS and GC-Orbitrap-MS, *Sci. Total Environ.* 647 (2019) 232–244, doi:[10.1016/j.scitotenv.2018.08.009](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.009).
- [23] M.I. Cervera, T. Portolés, E. Pitarch, J. Beltrán, F. Hernández, Application of gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for target and non-target analysis of pesticide residues in fruits and vegetables, *J. Chromatogr. A.* 1244 (2012) 168–177, doi:[10.1016/j.chroma.2012.04.063](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.063).
- [24] European Commission, Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017, (2017) 2–44. 10.13140/RG.2.2.33021.77283.
- [25] A. von Eyken, S. Bayen, Optimization of the data treatment steps of a non-targeted LC-MS-Based workflow for the identification of trace chemical residues in honey, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30 (2019) 765–777, doi:[10.1007/s13361-019-02157-y](https://doi.org/10.1007/s13361-019-02157-y).

CAPÍTULO

3

**APLICACIÓN DE LA
ESPECTROMETRIA DE
MASAS DE ALTA
RESOLUCIÓN EN
ESTUDIOS DE
DISIPACIÓN /
DEGRADACIÓN DE
PLAGUICIDAS EN EL
ÁMBITO
MEDIOAMBIENTAL Y
ALIMENTARIO**

1. Introducción

El uso de plaguicidas permite incrementar la producción agrícola, siendo de gran importancia su aplicación a las dosis recomendadas en los cultivos en los que están autorizados. Una vez aplicados es importante conocer cómo se comportan y distribuyen tanto en el cultivo como en el medioambiente.

Uno de los principales fenómenos que experimentan los plaguicidas una vez aplicados es su transformación en compuestos más sencillos, los metabolitos. Por esta razón, los estudios tanto de disipación como de degradación, independientemente de la escala a la que se realicen son fundamentales para conocer su comportamiento. El escenario más sencillo representa la realización de estudios en condiciones de laboratorio con la ventaja de poder controlar las condiciones de los mismos. Sin embargo, los estudios realizados en campo (abierto o invernadero) son más realistas puesto que se han realizado en condiciones ambientales reales.

Estos estudios de disipación/degradación permiten avanzar en el conocimiento sobre las rutas metabólicas y los metabolitos en los que se transforman. Los resultados obtenidos son cada vez de mayor interés debido sobre todo a que algunos poseen mayor persistencia y actividad que sus compuestos de origen. Una forma sencilla de entender la disipación/degradación de un plaguicida puede ser la detección de los metabolitos [1,2].

La HRMS presenta las capacidades necesarias respecto a sensibilidad y selectividad para llevar a cabo este tipo de estudios. Además permite la identificación de compuestos generados para los que no se dispone de patrón comercial [3]. Los analizadores de HRMS tipo Orbitrap permiten abordar esta problemática.

En este capítulo se presentan los trabajos centrados en el comportamiento de disipación y degradación de un herbicida en un estudio

de laboratorio en suelo y agua mediante LC-HRMS (**Publicación III**), así como el de un fungicida en un estudio de campo en invernadero en cultivos hortícolas mediante LC-HRMS (**Publicación IV**). En ambos trabajos se incluye el desarrollo y validación de los métodos en las matrices correspondientes.

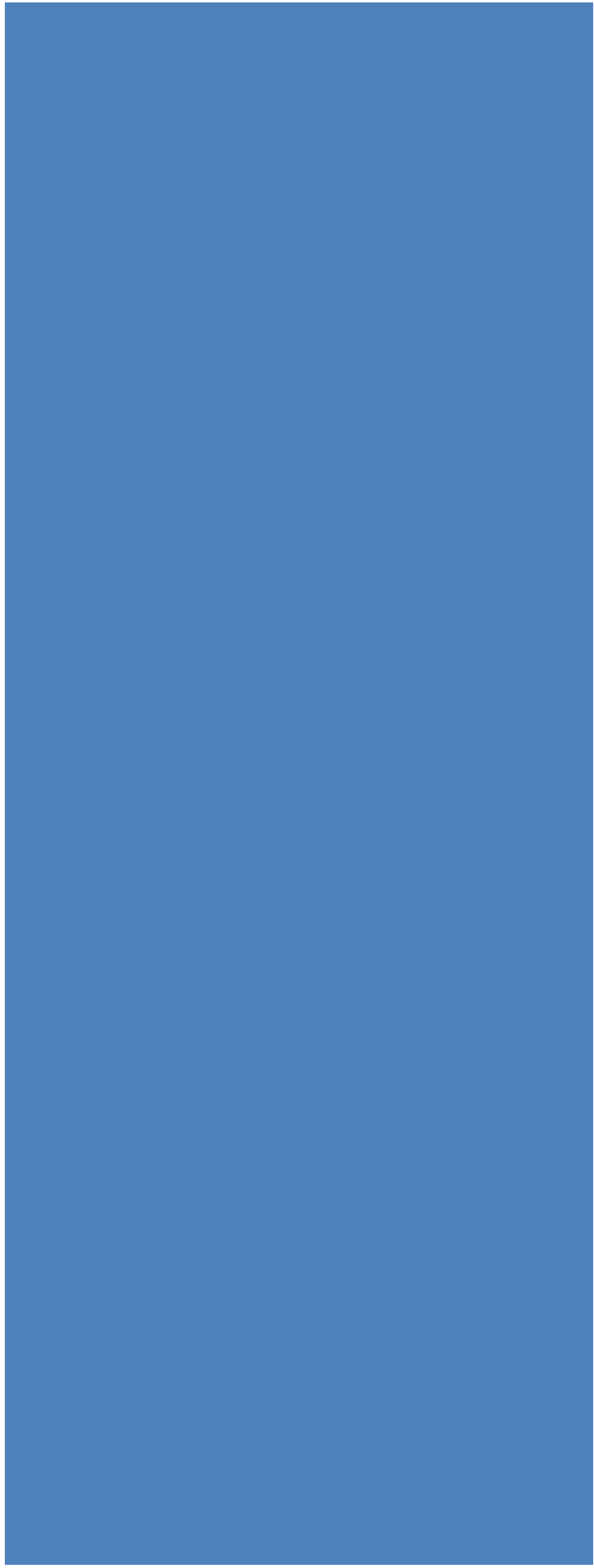
Las publicaciones incluidas en este capítulo, referentes a la determinación de plaguicidas, son las siguientes:

- **Publicación III.** Evaluation of the behaviour of propoxycarbazone herbicide in soils and water under different conditions. Post-targeted study. Marta Vargas-Pérez, Francisco Javier Egea González, Antonia Garrido Frenich. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183, (2019), 109506
- **Publicación IV.** Dissipation and residue determination of fluopyram and its metabolites in greenhouse crops. Marta Vargas-Pérez, Francisco Javier Egea González, Antonia Garrido Frenich. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,

2. Referencias

1. Chen, K.; Liu, X.; Wu, X.; Xu, J.; Dong, F.; Zheng, Y. The degradation dynamics and rapid detection of thiacloprid and its degradation products in water and soil by UHPLC-QTOF-MS. *Chemosphere* **2021**, *263*, 127960, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127960.
2. Dai, J.; Jiang, C.; Gao, G.; Zhu, L.; Chai, Y.; Chen, H.; Liu, X. Dissipation pattern and safety evaluation of cartap and its metabolites during tea planting, tea manufacturing and brewing. *Food Chem.* **2020**, *314*, 126165, doi:10.1016/j.foodchem.2020.126165.
3. Kaufmann, A. The use of UHPLC, IMS, and HRMS in multiresidue analytical methods: A critical review. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2020**, *1158*, 122369, doi:10.1016/j.jchromb.2020.122369.

PUBLICACIÓN III



Evaluation of the behaviour of
propoxycarbazone herbicide in soils
and water under different
conditions. Post-targeted study

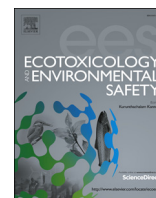
Marta Vargas-Pérez,

Francisco Javier Egea González & Antonia

Garrido Frenich

Exotoxicology and Environmental Safety

183 (2019) 109506



Evaluation of the behaviour of propoxycarbazone herbicide in soils and water under different conditions. Post-targeted study



Marta Vargas-Pérez, Francisco Javier Egea González, Antonia Garrido Frenich*

Research Group "Analytical Chemistry of Contaminants", Department of Chemistry and Physics, Center for Research in Mediterranean Intensive Agrosystems and Agri-Food Biotechnology (CIAIMBITAL), University of Almería, Agrifood Campus of International Excellence, CeiA3, E-04120, Almería, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Propoxycarbazone
UHPLC-Orbitrap-MS
Post-targeted
Transformation products
Dissipation

ABSTRACT

The aim of this study is to understand the levels and behaviour of the herbicide propoxycarbazone in environmental compartments, which are poorly characterized considering degradation products that might reach either surface water as groundwater or soil samples. To this end, an analytical method, based on ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled with Orbitrap mass spectrometry (MS), has been developed to determine the parent compound and its transformation products in soils and water. In addition, a set of laboratory trials has been designed to address the dissipation process of propoxycarbazone formulation in both environmental substrates. The study revealed that the dissipation in water followed a first order kinetics and a non-linear "First Order Multi Compartment" model (FOMC) to soil.

Relevant advances have been also achieved in terms of the analytical methodology, as far as the UHPLC-Orbitrap-MS technique allows the development of a retrospective screening of pesticide transformation products in water and soils. For this purpose, an accurate-mass database has been built and used for the post-run screening analysis with 9 transformation products. Photodegradation presumably plays an important role in the dissipation of propoxycarbazone. The results of UHPLC-Orbitrap-MS revealed that four transformation products were formed during the degradation process of the herbicide.

1. Introduction

Since the use of pesticides was generalized, the yield of crops have greatly improved, in terms of either quality as quantity (Barchanska et al., 2017). They are used almost at every place, i.e., agricultural fields, homes, parks, schools and forests. As result of applications in modern agriculture, pesticides can be found in the environment, including waters and soils, and in foodstuffs. In addition to the aforementioned benefits, they may also produce non-beneficial side effects, as they can be toxic and that pose potential hazard to the environment. One of non-beneficial side effects is that biodiversity in soils can decrease because the active ingredients might not only eliminate the intended pest, but often also affect many other organisms present in soil. For example, the reduction of life in the soils has a knock-down effect on water retention properties, which reduces the soil quality for crops (Bajeer et al., 2016). On the regional and worldwide scale, current knowledge of the occurrence and fate of pesticides in the environment is limited and has emerged as an environmental issue (Tlili et al., 2016). Pesticides in the environment can be transformed into a large number of degradation compounds, commonly defined as transformation

products, which can sometimes be as toxic and as persistent as the original pesticide (Martínez Vidal et al., 2009). Degradation processes or transformation begins once pesticides are applied in the field. However, it may happen that the mineralization or degradation process is not completed or when it occurs slowly in the environment, then different intermediates can be formed. In many cases, these transformation products possess unknown physico-chemical properties and their environmental behaviour and significance might differ significantly from the parent compounds (Sevilla-Morán et al., 2014). As a main feature, transformation products are more water soluble than parent compounds and are leached more rapidly through the soil profile into ground water (Scribner et al., 2000). As typical behaviour, degradation is faster in surface water and soil than in groundwater samples, mainly due to increased biological activity and exposure to sunlight (Blankenberg et al., 2006).

Nevertheless, our understanding of the consequences from pesticides use remains incomplete because most previous investigations have primarily focused on parent compounds. Information on the environmental occurrence of transformation products has been more restricted because the analytical methods are difficult, expensive, or

* Corresponding author.

E-mail address: agarrido@ual.es (A.G. Frenich).

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109506>

Received 5 June 2019; Received in revised form 26 July 2019; Accepted 30 July 2019

Available online 03 August 2019

0147-6513/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

unavailable except for some cases such as the EFSA study (Food and Authority, 2016). Although neither a method of extraction nor chromatographic conditions are described in EFSA document. Thus, it becomes imperative that information on major degradation pathways are identified, analytical methods are developed to determine environmental concentrations, and research is conducted to determine environmental significance (Kolpin et al., 1998).

Propoxycarbazone, sodium salt, propoxycarbazone-sodium as proposed, is a herbicide active substance to be used in winter wheat against the three grass species. The plant protection product (PPP) *Attribut*[®] used in this study contains 700 g/kg of the active substance, any information about transformation products.

An investigation of the literature has shown that there is little information available about dissipation kinetics of propoxycarbazone, in soils (Koskinen et al., 2006; Rouchaud et al., 2001) or in aqueous media (Dulov et al., 2011) and, there is only one study in foodstuff that includes at least one of its transformation product (Vargas-Pérez et al., 2019). These studies are predominantly focused on the parent compound and based in a target compound analysis approach. Therefore, this study has been carried out in order to fill the existing gap of information related with the dissipation, and degradation processes of propoxycarbazone herbicide, considering the possible appearance of transformation products. To this end, ultra high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry, using Orbitrap, UHPLC-Orbitrap-MS, has been used instead of liquid chromatography with low resolution MS analyzers used in EFSA (Food and Authority, 2016). For this aim the behaviour of the propoxycarbazone formulation *Attribut*[®], and its degradation into its transformation products, has been evaluated in two agricultural soils with different moisture content and two different conditions for water: darkness and sunlight. From the analytical point of view, extraction methods for propoxycarbazone and its metabolite (2-hydroxy-propoxycarbazone), based on solid phase extraction (SPE) for water and a one-step solid-liquid extraction for soils, have been optimized and validated. In addition, an analytical method based on UHPLC-Orbitrap-MS has been developed and validated for the target compounds in both matrices. Determination strategy combines the classical quantitative target analysis of the parent compound and its transformation product (propoxycarbazone sodium and 2-hydroxy-propoxycarbazone using reference standards); with a post-run screening of non-targeted compounds taking the advantages of exact masses provided by the UHPLC-Orbitrap-MS.

2. Material and methods

2.1. Reagents and chemicals

Reference standard of propoxycarbazone sodium (> 98.0%) was supplied from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), while the reference standard of 2-hydroxy-propoxycarbazone (> 98.7%) was supplied from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The PPP *Attribut*[®] (propoxycarbazone-sodium 70% p/p), was supplied by Bayer CropScience AG. Stock solutions of propoxycarbazone sodium and 2-hydroxy-propoxycarbazone (200 mg/L) were individually prepared in methanol (HPLC grade, Sigma Aldrich), and they were stored at -20 °C in the dark. A working standard solution containing both compounds was prepared by diluting accurate volumes of the above solutions in a volumetric flask to obtain a concentration of 1 mg/L, which was also stored at -20 °C in the dark.

Acetonitrile (LC-MS grade) was acquired from Fluka (St. Louis, MO, USA), water (LC-MS grade) from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands) and acetic acid was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). C18 (octadecyl) bonding was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Formic acid (Optima LC-MS) was supplied from Fisher Scientific (Geel, Belgium). Oasis HLB flangeless SPE cartridges were purchased from Waters (Dublin, Ireland).

2.2. Instrument and apparatus

A Thermo Fisher Scientific Transcend 600 LC (Thermo Scientific Transcend™, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) was used for chromatographic analysis. The chromatographic system was coupled to a single mass spectrometer Orbitrap Thermo Fisher Scientific (Exactive™, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) that used an electrospray interface (ESI) (HESI-II, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) in positive and negative ion modes. A Zorbax plus C18 column (2.1 × 100 mm 1.8 μm particle size) from Agilent (San Jose, CA, USA) was used for chromatographic separation of the target compounds.

Soil samples were weighed using an analytical balance AB204-S (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland), were shaken in a Reax 2 rotary agitator from Heidolph (Schwabach, Germany), and also a WX vortex from Velp Scientifica (Usmate, Italy) was used. Centrifugation was completed in a Consul 21 from Orto Alresa (Madrid, Spain). Water samples were preconcentrated by SPE on an extraction manifold Vac Elut (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

2.3. Samples

Two moisture content soils were used during development, validation of the method and degradation studies. One clay loam soil that was collected from El Ejido and other sandy clay loam from Roquetas de Mar, Almería (Spain). The soils were firstly air-dried at room temperature for two days, the plant tissues and stones were removed and finally they were passed through a particle size b2 mm mesh sieve. The physicochemical properties of soils, can be found complete in Table S1 (see Supplementary material).

The water for the study (pH value 7.91 and conductivity value 768 μS/cm) was obtained from a well. Water was collected from a well located in El Ejido and managed by the Sol y Arena Irrigation User Community.

2.4. Laboratory trials

Laboratory trial experiences have been carried out in order to know, specifically, the behaviour of this PPP *Attribut*[®]. Dissipation experiments were conducted during November to March in 2017–2018 for soils and January to June in 2018 for water, both under laboratory conditions in Analytical Chemistry of Contaminants Laboratory, Department of Chemistry and Physics, University of Almería. That this study has been executed under laboratory conditions guarantees that conditions remain constant and controlled.

2.4.1. Soils trials

The degradation trials design was based on these procedures recently published (López-Ruiz et al., 2017; Monika et al., 2017), it considers characterized soils, which are spiked with a known amount of the PPP formulation and stored in controlled conditions for a period of time to examine the persistence of the herbicide. This experiment employed a design with 2 spiked concentration levels × 2 soil moisture contents. For spiked concentration levels, we chose to use 0.5 g/L, the recommended dose 100 g/ha (463 μg/kg of soil), and 1.0 g/L, twice recommended dose (927 μg/kg of soil). For soil moisture, two levels were chosen: 30% on weight basis for clay loam, and 15% on weight basis for sandy clay loam soil.

This experiment was carried out by weighing aliquots of 200 gr of each soil were spiked with the PPP *Attribut*[®] at the two concentration levels. Soils were then adjusted to the appropriate moisture content for each soil. The spiked soils were thoroughly mixed for 5 min. After, aliquots of 15 g of spiked soil were placed separately in thirty-two Erlenmeyer flasks and stored at room temperature (minimum temperature: 20 °C, maximum temperature: 25 °C), under normal sunlight conditions inside the laboratory with an average of 8 h of sunlight per

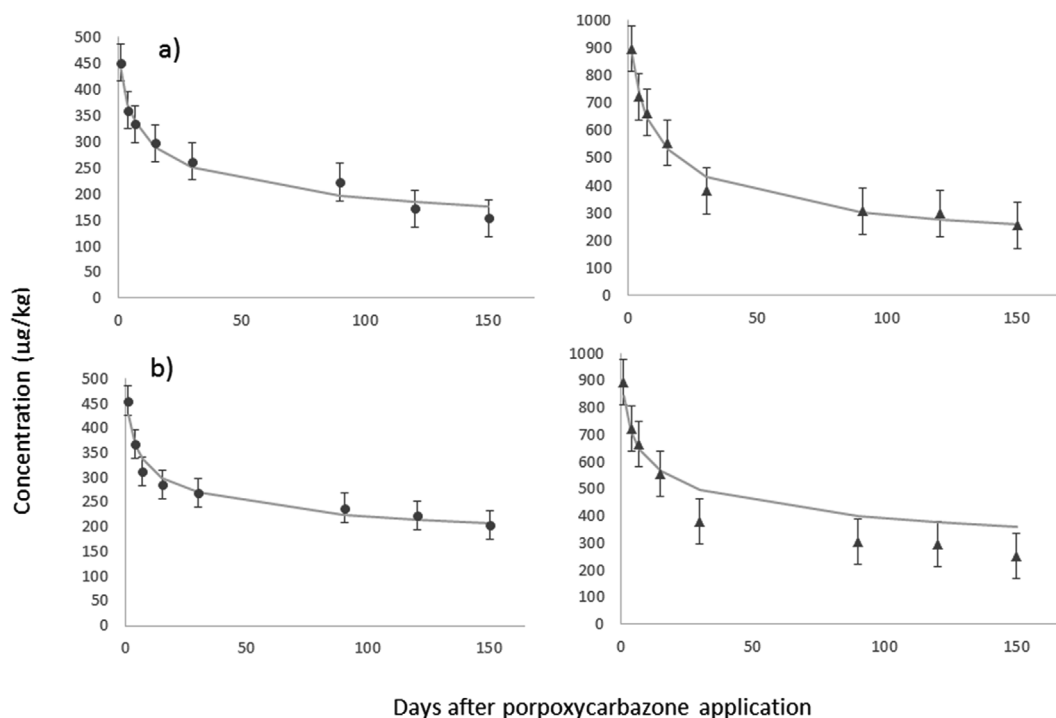


Fig. 1. Degradation curves of propoxycarbazone for 2 spiked concentration levels: recommended dose (●) and twice dose (▲) at 2 soil moisture contents: clay loam (a) and sandy clay loam (b).

Table 1

Propoxycarbazone dissipation kinetics parameters in soil for the different treatments applied.

Parameters	Propoxycarbazone			
	Recommended dose		Twice dose	
	Clay loam	Sandy clay loam	Clay loam	Sandy clay loam
C ₀ (µg/kg)	505	481	995	948
β (FOMC)	1.42	0.93	2.73	1.23
α (FOMC)	0.23	0.16	0.34	0.20
DT50	28	60	30	61

day, which represented the natural conditions. Soil moisture content was kept by checking the weight periodically (3–4 days interval) and making up the loss of moisture by adding required amount of distilled water throughout the experimental period. Later they were taken at 24 h, 4, 7, 15, 30, 90, 120 and 150 days and analyzed. The soil trial totaled 4 treatments. Each treatment was done in triplicate, totalizing 12 samples per treatment (3 samples per treatment per sampling day; 8 sampling days in total).

2.4.2. Water trials

This experiment employed a design with 2 spiked concentration levels \times 2 light conditions. For spiked concentration levels, we chose to use 1 mg/L and 5 mg/L with the commercial product, Attribut® (propoxycarbazone 70%). For light conditions, we investigated under darkness conditions, simulating groundwater, and under sunlight conditions, simulating surface waters, at room temperature (minimum temperature: 20 °C, maximum temperature: 25 °C).

In this experiment, we disposed 125 mL of water into amber (darkness conditions) and transparent bottles (sunlight conditions). After that, each bottle was spiked at the above-mentioned two concentration levels. They were hermetically closed, and agitated. Samples in sunlight conditions were placed on a sill of the window, inside the laboratory where we made sure that they would be exposed to at least

8 h of sunlight. Samples in darkness conditions were stored in a laboratory cabinet. Later they were taken and analyzed (three replicates) at 24 h and 15, 30, 60, 90, 110 and 150 days, which totaled 84 samples.

2.5. Samples preparation for analysis

2.5.1. Soil preparation for analysis

Propoxycarbazone and its transformation product were extracted following a QuEChERS preparation procedure. First, 5 g of soil sample were accurately weighed in a 50 mL polypropylene centrifuge tube. After that, 10 mL of acetonitrile containing 1% (v/v) of acetic acid and 10 mL water containing 1% acetic acid were added and stirred for 15 min in a rotary shaker. Thereafter, the tube was centrifuged for 10 min at 5000 rpm (4136 \times g). Then, 2 mL of the supernatant were transferred to a 15 mL centrifuge tube containing 50 mg of C18. This tube was again vortexed for 1 min, centrifuged for 10 min at 5000 rpm, finally the supernatant was transferred into a vial for the analysis and inject it into the UHPLC-Orbitrap-MS.

2.5.2. Water preparation for analysis

Concerning water samples, the target compounds were pre-concentrated by SPE on an extraction manifold. First, cartridges were conditioned with 3 mL of ACN and after that, 3 mL of distilled water that was acidified with 5% of formic acid at atmospheric pressure. Each aliquot of 125 mL of water sample was acidified with 0.1% of formic acid and passed through a conditioned cartridge at one drop per second under vacuum. Once the retention step had been completed, the cartridge was dried with an air current under vacuum for 30 min. The analytes elution was conducted by means 1.5 mL of ACN. Finally, one mL was transferred into a vial for the analysis. Using these conditions, a preconcentration factor of 83.33 was achieved.

2.6. UHPLC-orbitrap-MS analyses

Propoxycarbazone and 2-hydroxy-propoxycarbazone

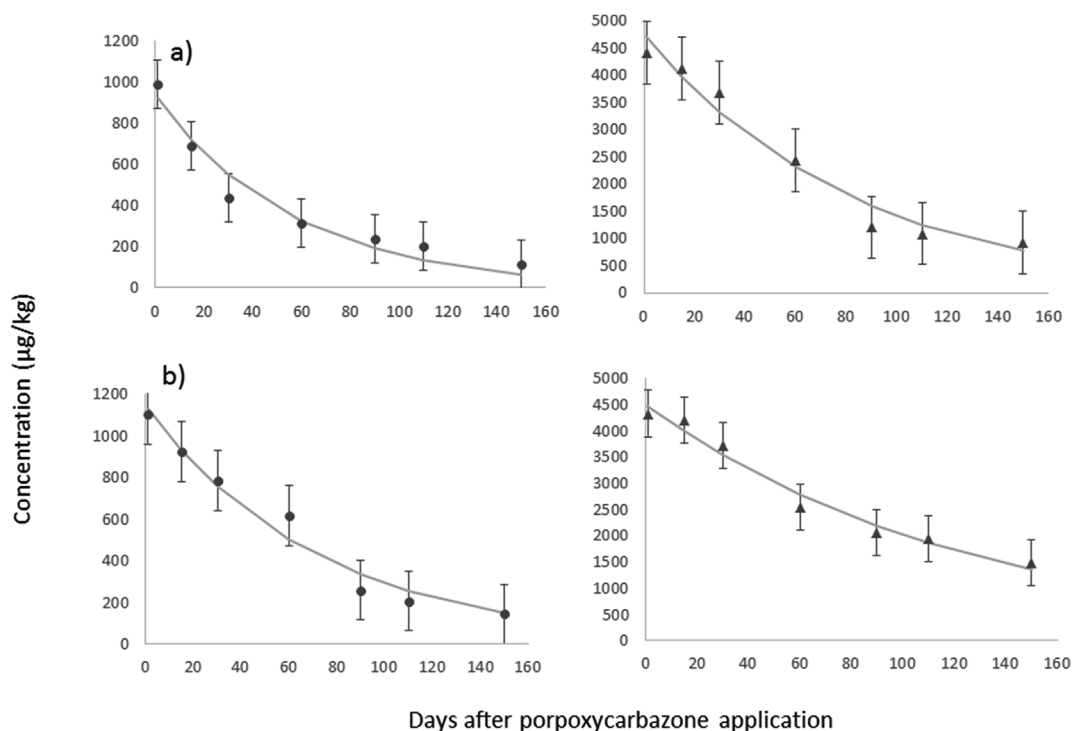


Fig. 2. Degradation curves of propoxycarbazone for 2 spiked concentration levels: 1 ppm (●) and 2 ppm (▲) at 2 light conditions: light (a) and dark (b).

Table 2

Propoxycarbazone dissipation kinetics parameters in water for the different treatments applied.

Parameters	Propoxycarbazone			
	1 mg/L dose		5 mg/L dose	
	Light condition	Dark condition	Light condition	Dark condition
C ₀ (µg/kg)	935	1142	4760	4511
k (days ⁻¹)	0.017	0.0136	0.012	0.008
DT50	39	50	57	86

concentrations were determined by ultra-high performance liquid chromatography coupled with Orbitrap mass spectrometry (UHPLC-Orbitrap-MS), employing a binary mobile phase with methanol (A) and an aqueous solution of formic acid (0.1%, v/v) (B) with a flow rate of 0.2 mL/min. The gradient elution was follows: 0–2 min 90% B, then it was linearly decreased to 70% in 1 min, to 50% in 1 min, to 20% in 1 min and to 0% in 1 min, and then it was kept constant for 1 min. Finally, it was increased linearly to 90% returned to the initial conditions in 1 min and remained constant during 2 min. The total running time was 12 min. The column temperature was set to 25 °C and the injection volume to 10 µL. ESI parameters were as follows: spray

voltage, 4 kV; sheath gas (N₂, >N95%), at 35 (adimensional); auxiliary gas (N₂, >N95%), at 10 (adimensional); skimmer voltage, 18 V; capillary voltage, 35 V; tube lens voltage, 95 V; heater temperature, 305 °C; and capillary temperature, 300 °C. Mass range used was between m/z 50–500. The chromatograms were acquired using the external calibration mode and Xcalibur™ software version 3.0.63, with Quan browser and Qual browser were used for optimization and quantification of the pesticide and its transformation products analyzed.

2.7. Method validation

The analytical method parameters were validated according to the performance criteria established by DG SANTE documentation (European Commission, 2017) calculating the following parameters: linearity, matrix effect, precision, trueness and limits of detection (LOD) and of quantitation (LOQ).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of UHPLC-Orbitrap-MS

The optimization of UHPLC-Orbitrap-MS parameters was performed by injecting individual standard solutions of the propoxycarbazone and its transformation product at two concentrations 0.5 and 1 mg/L. Both

Table 3

Database of screened transformation products of propoxycarbazone.

Transformation products	Elemental composition
2-Hidroxy-propoxycarbazone	C ₁₅ H ₁₈ O ₈ N ₄ S ₁
M02 ((5-(2-hydroxypropoxy)-4-methyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one)	C ₆ H ₁₁ O ₃ N ₃
M04 (2-(((4,5-Dihydro-4-methyl-5-oxo-3-propoxy-1H-1,2,4-triazol-1-yl)carbonyl)amino)sulfonyl benzoic acid)	C ₁₄ H ₁₆ O ₇ N ₄ S ₁
M05 (Methyl 2-sulfamoylbenzoate)	C ₈ H ₉ O ₄ N ₁ S ₁
M06 (2-Sulfamoylbenzoic acid)	C ₇ H ₇ O ₄ N ₁ S ₁
M07 (1,2-Benzothiazol-3(2H)-one-1,1-dioxide)	C ₇ H ₅ O ₃ N ₁ S ₁
M08 (1,2-Benzisothiazol-3(2H)-one-4-hydroxy-1,1-dioxide)	C ₇ H ₅ O ₄ N ₁ S ₁
M09 (4-Methyl-5-oxo-3-propoxy- 4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazole- 1-carboxamide)	C ₇ H ₁₂ O ₃ N ₄
M10 (4-methyl-5-propoxy-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one)	C ₆ H ₁₁ O ₂ N ₃

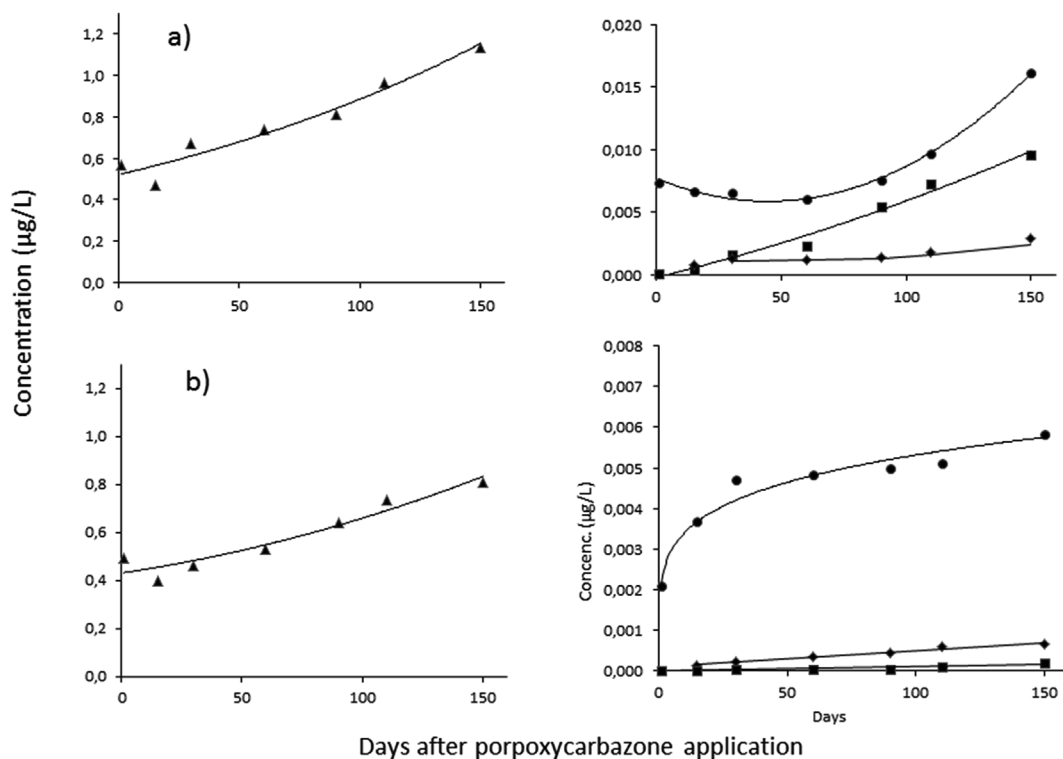


Fig. 3. Degradation curves of the transformation products in water: (5-(2-hydroxypropoxy)-4-methyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one (M02) (◆), methyl 2-sulfamoylbenzoate (M05) (●), 4-methyl-5-propoxy-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one (M10) (▲) and 2-hydroxy propoxycarbazone (■) at 2 light conditions: light (a) and dark (b).

were analyzed using ESI⁺ and ESI⁻ modes. Results showed better sensitivity, accurate mass and peak intensity when ESI⁺ was used. Full-scan MS (ESI⁺) was applied to obtain the characteristic ion for each compound. The protonated ion of each compound was monitored according to its molecular formula, and the exact masses were selected with the criterion that mass error was lower than 5 ppm for both compounds. The fragments were obtained using all-ion fragmentation (AIF) in positive mode, setting the collision energy at 30 eV. In order to confirm the identification of analytes, fragment ions generated in the collision cell were monitored. Firstly, the chemical formula was processed with the software to obtain the theoretical mass and molecular ions. Two fragments were monitored for each target compound. Table S2 (see Supplementary material) shows the UHPLC-Orbitrap-MS parameters for the analysis of propoxycarbazone and its transformation product.

3.2. Optimization of the extraction procedures

The QuEChERS method (Anastassiades et al., 2003) was chosen for analyzing soil samples its proven reliability and versatility to the analysis of many different types of matrices. In this study, different parameters of QuEChERS method, such as extracting solvent, salting out or time of shaking have been modified and optimized to determine both compounds. Initially, three procedures were evaluated to optimize solvents and salts (Table S3 (see Supplementary material)): (i) QuEChERS extraction procedure that uses acetonitrile and water as extraction solvents, without including salts (MgSO₄ and ClNa), (ii) next, acidified QuEChERS with salts (MgSO₄ and ClNa) that uses acetonitrile containing 1% (v/v) of acetic acid and water containing 1% (v/v) of acetic acid as extracting solvents, and (iii) same acidified QuEChERS extraction procedure than before, although this time without salts (MgSO₄ and ClNa). The best results were obtained with this last extraction method (Table S3). After that, the agitation was considered by testing 5, 10, 15, 30, and 60 min in the shaker. Appropriated recoveries

were obtained, all very similar, for 15, 30 and 60 min while for 5 and 10 min low recoveries were obtained (see Table S3), and in consequence, 15 min were selected to save in time.

Concerning water samples, SPE is the most usual sample treatment procedure for preconcentration and pesticide extraction, allowing the detection and quantification of pesticides and transformation products at the low concentration levels established in legislations (European Union, 2006; Official Journal of the European Union, 2009). In order to optimize this step, two different types of SPE, such as on-line and off-line SPE, were tested.

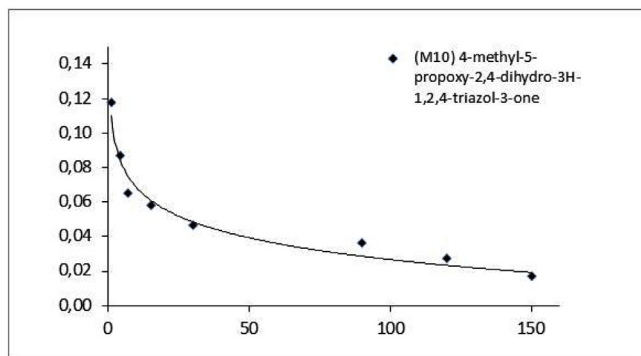
On-line SPE: The on-line SPE allows us to inject large volumes of sample into the UHPLC-Orbitrap-MS. It was tested loading aliquots of 100 µL and 1 mL of water samples acidified with 0.1% v/v formic acid and spiked at three concentration levels: 0.01, 0.02 and 1 mg/L. They were preconcentrated using an Oasis HLB column (25 µm particle size, 80 Å pore size) from Water Corporation (Milford, MA, USA), coupled on-line with the chromatographic column Zorbax plus C18 column, Methanol was used as solvent to carry the analytes to the analytical column. This procedure was rejected because compounds were not retained and, in consequence, not detected.

Off-line SPE: The Oasis cartridges were chosen because of their ability to extract a broad range of compounds with good efficiency (Net et al., 2015; Tlili et al., 2016). The conditioning conditions of the cartridge used were previously developed by (López-Ruiz et al., 2018). After, the use of acidified and no acidified water samples were tested, being the best results obtained when 0.1% of formic acid was added, achieving 87% and 98% recovery of target compound and its transformation product respectively.

3.3. Method validation and quality control

Once the method had been optimized, a complete validation was performed on spiked samples. Firstly, matrix effects for soil and water samples were evaluated. The study was performed by comparing the

a) Clay loam



b) Sandy clay loam

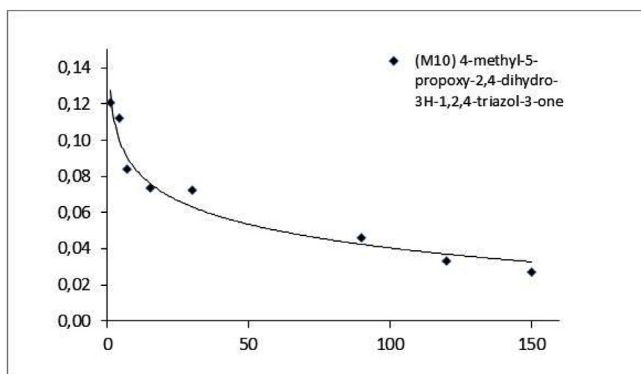


Fig. 4. Degradation curves of the transformation products in soil: 4-methyl-5-propoxy-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one (M10) (▲) at 2 soil moisture contents: clay loam (a) and sandy clay loam (b).

slopes of calibration curves obtained from standards prepared in pure solvent, with those obtained from calibration curves prepared in matrix-matched blank sample extracts at the same concentrations (López-García et al., 2017) It is considered that was not presented matrix effect when the ratio between slopes should be between 0.8 and 1. The results obtained were the within this range, which means a negligible matrix effect and quantification can be performed with calibration curves prepared in pure solvent, Table S4 (see Supplementary material).

Linearity in soils was evaluated in the concentration range between 5 and 100 µg/L, while in waters a concentration range between 0.1 and 1 mg/L was considered. In both cases, five calibration standards were prepared spiking blank extracts to obtain matrix-matched calibrations. Good linear relationships were obtained with regression coefficients (R^2) equal to 0.99 for both compounds and both matrices in the range studied (Table S4). In addition, the relative standard deviation of response factor (%RSD), estimated by means of precision experiments, was less than $\pm 20\%$ for each matrix studied.

Precision was expressed as relative standard deviation (RSD) either intra-day as inter-day studies. Trueness of the analytical method was assessed in terms of recovery rates (%R), using both blank soil and water samples, which were spiked with propoxycarbazone and its transformation product, at two concentrations levels, 10 and 100 µg/kg for soils and 0.1 and 1 µg/L for water samples. In both cases, trueness rates were determined from five replicates at each spiking level. The recovery rates of propoxycarbazone and transformation product were between 74 and 113% respectively for soil and between 76 and 84% for water samples. The intra-day precision values in soils were between 2 and 5% at the low concentration levels and 8–11% for the highest level for both compounds respectively. Intra-day precision rates obtained in water were between 8 and 12% respectively considering the low

concentration levels, and 5–10% the high level for propoxycarbazone and its transformation product. The inter-day precision values for soil were between 12 and 17% for the lower concentration level and 11–12% for high level. For water were between 15 and 17% for the lower concentration level and 13–16% for high level for propoxycarbazone and its transformation product.

LODs were estimated experimentally using spiked blanks at low concentrations. LOD was set as the minimum concentration at which the characteristic ion is monitored with a mass error lower than 5 ppm. LOQs were estimated according to the lower concentration providing acceptable trueness (70–120%) and precision ($\leq 20\%$) values.

The lower limits of the method (LOD and LOQ) are also shown in Table S4. LODs were set at 5 µg/L for both compounds, whereas LOQs were 10 µg/L for the two compounds in soils. While the LOD was 0.1 µg/L and LOQ 1 µg/L of the water method (Table S4).

A quality control (QC) procedure was applied in order to ensure that recovery rates and precision keep acceptable, (consistent with those obtained during method validation) and neither accidental contamination nor sample losses occurred. The QC consisted in including in each batch of samples a set of two calibration standards prepared in solvent, at the same concentration levels as spiked water and soil samples, blank samples and a calibration curve in solvent for the quantification step. Quality control showed that recovery rates and precision keep acceptable (in the range of 70–110% and RSD < 20%) during the whole study and neither accidental contamination nor sample losses was detected.

3.4. Degradation trials

There are available a large number of kinetic models to describe pesticide dissipation by plotting residue concentration against time. To determine and select the kinetic models that describe propoxycarbazone dissipation for the different treatments applied the Forum for the Co-ordination of Pesticide Fate Models and Their Use (FOCUS, 2006) was used, it recommends the use of six models: the single first-order (SFO) model, three bi-phasing models, and other two models that are suitable to describe dissipation patterns with a lag-phase. To select the model that best describes propoxycarbazone dissipation for soil and water samples, the indicators recommended by (FOCUS, 2006) to assess the goodness of fit and to compare the models were used, there were visual assessment of curve fits. In this study, single first-order (SFO, (equation 1)) and first-order multi-compartment model (FOMC, (equation 2)) (Gustafson and Holden, 1990), were tried in order to find out which model fits more adequately to the measured dissipation data.

$$C_t = C_o e^{-kt} \quad (1)$$

$$C_t = \frac{C_o}{\left(\frac{t}{\beta} + 1\right)^\alpha} \quad (2)$$

3.4.1. Soil degradation

Goodness of fit for FOMC model showed better results than SFO (graphs not shown) and it was the model that best describes the dissipation of propoxycarbazone, then the FOMC model was used to adjust degradation kinetics. The degradation behaviour of propoxycarbazone is presented in Fig. 1. It appears that the dissipation consisted of two phases, a rapidly decreasing practically a 40% of the target compound first phase during the thirty day and a slower second phase that extended till the end of the trial (150 days), achieved 70% degradation. Same behaviour can be observed on recommended and twice dose (Fig. 1).

If we compared the dissipation plot (Fig. 1), clays soil gives more curvature than sands clay, a physical explanation for this observed curvature in the dissipation behaviour is that certain regions in the soil exhibit relatively rapid dissipation, causing an initially steep slope, but

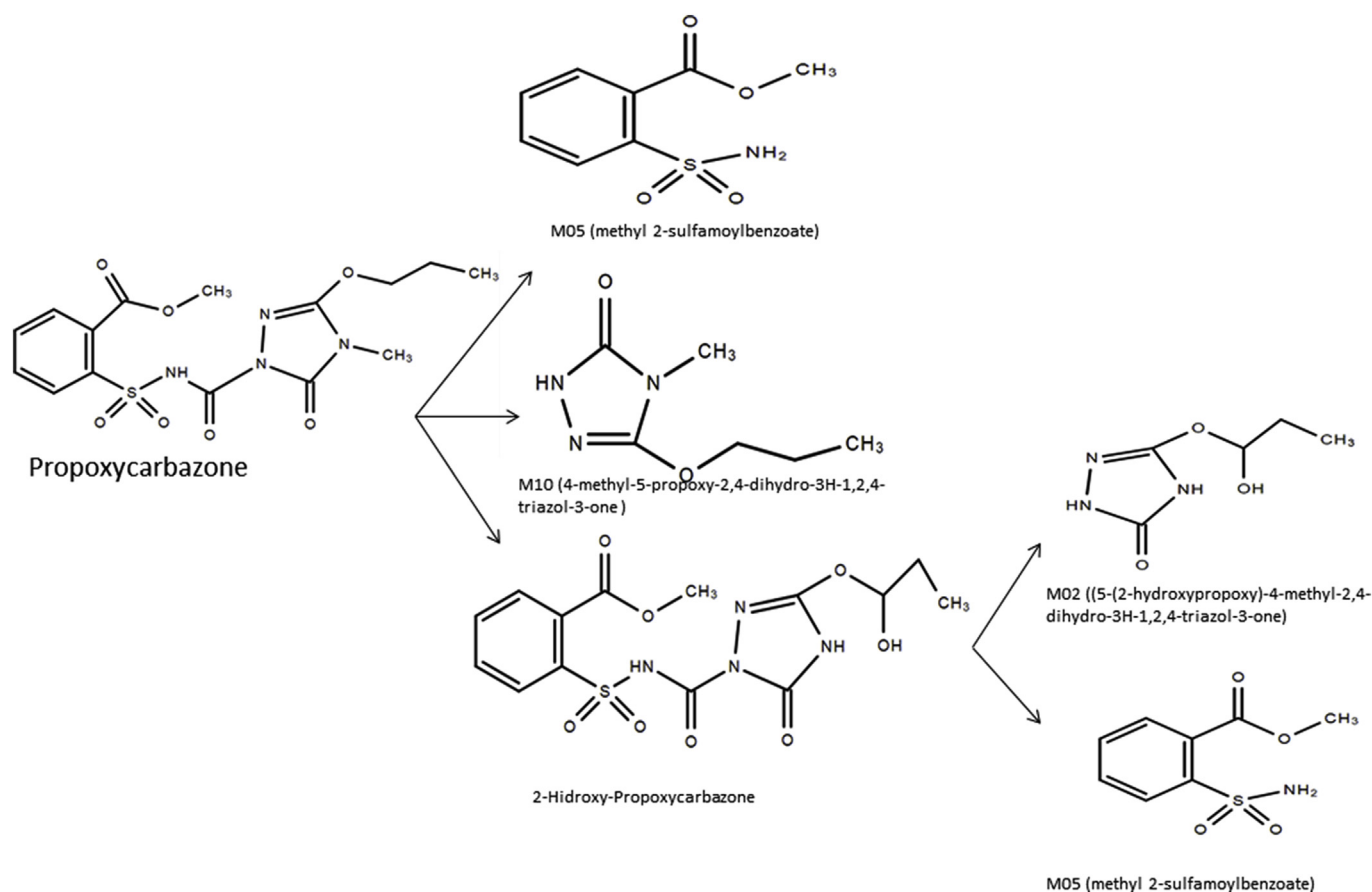


Fig. 5. Dissipation scheme of propoxycarbazone.

these areas become exhausted of pesticide, because it gets saturated, leaving behind a residue that dissipates somewhat less rapidly (Gustafson and Holden, 1990). Table 1 shows the dissipation kinetics parameters from the fitting to a FOMC kinetic model. The half-life (DT50) values were different for the two evaluated soils, but similar at recommended and twice dose. For example the DT50 of propoxycarbazone when estimated by the FOMC model was 28 days in clay loam soil and 60 days in sandy clay loam, recommended dose (see Table 1). To sum up, we can say that the dissipation patterns of propoxycarbazone at the recommended and twice dose, and at the two soil types, was similar according to the DT50 values (see Table 1), which indicates that the dissipation process is independent of the initial concentrations. Although, these results differ with those of a previous study of the Hertfordshire University where DT50 for soil was 39.6 days, studies performed under laboratory conditions but we do not know the specific conditions with which this study was carried out.

3.4.2. Water degradation

Instead, when assayed the two previous kinetic models, only the SFO model did fit to the experimental data and described the dissipation of propoxycarbazone in water. As it is shown in Fig. 2, the initial residue concentrations of propoxycarbazone in both conditions and both doses were similar dissipation patterns in waters, either in light as dark conditions. In terms of residue contents in water, relatively slow dissipation has been stated for dark conditions. SFO kinetic model (Table 2) shows that DT50 value was different for the two evaluated conditions, DT50 was higher at light (39–57 days) than darkness (50–86 days) conditions for both doses. The degradation speed was lower in darkness conditions in comparison with light conditions. The effect of the sun in the water is important for the degradation of propoxycarbazone. This time, the DT50 value obtained at the Hertfordshire

University for water was 18.1 days, as with the soil, we do not know the specific conditions in which the laboratory study was carried out.

3.5. Post-targeted screening

Without doubt, the best feature of the UHLC-Orbitrap-MS instrument is the possibility to collect full-scan data, this enables, review the acquired data to look for additional substances. This post-targeted screening of soils and water samples has been performed to obtain additional analytical information related with the presence of likely untargeted transformation products related with the degradation process of propoxycarbazone that are not yet investigated.

The first step of analytical strategy of post-run target screening was to build a database with the compound-specific information, with the information of the transformation products found in the EFSA review (Food and Authority, 2016). The database comprising 8 transformation products of propoxycarbazone in addition to the transformation product of 2-hydroxy-propoxycarbazone, are in Table 3. This is a theoretical database where no standards were analyzed to get characteristic fragments.

After the retrospective examination of the acquired UHPLC-Orbitrap-MS chromatograms, four unknown transformation products were tentatively identified in water samples and one of them in soils. Using the only commercially available reference standard solution, we confirmed the detection of the 2-hydroxy-propoxycarbazone transformation product, the rest of them could not be confirmed with standards as they were not commercially available (5-(2-hydroxypropoxy)-4-methyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one (M02), methyl 2-sulfamoylbenzoate (M05) and 4-methyl-5-propoxy-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one (M10)) for the case of water samples, and only M10 for soil samples. Although it is not possible an accurate quantification of

the metabolites found, it is feasible a semiquantitative estimation of their concentration using the parent compound. The highest level was observed for the M10 metabolite in water (1.13 µg/L). Then we analyze the PPP *Attribut*[®] by dissolving the product in water, preparing it according to the manufacturer's instructions and also by dissolving it in acetone. In both cases the results were that the M10 transformation product was present. In the case of water samples, the other transformation products contained low average concentration levels ranging from 2.9 ng/L for M02 to 16.2 ng/L for M05. During the dissipation of propoxycarbazone it was observed that these transformation products increased their concentration (Figs. 3 and 4), which would be the degraded products of propoxycarbazone. For the further elucidation of the metabolic pathway of propoxycarbazone, we also quantitatively analyzed distribution and formation of these transformation products in water. As a result, we found three primary transformation products: M05, M10 and 2-hydroxypropoxycarbazone, began to occur at 1 day and followed by formation of a secondary transformation product, M02, began at 15 days after (see Fig. 5). In dark conditions, M05 experienced a large increase until day 30 and then the increase is gradual. Figs. 3 and 4 shows the evolution of all transformation products throughout the degradation study. Based on the qualitative and quantitative analyses mentioned above, it was deduced that propoxycarbazone was split in water into M02, M05, and 2-hydroxy-propoxycarbazone, and M10 to a lesser extent by being present in the *Attribut*[®].

In contrast to dissipation water, soil dissipation, both propoxycarbazone and other M10 transformation compound decrease their concentration, both are present in *Attribut*[®] from the beginning as their analysis has revealed. No other transformation product was detected in soils.

4. Conclusions

The present laboratory study involves the first report focusing on the dissipation behaviour of propoxycarbazone and transformation products in the biosphere and anthroposphere making use of HRMS. Although it would be necessary to carry out field studies for an additional confirmation of the dissipation pattern. It is a compound with a medium to high persistence because the DT50 is greater than 15 days.

The variation in the dissipation rates observed implies that the soil properties such as the sand's content and texture, could significantly affect the degradation of pesticides in soil. Instead, in water the behaviour in the dissipation confirmed that degradation is faster in light conditions than in dark conditions, i.e. the light is the factor what to explain the different half-lives.

Completing this study, the screening approach permitted the unambiguous identification of transformation products in water and soils.

The development and application of a comprehensive strategy for retrospective analysis of pesticide transformation products in water, soils and Plant Protection Product, confirming that the method developed could be applied for both compliance and surveillance monitoring purposes, as well as providing substantial advantages over standard methods.

Taken together, we provide a highly-compatible tool to monitor propoxycarbazone in samples environmental origin, and the current elucidation of residual essential of propoxycarbazone in the typical agricultural ecosystem would advance the further insight into risks posed by this herbicide associated with its transformation products.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109506>.

References

- Anastasiades, M., Lehotay, S.J., Štajnbaher, D., Schenck, F.J., 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86, 412–431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>.
- Bajeer, M.A., Mallah, M.A., Sherazi, S.T.H., Bhangar, M.I., Nizamani, S.M., 2016. Investigation of dissipation, adsorption, degradation, and leaching of triazophos pesticide in various soils. *Polycycl. Aromat. Compd.* 36, 229–241. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.964424>.
- Barchanska, H., Sajdak, M., Szczypka, K., Swientek, A., Tworek, M., Kurek, M., 2017. Atrazine, triketone herbicides, and their degradation products in sediment, soil and surface water samples in Poland. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 644–658. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7798-3>.
- Blankenberg, A.G.B., Braskerud, B., Haarstad, K., 2006. Pesticide retention in two small constructed wetlands: treating non-point source pollution from agriculture runoff. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 86, 225–231. <https://doi.org/10.1080/03067310500247470>.
- Dulov, A., Dulova, N., Veressinina, Y., Trapido, M., 2011. Degradation of propoxycarbazone-sodium with advanced oxidation processes. *Water Sci. Technol. Water Supply* 11, 129–134. <https://doi.org/10.2166/ws.2011.019>.
- European Commission, 2017. Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed 2–44. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33021.77283>.
- FOCUS, 2006. Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration. *EC Doc. Ref. Sanco/10058/2005 version 2.0* 1–436.
- Food, E., Authority, S., 2016. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance propoxycarbazone (variant evaluated propoxycarbazone-sodium). *EFSA J* 14. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4612>.
- Gustafson, D.I., Holden, L.R., 1990. Nonlinear pesticide dissipation in soil: a new model based on spatial variability. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1032–1038. <https://doi.org/10.1021/es00077a013>.
- Kolpin, D.W., Thurman, E.M., Linhart, S.M., 1998. The environmental occurrence of herbicides: the importance of degradates in ground water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 385–390. <https://doi.org/10.1007/s002449900392>.
- Koskinen, W.C., Calderon, M.J., Rice, P.J., Cornejo, J., 2006. Sorption-desorption of flucarbazone and propoxycarbazone and their benzenesulfonamide and triazolinone metabolites in two soils. *Pest Manag. Sci.* 62, 598–602. <https://doi.org/10.1002/ps.1002>.
- López-García, M., Romero-González, R., Frenich, A.G., 2017. Determination of rodenticides and related metabolites in rabbit liver and biological matrices by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 137, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.043>.
- López-Ruiz, R., Romero-González, R., Martínez Vidal, J.L., Fernández-Pérez, M., Garrido Frenich, A., 2017. Degradation studies of quizalofop-p and related compounds in soils using liquid chromatography coupled to low and high resolution mass analyzers. *Sci. Total Environ.* 607–608, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.261>.
- López-Ruiz, R., Romero-González, R., Martínez Vidal, J.L., Garrido Frenich, A., 2018. Behavior of quizalofop-p and its commercial products in water by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 157, 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.094>.
- Martínez Vidal, J.L., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., 2009. Determination of pesticide transformation products: a review of extraction and detection methods. *J. Chromatogr. A* 1216, 6767–6788. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.013>.
- Monika, Srivastava, A., Suyal, A., Srivastava, P.C., 2017. Persistence behavior of penoxsulam herbicide in two different soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 99, 470–474. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2171-x>.
- Net, S., Rabodonirina, S., Sghaier, R., Ben, Dumoulin, D., Chhib, C., Tlili, I., Ouddane, B., 2015. Distribution of phthalates, pesticides and drug residues in the dissolved, particulate and sedimentary phases from transboundary rivers (France-Belgium). *Sci. Total Environ.* 521–522, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.087>.
- Official Journal of the European Union, 2009. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000. (October).
- Rouchaud, J., Neus, O., Eelen, H., Bulcke, R., 2001. Persistence and movement of the herbicide propoxycarbazone-sodium in winter wheat crops. *Toxicol. Environ. Chem.* 82, 99–111. <https://doi.org/10.1080/716067221>.
- Scribner, E.A., Thurman, E.M., Zimmerman, L.R., 2000. Analysis of selected herbicide metabolites in surface and ground water of the United States. *Sci. Total Environ.* 248, 157–167. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00539-2](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00539-2).
- Sevilla-Morán, B., López-Gotí, C., Alonso-Prados, J.L., Sandín-España, P., 2014. Aqueous photodegradation of sethoxydim herbicide: qtof elucidation of its by-products, mechanism and degradation pathway. *Sci. Total Environ.* 472, 842–850. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.065>.
- Tlili, I., Caria, G., Ouddane, B., Ghorbel-Abid, I., Ternane, R., Trabelsi-Ayadi, M., Net, S., 2016. Simultaneous detection of antibiotics and other drug residues in the dissolved and particulate phases of water by an off-line SPE combined with on-line SPE-LC-MS/MS: method development and application. *Sci. Total Environ.* 563–564, 424–433. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.101>.
- Union, European, 2006. The groundwater directive (Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the council of 12 December 2006 on the protection of groundwater against pollution and deterioration). *Off. J. Eur. Union* 19, 19–31. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32006L0118>.
- Vargas-Pérez, M., Marín-Sáez, J., Egea González, F.J., Garrido Frenich, A., 2019. Optimization and establishment of QuEChERS based method for determination of propoxycarbazone and its metabolite in food commodities by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Chem* 274, 429–433. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.135>.

PUBLICACIÓN IV



Dissipation and residue
determination of Fluopyram and its
metabolites in greenhouse crops

Marta Vargas-Pérez,

Francisco Javier Egea González & Antonia

Garrido Frenich

Journal of the Science of Food and

Agriculture 100 (2020) 4826-4833

Dissipation and residue determination of fluopyram and its metabolites in greenhouse crops

Marta Vargas-Pérez,  Francisco Javier Egea González and Antonia Garrido Frenich* 

Abstract

BACKGROUND: Fluopyram is a pesticide widely used in tomato and cucumber crops cultivation to control fungal diseases that develop especially in environments with moderate temperatures and high humidity, such as in a greenhouse. The pathway of fluopyram dissipation has been monitored in cucumber and cherry tomato under greenhouse conditions.

RESULTS: In the greenhouse trials, cherry tomato and cucumber were treated by irrigation water with the commercial product at the manufacturer's recommended dose and double dose. High-resolution mass spectrometry (HRMS) coupled to ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) has been selected as the technique to obtain the identification of fluopyram and metabolites. The fate of fluopyram in greenhouse tomato and cucumber was investigated over 44 days. The metabolic pathway of fluopyram was: in a first step there was a primary transformation to fluopyram-7-hydroxy and fluopyram-8-hydroxy, isomeric compounds, and in a second phase to fluopyram-benzamide and fluopyram-pyridyl-carboxylic acid. The behavior of fluopyram does not fit any type of kinetic classical model of degradation.

CONCLUSIONS: Greenhouse trials revealed that the fluopyram is a very persistent compound, and their terminal residues do not exceed maximum residue level (MRL) at the end of the study.

© 2020 Society of Chemical Industry

Keywords: fluopyram; dissipation; metabolites; orbitrap; greenhouse; fungicide

INTRODUCTION

Tomato (*Solanum lycopersicum*) and cucumber (*Cucumis sativus*) are two of the most important horticultural crops in the world^{1–3} and a fundamental part of the Mediterranean diet. Spain is Europe's second greatest tomato producer and the third greatest cucumber producer, with an average yield of 4.8×10^6 t yr⁻¹ and 643×10^3 t yr⁻¹, respectively. An example is the Almería province, on the southeast coast of Spain, which counted in 2018,⁴ with 5099 and 10 311 ha of greenhouses dedicated to growing cucumber and tomato, respectively, which raised a market value that exceeded 1 billion euros. Greenhouses are agrosystems that present important productive advantages, although their moderate temperatures and high humidity inside, and the continuous cropping practices, are favourable conditions for fungal disease development.¹ Hydroponic is often used as a soilless greenhouse cropping practice. It uses substrates such as rockwool, coconut fibre, perlite, clay pellets or vermiculite to grow the plants. This cropping technique overcomes pathogens diseases in soils and poor physical–chemical characteristics. A powdery mildew, also named Oidium (caused by *Sphaerotheca fuliginea* fungi and *Erysiphe cichoracearum* fungi), is the disease that causes major crop losses in cucumber and tomato worldwide.^{2,5,6} In soilless crops, pathogens can be conserved in the substrates or in the roots that are embedded in the picks from previous crops.⁷ Fluopyram⁸ (N-

{2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]ethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide) is a new systemic fungicidal compound present as the lone active ingredient in the Velum-Prime® plant protection product (PPP), which is very effective against Oidium pest. It is used as a broad-spectrum fungicide applied through drip irrigation systems or by foliar spray on several horticultural crops. Fluopyram acts on pathogen cells by inhibiting their normal respiration process. It as a systemic compound is absorbed through the leaves or roots and then distributed throughout the plant.^{9–11} In consequence fluopyram can be moved easily into the edible portion of the crops which may pose a high risk to people on the basis of their potential toxicity properties. Moreover, once the pesticide is distributed throughout the plant, it degrades into several metabolites. As a result, concern arises about the

* Correspondence to: AG Frenich, Research Group 'Analytical Chemistry of Contaminants', Department of Chemistry and Physics, Center for Research in Mediterranean Intensive Agrosystems and Agri-Food Biotechnology (CIAIMBITAL), University of Almería, Agrifood Campus of International Excellence, Almería, Spain. E-mail: E-mail: agarrido@ual.es

Research Group 'Analytical Chemistry of Contaminants', Department of Chemistry and Physics, Center for Research in Mediterranean Intensive Agrosystems and Agri-Food Biotechnology (CIAIMBITAL), University of Almería, Agrifood Campus of International Excellence, Almería, Spain

persistence of fungicide residues and its metabolites in the edible parts of crops, which could become a significant route of human exposure.¹² Usually legislation on maximum residue level (MRL) definitions generally just includes parent compound pesticides, and only in limited cases includes certain toxicologically relevant metabolites, which result from transformations. This is the case of the MRL for fluopyram that only includes the original compound, for example, in the regulations established by Codex Alimentarius¹³ or the European Union (EU).¹⁴ Therefore, residue of fungicides and metabolites in raw agricultural commodities must be periodically measured for food safety.¹⁵

This study considers, in addition to fluopyram, the characterization of metabolites that are not included in routine monitoring programmes to understand the dissipation of the fluopyram PPP, in greenhouse conditions, and to identify potential toxic metabolites that could be present in fresh tomato and cucumber vegetables.

Up to date, fluopyram dissipation studies can be divided into those carried out in open fields and ingreenhouses. Open fields studies focus predominantly on the behaviour of the parent compound without taking into account the degradation compounds,^{11,16–18} although in one of them a single degradation compound was identified.⁹ Also there is only one study conducted in greenhouse in which its degradation compounds were studied,¹⁹ but the crop was in soil. Concerning PPP application techniques, most of the earlier-cited literature, deals with fluopyram foliar spraying on crops, except the study of Suchi Chawla *et al.*,⁹ where roots were drenched in the fungicide. The main objective of this study was to deepen knowledge about the dissipation of the fluopyram pesticide, including the transformation and behaviour of generated metabolites, in two important crops (cherry tomato and cucumber) under greenhouse conditions. To this end, ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to high-resolution mass spectrometry (HRMS), UHPLC-Orbitrap-MS, has been used in order to enhance previous methodologies based on gas chromatography with low resolution MS analysers.²⁰ In addition, this is the first report in which fluopyram was applied dripping on an artificial substrate.

MATERIALS AND METHODS

Equipment, reagents and chemicals

Reference standards of fluopyram (> 98.0%) and fluopyram benzamide (> 97.0%) were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), while fluopyram pyridyl carboxylic acid (> 95.0%) from Matrix Scientific (Columbia, SC, USA), and were stored at -30°C . Individual reference standard stock solutions were prepared in methanol at a concentration of 1000 mg L^{-1} . From individual reference standard stock solutions, three mix-standards were prepared by diluting accurate volumes of the earlier solutions to obtain concentrations of 10, 1 and 0.1 mg L^{-1} , respectively in methanol. Stock and intermediate solutions were stored in amber screw-capped glass vials in the darkness at -30°C .

The Velum-Prime® (concentrate suspension fluopyram 40% *p/v*) PPP was supplied by Bayer Crop Science AG (Monheim am Rhein, Germany). Acetonitrile and methanol (LC-MS grade) from Fluka (St Louis, MO, USA), magnesium sulphate, primary secondary amine (PSA) and acetic acid from Panreac (Barcelona, Spain) and sodium acetate anhydrous from Sigma Aldrich were used. Filters for syringe Econofitr Nylon $0.2\text{ }\mu\text{m}$, 13 mm were purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

Analyses were performed with a Thermo Fisher Scientific Transcend 600 LC (Thermo Scientific Transcend™, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA), coupled to a single mass spectrometer Orbitrap Thermo Fisher Scientific (Exactive™, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) that used an electrospray interface (ESI) (HESI-II). Separations were carried out on a Zorbax plus C18 column ($2.1\text{ mm} \times 100\text{ mm} \times 1.8\text{ }\mu\text{m}$ particle size) from Agilent Technologies with a flow rate of 0.2 mL min^{-1} and temperature to 25°C . The mobile phase in gradient mode consisted of methanol as phase A, and water containing 0.1% formic acid as phase B (0–1.0 min, 5% A; 1.0–3.0 min, increased to 100% A; 3.0–7.0 min, 100% A hold for 4 min; 7.0–7.5 min 100% A decreased to 0% A; 7.5–9.0 min 0% hold for 1.5 min). The total running time was 9 min. ESI parameters were as follows: spray voltage, 4 kV; sheath gas ($\text{N}_2 > 95\%$), at 35 (adimensional); auxiliary gas ($\text{N}_2 > 95\%$), at 10 (adimensional); skimmer voltage, 18 V; capillary voltage, 35 V; tube lens voltage, 95 V; heater temperature, 305°C ; and capillary temperature, 300°C . Mass range used was between *m/z* 50–500. The Xcalibur™ software version 3.0.63, with Quan browser and Qual browser were used for optimization and quantification of the pesticide and its metabolites.²¹ Data was processed with a homemade database containing the specific data of the potential fluopyram metabolites.²⁰ Table 1 shows the exact mass and molecular formula of the proposed metabolites.

Sample extraction

The samples were extracted following a practical method based on acetonitrile QuEChERS procedure.²² Samples of cucumber or cherry tomato (10 g) homogenized in a 50 mL centrifuge tube containing 10 mL of 1% acetic acid in acetonitrile. Next, the tube was vortexed for 2 min. Afterward, 4 g of magnesium sulphate and 1 g sodium acetate anhydrous were added and shaken vigorously for 2 min. The tube was centrifuged for 5 min at $3061 \times g$. The supernatant was filtered with a $0.22\text{ }\mu\text{m}$ nylon syringe filter and transferred to a vial for LC analysis. Finally, $10\text{ }\mu\text{L}$ were injected in the system.

Method validation

The validation study was carried out according to the performance criteria established by DG SANTE documentation²³ for fluopyram and its metabolites (fluopyram benzamide and fluopyram pyridyl carboxylic acid). Blank samples from each crop were used for validation studies. Linearity was studied in standard calibration solutions prepared in each matrix at 5, 10, 25, 50, 100 and $200\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ and determination coefficients (R^2) were calculated. Trueness and intraday precision values were determined through the recovery experiments ($n = 5$) at two spiking levels (10 and $100\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$). Interday precision was estimated in the same way that intraday precision but analysing samples in five different days. Limits of detection (LODs) were set as the minimum concentration at which the characteristic ion was monitored with a mass error lower than 5 ppm. Limits of quantification (LOQs) were estimated according to the lower concentration providing acceptable trueness and precision values.

Greenhouse trials

For dissipation trials, each crop was treated with the dose recommended (625 mL ha^{-1}) by the manufacturer and twice that dose (1250 mL ha^{-1}) by irrigation water. A second application was made in both crops, separated 30 days after the first application. Cherry tomato and cucumber were sampled at 10 min, 2 h, 6 h

and 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 21, 28, 37 and 44 days after second application. Thus, 1 kg samples of cucumber and cherry tomato were gathered randomly from plots.²⁴

The greenhouse was divided into four plots of which two were selected for the cultivation of 60 cucumber plants and two plots were selected for the cultivation of 60 cherry tomato plants, at a rate of 30 plants per plot. The experiments were conducted in a greenhouse located in Almería, on the southeast coast of Spain in 2018. Weather conditions were monitored during the study period, being the usual in this geographical region with no rain and stable temperatures, in the range of 16 to 23 °C.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of UHPLC-Orbitrap-MS

In the present study, fluopyram and its metabolites were chromatographically separated under gradient elution conditions with water (0.1% formic acid) and methanol as mobile phase components. They were analysed with the proposed UHPLC-HRMS method (see Materials and Methods section) using ESI⁺ and ESI⁻ modes, providing better sensitivity, good chromatographic resolution and high responses when full-scan (ESI⁺) was applied, and then used to obtain the characteristic ion of the compounds that were available as standards. The product-ion spectra provided the accurate masses of fragments that were used to build a home-made database. Since primary standards are not available for some metabolites, accurate mass data from EFSA review²⁰ was used as a tool for mining for metabolites of fluopyram. Table 1

includes two pairs of isomers (fluopyram-7-OH and fluopyram-8-OH and fluopyram-PCA and fluopyram-PAA), although they could not differentiate between them.

Sample extraction optimization and method validation

To simultaneously measure fluopyram and its metabolites (fluopyram benzamide and fluopyram pyridyl carboxylic acid) with UHPLC-Orbitrap-MS, a QuEChERS method was applied based on the AOAC Official Method.²²

To optimize the extraction procedure, initially acetonitrile containing 1% acetic acid (v/v) as extraction solvent was tested, followed by a clean-up step with magnesium sulphate and PSA. This method provided good recovery rates only for two compounds, therefore other variants were tested, such as the use of acetonitrile without cleaning step or acidified acetonitrile without cleaning stage. Best results were obtained when acetonitrile containing 1% acetic acid and without any clean-up step was applied. Table 2 shows recoveries rates obtained for fluopyram, fluopyram benzamide and fluopyram pyridyl carboxylic acid, in both commodities at 100 µg kg⁻¹.

Once the extraction method had been optimized, the validation studies for fluopyram and its metabolites were carried out. The obtained results of the validation parameters are provided in Table 3. The linear range was established between 5–200 µg kg⁻¹, obtaining determination coefficients (*R*²) of 0.99 and residual values ≤ 20%. LODs and LOQs results were 5 and 10 µg kg⁻¹, respectively, which are below the MRL in the EU.¹⁴ Recovery rates at 10 and 100 µg kg⁻¹ were satisfactory for fluopyram and

Table 1 List of proposed metabolites of fluopyram, their formulas and calculated exact masses

Compound	Chemical name	Formula	Exact mass
Fluopyram benzamide	2-(trifluoromethyl)benzamide	C ₈ H ₆ F ₃ NO ₃	190.0474
Fluopyram-7-OH	<i>N</i> -{2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]-2-hydroxyethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide	C ₁₆ H ₁₁ ClF ₆ N ₂ O ₂	413.0486
Fluopyram-8-OH	<i>N</i> -{2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]-1-hydroxyethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide		
Fluopyram-PCA	(3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinecarboxylic acid)	C ₇ H ₃ ClF ₃ NO ₂	223.9731
Fluopyram-PAA	([3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]acetic acid)		
Fluopyram-benzoic acid	2-(trifluoromethyl)benzoic acid	C ₈ H ₅ F ₃ O ₂	191.0314
Fluopyram-methyl-sulfoxide	3-(methylsulfinyl)-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinecarboxylic acid	C ₈ H ₆ SNO ₃	240.0033
2,9-bis(trifluoromethyl)-6,7-dihydropyrido[2,3- <i>e</i>][2]benzazocin-8(5 <i>H</i>)-one	2,9-bis(trifluoromethyl)-6,7-dihydropyrido[2,3- <i>e</i>][2]benzazocin-8(5 <i>H</i>)-one	C ₁₆ H ₁₀ F ₆ N ₂ O	361.0770

Table 2 Comparison of recovery values (at 100 µg kg⁻¹) when different extraction procedures were evaluated on cherry tomato and cucumber samples

Recovery (%)	Extraction method					
	Fluopyram		Fluopyram benzamide		Fluopyram pyridyl carboxylic acid	
	Cherry tomato	Cucumber	Cherry tomato	Cucumber	Cherry tomato	Cucumber
Acidified QuEChERS, with clean up	85	83	90	92	46	55
Acidified QuEChERS, without clean up	106	99	92	95	76	80
No acidified QuEChERS, without clean up	76	80	67	60	49	59

Table 3 Performance characteristics of the optimized method

Compound	Matrix	R^2	Concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recovery (%)	Intra-day precision (%RSD)	Inter-day precision (%RSD)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Fluopyram	Tomato	0.99	10	93	8	9	5	10
			100	80	2	15		
	Cucumber	0.99	10	100	7	17	5	10
			100	94	4	15		
Fluopyram-benzamide	Tomato	0.99	10	72	8	10	5	10
			100	79	4	9		
	Cucumber	0.99	10	83	9	13	5	10
			100	91	10	11		
Fluopyram-pyridyl-carboxylic acid	Tomato	0.99	10	106	10	9	5	10
			100	91	15	11		
	Cucumber	0.99	10	78	7	9	5	10
			100	88	8	12		

Table 4 Comparison of validation parameters of developed method with published methods for fluopyram in vegetables

Authors	Matrix	Recovery (%)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Metabolites included	Detection
This research	Cherry tomato Cucumber	72–106	10	Yes	UHPLC-Orbitrap-MS
Dong <i>et al.</i> ¹¹	Watermelon	>91	10	No	GC-MS
Podbielska <i>et al.</i> ¹⁸	Apples	70–120	10	No	GC-NPD
Abad-Fuentes <i>et al.</i> ²⁵	Strawberry	80–136	10	No	UPLC-MS/MS

metabolites, being between 72% and 106%, with adequate intra-day, 2–15%, and interday precision, 9–17% values. The primary findings when comparing validation parameters of methods to analyse fluopyram in fruits and vegetables are summarized in Table 4. All three studies were conducted on fruits,^{11,18,25} while this research concerned vegetables. Although the cited studies refer acceptable sensitivity, none of them used HRMS as detection technique. The proposed method is the first one that applies LC-HRMS and validates metabolites of the main compound.

Dissipation study in greenhouse

The dissipation process of Velum-Prime® PPP was studied when it is applied in both greenhouse crops. The sampling period covers approximately 1.5 months after the second application. Both fluopyram and metabolites were monitored and their concentrations measured in each sampling throughout the study. First application of each dose was carried out 25 days after transplanting and a second treatment was performed 30 days after the first application in both crops. Composite samples were taken by triplicate with a size of 1 kg approximately of fruits per sample; fruits were selected using random numbers as established in the sampling regulation for the control of pesticide residues.²⁶ Figure 1 shows the dissipation of fluopyram in both matrices at single and double dose. It is noteworthy that the behaviour of fluopyram was similar in both target crops, and both concentrations. It is observed that the dissipation process does not conform to previous models, such as first-order kinetics, where the decrease in concentration, expressed as a percentage of the parent compound, is constant over time regardless of its initial concentration. Nor did it conform to the two-phase kinetic pattern of pesticide degradation consisting of a rapid initial decline in pesticide

concentration, followed by a slower decline, as occurred in the study by Chawla *et al.*⁹ also for fluopyram. In our experiments carried out these patterns were not met, the decrease in concentration was not constant over time and varied with the initial concentration. The reason for treating with double of recommended dose was to monitor the metabolic pathway with as much of the metabolites as possible.

Residue distribution of fluopyram

Concentrations of fluopyram pesticide residues in cherry tomato dropped in the first day, after treatment at the recommended dose, from $190 \mu\text{g kg}^{-1}$ obtained 10 min after application to $120 \mu\text{g kg}^{-1}$ 6 h later. The same crop in the plot treated at second dose dropped from $231 \mu\text{g kg}^{-1}$ obtained in the samples collected 10 min after application to $92 \mu\text{g kg}^{-1}$ 2 h later. In the subsequent 7 days, at normal dose, concentration increased significantly until reaching $506 \mu\text{g kg}^{-1}$. In the plot applied at double dose, it was observed that the concentration increased to the ninth day, reaching the maximum concentration of $1057 \mu\text{g kg}^{-1}$. After that, the concentration of fluopyram pesticide residues began to decrease, the last sampling of cherry tomato, picked at 44th day after starting the study, showed concentrations of $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $97 \mu\text{g kg}^{-1}$, normal and double dose, respectively.

Dissipation differs in the case of cucumber crop, where the initial sharp decrease of fluopyram concentration observed in cherry tomato, was not observed. Furthermore, the concentration increased in samples picked after the application until the third day, from $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ to $615 \mu\text{g kg}^{-1}$ and from $125 \mu\text{g kg}^{-1}$ to $1033 \mu\text{g kg}^{-1}$ at normal and double dose, respectively. Then the concentrations of fluopyram residues decreased gradually to the

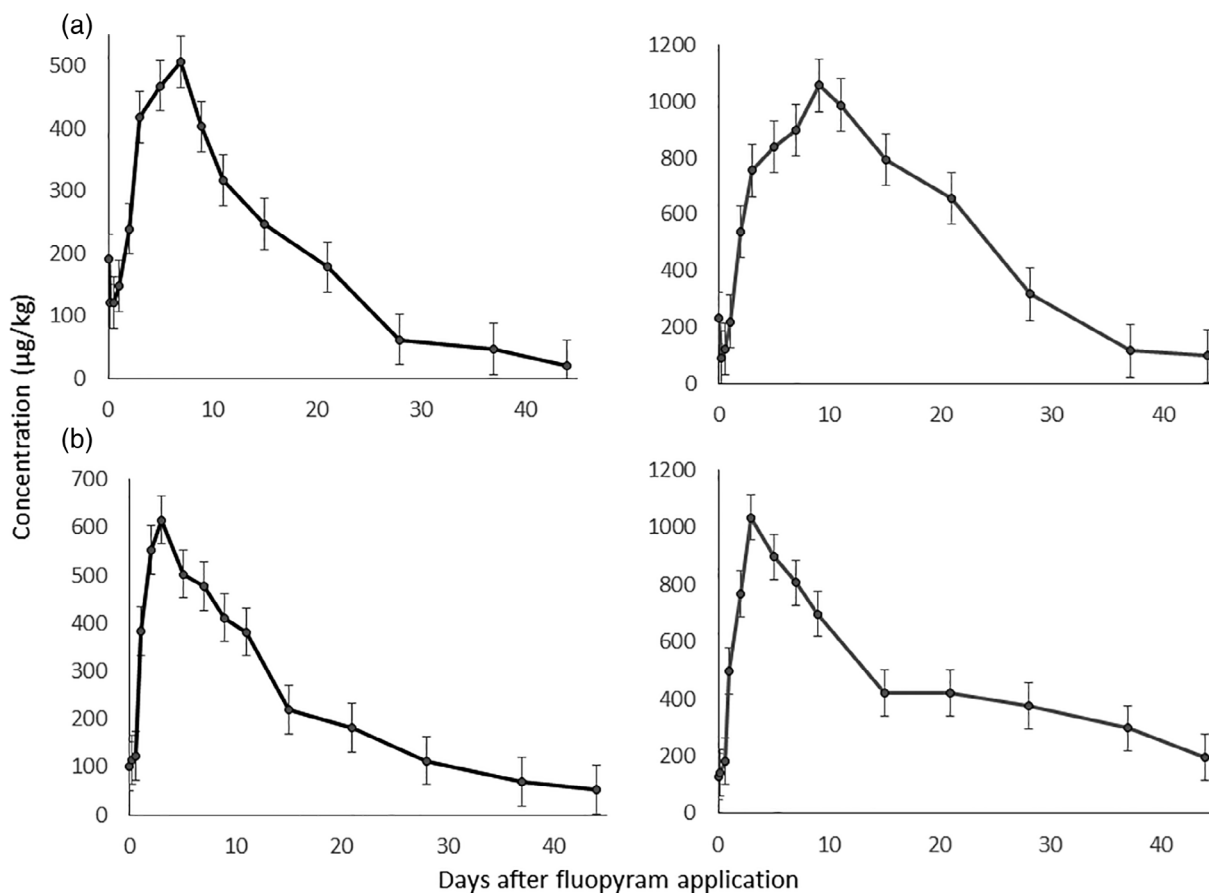


Figure 1 Behaviour curves of fluopyram for two spiked concentration levels: recommended dose (1) and double dose (2) for two crops: cherry tomato (a) and cucumber (b). Error bars obtained for $n = 3$.

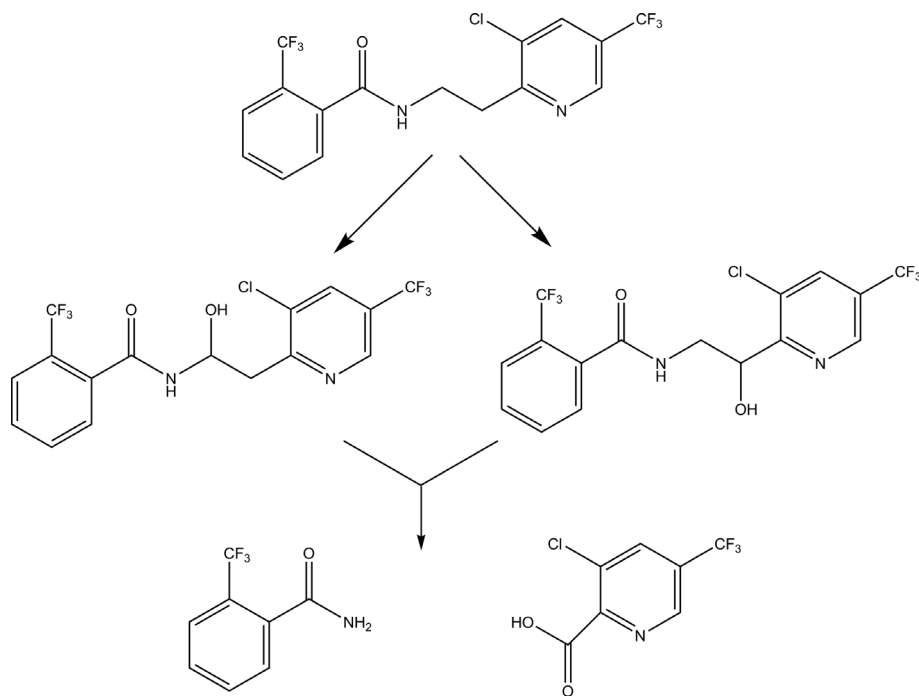


Figure 2 Proposed metabolic pathway of fluopyram.

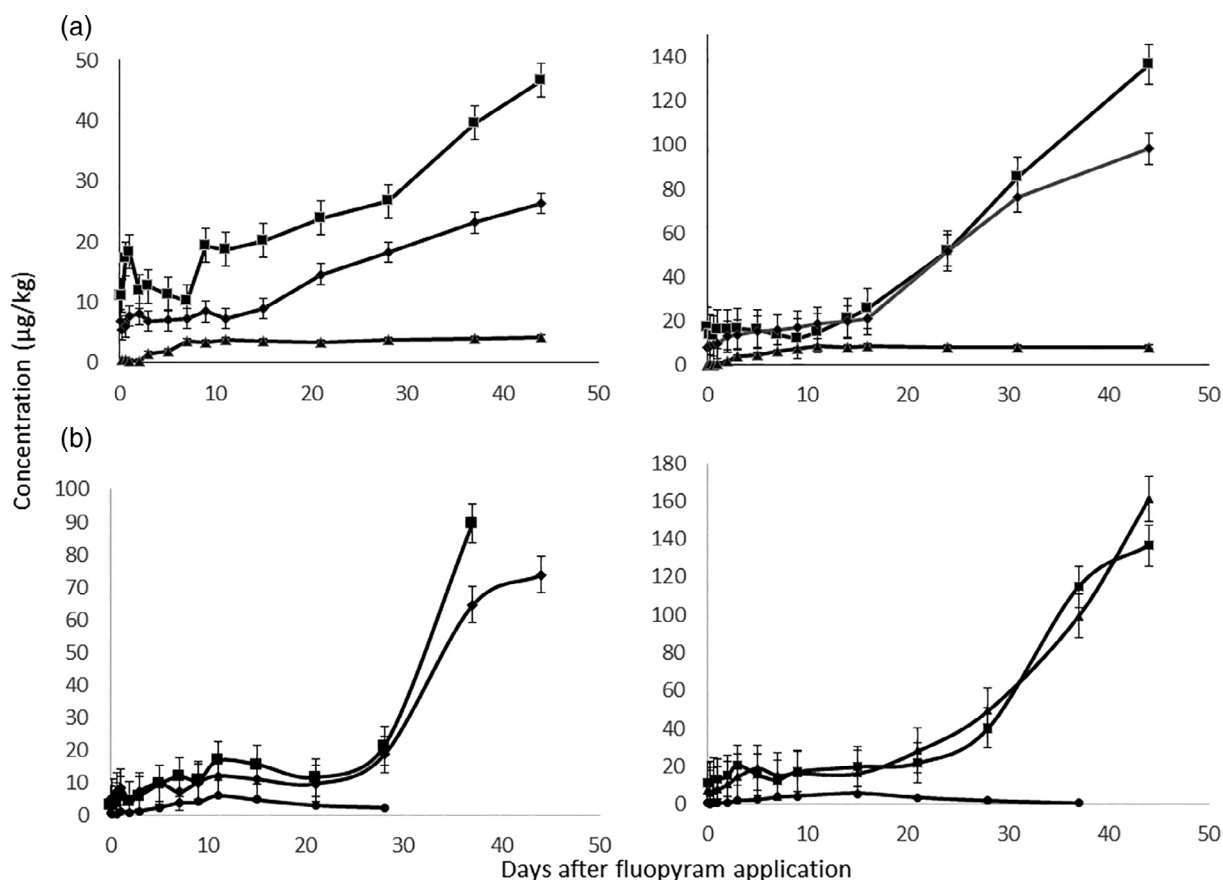


Figure 3 Behaviour curves of the metabolites in cherry tomato (a) and cucumber (b) (fluopyram benzamide (\square), fluopyram pyridyl carboxylic acid (\circ) and fluopyram hydroxy (\triangle)). Error bars obtained for $n = 3$.

minimum of $52 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $119 \mu\text{g kg}^{-1}$ for both application doses respectively found in samples picked on day 44. Fluopyram pesticide remained on the cucumbers and cherry tomatoes for 44 days after the last treatment.

Moreover, the terminal residue level of the parent compound, as defined by the EU,¹⁴ at the end of the study was below the established MRL, $900 \mu\text{g kg}^{-1}$ in tomato and $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ in cucumber.

Residue distribution of fluopyram metabolites

Using untargeted (full-scan) acquisition mode, one more metabolite of fluopyram (fluopyram hydroxy) was detected in cherry tomato and cucumber collected from the first sample (10 min). For further elucidation, Fig. 2 shows the proposed metabolic pathway for fluopyram. Then the formation and distribution of these metabolites were studied although taking into account the impossibility of quantifying the concentration of fluopyram hydroxy, since its analytical standard was not commercially available. The way to study was through the relationship between the detected metabolite area and the fluopyram area and when representing it, concentration trend was obtained. As a result, in a first step there was a primary transformation that consisted of the hydroxylation of the parent compound to the fluopyram-7-hydroxy and fluopyram-8-hydroxy²⁰ metabolites, isomeric compounds. These metabolites were detected in samples from the four plots. In cherry tomato crop throughout the study a slight increase to day 7 was observed (from $0.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ to $4.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ in normal dose and from $0.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ to $8.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ in double dose), and remained at a quite constant level until the end of

the study ($4.15 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $8.25 \mu\text{g kg}^{-1}$ in normal and double dose, respectively). Concerning both cucumber experiments, fluopyram-7-hydroxy and fluopyram-8-hydroxy were detected in the first sample and in the following ones until the sample corresponding to 28 and 37 days, in the plots treated at normal and double dose, respectively; after they were no longer detected. A second phase took place in the metabolic path: the cleavage of the hydroxylated metabolites occurs and subsequent oxidation give rise to two distinct groups of metabolites: one containing the trifluoromethyl-phenyl moiety, fluopyram-benzamide(2-trifluoromethylbenzamide) and another containing the pyridyl moiety, fluopyram-pyridyl-carboxylic acid.²⁰ The concentrations of these metabolites showed an upward trend throughout the study: fluopyram-pyridyl-carboxylic acid concentration increased from $11 \mu\text{g kg}^{-1}$ found in the first sample of cherry tomato to $47 \mu\text{g kg}^{-1}$ detected in the last sample treated at normal dose; and from $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ to $189 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectively in the case of double dose treatment. In the case of cucumber, concentrations were within $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ to $74 \mu\text{g kg}^{-1}$ (normal dose) and $11 \mu\text{g kg}^{-1}$ to $136 \mu\text{g kg}^{-1}$ (double dose). A similar behaviour was observed for fluopyram-benzamide, its concentration in samples of cherry tomato varied from 7 to $26 \mu\text{g kg}^{-1}$ and from 9 to $95 \mu\text{g kg}^{-1}$ in normal and double dose, respectively. However, in cucumber samples concentrations of this metabolite ranged from 3 to $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ (normal dose) and from 7 to $161 \mu\text{g kg}^{-1}$ (double dose), although it was undetectable on day 44.

From the quantitative and estimated information of the compounds it can be speculated that the reaction from the first

transformation stage to the second one took place very quickly, since the concentration of fluopyram-hydroxy isomers has practically maintained constant throughout the study. However, Fig. 3 shows that the concentrations of the fluopyram-benzamide and fluopyram-pyridyl-carboxylic acid metabolites generally increased. It can be observed in Figs 1 and 3 that regardless of the crop, the days with higher concentration of fluopyram corresponded to those with a lower concentration of metabolites of the second transformation.

CONCLUSION

In the present study, an efficient and sensitive method of extraction based on QuEChERS method with UHPLC-Orbitrap-MS analysis was developed and validated to determine traces of fluopyram and its metabolites in the two vegetables crops (cherry tomato and cucumber). HRMS operating in full scan mode has been able to identify and measure fluopyram metabolite concentrations, which are undetectable at low concentrations for most analytical techniques. The data obtained in the study has provided the characterization of fluopyram pesticide dissipation during the crop of cherry tomato and cucumber under greenhouse conditions. The study includes the elucidation of metabolites (fluopyram hydroxy, fluopyram-benzamide and fluopyram-pyridyl-carboxylic acid), which have been detected from the first day to the end of the study, at 44 days. It can also be concluded that fluopyram exhibited a high persistence, since at the end of the study concentrations of the compound were still detected, although lower than MRL values. With the results of this study, progress is made in understanding the fate of fluopyram, its metabolites and its persistence. It would be necessary to consider new studies focusing on obtaining toxicological information on these metabolites, in order to consider its inclusion in the definition of MRL. The developed strategy of pesticide metabolite screening could be used to provide evidence on illegal practices if used in organic farming. This research may be the beginning to address the synthesis of main metabolites found as well as pathways of formation of these metabolites in other vegetables, their relative concentrations and possible toxicity.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank Terraverde P. company for permission to work on his greenhouse, for his assistance in the greenhouse and for providing the Velum Prime® PPP.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Angioni A, Porcu L and Dedola F, Determination of famoxadone, fenamidone, fenhexamid and iprodione residues in greenhouse tomatoes. *Pest Manag Sci* **68**:543–547 (2012).
- Bian Y, Guo G, Liu F, Chen X, Wang Z and Hou T, Meptyldinocap and azoxystrobin residue behaviors in different ecosystems under open field conditions and distribution on processed cucumber. *J Sci Food Agric* **100**:648–655 (2020).
- Xue J, Pan D, Li M, Wu X, Wang X and Hua R, Degradation of amisulbrom and its metabolite IT-4 in cucumber under field conditions and processing. *Int J Environ Anal Chem* **98**:67–81 (2018).
- MAPA. Superficies y Producciones Agrícolas. Available: www.Mapa.Gob.Es/Es/Estadistica/Temas/Publicaciones/Anuario-de-Estadistica/2018. accessed January 14, 2020.
- Chelal J and Hau B, Modelling the interaction between powdery mildew epidemics and host dynamics of tomato. *Eur J Plant Pathol* **142**:461–479 (2015).
- Rur M, Rämert B, Hökeberg M, Vetukuri RR, Grenville-Briggs L and Liljeroth E, Screening of alternative products for integrated pest management of cucurbit powdery mildew in Sweden. *Eur J Plant Pathol* **150**:127–138 (2018).
- Lara ML, Miranda L, Paez FC, Baeza R, Lopez MI, Ortiz F, Yruela MC, and Fernandez MM. Aplicación de Productos Fitosanitarios. Nivel Fumigador. Consejería de Agricultura P y DRI de I y FA y P, ed. 2017. Spanish legal deposit: SE 926-2017
- Robatscher P, Eisenstecken D, Innerebner G, Roschatt C, Raifer B, Rohregger H *et al.*, 3-Chloro-5-trifluoromethyl pyridine-2-carboxylic acid, a metabolite of the fungicide fluopyram, causes growth disorder in *Vitis vinifera*. *J Agric Food Chem* **67**:7223–7231 (2019).
- Chawla S, Patel DJ, Patel SH, Kalasariya RL and Shah PG, Behaviour and risk assessment of fluopyram and its metabolite in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit and in soil. *Environ Sci Pollut Res* **25**:11626–11634 (2018).
- Chawla S, Patel DJ, Patel SH, Kalasariya RL and Shah PG, Correction to: Behaviour and risk assessment of fluopyram and its metabolite in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit and in soil (Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(12), 11626–11634). *Environ Sci Pollut Res* **25**:11635 (2018).
- Dong B and Hu J, Dissipation and residue determination of fluopyram and tebuconazole residues in watermelon and soil by GC-MS. *Int J Environ Anal Chem* **94**:493–505 (2014).
- Chen X, Wang W, Liu F and Bian Y, Improved analysis of propamocarb and cymoxanil for the investigation of residue behavior in two vegetables with different cultivation conditions. *J Sci Food Agric* (2020). **100**:3157–3163.
- Codex Alimentarius International Food Standards. Codex online databases pesticides. Available: www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/en/?p_id=243.
- Regulation (EC) 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the Market. *Off J Eur Union* **L309**:1–50 (2009).
- Niu J and Hu J, Dissipation behaviour and dietary risk assessment of boscalid, triflumizole and its metabolite (FM-6-1) in open-field cucumber based on QuEChERS using HPLC-MS/MS technique. *J Sci Food Agric* **98**:4501–4508 (2018).
- Guan W, Ma Y and Zhang H, Residue and dissipation dynamics of fluopyram in cucumber and soil. *Adv Mater Res* **347–353**:2255–2259 (2012).
- Patel BV, Chawla S, Gor H, Upadhyay P, Parmar KD, Patel AR *et al.*, Residue decline and risk assessment of fluopyram + tebuconazole (400SC) in/on onion (*Allium cepa*). *Environ Sci Pollut Res* **23**:20871–20881 (2016).
- Podbielska M, Szpyrka E, Piechowicz B, Zwolak A and Sadło S, Behavior of fluopyram and tebuconazole and some selected pesticides in ripe apples and consumer exposure assessment in the applied crop protection framework. *Environ Monit Assess* **189**:350 (2017).
- Wei P, Liu Y, Li W, Qian Y, Nie Y, Kim D *et al.*, Metabolic and dynamic profiling for risk assessment of fluopyram, a typical phenylamide fungicide widely applied in vegetable ecosystem. *Sci Rep* **6**:1–11 (2016).
- Food E and Authority S, Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fluopyram. *EFSA J* **11** (2013). 1–76.
- Vargas-Pérez M, Egea González FJ and Garrido Frenich A, Evaluation of the behaviour of propoxycarbazone herbicide in soils and water under different conditions. Post-targeted study. *Ecotoxicol Environ Saf* **183** (2019).1–8.
- Official Method 2007.01, Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. *J AOAC Int* **90**: 17–26 (2007).
- Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017: 2–44 (2017).
- COMMISSION DIRECTIVE 2002/63/EC of 11 July 2002, Establishing community methods of sampling for the official control of pesticide residues in and on products of plant and animal origin and repealing Directive 79/700/EEC (text with EEA relevance). *Off J Eur Union* **30**: 30–43 (2002).

- 25 Abad-Fuentes A, Ceballos-Alcantarilla E, Mercader JV, Agulló C, Abad-Somovilla A and Esteve-Turrillas FA, Determination of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **407**:4207–4211 (2015).
- 26 REAL DECRETO 290/2003, de métodos muestreo control de residuos plaguicidas. *BOE* **58**:9299–9308 (2003).

CAPÍTULO

4



DISCUSIÓN INTEGRADA

1. Introducción

El interés creciente por el control de plaguicidas en los campos de la seguridad alimentaria y en el medioambiente ha quedado patente en diversas secciones de esta Tesis, siendo una demanda el desarrollo y validación de métodos analíticos y el análisis de la información que proporcionan. El número de plaguicidas que potencialmente pueden estar presentes en alimentos y/o medioambiente puede ser muy elevado. Además de los principales productos fitosanitarios utilizados en cada territorio, puede darse el caso de la utilización de otros no autorizados, sean de uso ilegal en una zona dada o bien porque se importen productos de un país donde un plaguicida esté autorizado, pero no en el de destino. A esto se suma la más que probable presencia de metabolitos y productos de degradación de las materias activas de los diferentes productos fitosanitarios.

Teniendo en cuenta la problemática anterior, una estrategia de análisis adecuada es la aplicación de métodos analíticos que permitan por un lado la determinación cuantitativa de listas de plaguicidas prioritarios, en un modo de análisis dirigido; y por otro lado combinar lo anterior con el análisis retrospectivo de datos, de forma que se posibilite la búsqueda de otros compuestos, no presentes en la lista de prioritarios, o de analitos desconocidos, considerando una perspectiva de análisis no dirigido. La HRMS ofrece la ventaja de obtener una sensibilidad máxima operando en modo de barrido completo, lo que permite que todos los compuestos extraídos e ionizados sean detectados sin necesidad de ser previamente seleccionados como “compuestos diana”.

Los estudios sobre niveles de plaguicidas y sus efectos, tanto en el medio ambiente como en seguridad alimentaria son muy numerosos, si bien la mayor parte de ellos se han centrado en la molécula que constituye la materia activa sin posibles modificaciones con respecto a la registrada para formular el

producto fitosanitario. Sin embargo, los avances en metodologías analíticas y en el conocimiento de la toxicología, justifican un aumento creciente del interés en el conocimiento de posibles reacciones de degradación de plaguicidas una vez que han sido aplicados. Estas suelen conducir a la formación de metabolitos más polares que el compuesto del que proceden con el consiguiente aumento del riesgo de exposición del medioambiente, fruto del incremento de la movilidad de los metabolitos en medios acuosos o su capacidad de intercambio con iones de las fracciones arcillosas del suelo y de la materia orgánica. A este incremento del riesgo de exposición se une que los metabolitos no suelen estar incluidos en los programas de control de alimentos o de muestras ambientales. Esto se debe, por un lado, a la falta de información disponible sobre su naturaleza, rutas de formación y métodos de análisis y, por otro lado, a la dificultad de encontrar patrones disponibles comercialmente. Así es necesario generar información científica sobre rutas de disipación y degradación de plaguicidas, así como desarrollar métodos analíticos fiables para identificar y cuantificar los metabolitos potencialmente generados.

Una de las familias de plaguicidas más interesante por los riesgos ambientales que puede conllevar es la de los herbicidas, ya que son aplicados directamente al suelo. Los herbicidas son generalmente compuestos de elevada polaridad, lo que, unido a la alta movilidad en suelos, los hace buenos candidatos para contaminar las aguas subterráneas y/o superficiales, además del suelo y el propio cultivo. Como ejemplo se plantea el problema de la determinación del herbicida propoxicarbazona, junto con su metabolito 2-hidroxi-propoxicarbazona, y su comportamiento en distintos medios como agua y suelo, convirtiéndose en uno de los objetivos de la Tesis.

Otra familia de plaguicidas de gran interés son los fungicidas, los cuales representan el grupo de fitosanitarios más comercializado en España para

combatir enfermedades provocadas por hongos en los cultivos. El fungicida sistémico fluopyram, de aprobación relativamente reciente (2016), es especialmente interesante para estudiar su disipación y degradación en ambientes tan propicios a enfermedades fúngicas como son los cultivos intensivos bajo plástico de tomate y pepino.

En este apartado se aborda la discusión del trabajo realizado en el marco de esta Tesis estructurado en dos bloques de diferente temática. En un primer bloque se discute el desarrollo y validación de métodos analíticos, mono y multiresiduo, en diferentes matrices alimentarias utilizando LC-MS/MS y GC-HRMS. En un segundo bloque se aborda la discusión del comportamiento de disipación y/o degradación de dos plaguicidas, incluyendo estudios cinéticos en matrices ambientales (agua y suelo), y alimentarias (tomate y pepino) usando LC-HRMS como técnica de análisis. En ambos estudios se ha llevado a cabo una posterior identificación de metabolitos aplicando LC-HRMS.

2. Desarrollo de métodos para el control de la seguridad alimentaria

Este apartado reúne la investigación llevada a cabo para desarrollar métodos analíticos ajustados a objetivo y validados para la determinación de: (i) el herbicida propoxicarbazona y su metabolito 2-hidroxi-propoxicarbazona en miel, harina de soja, remolacha y lechuga mediante LC-MS/MS (Publicación I), y (ii) 200 plaguicidas en un método multiresiduo en fresa, plátano, pera y sandía mediante GC-HRMS (**Publicación II**).

2.1. Método monorresiduo para propoxicarbazona y su metabolito 2-hidroxi-propoxicarbazona mediante LC-MS/MS

2.1.1. Separación y detección por cromatografía de líquidos acoplada al analizador de masas QqQ

Con el fin de lograr una identificación y cuantificación inequívoca del plaguicida propoxicarbazona y su metabolito, 2-hidroxi-propoxicarbazona, se realiza la optimización de la etapa de separación. En la **Publicación I**, la técnica de separación cromatográfica utilizada ha sido la LC, utilizando la columna Zorbax plus C18 (100 x 2.1 mm; 1.8 μ m de tamaño de partícula). La separación de los dos compuestos fue precedida de la correspondiente optimización de las condiciones cromatográficas como composición de fase móvil y del gradiente de elución. La fase móvil compuesta de metanol y agua acidificada con 0.1% de ácido fórmico permitió obtener las mejores formas de pico.

En la **Tabla 1** se resumen las condiciones cromatográficas utilizadas y en la **Figura 1** se muestra el gradiente de elución.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas utilizadas para la separación de propoxicarbazona y 2-hidroxi-propoxicarbazona.

Parámetro LC	Condiciones (Publicación I)
Fase acuosa	0.1% ácido fórmico en agua
Fase orgánica	Metanol
Columna	Zorbax plus C18 (100 x 2.1 mm; 1.8 μ m)
Tª columna	25°C
Vol. Inyección	5 μ L
Flujo	0.2 mL/min
Tiempo análisis	10 min
Modo de elución	Gradiente



Figura 1. Gradiente de elución utilizado en la Publicación I.

Trabajando en dichas condiciones se consiguió una adecuada separación del herbicida propoxicarbazona y su metabolito (**Figura 2**).

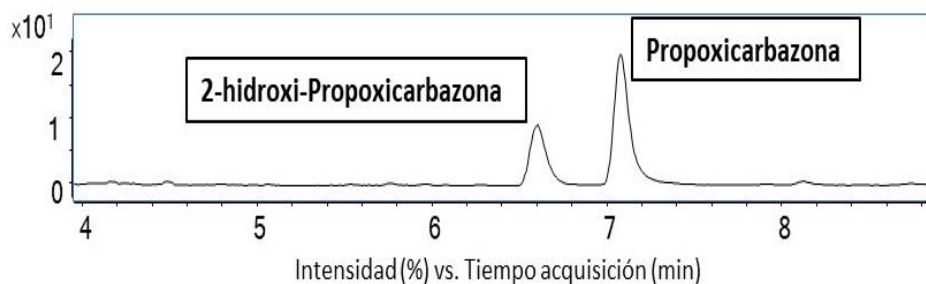


Figura 2. Cromatograma de propoxicarbazona y su metabolito en una disolución en metanol a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Respecto a la optimización de los parámetros espectrométricos se llevó a cabo inyectando una disolución patrón de cada uno de los compuestos por separado, tanto en modo positivo como en negativo, con el objetivo de caracterizarlos estructuralmente y seleccionar el ion precursor junto con al menos un ion fragmento o producto para su monitorización. Los mejores resultados, en términos de intensidad de señal del ion precursor para ambos compuestos, así como el patrón de fragmentación, fueron obtenidos en modo

positivo, además de una mejor fragmentación, con un error de masa inferior a 5 ppm. Se seleccionaron los dos iones fragmento de mayor intensidad, eligiendo el de mayor sensibilidad para la cuantificación y el segundo más sensible para la confirmación.

La **Figura 3** muestra los mecanismos de fragmentación de ambos compuestos protonados y sus espectros de MS/MS. Dicha información se encuentra resumida en la **Tabla 2**, así como el ion precursor y el tiempo de retención de cada uno de los compuestos.

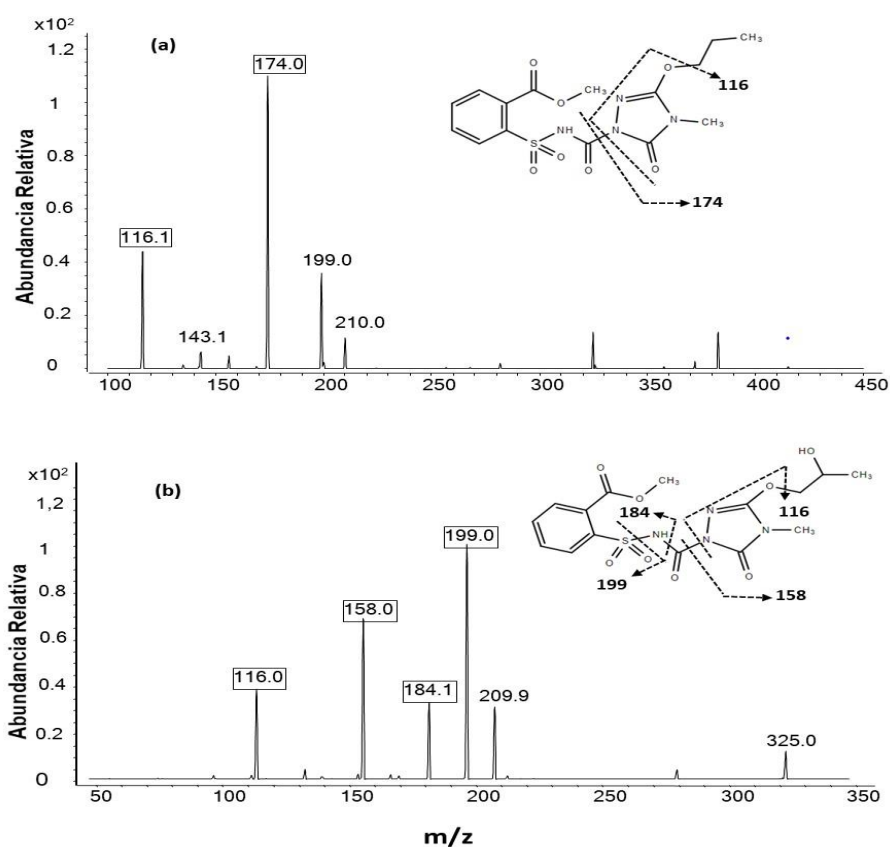


Figura 3. Espectros MS/MS y fragmentación de: (a) propoxicarbazona y (b) 2-hidroxi-propoxicarbazona.

Tabla 2. Parámetros MS/MS para los compuestos en estudio.

Compuesto	T _R (min)	Ion precursor (m/z)	Ion fragmento (m/z)
Propoxicarbazona	7.20-7.31	399.0	174.0
			116.0
2-hidroxi-propoxicarbazona	6.73-6.84	415.0	199.0
			184.1
			158.0
			116.0

T_R: Tiempo de retención

2.1.2. Método de extracción

En este trabajo ha sido necesario optimizar un método para la extracción de propoxicarbazona y su metabolito en matrices alimentarias muy distintas, lechuga, remolacha, harina y miel, para su posterior determinación por LC. Para ello se han introducido varias modificaciones en el método QuEChERS tamponado AOAC 2007. Los experimentos para optimizar el método de extracción consistieron en estudiar la influencia de los siguientes parámetros en la recuperación:

- Cantidad de muestra
- Disolvente de extracción
- Sales de extracción
- Adición de agua a las muestras secas (miel y harina de soja)
- Sales de limpieza

El método original QuEChERS AOAC 2007 emplea una disolución de ácido acético al 1% en acetonitrilo como disolvente de extracción y sulfato magnésico anhidro y acetato sódico como sales de extracción. En el procedimiento “extracción 1”, aplicado a matrices de alto contenido en agua (lechuga y remolacha), se estudió la recuperación de los analitos usando el método original. En las matrices de harina de soja y miel, con bajo contenido en agua, se incorporó un paso previo a la extracción que consistía en la

hidratación de la muestra mediante adición de agua, siguiendo las recomendaciones de la guía SANTE para mejorar la eficacia de la extracción. Además de “extracción 1”, se ensayaron dos modificaciones del método original para comprobar si era posible mejorar los porcentajes de recuperación de forma significativa en las matrices de miel y harina de soja, que fueron: uso de metanol:agua (1:1, v/v) con 0.5% ácido fórmico como disolvente de extracción, denominada “extracción 2”, y uso de metanol con 0.5% ácido fórmico como disolvente de extracción (“extracción 3”). Un cuarto procedimiento se aplicó solo para la harina de soja, ya que los anteriores no mostraron resultados satisfactorios en términos de porcentajes de recuperación. La modificación consistió en cambiar las sales de sulfato de magnesio y de acetato sódico por acetato amónico. La **Figura 4** esquematiza los procedimientos que dieron mejores resultados, esto es, “extracción 1” para los dos vegetales y miel, a la que se ha añadido la etapa previa de hidratación, y la hidratación más sustitución de las sales de extracción por acetato amónico en el caso de harina de soja.

Previo a la separación y detección cromatográfica, y teniendo en cuenta la complejidad de las matrices estudiadas, fue necesario aplicar una etapa de limpieza para eliminar interferentes con el objetivo de reducir en lo posible el efecto matriz en la cuantificación, el cual era relevante en muchos casos. Se estudió la eficacia de una etapa de limpieza basada en dSPE utilizando sulfato magnésico (150 mg) en todas las matrices a excepción de la harina de soja; a ésta se añadió PSA junto con C18 y/o carbón negro grafitizado (GBC), en las siguientes combinaciones: PSA + C18, PSA + GBC, PSA + C18 + GBC. Las combinaciones de sales de limpieza seleccionadas en función de la matriz, fueron las siguientes: sulfato magnésico + PSA en lechuga y remolacha; sulfato magnésico + PSA + C18 en miel y PSA + C18 para harina de harina de soja. Los métodos de extracción óptimos para cada una de las matrices se describen en la **Figura 4 (Publicación I)**.

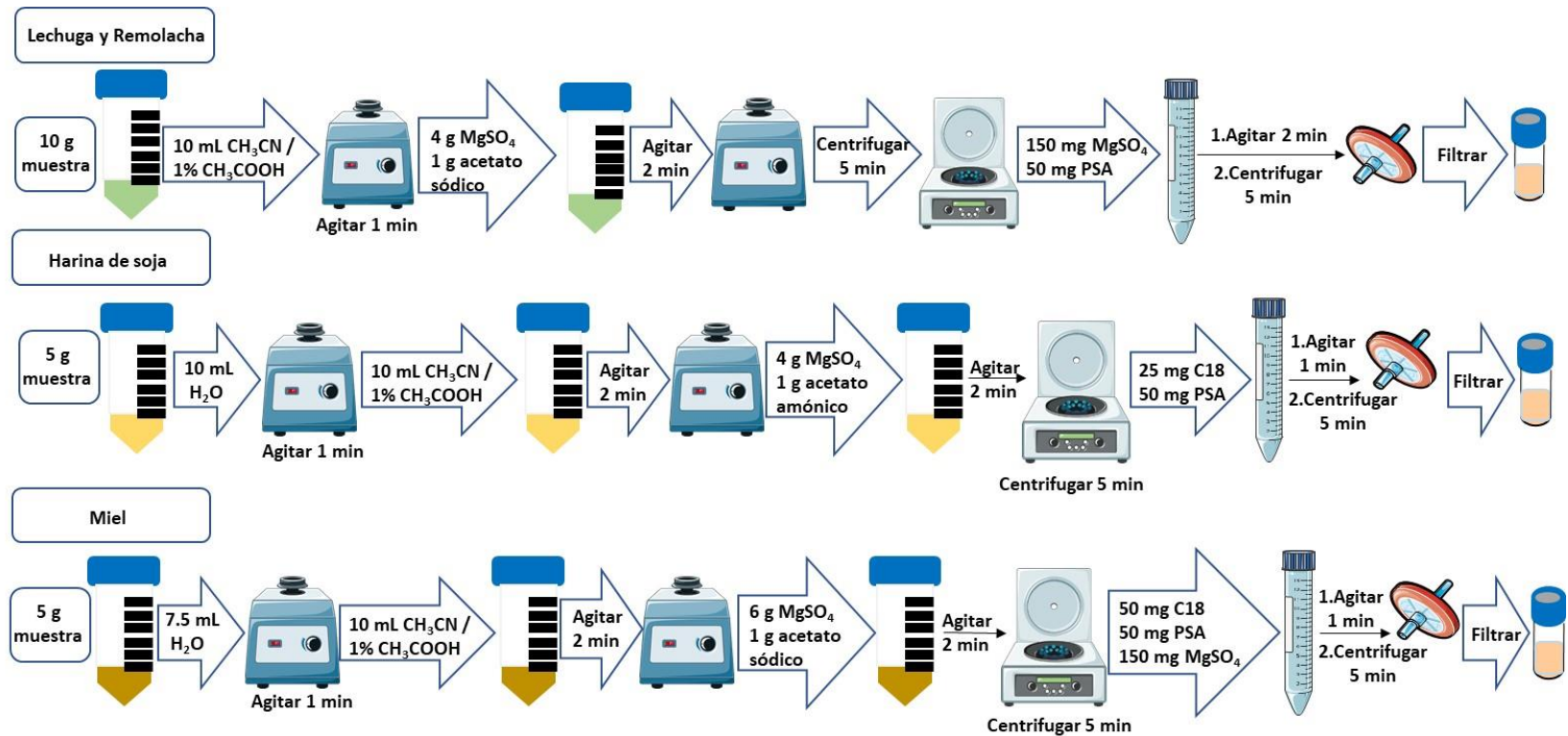


Figura 4. Esquema de los diferentes métodos de extracción desarrollados en la Publicación I.

2.1.3. Validación del método

El método analítico desarrollado fue validado conforme a las directrices de la guía SANTE con el fin de demostrar su aplicabilidad y asegurar una adecuada identificación y cuantificación de los compuestos objetivo. Los parámetros que fueron evaluados, así como los criterios de aceptación se encuentran resumidos en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Parámetros y criterios de aceptación para la validación de propoxicarbazona y 2-hidroxi-propoxicarbazona.

Parámetro	Pruebas	Criterio aceptación
Efecto matriz	Linealidad en disolvente y matriz	Relación entre pendientes (valor absoluto) $\leq 20\%$
Linealidad	5 niveles de concentración	$R^2 \geq 0.99$
Recuperación	5 muestras fortificadas a los niveles LOQ y 2-10x LOQ	70-120%
Precisión intra-día	5 muestras fortificadas a los niveles LOQ y 2-10x LOQ	$RSD \leq 20\%$
Precisión inter-día	5 muestras fortificadas a los niveles LOQ y 2-10x LOQ	$RSD \leq 20\%$
Límite cuantificación (LOQ)	5 muestras fortificadas a niveles muy bajos de concentración	$S/N > 10^*$
Límite detección (LOD)	5 muestras fortificadas a niveles muy bajos de concentración	$S/N > 3^*$

R^2 : Coeficiente de regresión

RSD: Desviación estándar relativa

S/N: Señal/ruido

*: Cumple los criterios de recuperación y precisión

El estudio del efecto matriz consistió en la comparación de las pendientes de las rectas de calibrado preparadas en disolvente y en matriz. En las matrices de lechuga y remolacha se obtuvo una relación inferior al 20%, dato que indica que no hay efecto matriz. En cambio, para harina de soja y miel esta relación fue superior al 20%, por lo que estas matrices mostraron un efecto de supresión de la señal analítica. Teniendo en cuenta este resultado se utilizó la calibración en matriz para la cuantificación con el fin de corregir este efecto.

La linealidad se evaluó preparando las curvas, en todas las matrices, tanto en disolvente como en matriz y determinando los R^2 utilizando el área de la señal frente a la concentración, obteniéndose $R^2 > 0.99$ en ambos compuestos, tanto en matriz como disolvente para lechuga y remolacha y solo en matriz para miel y harina de soja.

La recuperación se estudió a dos niveles de concentración indicados en la **Tabla 4**, con muestras fortificadas preparadas en el laboratorio. Las recuperaciones calculadas oscilaron entre el 73 y 110%. La precisión se estimó calculando la RSD, de cinco muestras analizadas el mismo día (intra-día) y en días distintos (inter-día), obteniéndose valores entre 4-19% y 5-20% respectivamente.

Por último, los LODs y LOQs se estimaron como la concentración a la que la señal cromatográfica de los compuestos podía diferenciarse del ruido cromatográfico, con una relación señal/ruido de tres o diez veces, respectivamente. Los LODs estimados varían entre 3 y 6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y los LOQs fueron 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para lechuga y remolacha y 25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para harina de soja y miel. En la **Tabla 4** se muestra el resumen de los valores de los parámetros de validación obtenidos.

Tabla 4. Resultados de los parámetros de validación del método para propoxicarbazona y 2-hidroxi-propoxicarbazona.

Parámetros validación	Resultados	
	Propoxicarbazona + metabolito	
Matriz	Lechuga y Remolacha	Harina de soja y Miel
Efecto matriz	<20%	>20%
Linealidad (R ²)	>0.99	
Conc. estudiadas (µg/Kg)	10	25
Recuperación (%)	73-110	
Precisión Intra-día (%RSD)	4-19	
Precisión Inter-día (%RSD)	5-20	
LOQ (µg/Kg)	10	25
LOD (µg/Kg)	3-6	

2.1.4. Aplicación del método desarrollado a muestras reales: lechuga, remolacha, harina de soja y miel

Para comprobar la aplicabilidad del método desarrollado se analizaron muestras adquiridas en mercados locales procedentes de cultivos convencionales (no certificados como ecológicos ni de control integrado de plagas): lechuga, remolacha, harina de soja y además, miel (Publicación I).

Se aplicó un control de calidad interno con cada lote de muestras analizado, que consistía en análisis de blancos de matriz, blancos de matriz fortificados a la concentración del LOQ y una recta de calibrado en disolvente, excepto para miel y harina de soja que fueron preparadas en matriz.

Se analizaron 5 muestras diferentes de cada una de las matrices, utilizando el método desarrollado en la Publicación I para detectar la presencia de propoxicarbazona y su metabolito. Ninguna de las muestras analizadas superó el valor del LOD para los analitos en estudio.

2.2 Método multirresiduo mediante GC-Q-Orbitrap-MS

2.2.1. Separación y detección por cromatografía de gases acoplada al analizador Q-Orbitrap

En el segundo estudio (Publicación II) la técnica de separación utilizada en el método multirresiduo para 200 plaguicidas ha sido la GC-Q-Orbitrap. Para la separación cromatográfica se eligió una columna ligeramente polar, VF-5ms (30 x 0.25 mm; 0.25 μm), y se estudiaron diferentes rampas de temperatura del horno cromatográfico. La mejor separación, en un tiempo de análisis menor a 30 minutos, se consiguió con el gradiente representado en la **Figura 5**.

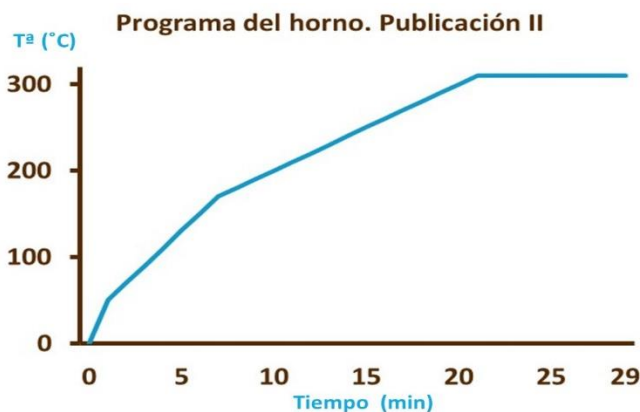


Figura 5. Programa de temperatura del horno utilizado para la separación de los plaguicidas del método multirresiduo.

Para la optimización de las condiciones cromatográficas se continuó con el estudio del efecto de distintas temperaturas del inyector, 220, 250 y 280 °C. Con esta última se obtuvieron las áreas mayores para los iones de cuantificación. Posteriormente se ajustó el tiempo en transferir la muestra ya vaporizada (*splitless*) a la columna. Se probaron tiempos de 1, 2 y 3 min, obteniéndose mejor forma de pico al nivel de concentración del LOQ con un

tiempo de 1 min. La **Tabla 5** reúne otros parámetros cromatográficos que influyen en la separación de los compuestos.

Tabla 5. Resumen de los parámetros cromatográficos.

Condiciones GC	Condiciones
Gas portador	He
Tª inyector	280°C
Vol. Inyección	1 µL
Flujo	1 mL/min
Tiempo análisis	29 min
Modo	Sin división (1 min)

El analizador Q-Orbitrap se utilizó con una fuente de ionización electrónica (EI), realizando la ionización a 70 eV a una Tª de 250°C. La adquisición de MS se realizó en el modo de adquisición barrido completo o *full-MS* en un rango de masas de 40 a 500 *m/z*. El poder de resolución *full-MS* se fijó en 60000 FWHM. El equipo estaba controlado con el *software* Xcalibur y los cromatogramas se procesaron utilizando TraceFinder. En la **Tabla 6** se resumen las condiciones de trabajo del analizador optimizadas para el método multirresiduo de plaguicidas mediante GC-Q-Orbitrap.

Tabla 6. Condiciones del Q-Orbitrap-MS.

Parámetro	Condiciones Q-Orbitrap
Modo ionización	EI (70 eV)
Tª fuente iones	250°C
Modo Scan	<i>full-MS</i>
Resolución <i>full-MS</i>	60000 FWHM
AGF target	1x10 ⁶

La información necesaria de fragmentos y tiempos de retención fue obtenida mediante un proceso realizado de forma automática tras la inyección de una disolución patrón en disolvente de todos los compuestos a la concentración de 100 µg/Kg. El espectro obtenido de cada compuesto se comparó con la información de la biblioteca Food & Environmental (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA), al aplicar el criterio de error de masa menor

a 5 ppm, identificándose así el tiempo de retención y la relación m/z de los principales iones. En los casos en que no se dispusiera de información de algún compuesto también se usó la biblioteca NIST (versión 2.0). Para cada compuesto se seleccionó un ion de cuantificación (el de mayor intensidad) y dos iones de confirmación. Como ejemplo, la **Figura 6** muestra los cromatogramas y los espectros de masas de boscalida y deltametrin que cumplen los criterios de confirmación, indicados en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Iones seleccionados, tiempo de retención para boscalida y deltametrin.

Compuesto	T_R (min)	Ion cuantificación (m/z)	Ion confirmación 1 (m/z)	Ion confirmación 2 (m/z)
Boscalida	19.93	139.98983	342.03214	111.99494
Deltametrin	21.44	181.06477	252.90466	171.98829

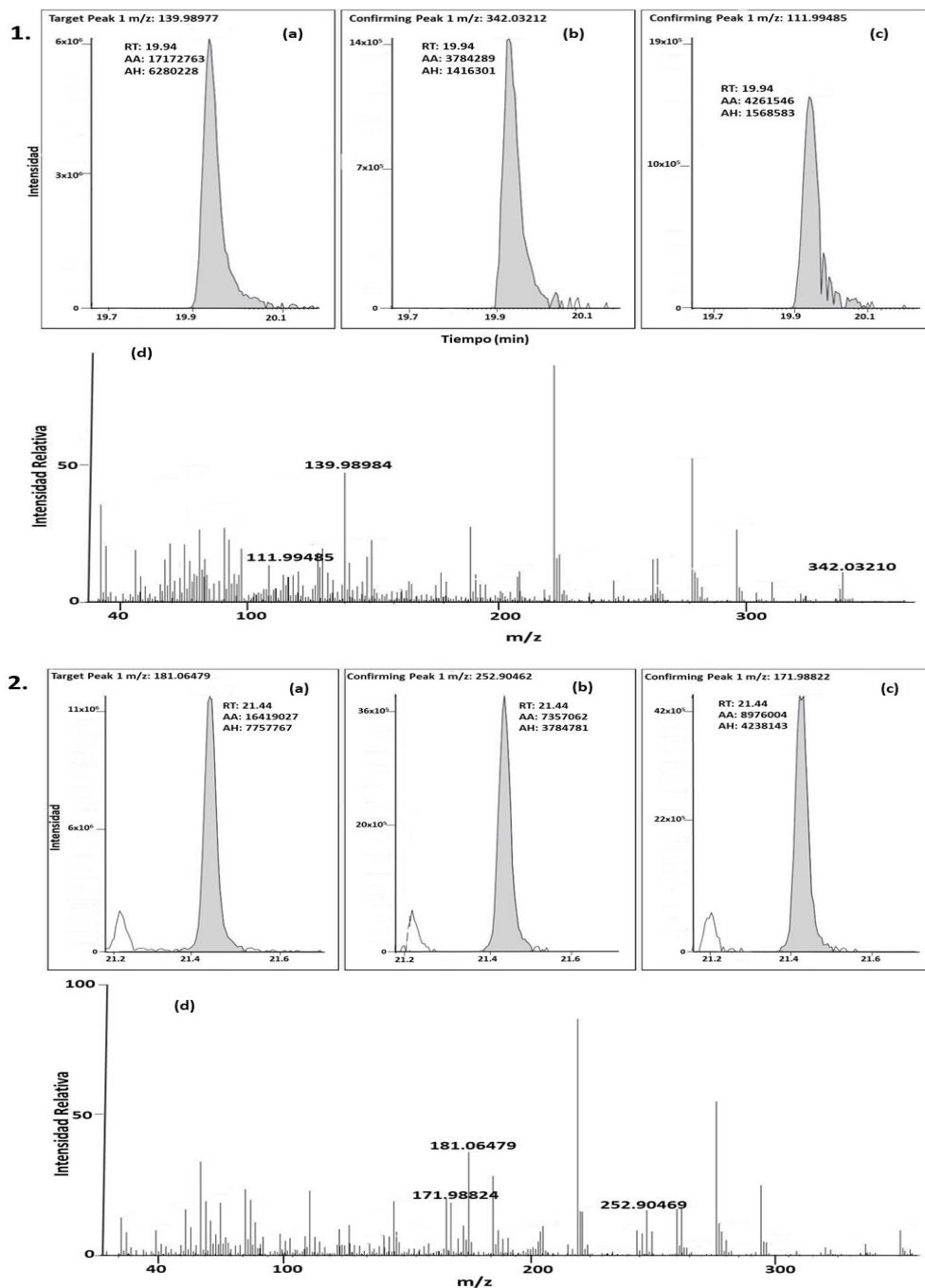


Figura 6. Cromatograma de iones extraídos (1) boscalida y (2) deltametrina: a) ion cuantificación, b y c) iones de confirmación, y d) *full-scan* experimental.

2.2.2. Método de extracción

El objetivo del presente método es abarcar un alcance amplio en número de analitos (200 plaguicidas) en matrices clasificadas en distintos grupos dentro de la guía SANTE: grupo de alto contenido en agua (sandía, pera y plátano) y grupo de alto contenido en ácido y alto contenido en agua (fresa). El método original QuEChERS EN 15662, que emplea acetonitrilo como disolvente de extracción y sulfato magnésico anhidro, citrato sódico y citrato sódico sesquihidrato como sales de extracción, se ha usado como base para optimizar el proceso de extracción. En el estudio se ha utilizado el mismo disolvente (acetonitrilo) aunque adicionando cloruro sódico a las sales de extracción. A continuación, también se estudió la conveniencia o no de aplicar una etapa de limpieza empleando 750 mg de sulfato magnésico anhidro y 125 mg de PSA (**Figura 8**). En general los extractos, sin limpieza, resultaban transparentes, aunque con el color característico de la matriz de la que provenían, así el de plátano era amarillo, rojo el de fresa y sandía y verde el de pera. No obstante, los porcentajes de recuperación obtenidos sin la etapa de limpieza resultaban fuera del rango 70-120% recomendado. Por el contrario, al aplicar a 5 mL de extracto el procedimiento de limpieza, se obtenían extractos incoloros y los porcentajes de recuperación para la mayoría de los 200 analitos estaban dentro del intervalo aceptable. En la **Figura 8** se presenta el esquema del procedimiento de extracción desarrollado en la **Publicación II**.

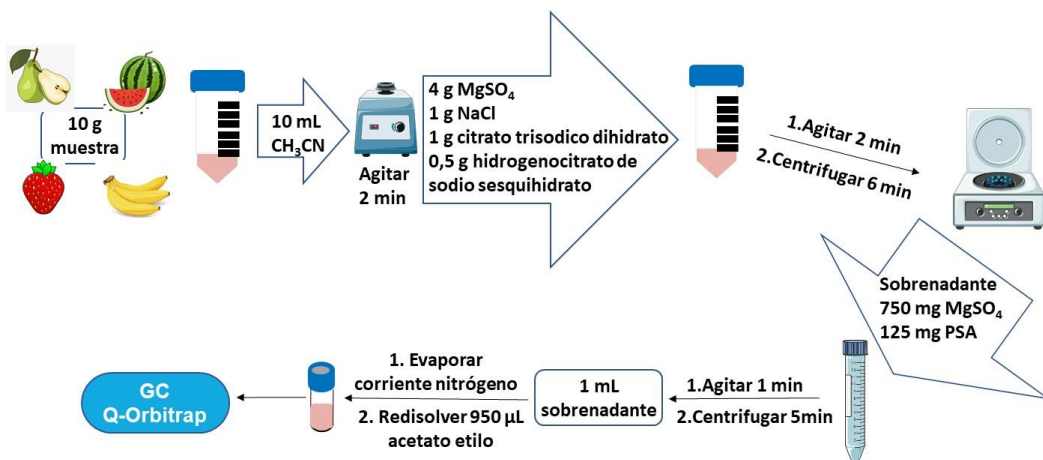


Figura 8. Método de extracción optimizado en la Publicación II.

2.2.3. Validación del método

Una vez optimizado el método se procedió a su validación en las diferentes matrices. La **Tabla 8** muestra el resumen de los resultados obtenidos para 191 plaguicidas finalmente validados en la **Publicación II**.

Tabla 8. Resultados de los parámetros de validación del método multiresiduo

Parámetros validación	Resultados	
Matriz	Plátano, Pera y Sandía	Fresa
Efecto matriz	<20%	<20%
Linealidad (R^2)	>0.99	
Conc. estudiadas ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	5, 10	5, 10
Recuperación (%)	70-120	
Precisión Intra-día (%RSD)	< 20	
Precisión Inter-día (%RSD)	<20	
LOD ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	1	5
LOQ ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	5	5

Nueve de los plaguicidas en estudio, bifenilo, dimetomorf, etoxiquin, fenamifos, fenamifos sulfoxido, fenamifos sulfona, metamidofos, oxifluorfen

y sulprofos, presentaron dificultades de extracción en las cuatro matrices estudiadas. Los coeficientes de correlación fueron siempre superiores a 0.99, excepto para isocarbofos en fresa. Respecto a los valores de recuperación, precisión intra-día e inter-día los plaguicidas que no cumplieron en alguno de estos parámetros fueron: 4-cloro-metilfenol, fenitrothion y tetraclorvinfos en sandía; azoxistrobina, bifenoxy, fenitrothion e isocarbofos en pera; y 4-cloro-metilfenol, quinometionato, clorotalonil, fenitrothion y tetraclorvinfos en plátano.

2.2.4. Aplicación a muestras reales

Una vez validado el método multiresiduo (**Publicación II**) se aplicó al análisis de un total de 31 muestras, fresa (8), pera (12), plátano (6) y sandía (5), adquiridas en mercados locales procedentes de cultivos convencionales (no certificados como ecológicos ni de control integrado de plagas). Se aplicó un control de calidad que incluía dos blancos de matriz y dos muestras fortificadas a 5 y 10 µg/Kg en cada una de las matrices analizadas, así como una recta de calibración para la cuantificación de los resultados positivos. La **Tabla 9** muestra los resultados obtenidos.

Tabla 9. Frecuencia de detección y rango de concentraciones de plaguicidas encontrados por matriz analizada.

Matriz	Plaguicida detectado	Frecuencia de detección	Concentración ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Fresa	Lambda-cihalotrina	3	4.2-8.1
	Miclobutanil	2	2.6-3.8
Pera	Clorotalonil	1	10.1
	Difenoconazol	1	445.8
	Fenvalerato	1	139.0
	Fludioxonil	2	554.4-653.0
	Lambda-cihalotrina	3	7.5-20.5
	Tebuconazol	3	6.7-57.2
	Pirimetanil	3	3.1-678.1
Plátano	Azoxistrobina	2	48.7-254.5
	Bifentrina	2	10.9-18.0
	Buprofezin	1	3.7
Sandía	Boscalida	1	27.4
	Clorotalonil	1	16.2

Como se puede observar 14 muestras contenían al menos un residuo de plaguicida, lo cual supone el 45% de las analizadas. Se detectaron 12 plaguicidas diferentes, siendo los más frecuentes lambda-cihalotrina, pirimetanil y tebuconazol. Respecto a las matrices, pera es la que mayor porcentaje de positivos presentó con un 67% de las muestras, seguida de sandía (40%), fresa (37%) y plátano (33%). Por el contrario, el 55% de las muestras no contenían ningún plaguicida. Los resultados se evaluaron de acuerdo con los LMR establecidos por el Reglamento Europeo. Es importante señalar que dos resultados superaron los LMR, fenvalerato (139.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) en pera y azoxistrobina en plátano (254.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). En la **Tabla 10** se presentan la relación m/z de los iones seleccionados y los tiempos de retención para azoxistrobina en plátano, difenoconazol y fenvalerato en pera y lambda-cihalotrina en fresa y en la **Figura 7** se comprueba la identificación de estos plaguicidas en las muestras reales.

Tabla 10. Ejemplo de cuatro plaguicidas positivos en muestras reales de plátano, pera y fresa.

Compuesto	Matriz	T _R (min)	Ion cuantificación (m/z)	Ion confirmación 1 (m/z)	Ion confirmación 2 (m/z)
Fenvalerato	Pera	20.6-20.9	225.07845	125.01533	167.06223
Lambda-cihalotrina	Fresa	18.03	181.06479	141.05107	197.03389
Azoxistrobina	Plátano	21.63	344.10296	329.07953	388.09311
Difenoconazol	Pera	21.22	264.98204	323.02363	202.01799

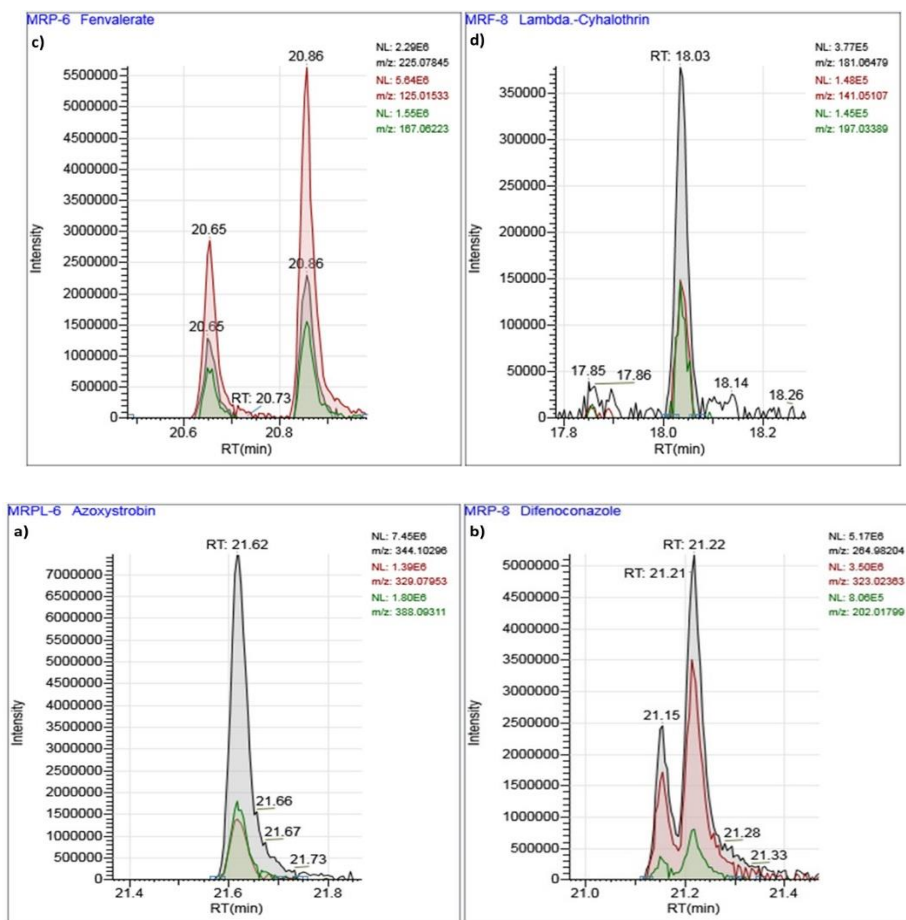


Figura 7. Cromatograma de iones extraídos para ion cuantificación (negro) e iones de confirmación (rojo y verde) de: a) azoxistrobina; b) difenoconazol; c) fenvalerato y d) lambda-cihalotrina.

2.2.5. Desarrollo de un método de análisis no dirigido

Hasta ahora se ha discutido el desarrollo y validación de un método analítico dirigido, enfocado desde un punto de vista del análisis de compuestos seleccionados a priori o diana, para los cuales se ha elaborado previamente una base de datos de plaguicidas a partir de patrones comerciales. Sin embargo, el analizador GC-Q-Orbitrap ofrece la posibilidad de llevar a cabo un análisis retrospectivo desarrollando un método de análisis no-dirigido a partir de las señales detectadas previamente mediante el barrido completo. Dichas señales fueron posteriormente procesadas con la herramienta "Deconvolution Plugin" del *software* TraceFinder. Este procesado proporcionó una identificación automática inicial de una gran cantidad de compuestos. Por ello fue necesario establecer una serie de parámetros para realizar un cribado de los datos obtenidos. A tal fin se han evaluado una serie de parámetros de cribado que han permitido la identificación tentativa de compuestos no seleccionados previamente, como pueden ser residuos de otros plaguicidas en las muestras de frutas y hortalizas.

El flujo de trabajo y los parámetros de cribado fueron los siguientes:

1. El cribado de plaguicidas no seleccionados previamente tuvo lugar mediante la detección inicial de las señales de mayor intensidad por deconvolución.
2. Se estableció como criterio de confianza para las coincidencias obtenidas un error de masa exacta inferior a 5 ppm.
3. Se compararon los espectros de masas con los de la biblioteca de Alimentos y Contaminantes Ambientales (Thermo Fisher Scientific, San José, EE.UU.), así como la NIST; sumando entre las dos más de 200.000 espectros.

De esta forma se obtiene una lista provisional de compuestos coincidentes por cada señal cromatográfica. A esta lista se le vuelven a aplicar

otra serie de filtros, que permiten reducir el número de compuestos previamente considerados como potencialmente identificados, como son: puntuación de coincidencia (*score*); índice de búsqueda clásica (SI) y porcentaje del espectro que puede ser explicado por la fórmula química propuesta según la mayor concordancia con la biblioteca (HRF). Este último se trata de un valor de filtrado de alta resolución. Los valores establecidos para cada filtro se encuentran en la siguiente **Tabla 11**.

Tabla 11. Filtros establecidos en el método no dirigido con sus criterios.

Filtro	Valor
Score	≥ 70
Intensidad de señal (SI)	> 700
Filtrado de alta resolución (HRF)	> 80

La estrategia propuesta se aplicó a las 31 muestras ya analizadas, cuyos resultados habían sido obtenidos aplicando el método de análisis dirigido a compuestos diana. Todos los resultados de positivos encontrados previamente se confirmaron mediante el enfoque no dirigido, pero además se identificaron tentativamente otros plaguicidas, que al no estar incluidos en el método multiresiduo no habían sido detectados con el mismo. En las **Figuras 8 y 9** se puede observar, como ejemplo de doble confirmación, la identificación de fenvalerato y difenoconazol en muestras de pera mediante ambos métodos, el dirigido y el no dirigido empleando como *software* QualBroser de Xcalibur y TraceFinder respectivamente. En la muestra en la que se identificó tentativamente fenvalerato, se detectaron 1412 picos, de los cuales 31 de ellos fueron identificados como dicho compuesto, pero solo 16 tenían un valor de *score* superior a 70, de éstos solo 6 cumplían los otros dos filtros (SI y HRF) y al compararlos con las bases de datos coincidían con el compuesto fenvalerato (**Figura 8**). Para el caso de la muestra en la que se identificó tentativamente el plaguicida difenoconazol se detectaron 1433 picos, de los cuales 29 se identificaron como dicho compuesto, aunque solo 8

cumplían con un valor de *score* superior o igual que 70 y tan solo 3 con SI mayor que 700 con HRF > 80 (**Figura 9**). Ambos resultados eran coincidentes con los obtenidos mediante el método de análisis dirigido, como puede comprobarse en los cromatogramas de cada una de las figuras. Así como las coincidencias con los valores de m/z de los iones seleccionados y los tiempos de retención de la **Tabla 10**.

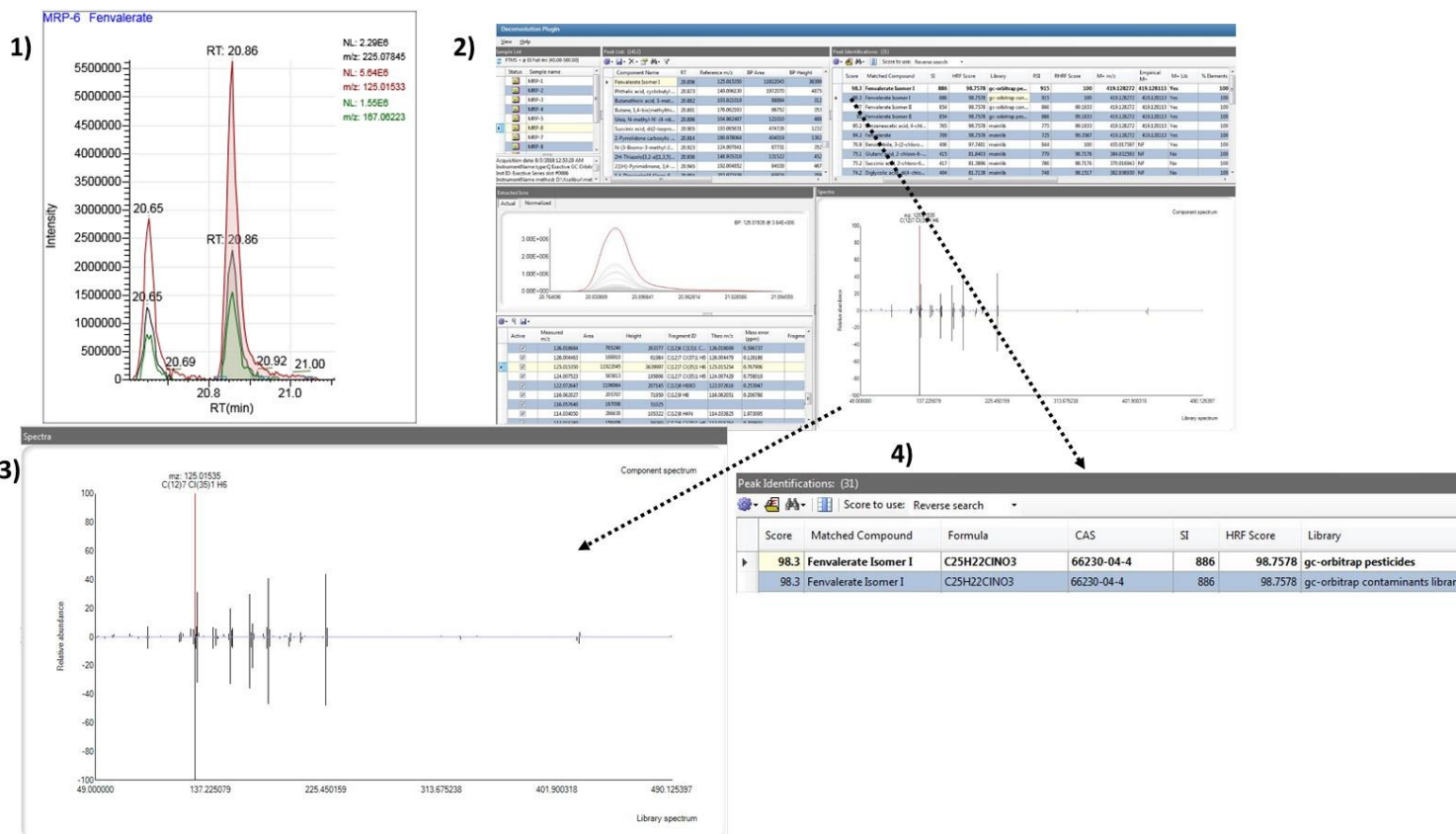


Figura 8. Esquema de confirmación de fenvalerato en pera mediante el método dirigido y no-dirigido: 1) cromatograma de iones extraídos por método dirigido; 2) resultado de la deconvolución; 3) espectro del compuesto y en espejo el de biblioteca y 4) identificación del pico.

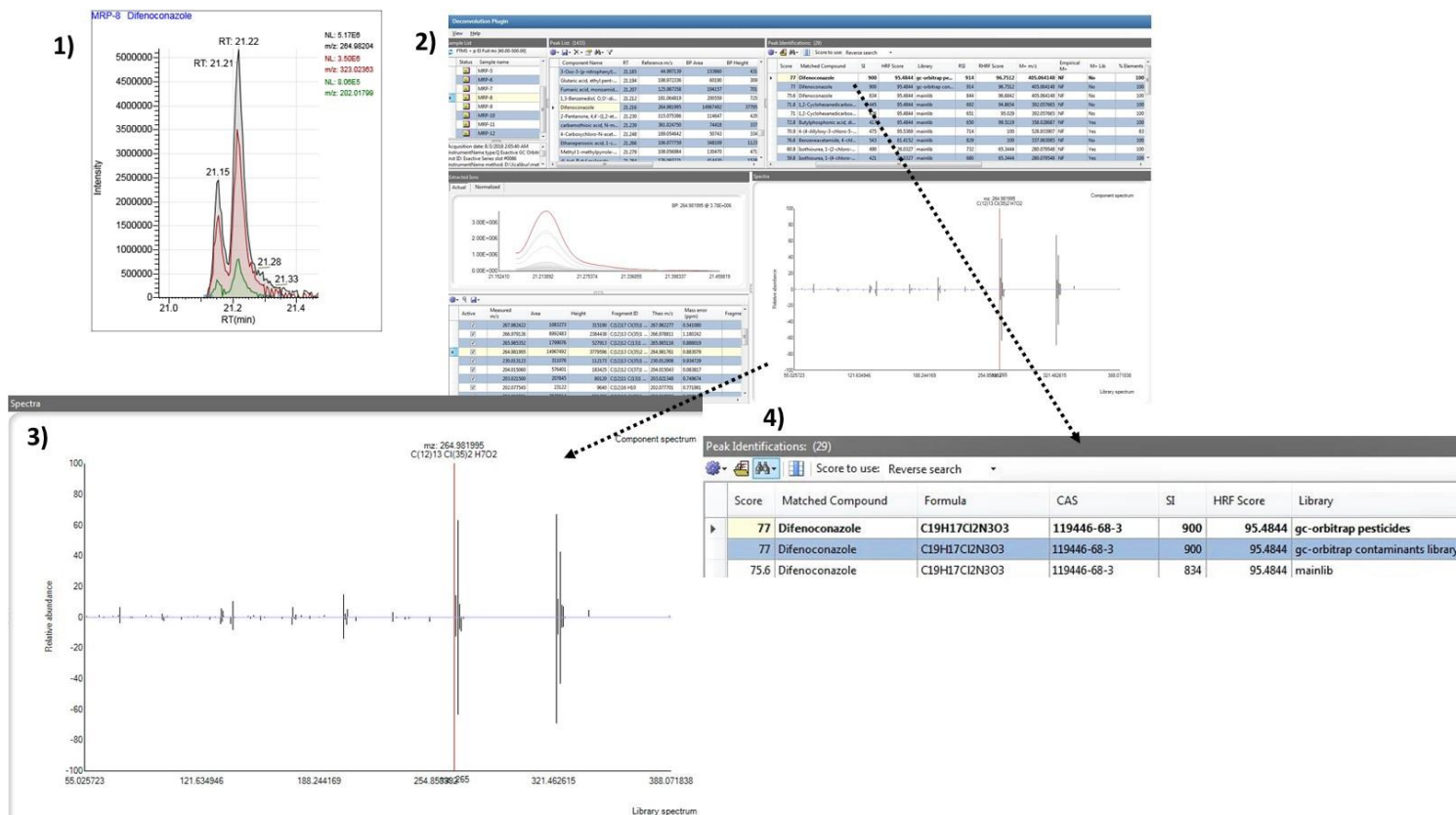


Figura 9. Esquema de confirmación de difenoconazol en pera mediante el método dirigido y no-dirigido: 1) cromatograma de iones extraídos por método dirigido; 2) resultado de la deconvolución; 3) espectro del compuesto y en espejo el de biblioteca y 4) identificación del pico.

Posteriormente se procesaron otras 83 muestras de frutas y hortalizas para su análisis mediante el método no dirigido, aplicando el tratamiento de datos antes descrito. En la **Tabla 12** se detalla la variedad de matrices del total de 114 muestras que se analizaron mediante la estrategia de análisis no dirigido.

Tabla 12. Variedad y número de matrices analizadas.

Frutas y Hortalizas	No de muestras
Ajo	1
Albaricoque	4
Berenjena	2
Boniato	1
Calabacín	6
Cereza	1
Champiñón	1
Ciruela	2
Esparrago	1
Fresa	8
Judía	3
Melocotón	5
Melón	6
Nectarina	4
Paraguayo	4
Patata	5
Pepino	8
Pera	12
Pimiento	5
Plátano	6
Sandía	25

A modo de resumen, en 28 muestras se obtuvo la identificación tentativa de al menos un plaguicida; de éstas, en el 60% se identificó tentativamente un solo plaguicida, 2 plaguicidas en el 25% y en el 15% restante se identificaron tentativamente entre 3 y 5 plaguicidas. Las 5 materias activas más identificadas tentativamente fueron lambda-cihalotrina (5.3%), triadimenol (4.4%) e imazalil, pirimetanil y tebuconazol (2.6% cada uno). La identificación

fue tentativa debido a que no fueron confirmados con patrón. La **Tabla 13** reúne los plaguicidas identificados tentativamente acorde a los criterios establecidos en el método no dirigido.

Tabla 13. Plaguicidas identificados tentativamente que cumplieron los criterios del método no dirigido.

Matriz	Plaguicida	Score	SI	HRF
Ajo	Metidation	76.4	780	94.05
Champiñón	Cipermetrin	77.0	861	99.22
Fresa	Lambda-cihalotrina	76.4	808	90.87
	Lambda-cihalotrina	74.4	756	97.29
	Lambda-cihalotrina	74.5	725	97.02
	Metalaxil	76.5	784	92.91
	Miclobutanil	74.8	749	97.95
	Miclobutanil	74.4	727	99.48
	Tetrametrin	75.6	744	96.27
	Triadimenol	76.5	815	99.70
	Triadimenol	76.6	831	99.66
	Triadimenol	75.3	762	99.11
	Triadimenol	77.0	852	99.66
	Triadimenol	76.7	840	99.35
	Melón	Tebufenpirad	94.8	779
Pera	Clorotalonil	94.8	837	94.98
	Difenoconazol	77.0	900	95.48
	Dinocap	77.5	821	98.27
	Fenvalerato	97.0	854	98.76
	Fludioxonil	96.5	860	95.66
	Fludioxonil	93.3	830	87.90
	Furmeciclo	71.9	807	98.44
	Imazalil	99.0	940	99.61
	Imazalil	98.3	915	98.84
	Lambda-cihalotrina	77.0	850	100.00
	Lambda-cihalotrina	76.2	807	100.00
	Lambda-cihalotrina	75.6	749	98.88
	Pirimetanil	96.1	806	94.16
Pirimetanil	97.5	914	97.58	
Pirimetanil	97.6	913	97.48	
Tebuconazol	78.0	897	99.28	
Tebuconazol	75.1	775	94.47	
Tebuconazol	77.9	897	99.47	

Pimiento	Flutriafol	78.4	920	98.27
	Pirimicarb	98.5	929	99.53
Plátano	Azoxistrobina	74.2	707	96.05
	Azoxistrobina	97.6	873	98.87
	Bendiocarb	73.3	810	87.77
	Bendiocarb	72.9	802	91.24
	Bifentrina	70.3	780	91.09
	Bifentrina	70.6	892	96.43
	Buprofezin	74.4	728	97.40
	Fenobucarb	75.0	743	97.77
	Fenobucarb	75.4	756	98.93
	Imazalil	77.7	872	99.77
	Isoprocarb	75.0	743	97.77
	Isoprocarb	75.0	747	98.83
	Tiabendazol	98.0	901	99.10
	Sandía	Boscalida	94.0	718
Clorotalonil		93.5	777	80.49
Tebuconazól		93.4	706	90.54
Tomate	Clorpirifos metil	71.5	728	90.24
	Ciprodinil	95.1	754	90.73
	Fenhexamida	73.9	732	95.05
	Spiromexifen	76.5	831	98.21

A modo de ejemplo, se puede comprobar en las **Figuras 10, 11 y 12** la identificación tentativa mediante deconvolución, así como la puntuación resultante de aplicar el filtrado con los parámetros establecidos para tal fin. En la **Figura 10** se muestra pirimicarb en pimiento, con 408 picos obtenidos, de los cuales 22 fueron identificados como este compuesto, solo 3 cumplían el filtro del *score* y de ellos solo 2 cumplían los criterios de SI y HRF. La **Figura 11** muestra la identificación de spiromesifen en tomate en el que se han obtenido 305 picos, de los cuales 23 son identificados como este compuesto, solo 4 cumplían el filtro del *score* y 2 cumplían los criterios de SI y HRF. La **Figura 12** muestra la identificación tentativa de fludioxonil en pera, con 1602 picos detectados de los cuales solo uno de ellos ha cumplido todos los criterios establecidos para los filtros.

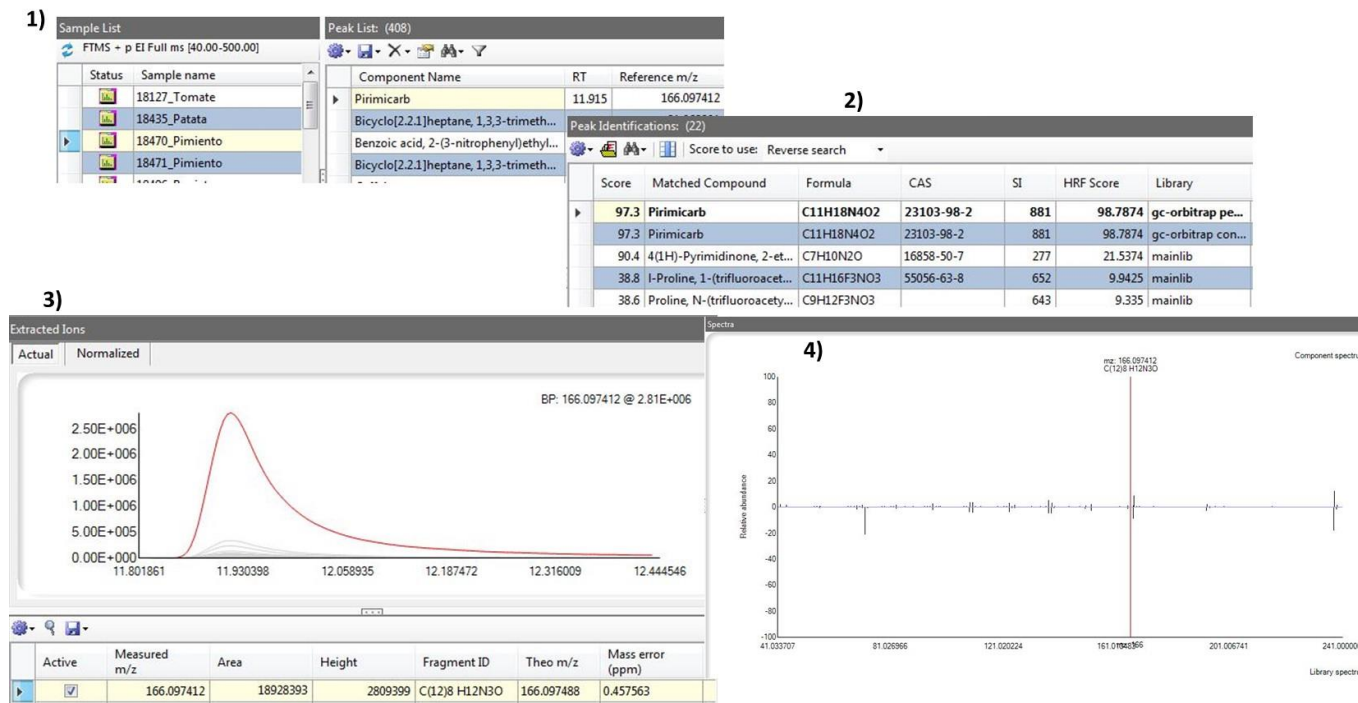


Figura 10. Identificación tentativa de pirimicarb en pimiento por GC-Q-Orbitrap-MS usando TraceFinder: 1) lista de picos obtenidos de la deconvolución espectral del TIC, 2) picos identificados mediante búsqueda en la biblioteca y la puntuación de filtrado utilizado para la identificación de compuestos, 3) iones extraídos y 4) espectro del compuesto y en espejo el de la biblioteca.

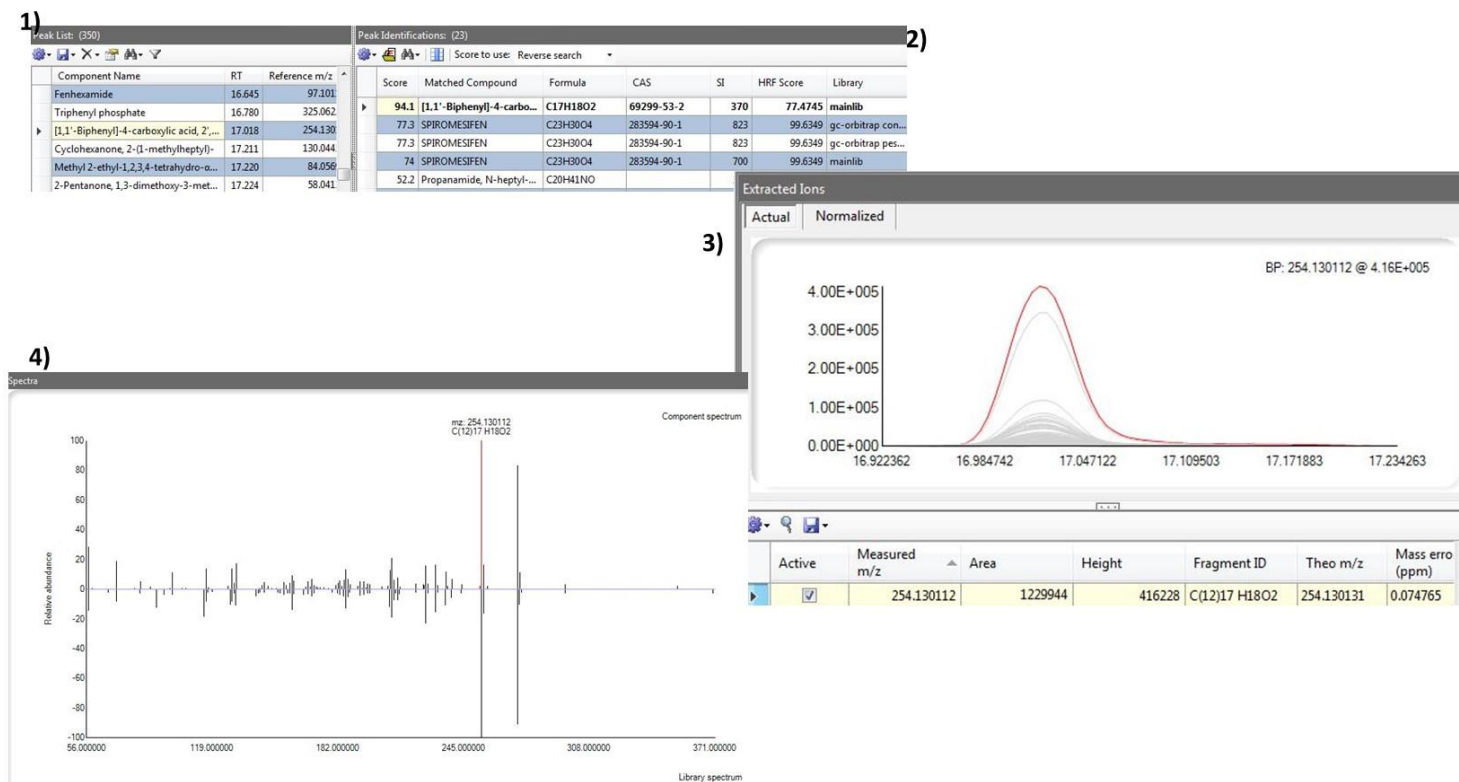


Figura 11. Identificación tentativa de spiromesifen en tomate por GC-Q-Orbitrap-MS usando TraceFinder: 1) lista de picos obtenidos de la deconvolución espectral del TIC, 2) picos identificados mediante búsqueda en la biblioteca y la puntuación de filtrado utilizado para la identificación de compuestos, 3) iones extraídos y 4) espectro del compuesto y en espejo el de biblioteca.

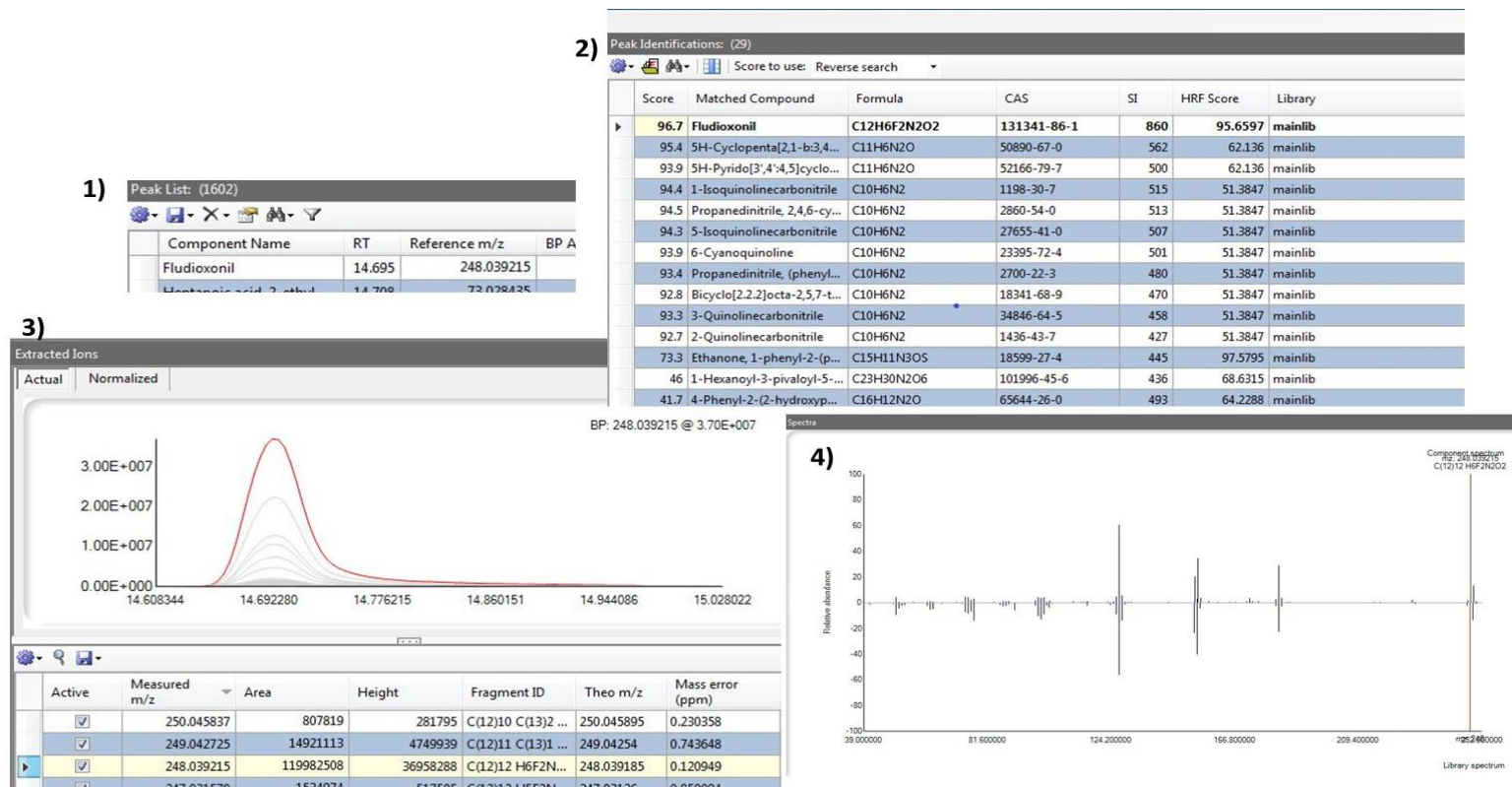


Figura 12. Identificación tentativa de fludioxonil en pera por GC-Q-Orbitrap-MS usando TraceFinder: 1) lista de picos obtenidos de la deconvolución espectral del TIC, 2) picos identificados mediante búsqueda en la biblioteca y la puntuación de filtrado utilizado para la identificación de compuestos, 3) iones extraídos y 4) espectro del compuesto y en espejo el de la biblioteca.

3. Estudios de disipación y degradación de plaguicidas e identificación de sus metabolitos en muestras ambientales y alimentarias

La metodología de desarrollo y validación de métodos expuesta en el capítulo anterior ha sido seguida para el estudio del comportamiento de plaguicidas en muestras ambientales (suelo y agua, **Publicación III**) y productos hortícolas de invernadero (tomate cherry y pepino, **Publicación IV**). Al tratarse de combinaciones de matrices/plaguicidas no incluidas en los estudios anteriores se validaron los métodos analíticos, en un caso para aumentar el alcance de propoxicarbazona a suelos y aguas y en otro caso para la determinación de fluopyram y sus metabolitos fluopyram-benzamida y fluopyram-piridil-ácido carboxílico (fluopyram-PCA) en las hortalizas anteriormente citadas.

3.1. Disipación y degradación del herbicida propoxicarbazona en muestras medioambientales

3.1.1. Separación por cromatografía de líquidos. Detección mediante espectrometría de masas de alta resolución con el analizador Orbitrap

Para la determinación de propoxicarbazona y su metabolito (**Publicación III**) en suelo y agua se desarrolló un método mediante LC acoplada a un analizador HRMS tipo Orbitrap (LC-Exactive-Orbitrap). Siguiendo la misma estrategia que en el método desarrollado en la **Publicación I** se optimizaron las condiciones cromatográficas (**Tabla 14**), entre ellas el gradiente de elución (**Figura 13**) y la composición de la fase móvil.

Tabla 14. Resumen de las condiciones cromatográficas empleadas.

Parámetro	Condiciones
Fase acuosa	0.1% ácido fórmico en agua
Fase orgánica	Metanol
Columna	Zorbax plus C18 (100 x 2.1 mm; 1.8 μ m)
Tª columna	25°C
Vol. Inyección	10 μ L
Flujo	0.2 mL/min
Tiempo análisis	12 min
Modo de elución	Gradiente

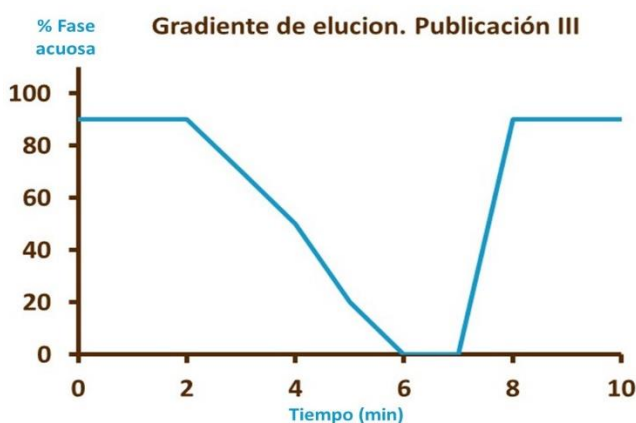


Figura 13. Gradiente de elución utilizado en la Publicación III.

La caracterización espectrométrica de los analitos mediante Orbitrap-MS comenzó inyectando soluciones estándar individuales, a dos concentraciones 0,5 y 1 mg/L, de propoxicarbazona y su metabolito. El espectro de masas de ambos compuestos se obtuvo en *full-scan* tanto en modo de ionización ESI⁺ como ESI⁻ a partir de la información de la masa exacta obtenida de su fórmula molecular. Los resultados mostraron una mayor sensibilidad, exactitud de masa e intensidad de pico cuando se utilizó ESI⁺. El ion protonado de cada compuesto se monitorizó según su fórmula molecular, y las masas exactas se seleccionaron con el criterio de que el error de masa fuera inferior a 5 ppm para ambos compuestos; con ello se disponía de la caracterización del ion

precursor. Posteriormente se llevó a cabo la caracterización de los iones fragmento en modo ESI⁺. A tal fin se aplicó el modo “*all-ion fragmentation*” (AIF) para la selección de los diferentes fragmentos en función de su sensibilidad, fórmulas moleculares y tiempos de retención iguales en relación con el ion precursor del que provenían, seleccionando las masas exactas con el mismo criterio de error de masa anterior. Se monitorizaron dos fragmentos para cada compuesto objetivo. La **Tabla 15** reúne los parámetros espectrométricos del Orbitrap-MS para la determinación de propoxicarbazona y su metabolito y la **Tabla 16** el tiempo de retención e iones precursor y fragmento de los compuestos.

Tabla 15. Resumen de las condiciones del analizador Orbitrap para la determinación de propoxicarbazona y su metabolito.

Parámetro	Condiciones
Modo ionización	ESI (+)
T ^a capilar	300 °C
Voltaje capilar	35 V
T ^a horno	305°C
Voltaje tubo lentes	95 V
Voltaje skimmer	18 V

Tabla 16. Resumen de condiciones de los compuestos.

Compuestos	T _R (min)	Ion precursor	Ion precursor
Propoxicarbazona	8.61	399.09690	199.00623
			116.04638
2-hidroxi-propoxicarbazona	8.00	415.09181	116.04638
			174.08763

En la **Figura 14** se presenta el cromatograma de iones totales, junto al espectro de masas, de propoxicarbazona y su metabolito.

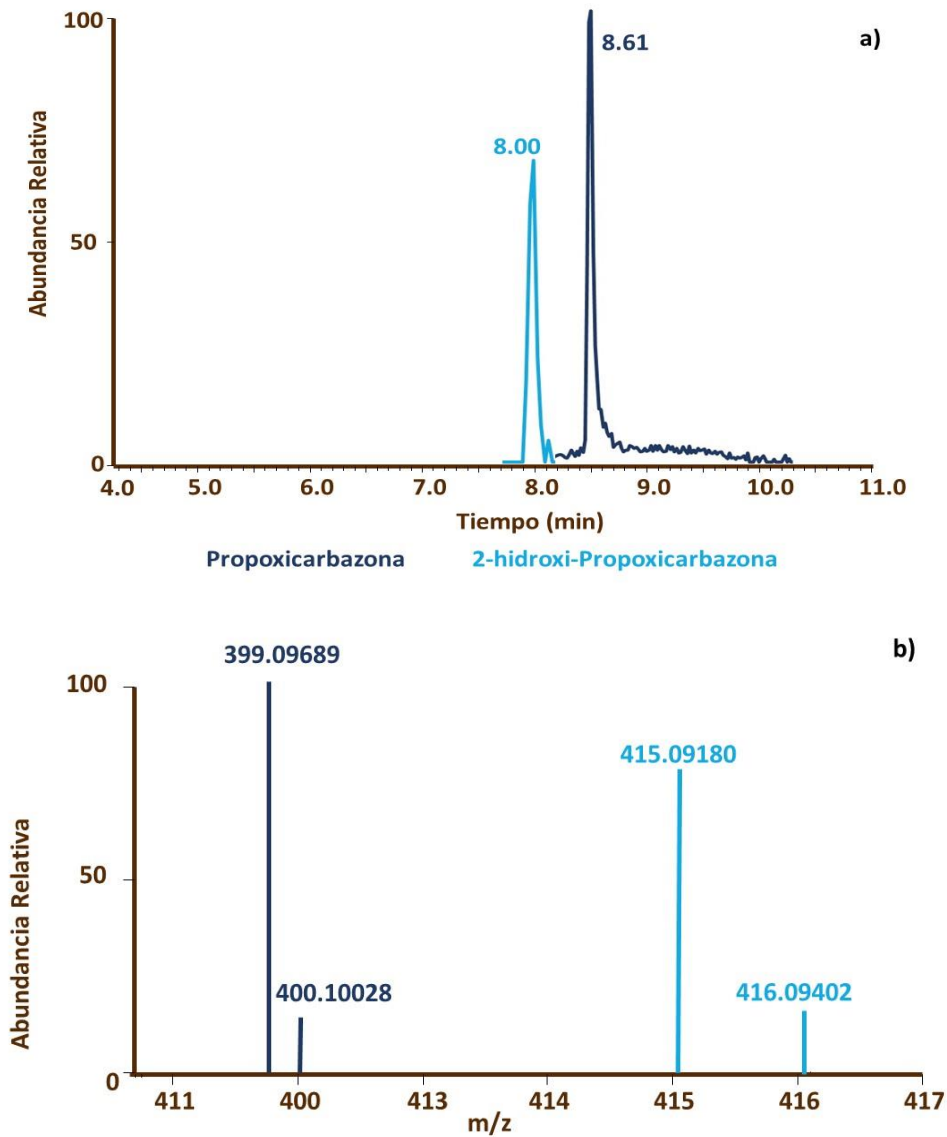


Figura 14. (a) Cromatograma de iones totales y (b) espectro de masas de propoxicarbazona y 2-hidroxi-propoxicarbazona.

3.1.2. Métodos de extracción

La extracción de propoxicarbazona y su metabolito en muestras de suelo se optimizó a partir del método original QuEChERS, que emplea acetonitrilo como disolvente de extracción y sulfato magnésico anhidro y cloruro sódico como sales de extracción. Al tratarse el suelo de una matriz con escasa humedad, se hidrató con una pequeña cantidad de agua como paso previo al estudio de selección del disolvente óptimo y las sales de extracción. Se aplicaron tres procedimientos: (i) extracción 1, empleando como disolvente acetonitrilo y ausencia de sales de extracción; (ii) extracción 2, usando el mismo disolvente anterior y añadiendo sulfato magnésico anhidro y cloruro sódico como sales de extracción y (iii) extracción 3, usando como disolventes para la extracción acetonitrilo con 1% de ácido acético seguido de agua también acidificada con 1% de ácido acético y ausencia de sales de extracción. Los mejores porcentajes de recuperación se obtuvieron con este último procedimiento denominado “extracción 3”, que tiene la ventaja adicional de ser bastante simple (**Figura 15**).

En la optimización del método de extracción también se estudió el efecto del tiempo de agitación en la recuperación de los analitos. Se ensayaron tiempos desde 3 minutos hasta una hora, resultando que una agitación de 15 minutos era suficiente para extraer los compuestos con porcentajes de recuperación aceptables (**Publicación III**).

En lo referente a la matriz agua, se estudió la eficacia de extracción mediante SPE conectada en línea y SPE no conectada en línea, comparando la recuperación de los analitos. En el primer caso, “extracción 1”, se acidificó la muestra con 0.1% de ácido fórmico y posteriormente se pasó por una columna Oasis HLB conectada en línea con la columna cromatográfica. En el segundo caso, la extracción SPE fuera de línea se llevó a cabo con un cartucho Oasis, previamente acondicionado, haciendo pasar la muestra, tanto acidificada con

0.1% de ácido fórmico (extracción 2), como sin acidificar (extracción 3). La extracción 2 fue la que proporcionó los mejores resultados. En la **Figura 15** se resumen los procedimientos óptimos para cada matriz.

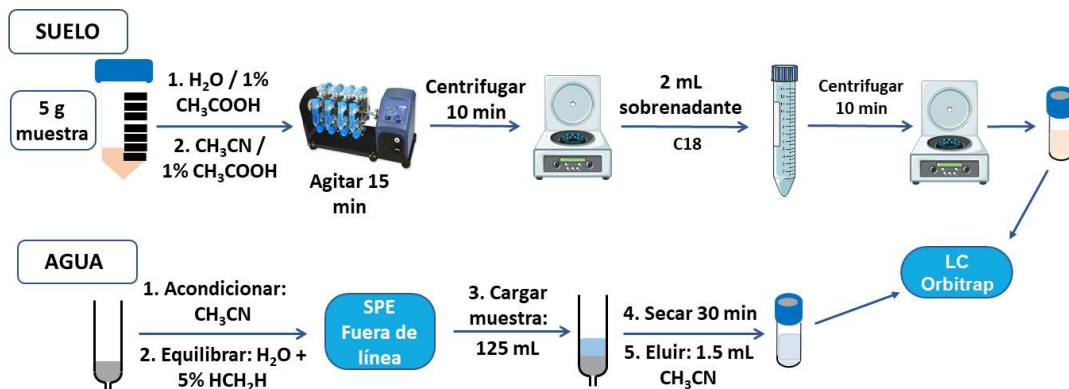


Figura 15. Procedimientos de extracción óptimos para las muestras de suelo y agua.

3.1.3. Validación de los métodos

Una vez optimizados los métodos analíticos se llevó a cabo el mismo procedimiento para su validación que en el apartado anterior. Los valores obtenidos de los parámetros evaluados se reúnen en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Resultados de la validación del método de análisis de propoxicarbazona y su metabolito en suelo y agua.

Parámetros validación	Resultados			
	Propoxicarbazona + metabolito			
Matriz	Suelo		Agua	
Efecto matriz	0.3-1.2		0.6-1.5	
Linealidad (R ²)	0.99			
LOQ	10 µg/Kg		1 µg/L	
LOD	10 µg/Kg		0,1 µg/L	
Conc. estudiadas	10 µg/Kg	100 µg/Kg	0.1 µg/L	1 µg/L
Recuperación (%)	74-113		76-87	
Precisión Intra-día (%RSD)	2-11		5-12	
Precisión Inter-día (%RSD)	11-17		13-17	

3.1.4. Diseño de experimentos de laboratorio para el estudio de la disipación y degradación en muestras ambientales

Para el estudio del comportamiento de propoxicarbazona en suelo y agua se diseñó un experimento de laboratorio que simulaba condiciones de campo usando el producto comercial *Attribut*[®] (propoxicarbazona sodio 70% SG) a dos dosis, durante un periodo de cinco meses desde el momento de la aplicación de la formulación, tal y como se describe a continuación:

Agua: se fortificaron un total de 28 alícuotas independientes de agua natural a dos concentraciones, 1 y 5 mg/L, y se almacenaron de la siguiente forma:

(i) 14 muestras tapadas en botellas translucidas, 7 de cada una de las concentraciones, almacenadas en el alfeizar de la ventana del laboratorio para evaluar el efecto de la luz o la radiación solar.

(ii) 14 muestras tapadas en botellas topacio, 7 de cada una de las concentraciones, almacenadas en un armario en oscuridad para simular condiciones de aguas subterráneas.

Suelo: se fortificaron un total de 16 muestras independientes, correspondientes a dos suelos con distintas características físico-químicas (8 muestras de cada suelo) a dos concentraciones, 463 y 927 µg/Kg (dosis normal y doble respectivamente), y se almacenaron en el laboratorio a temperatura ambiente. La humedad se mantuvo constante durante todo el estudio.

Muestreo y control de calidad: Se realizaron un total de ocho muestreos de suelos (1, 4, 7, 15, 30, 90, 120 y 150 días) y siete de agua (1, 15, 30, 60, 90, 110 y 150 días) a lo largo de los cinco meses que duraron los experimentos, cada muestra se tomó por triplicado. Como control de calidad, junto con las muestras fortificadas de cada matriz se guardaron blancos de agua y de suelo sin fortificar en suficiente cantidad como para poder tomar una muestra en

cada muestreo y procesarla junto con las demás para constatar que no existe contaminación accidental o degradación de la matriz.

3.1.5. Estudio cinético de disipación y degradación de propoxicarbazona

Una vez analizadas todas las muestras de agua y de suelo aplicando los métodos desarrollados y validados, se evaluó el comportamiento de propoxicarbazona en cada matriz, siendo necesario para ello tratamientos estadísticos para determinar a qué modelo cinético de los existentes se ajustaban los datos obtenidos experimentalmente.

Comportamiento de propoxicarbazona en suelo

El modelo que mejor describe la disipación de propoxicarbazona es el modelo FOMC. Como se puede observar en la **Figura 16** ambas dosis presentan un comportamiento similar. El comportamiento de disipación se produjo en dos fases, una primera de unos 30 días, en la que la concentración disminuyó aproximadamente en ambas concentraciones en un 40%, seguida de una segunda fase más lenta que se prolongó hasta el final del ensayo, con la que se alcanzó un 70% de disipación respecto a la concentración aplicada. Estos datos indican que el proceso de disipación es independiente de las concentraciones iniciales.

En la **Tabla 18** se reúnen los parámetros cinéticos de disipación derivados del ajuste al modelo cinético FOMC. Los valores de vida media (DT50) fueron diferentes para los dos suelos evaluados, pero similares para la dosis recomendada y la doble. Así la DT50 fue de 28-30 días para el suelo arcilloso limoso y de 60-61 días en el suelo arenoso arcilloso limoso, dosis recomendada y doble respectivamente. A modo de resumen se puede decir que el patrón de disipación es independiente de la concentración a la que se aplica y dependiente del tipo de suelo.

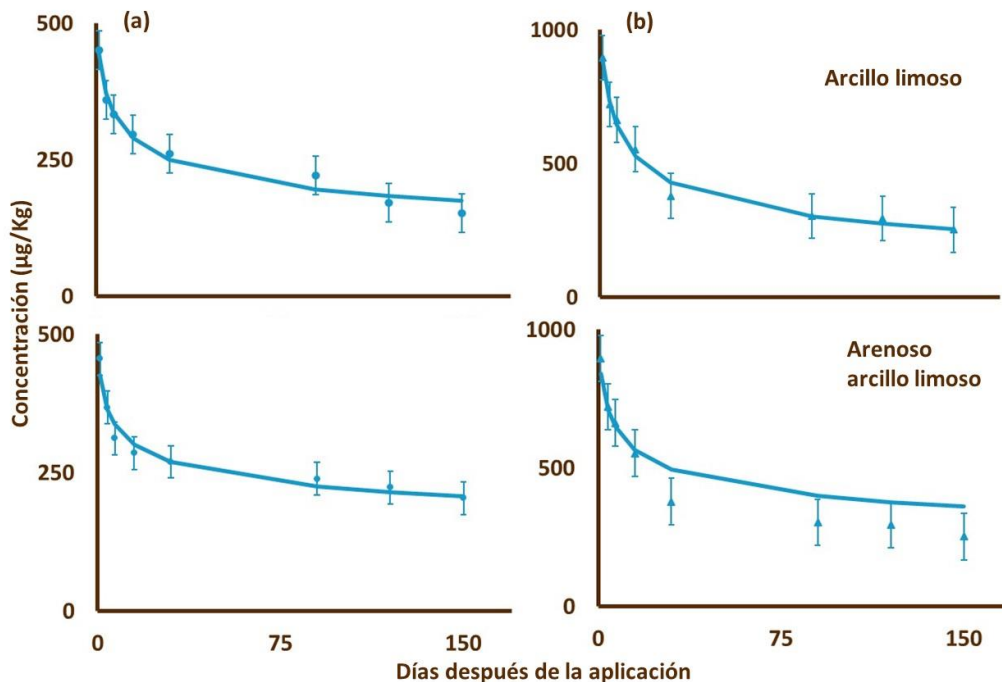


Figura 16. Curvas de disipación de propoxicarbazona en ambos tipos de suelo a: (a) dosis normal y (b) dosis doble. Ajuste — FOMC.

Tabla 18. Valores de los parámetros cinéticos del modelo FOMC para propoxicarbazona en suelo.

Parámetros	Dosis recomendada		Dosis doble	
	Arcillo limoso	Arenoso arcillo limoso	Arcillo limoso	Arenoso arcillo limoso
C_0 (µg/Kg)	505	481	995	948
β (FOMC)	1.42	0.93	2.73	1.23
α (FOMC)	0.23	0.16	0.34	0.20
DT50	28	60	30	61

Comportamiento de propoxicarbazona en agua

A diferencia del caso anterior, en todas las condiciones del estudio llevado a cabo en agua se encontró un mejor ajuste de los datos experimentales al modelo SFO como se muestra en la **Figura 17**.

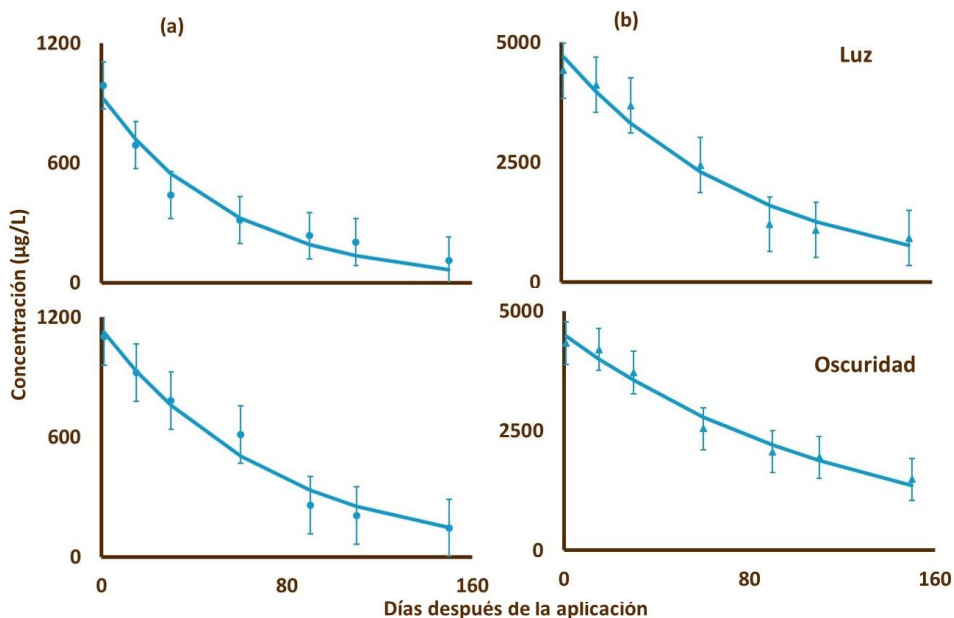


Figura 17. Curvas de disipación de propoxicarbazona en agua en condiciones de luz y oscuridad a: (a) dosis normal y (b) dosis doble. Ajuste — SFO.

Puede observarse un comportamiento similar en ambas dosis. La disipación presenta un comportamiento lineal en función al tiempo transcurrido, aunque el porcentaje de propoxicarbazona al finalizar el estudio en cada una de las situaciones (luz y oscuridad) fue ligeramente diferente. A la dosis de 1 mg/L quedaba alrededor de un 10% con luz y 13% en oscuridad, mientras que a la concentración de 5 mg/L resultó un 3.5% con luz y 34% en oscuridad. Con estos datos se puede concluir que la velocidad de disipación en condiciones de oscuridad fue más lenta que en condiciones de luz, con un

valor de vida media (DT50) menor en oscuridad (**Tabla 19**). El efecto de la luz en el agua es importante para la disipación de propoxicarbazona.

Tabla 19. Valores de los parámetros cinéticos del modelo SFO para propoxicarbazona en agua.

Parámetros	Dosis 1 mg/L		Dosis 5 mg/L	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
C ₀ (µg/L)	935	1142	4760	4511
k (días ⁻¹)	0.017	0.0136	0.012	0.008
DT50	39	50	57	86

3.1.6. Análisis retrospectivo de metabolitos de propoxicarbazona

En la **Publicación III** se profundiza en la posibilidad de incrementar el conocimiento sobre el comportamiento de los analitos en muestras ambientales, combinando la estrategia de análisis dirigido, con el análisis retrospectivo de las muestras del estudio para la búsqueda de metabolitos fruto de la degradación del plaguicida propoxicarbazona. Para el desarrollo de esta estrategia se ha construido una base de datos con los metabolitos de propoxicarbazona encontrados en bibliografía y en organismos competentes como EFSA. Los metabolitos incluidos en la base de datos de propoxicarbazona se reúnen en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Base de datos de metabolitos de propoxicarbazona para análisis retrospectivo.

Metabolito	Fórmula molecular	Masa Exacta
2-hidroxi-propoxicarbazona	C ₁₅ H ₁₈ O ₈ N ₄ S	415.09181
M02: (5-(2-hidroxi-propoxi)-4-metil-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-ona)	C ₆ H ₁₁ O ₃ N ₃	174.08732
M04: (2-(((4,5-dihidro-4-metil-5-oxo-3-propoxi-1H-1,2,4-triazol-1-yl)carbonil)amino)sulfonil ácido benzoico)	C ₁₄ H ₁₆ O ₇ N ₄ S	384.07342
M05: (Metil 2-sulfamoylbenzoato)	C ₈ H ₉ O ₄ NS	216.03250
M06: (Acido 2-sulfamoylbenzoico)	C ₇ H ₇ O ₄ NS	201.00902
M07: (1,2-benzotiazol-3(2H)-ona-1,1-dioxido)	C ₇ H ₅ O ₃ NS	184.00629
M08: (1,2-benzisotiazol-3(2H)-ona-4-hidroxi-1,1-dioxido)	C ₇ H ₅ O ₄ NS	200.00120
M09: (4-metil-5-oxo-3-propoxi-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-carboxamid)	C ₇ H ₁₂ O ₃ N ₄	190.09039
M10: (4-metil-5-propoxi-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-ona)	C ₆ H ₁₁ O ₂ N ₃	158.09240

Con esta información se realizó el análisis retrospectivo a todas las muestras del estudio de disipación y degradación y se procesaron utilizando el *software* Xcalibur™. La falta de disponibilidad comercial de patrones de alguno de los metabolitos identificados, hizo imposible su confirmación definitiva y cuantificación. En estos casos se realizó una identificación tentativa y una estimación semicuantitativa de su concentración utilizando como patrón el del plaguicida progenitor.

El análisis retrospectivo permitió la identificación tentativa de: (i) un metabolito, M10, en suelo y (ii) cuatro metabolitos en agua, 2-hidroxi-propoxicarbazona, M02, M05 y M10. Como ejemplo, la **Figura 18** muestra el cromatograma y los espectros de los metabolitos tentativamente identificados en agua, producto de la degradación de propoxicarbazona, que

cumplen los criterios de confirmación, aunque sólo se disponía del patrón de 2-hidroxi-propoxicarbazona.

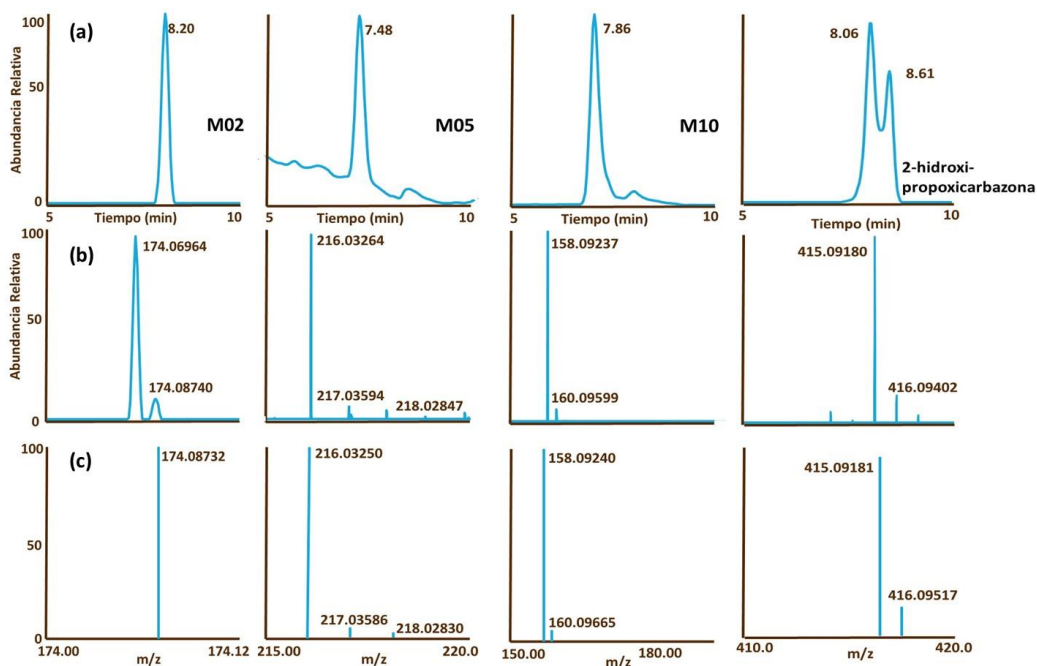


Figura 18. (a) Cromatograma de iones extraídos correspondiente al muestreo de agua del día 110 del experimento y espectros (b) *full-scan* MS experimentales, y (c) *full-scan* MS teóricos de los cuatro metabolitos tentativamente identificados.

El metabolito que se detectó a mayor concentración fue M10, tanto en suelo (0.1 y 0.02 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ a las dosis normal y doble respectivamente), como en agua (1.13 y 5.78 $\mu\text{g}/\text{L}$ en condiciones de luz a 1 y 5 mg/L respectivamente). Ello hizo pensar al principio del experimento que M10 pudiera estar presente en el propio producto comercial *Attribut*[®], o se formase al diluirlo en agua, hecho que se confirmó tras analizarlo y comprobar que tenía 130 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en la concentración de 1 mg/Kg de propoxicarbazona.

Asimismo, se estudió el comportamiento de disipación del metabolito M10 en suelo (**Figura 19**), observándose la disminución de su concentración con el tiempo, con el mismo comportamiento en ambas dosis.

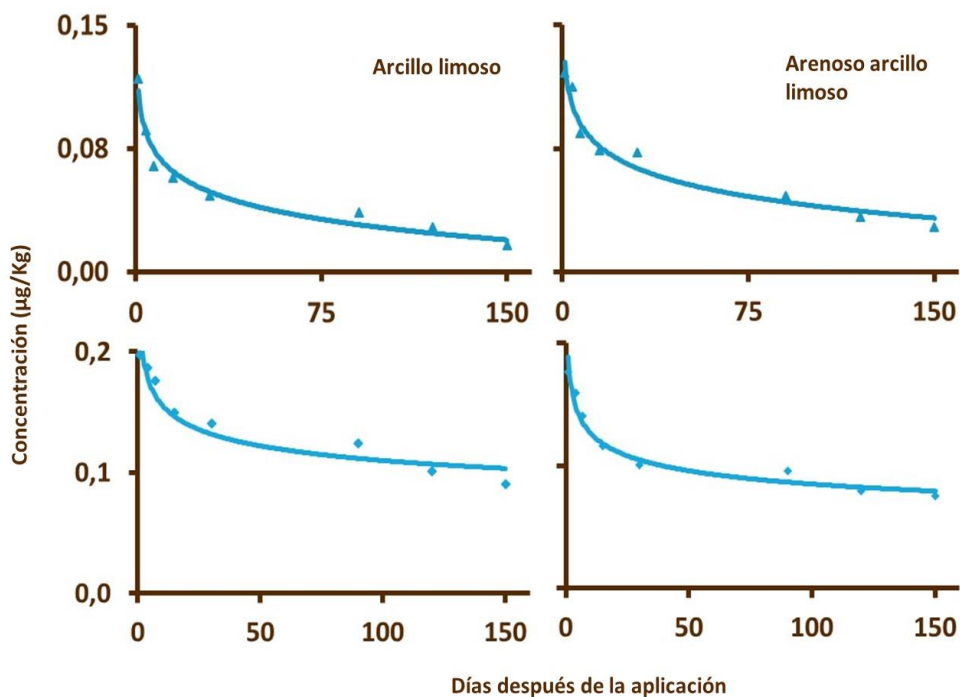


Figura 19. Curvas de comportamiento del metabolito M10 en los suelos estudiados. (▲) Dosis normal y (◆) dosis doble.

En el estudio en agua, la concentración de los metabolitos aumentó con el tiempo, tanto en condiciones de luz como de oscuridad (**Figura 20**). El nivel más alto de concentración se obtuvo para M10 llegando a alcanzar 1.13 $\mu\text{g}/\text{L}$ al final del estudio, los otros metabolitos presentaron niveles de concentración media bajos que iban de 2.9 ng/L para M02, 16.2 ng/L para M05 y 55.9 ng/L para 2-hidroxi-propoxicarbazona.

Al estudiar la distribución y formación de los metabolitos a lo largo de los experimentos, se observó que todos se encontraban desde el primer día, metabolitos primarios, a excepción de M02 que comenzó a detectarse tras 15

días. Por esta razón éste se identificó como metabolito secundario en la ruta metabólica propuesta, como se puede comprobar en la **Figura 21**.

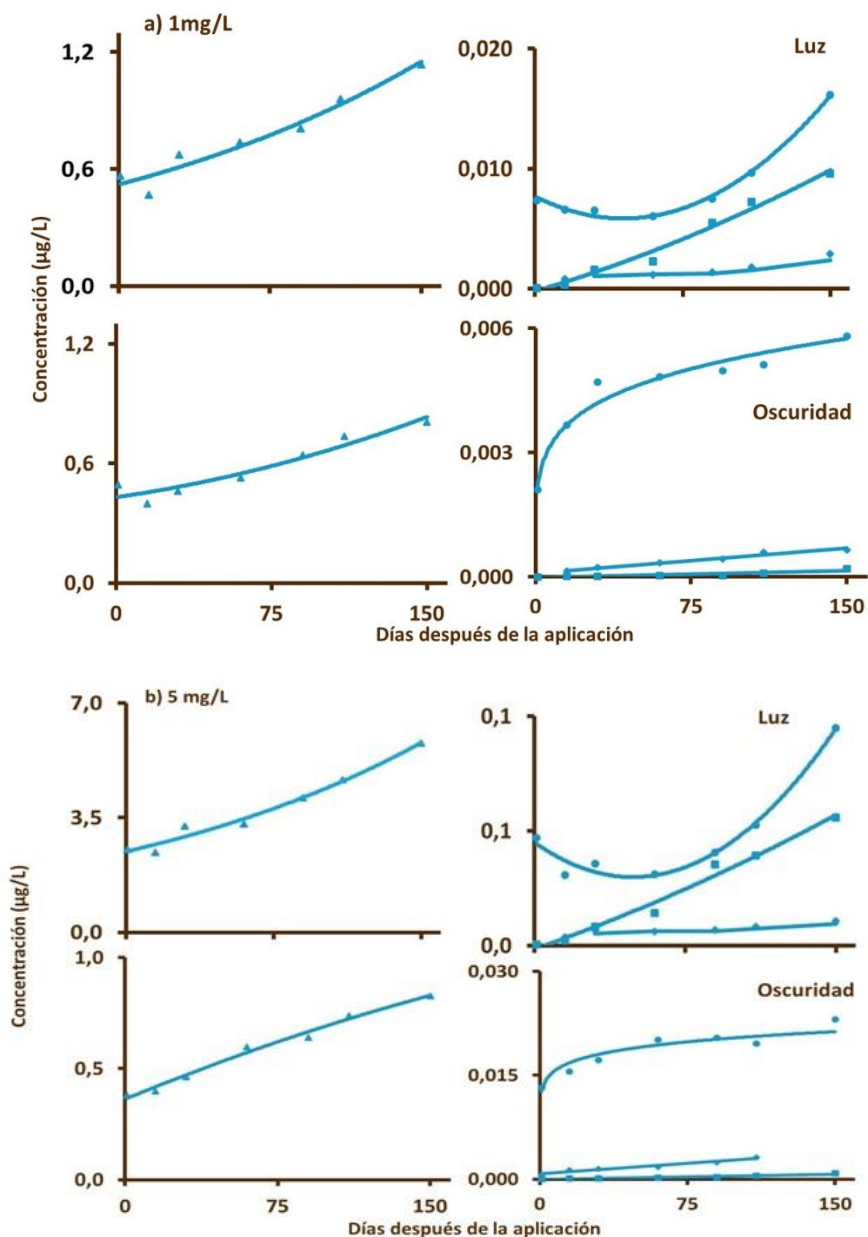


Figura 20. Curvas de comportamiento de los distintos metabolitos a lo largo del estudio de disipación en agua. (▲) M10; (●) M05; (◆) M02 y (■) 2-hidroxi-propoxycarbazona. (a) Dosis 1 mg/L y (b) Dosis 5 mg/L.

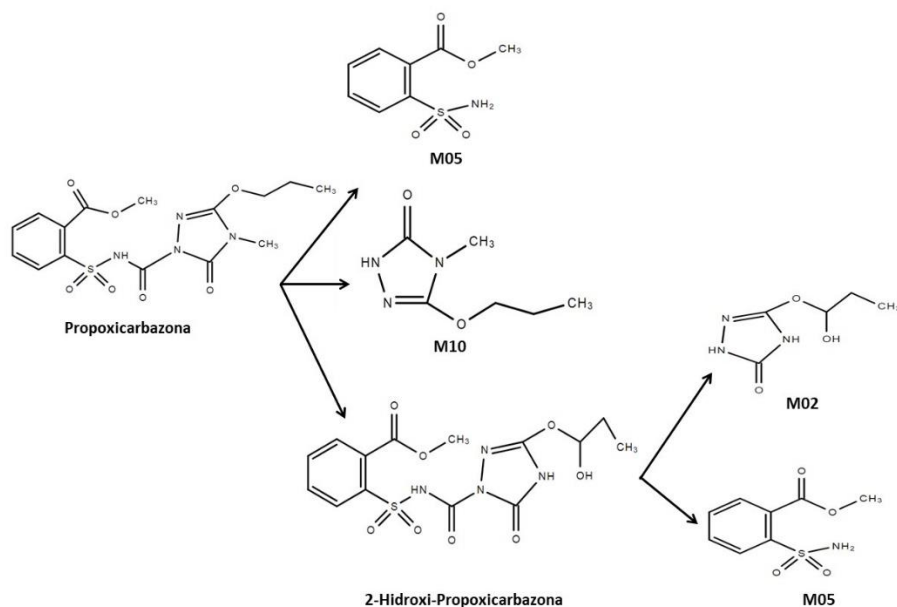


Figura 21. Ruta metabólica propuesta para la degradación de propoxicarbazona.

3.2. Disipación y degradación del fungicida fluopyram en muestras alimentarias

3.2.1. Separación por cromatografía de líquidos. Detección mediante espectrometría de masas de alta resolución con el analizador Orbitrap

El método cromatográfico utilizado para la determinación de fluopyram y sus metabolitos, fluopyram-benzamida y fluopyram-piridil-ácido carboxílico (fluopyram-PCA), (**Publicación IV**) en tomate cherry y pepino fue desarrollado a partir del método descrito en el apartado 3.1.1. basado en la técnica de LC-MS con analizador tipo Q-Orbitrap. La columna utilizada fue Zorbax plux C18 que proporcionó buena separación, tiempos de retención cortos y formas de

pico adecuadas. Se optimizó el gradiente de elución (**Figura 22**) y las condiciones cromatográficas finales son las resumidas en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Condiciones cromatográficas optimizadas.

Parámetros	Condiciones
Fase acuosa	0.1% ácido fórmico en agua
Fase orgánica	Metanol
Columna	Zorbax plus C18 (100 x 2.1 mm; 1.8 μ m)
Tª columna	25°C
Vol. Inyección	10 μ L
Flujo	0.2 mL/min
Tiempo análisis	9 min
Modo de elución	Gradiente

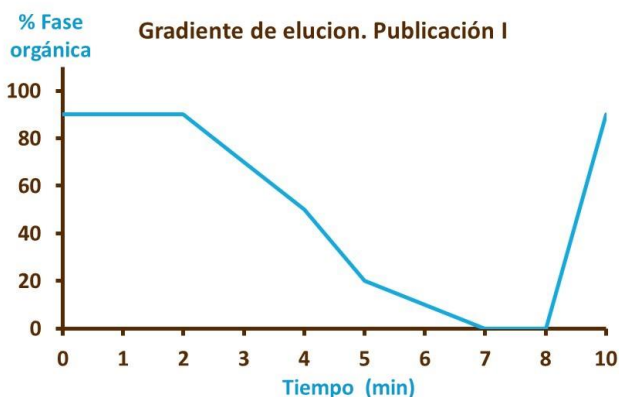


Figura 22. Gradiente de elución utilizado para la separación de fluopyram y sus metabolitos

En la **Figura 23** se puede observar un cromatograma de iones totales (TIC) con las condiciones cromatográficas optimizadas en el que se incluye además de fluopyram los metabolitos fluopyram-benzamida y fluopyram-PCA.

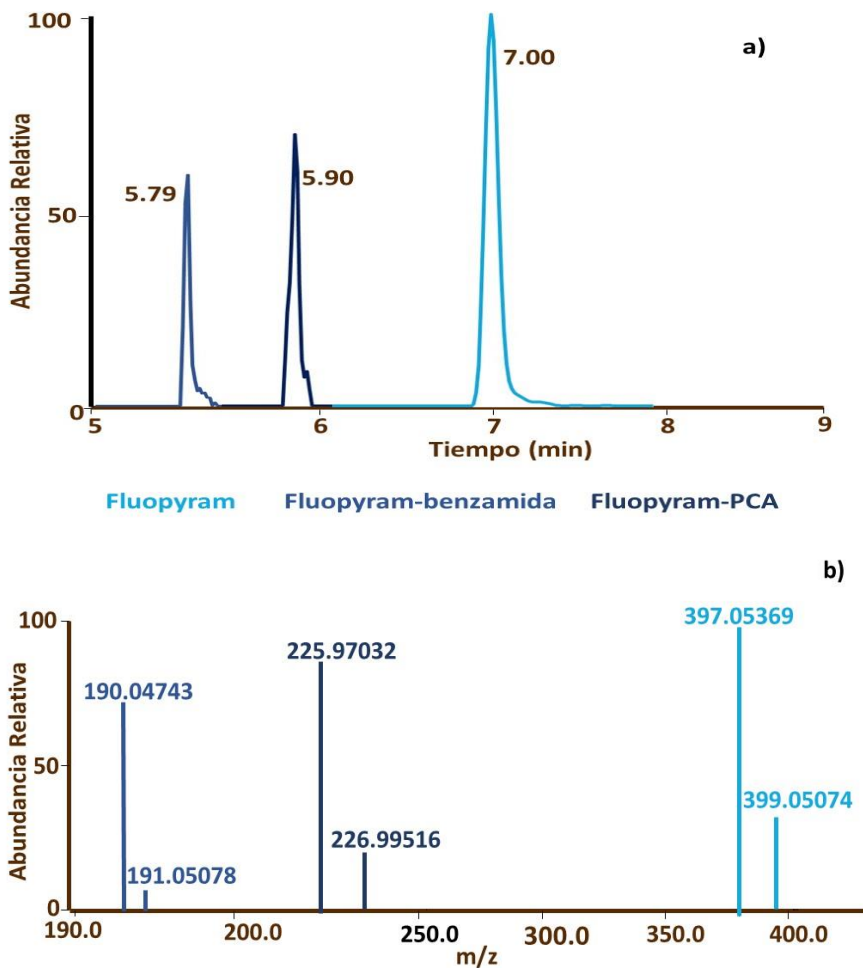


Figura 23. (a) TIC y (b) espectro de masas de fluopyram y metabolitos, correspondiente un patrón en metanol a 50 $\mu\text{g/L}$.

3.2.2. Método de extracción

Para la extracción de fluopyram y sus metabolitos en muestras de hortalizas se utilizó el método QuEChERS tamponado (AOAC 2017) (**Publicación IV**). Se compararon las recuperaciones de dos extracciones que tenían en común las sales de extracción, sulfato magnésico anhidro y acetato sódico, usando como disolvente acetonitrilo acidificado con 1% de ácido acético (extracción 1) y acetonitrilo sin acidificar (extracción 2). Con ambos métodos se obtuvieron valores de recuperación aceptables, si bien el primero

mostró ligeramente mejores porcentajes de recuperación. No fue necesario añadir etapa de limpieza al no mejorar los resultados significativamente. En la **Figura 24** se muestra el esquema de la extracción optimizada.

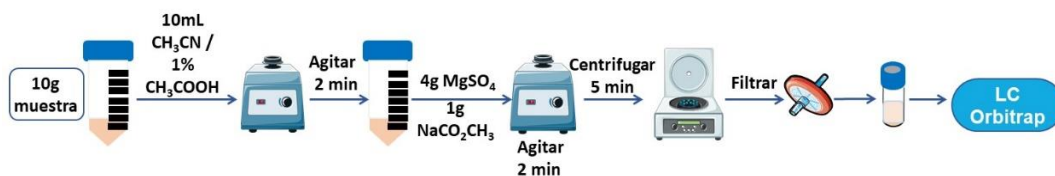


Figura 24. Método de extracción para fluopyram y metabolitos en tomate cherry y pepino.

3.2.3. Validación del método

Una vez desarrollado el método analítico, se aplicó el mismo procedimiento de validación del capítulo 2, apartado 2.1.3. Los valores obtenidos de los parámetros evaluados se reúnen en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Resumen de los resultados de la validación para fluopyram y sus metabolitos.

Parámetros validación	Resultados	
	Fluopyram + metabolitos	
Matriz	Tomate cherry	Pepino
Efecto matriz	<20%	
Linealidad (R ²)	0.99	
LOQ (µg/Kg)	5	
LOD (µg/Kg)	10	
Conc. estudiadas (µg/Kg)	10	100
Recuperación (%)	72-106	
Precisión Intra-día (%RSD)	2-15	
Precisión Inter-día (%RSD)	9-17	

3.2.4. Planificación de experimentos de campo para estudios de disipación y degradación en muestras alimentarias

Para el estudio del comportamiento de fluopyram se planificó un experimento en invernadero con cultivos de tomate cherry y pepino. La finca se dividió en cuatro parcelas de las cuales dos se destinaron al cultivo de pepino y dos al de tomate cherry. Cada cultivo fue tratado con la dosis recomendada (652 mL/ha) siguiendo las indicaciones del fabricante, y otra al doble de la dosis recomendada (1250 mL/ha). La aplicación se realizó a través del agua de riego con el producto comercial Velum-Prime® (fluopyram 40% SC). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se realizó la primera aplicación pasados 25 días del trasplante, y una segunda aplicación en ambos cultivos, transcurridos 30 días. El objetivo era aplicar al inicio del trasplante y a los 30 días para prevención de enfermedades fúngicas. El estudio se prolongó durante un mes y medio, periodo en el que se realizaron 15 muestreos (10 min, 2 h, 6 h, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 21, 28, 37, 44 días) por triplicado de forma aleatoria representativa en cada cultivo.

3.2.5. Estudio cinético de disipación y degradación de fluopyram

El comportamiento de disipación para fluopyram puede ser observado en la **Figura 25**. El comportamiento fue similar en ambos cultivos y a ambas dosis, aunque el mismo no se ajustaba a ningún modelo cinético.

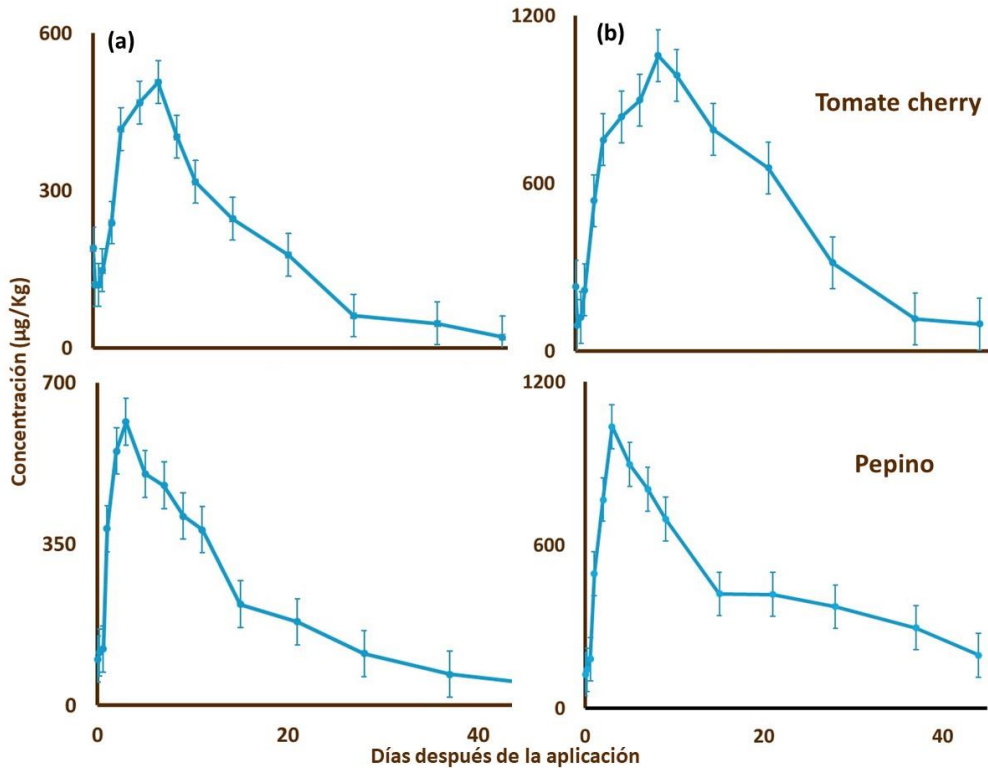


Figura 25. Comportamiento de disipación de fluopyram en tomate cherry y pepino a: (a) dosis normal y (b) dosis doble.

En tomate cherry, durante el primer día, la concentración de fluopyram sufrió un descenso para después aumentar significativamente hasta alcanzar un máximo el día 7 o 9, hecho que se constató a la dosis normal y doble respectivamente. Después de estos días la concentración comenzó a disminuir hasta el final del estudio, donde se detectó una concentración de 20 y 97 µg/Kg en cultivos tratados con dosis normal y dosis doble respectivamente. En ambos casos ello supone una disminución del 85% aproximadamente respecto a la concentración aplicada.

El comportamiento de fluopyram en pepino no sufrió la disminución inicial que se observó en el cultivo de tomate, pero si aumentó la concentración significativamente hasta el tercer día. A partir de este momento se inició una progresiva disminución de la concentración hasta el final del

estudio, alcanzando una concentración de 52 y 119 µg/Kg a dosis normal y doble respectivamente, es decir un descenso del 80% aproximadamente respecto a la concentración aplicada. En ambos cultivos, al final del periodo de muestreo, tras un mes y medio, se siguió encontrando fluopyram en concentraciones cuantificables si bien por debajo del LMR en ambos casos.

3.2.6. Análisis retrospectivo de metabolitos de fluopyram

En esta parte del trabajo de la **Publicación IV** se siguió la misma sistemática del apartado 3.1.5., construyendo una base de datos para la determinación de metabolitos generados en el proceso de degradación de fluopyram. Los metabolitos incluidos en la base de datos de fluopyram se encuentran en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Base de datos de metabolitos de fluopyram para análisis retrospectivo.

Metabolito	Fórmula molecular	Masa Exacta
Fluopyram benzamida	C ₈ H ₆ F ₃ NO ₃	190.04742
Fluopyram-7-OH	C ₁₆ H ₁₁ ClF ₆ N ₂ O ₂	413.04860
Fluopyram-8-OH		
Fluopyram-PCA ⁽¹⁾	C ₇ H ₃ ClF ₃ NO ₂	225.98771
Fluopyram-PAA ⁽²⁾	C ₈ H ₅ ClF ₃ NO ₂	240.00336
Fluopyram-ácido benzoico	C ₈ H ₅ F ₃ O ₂	191.03144
Fluopyram-metil-sulfoxido	C ₈ H ₆ SNO ₃	225.97316
AE C656948-lactam	C ₁₆ H ₁₀ F ₆ N ₂ O	361.07701

⁽¹⁾Fluopyram-PCA: Fluopyram-piridil-ácido carboxílico

⁽²⁾Fluopyram-PAA: Fluopyram-piridil- ácido acético

Los datos del análisis retrospectivo de fluopyram en ambos cultivos y concentraciones mostraron la identificación tentativa de tres metabolitos: fluopyram-PCA, fluopyram-benzamida y los isómeros de fluopyram-7-OH y fluopyram-8-OH, si bien sólo existía patrón disponible de fluopyram-PCA y fluopyram-benzamida. No fue objeto del estudio distinguir entre los isómeros.

La **Figura 26** muestra el cromatograma y los espectros de los tres metabolitos tentativamente identificados.

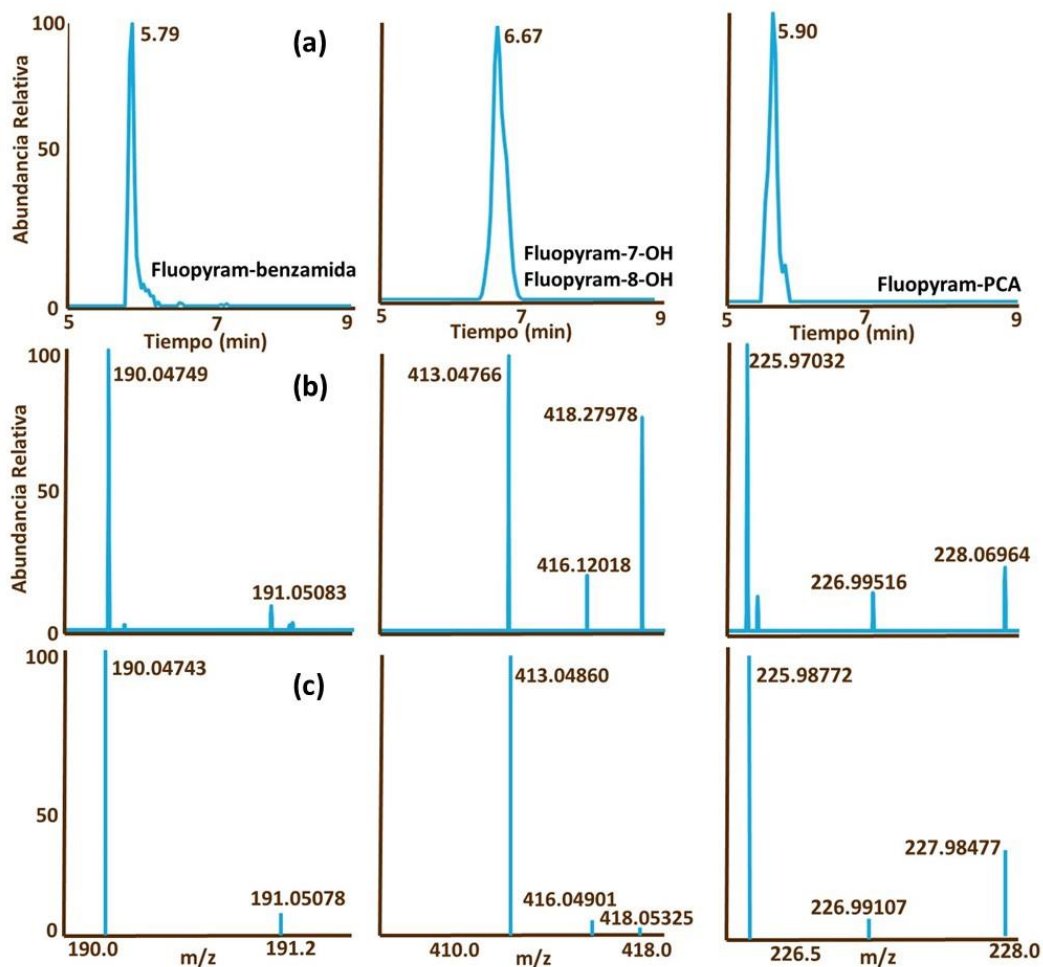


Figura 26. (a) Cromatograma correspondiente al muestreo de pepino del día 37 del experimento y espectros, (b) *full-scan* MS experimental y (c) *full-scan* MS teórico de los tres metabolitos tentativamente identificados.

Previo al estudio de los metabolitos presentes se analizó el producto Velum® para descartar que estuvieran presentes ya en el producto comercial, el resultado fue que solo se encontraba fluopyram.

Los isómeros fluopyram-7-OH y fluopyram-8-OH fueron identificados ya en la primera muestra tomada tras la aplicación del fitosanitario, manteniendo prácticamente constante su concentración hasta el final del estudio realizado en tomate y hasta 28 y 37 días en pepino, en las dosis normal y doble respectivamente. El metabolito fluopyram-PCA, así como fluopyram-benzamida, mostraron una tendencia ascendente en cuanto a la concentración a lo largo del estudio considerando las dos dosis aplicadas como se puede comprobar en la **Figura 27**. El metabolito encontrado a mayor concentración fue fluopyram-benzamida en pepino, llegando a alcanzar concentraciones de 89.5 y 161.1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, y fluopyram-PCA en tomate con valores de 46.6 y 136.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, a dosis normal y doble respectivamente.

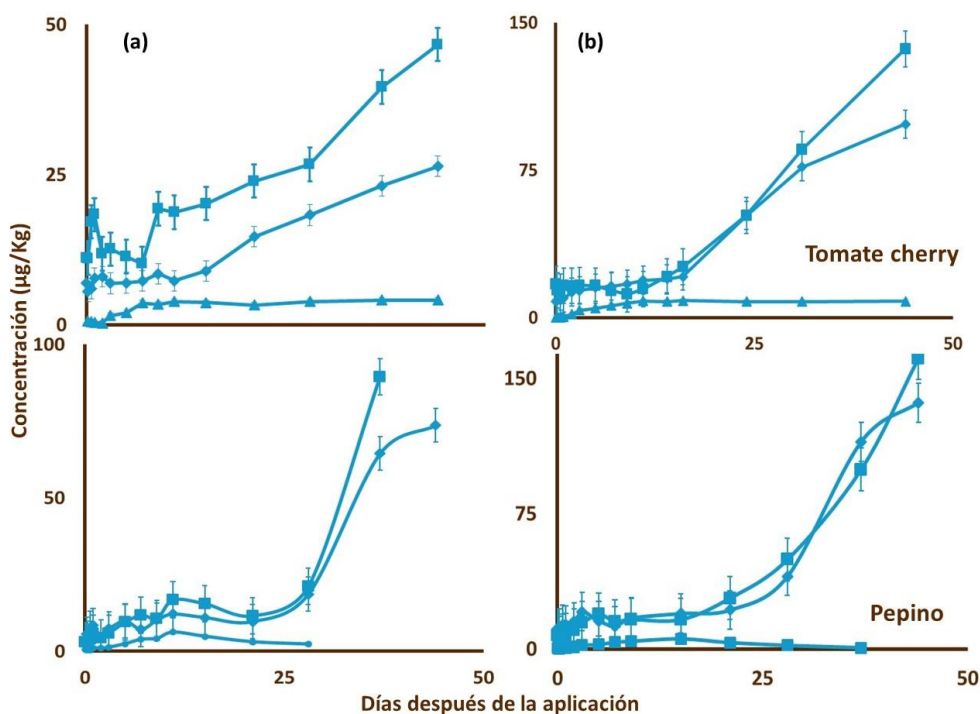


Figura 27. Comportamiento de los distintos metabolitos a lo largo del proceso de degradación a (a) dosis normal y (b) dosis doble.
 (■) Fluopyram-PCA; (◆) fluopyram-benzamida e (▲) isómeros fluopyram-7-hidroxi y fluopyram 8-hidroxi.

La ruta metabólica de degradación propuesta para fluopyram se muestra en la **Figura 28**. Fluopyram-7-hidroxi/fluopyram-8-hidroxi se forman en una primera fase, como metabolito primario, para posteriormente transformarse en los otros dos metabolitos, fluopyram benzamida y fluopyram-PCA.

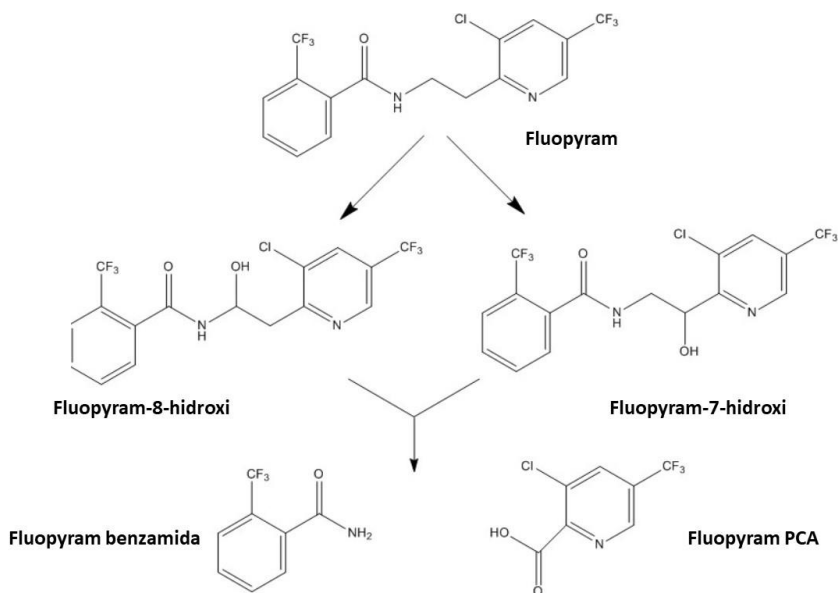


Figura 28. Ruta metabólica propuesta para la degradación de fluopyram.

Respecto a lo publicado hasta la realización de estos trabajos, estos son los primeros estudios que abordan la disipación y la degradación de propoxicarbazona y fluopyram en el que se incluyen sus metabolitos en muestras ambientales y en cultivos bajo plástico.

CAPÍTULO

5



CONCLUSIONES GENERALES

Considerando: (i) los objetivos generales de la Tesis relativos, por un lado, a la seguridad de alimentos y del medioambiente y por otro a la profundización en el conocimiento del comportamiento de plaguicidas y metabolitos una vez han sido aplicados, y (ii) los trabajos experimentales y de tratamiento de datos llevados a cabo para su consecución, las principales conclusiones son las siguientes:

- El método QuEChERS con modificaciones apropiadas ha proporcionado buenos resultados, en lo que se refiere a parámetros característicos del método analítico, para la extracción de plaguicidas y sus metabolitos de muestras sólidas (vegetales, suelo), mientras que para muestras líquidas (agua) la SPE fuera de línea ha proporcionado los mejores valores.
- La utilización de LC-QqQ-MS/MS para el control rutinario de residuos de propoxicarbazona y su metabolito en muestras de alimentos proporciona resultados satisfactorios en el campo de la seguridad alimentaria.
- La combinación de un método dirigido y no-dirigido utilizando GC-HRMS es una estrategia potente y práctica en análisis multiresiduo de plaguicidas en frutas y verduras, permitiendo determinar plaguicidas que no habían sido previamente detectados al estar fuera del alcance del método dirigido. Los límites de cuantificación alcanzados con GC-HRMS han sido muy bajos, inferiores a los LMRs establecidos en la legislación vigente. Esto es muy relevante en cuanto a su aplicabilidad a muestras como alimentos infantiles o productos ecológicos en los que es importante alcanzar las concentraciones más bajas posibles.
- Los estudios de disipación y degradación en laboratorio simulando las condiciones reales han resultado ser una buena opción para mostrar el comportamiento de los plaguicidas y de sus metabolitos en condiciones controladas.
- En conjunto, los estudios de campo y de laboratorio conducentes a la caracterización del comportamiento de plaguicidas en muestras de

origen ambiental y alimentario, así como la aplicación de métodos de análisis no-dirigido mediante el análisis retrospectivo de las muestras ha proporcionado información útil tanto en relación con la persistencia de productos fitosanitarios, como con la identificación de los metabolitos formados en la degradación de plaguicidas y por tanto la obtención de información sobre su ruta metabólica:

- Plaguicidas como propoxicarbazona permanecen en suelos y aguas más de 150 días en concentraciones detectables (152 -252 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 111-1479 $\mu\text{g}/\text{L}$), así como fluopyram en tomate cherry y pepino después de 44 días (20-97 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 52-195 $\mu\text{g}/\text{Kg}$).
- La identificación tentativa de metabolitos en muestras ambientales y alimentarias es relevante en tanto afecta a la propia definición de residuo y a la propia evaluación de riesgos.

ANEXO



DERECHOS DE

AUTOR

PUBLICACIÓN I





Optimization and establishment of QuEChERS based method for determination of propoxycarbazone and its metabolite in food commodities by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Author:

Marta Vargas-Pérez, Jesús Marín-Sáez, Francisco Javier Egea González, Antonia Garrido French

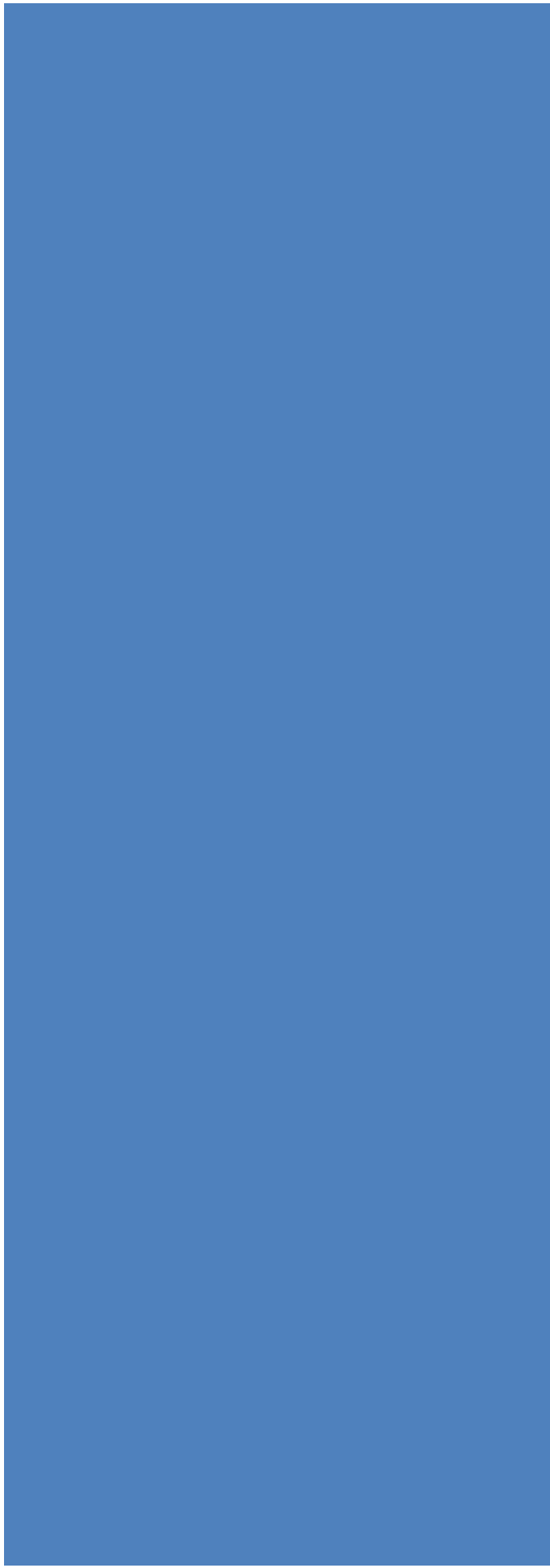
Publication: Food Chemistry**Publisher:** Elsevier**Date:** 15 February 2019*© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.*

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

PUBLICACIÓN II





Home

Help

Email Support

Marta Vargas ▾



Application of full scan gas chromatography high resolution mass spectrometry data to quantify targeted-pesticide residues and to screen for additional substances of concern in fresh-food commodities

Author:

Marta Vargas-Pérez,Irene Domínguez,Francisco Javier Egea González,Antonia Garrido Frenich

Publication: Journal of Chromatography A

Publisher: Elsevier

Date: 5 July 2020

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

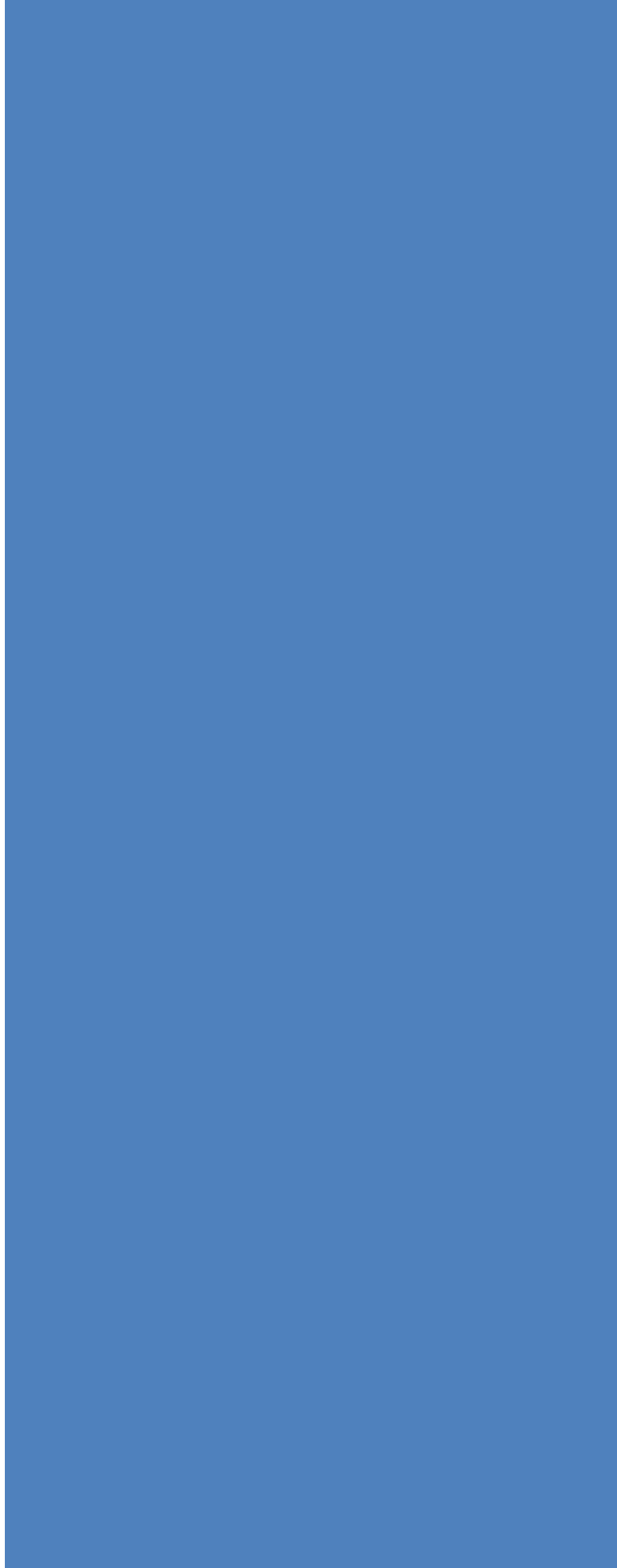
Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

PUBLICACIÓN III





Home

Help

Email Support

Marta Vargas ▾



Evaluation of the behaviour of propoxycarbazone herbicide in soils and water under different conditions. Post-targeted study

Author: Marta Vargas-Pérez, Francisco Javier Egea González, Antonia Garrido Frenich

Publication: Ecotoxicology and Environmental Safety

Publisher: Elsevier

Date: 15 November 2019

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

PUBLICACIÓN IV





Dissipation and residue determination of fluopyram and its metabolites in greenhouse crops

Author: Antonia Garrido Frenich, Francisco Javier Egea González, Marta Vargas-Pérez

Publication: Journal of The Science of Food and Agriculture

Publisher: John Wiley and Sons

Date: Jul 13, 2020

© 2020 Society of Chemical Industry

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Universidad de Almeria -- Marta Vargas ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5038150597057

[Printable Details](#)

License date Mar 29, 2021

Licensed Content

Licensed Content Publisher John Wiley and Sons
Licensed Content Publication Journal of The Science of Food and Agriculture
Licensed Content Title Dissipation and residue determination of fluopyram and its metabolites in greenhouse crops
Licensed Content Author Antonia Garrido Frenich, Francisco Javier Egea González, Marta Vargas-Pérez
Licensed Content Date Jul 13, 2020
Licensed Content Volume 100
Licensed Content Issue 13
Licensed Content Pages 8

Order Details

Type of use Dissertation/Thesis
Requestor type Author of this Wiley article
Format Print and electronic
Portion Full article
Will you be translating? No

About Your Work

Title Aplicación de técnicas de espectrometría de masas de baja y alta resolución para el estudio de plaguicidas y sus metabolitos en muestras alimentarias y ambientales
Institution name University of Almería
Expected presentation date Jun 2021

Additional Data

Order reference number 1

Requestor Location

Universidad de Almeria
La Cañada de San Urbano, Almeria

Tax Details

Publisher Tax ID EU826007151

Requestor Location

Almeria, Almeria 04120
Spain
Attn: Universidad de Almeria

Price

Total 0.00 EUR

Would you like to purchase the full text of this article? If so, please continue on to the content ordering system located here: [Purchase PDF](#)
If you click on the buttons below or close this window, you will not be able to return to the content ordering system.

Total: 0.00 EUR

[CLOSE WINDOW](#)

[ORDER MORE](#)