



# **UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**

**Departamento de Hidrogeología y Química Analítica**  
**Máster Universitario Oficial en Residuos de Plaguicidas**  
**y Contaminantes. Control Alimentario y Ambiental**

**Trabajo Fin de Máster:**

**"DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS DE CARÁCTER ÁCIDO EN**  
**SUELOS AGRÍCOLAS"**

Julio 2011

Autor: **ÁNGEL GRANDE MARTÍNEZ**<sup>1</sup>

Tutores: **PATRICIA PLAZA BOLAÑOS Y ROBERTO ROMERO GONZÁLEZ**

---

<sup>1</sup> ✉ [angelquimico@yahoo.es](mailto:angelquimico@yahoo.es)

## **TRABAJO FIN DE MASTER**

El presente trabajo ha sido realizado por Ángel Grande Martínez para la obtención del Título de Máster “Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental”, dentro del Programa de Másteres Universitarios Oficiales.

Fdo. Ángel Grande Martínez

Tutores: Patricia Plaza Bolaños y Roberto Romero González

Fdo. Patricia Plaza Bolaños

Fdo. Roberto Romero González

## **"DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS DE CARÁCTER ÁCIDO EN SUELOS AGRÍCOLAS"**

El objetivo de este Trabajo Fin de Máster es **la determinación de plaguicidas de carácter ácido en suelos agrícolas**. Este estudio supone un reto ante la dificultad para su correcta monitorización mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas y siendo el suelo la matriz objeto de estudio. Las actividades a realizar implicarán la optimización de condiciones instrumentales adecuadas para su determinación a bajas concentraciones, así como el desarrollo de un procedimiento de extracción apropiado.

## ÍNDICE

I. PRESENTACIÓN .....	5
II. MEMORIA CIENTÍFICA .....	9
1. Objeto y campo de aplicación .....	9
2. Introducción .....	10
2.1. Situación socio-económica .....	10
2.2. Compuestos objeto de estudio .....	11
2.3. Legislación .....	14
2.4. Técnicas de pre-tratamiento de muestra .....	16
2.5. Técnicas de determinación .....	19
2.5.1. Técnicas de separación: cromatografía de líquidos .....	19
2.5.2. Técnicas de detección: espectrometría de masas .....	23
3. Experimental .....	34
3.1. Reactivos y aparatos .....	34
3.2. Análisis mediante UHPLC-Orbitrap-MS .....	35
3.3. Tratamiento de muestra .....	37
4. Resultados y discusión .....	38
4.1. Identificación y confirmación de los analitos .....	38
4.2. Optimización del método UHPLC-Orbitrap-MS .....	41
4.3. Optimización del método de extracción .....	45
4.3.1. Etapa de limpieza: Reducción del efecto matriz .....	48
4.4. Validación de la metodología optimizada .....	50
4.5. Aplicación del método de análisis a muestras reales .....	53
IV. CONCLUSIONES .....	56
V. PROPUESTAS PARA EL FUTURO .....	58
VI. REFERENCIAS .....	59

## I. PRESENTACIÓN

El Máster Universitario Oficial "RESIDUOS DE PLAGUICIDAS Y CONTAMINANTES. CONTROL ALIMENTARIO Y AMBIENTAL", Curso 2010-2011, consta de 60 créditos ECTS y se estructura en cinco Módulos, tres fundamentalmente de contenido teórico, el cuarto de carácter práctico y el último de ellos corresponde al desarrollo del Trabajo Fin de Máster (TFM).

Además, el Máster ha sido seleccionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno Español para el Programa *Pablo Neruda* de movilidad académica con países latinoamericanos.

Un tema de especial interés es la seguridad alimentaria y el control ambiental en lo que se refiere a la presencia de residuos y contaminantes en alimentos o matrices medioambientales. Este Máster aborda el estudio del significado de los compuestos de interés, la organización de laboratorios, y la aplicabilidad de técnicas avanzadas de análisis, sin olvidar aspectos normativos, para conseguir una formación suficiente en el ámbito profesional y para la iniciación a la investigación.

El contenido de los módulos se describe a continuación:

### **MÓDULO I – PLAGUICIDAS**

Consta de las siguientes asignaturas:

- Plaguicidas. Aplicaciones y tendencias (3 créditos)
- Políticas de seguridad alimentaria (3 créditos)
- Registro de plaguicidas (3 créditos)
- Formulaciones de plaguicidas. Liberación controlada (3 créditos)

En este módulo se pretende proporcionar y complementar la formación general, acerca de distintas disciplinas científicas que soporten el control alimentario y ambiental de residuos de plaguicidas. Se adquiere una visión general sobre las medidas reguladoras del control de residuos de plaguicidas y contaminantes en alimentos, tanto en el ámbito internacional como nacional y autonómico. Así como el conocimiento de los objetivos y procedimientos para el registro de plaguicidas dentro del marco normativo y administrativo

en España y Europa (propuesta REACH, *Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals*). Por último, se han tratado los fundamentos, tipos y aplicaciones agronómicas de las formulaciones de liberación controlada de plaguicidas, considerando aspectos tales como eficacia y medioambiente.

## **MÓDULO II – CONTAMINANTES**

Consta de las siguientes materias:

- Calidad y trazabilidad alimentaria (3 créditos)
- Contaminantes. Significación alimentaria y ambiental (3 créditos)
- Contaminación y remediación de suelos (3 créditos)

Este módulo ha sido orientado para ofrecer una amplia visión sobre los sistemas de gestión de la calidad y seguridad alimentaria, el fraude alimentario y las estrategias analíticas para su detección, los sistemas de trazabilidad alimentaria y el marco legislativo en que se encuentran. De la misma manera ha comprendido formación en toxicología general, y más ampliamente en toxicología alimentaria y ambiental. Por último, se proporcionó una visión general sobre la constitución del suelo y los procesos de contaminación y remediación de suelos.

## **MÓDULO III – GESTIÓN DE LABORATORIOS**

Consta de las siguientes materias:

- Muestreo. Preparación de muestras (3 créditos)
- Tratamiento de datos analíticos. Control de calidad (3 créditos)
- Gestión de la calidad en laboratorios (3 créditos)

En este módulo se incide sobre la importancia del muestreo y el tratamiento de muestra en la totalidad del método analítico. Se consideraron los tipos de muestreo, la incertidumbre asociada, el diseño de un plan de muestreo, así como la legislación relacionada. Se han expuesto los objetivos y tendencias en la etapa de tratamiento de muestra, así como las principales técnicas de preconcentración en análisis de trazas. Se ha mostrado la utilidad de las herramientas estadísticas para asegurar la adecuada

comparación de las medidas, el diseño de experimentos, validación de métodos y control de calidad. Finalmente, también se abordaron aspectos básicos de la gestión de calidad en los laboratorios de ensayo, así como las actividades necesarias para evaluar y asegurar la calidad en los mismos.

#### **MÓDULO IV – EXPERIMENTACIÓN EN TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**

Consta de las siguientes asignaturas:

- Espectrometría de masas (3 créditos)
- Exposición a plaguicidas (3 créditos, optativa)
- Experimentación en técnicas cromatográficas (9 créditos)

El objetivo de este módulo es la adquisición de conocimientos sobre los fundamentos de la técnica de espectrometría de masas (MS) y los distintos tipos de fuentes de ionización, analizadores, modos de trabajo, criterios de identificación y modos de cuantificación aplicados en el desarrollo de métodos de análisis de contaminantes y plaguicidas. Se abordó la aplicación de estas técnicas, junto con técnicas cromatográficas, de una manera teórico-práctica para familiarizarnos con el manejo de equipos y las técnicas más modernas y relevantes en lo que a control de plaguicidas y contaminantes orgánicos se refiere. Además se adquirieron conocimientos sobre las metodologías analíticas para la evaluación de riesgos de exposición humana a plaguicidas como consecuencia de su aplicación en cultivos intensivos.

#### **MÓDULO V – TRABAJO FIN DE MÁSTER (15 CRÉDITOS)**

El Trabajo Fin de Máster titulado: "*Determinación de plaguicidas de carácter ácido en suelos agrícolas*" ha sido realizado en el Grupo de Investigación Química Analítica de Contaminantes (FQM-170), perteneciente al Departamento de Hidrogeología y Química Analítica, Universidad de Almería.

En el desarrollo de este trabajo de investigación he adquirido habilidades y conocimientos para:

- Búsqueda de información bibliográfica y legislación relacionada, en la etapa previa al desarrollo de un trabajo científico.

- Planificar y llevar a cabo estudios científicos relacionados con la presencia de residuos de plaguicidas en suelos.
- Tener criterios para realizar de forma correcta la toma de muestras, así como para la gestión de las mismas.
- Aplicar distintas técnicas de tratamiento de muestra y optimizar métodos de extracción.
- Desarrollar y validar métodos de análisis de residuos de plaguicidas y contaminantes orgánicos mediante UHPLC-Orbitrap-MS.
- Evaluar los resultados obtenidos tras la etapa de análisis y obtener conclusiones acerca de la eficacia del método.
- Llevar a cabo un tratamiento de datos, tanto en la etapa de validación del método como en la posterior aplicación del mismo a muestras reales, donde ha sido necesario procesar, evaluar, sintetizar y obtener conclusiones de la información obtenida.

En definitiva, los conocimientos adquiridos proporcionan la aptitud necesaria para poder planificar, documentar, desarrollar, validar y aplicar de forma autónoma métodos para el análisis de contaminantes orgánicos.

Finalmente indicar que la realización del Máster me ha permitido adquirir competencias transversales, entre ellas capacidad de planificación y organización, siendo focalizadas siempre con criterios de calidad y eficacia. Considero que estas destrezas adquiridas son fundamentales tanto para la para mi desarrollo profesional posterior como para poder llevar a cabo un posible trabajo de investigación.



## **II. MEMORIA CIENTÍFICA**

### **1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN**

Hoy en día es indudable la importancia y necesidad de los productos fitosanitarios para mantener los niveles de producción de alimentos que demanda la población mundial. Los plaguicidas aumentan el rendimiento de las cosechas, evitando pérdidas debidas a animales, plantas y microorganismos que tienen un efecto negativo sobre la producción agrícola. Otros factores de vital importancia en el rendimiento de producción recaen sobre las necesidades de agua, fertilizantes, así como en la mejora genética de productos, que al igual que los plaguicidas juegan un papel trascendental en la agricultura.

El objetivo de este trabajo es la determinación de plaguicidas de carácter ácido en suelos agrícolas y su posterior análisis mediante UHPLC-Orbitrap-MS. Este tipo de materias activas presentan masas moleculares bajas y poseen especiales características que dificultan su monitorización mediante las técnicas de análisis más frecuentes. Una de las opciones más utilizadas para su determinación es la derivatización. Sin embargo, esta etapa incrementa el tiempo total de análisis, siendo deseable el desarrollo de nuevos métodos que eviten este paso, lo que reduce tanto el coste del análisis como el tiempo empleado. Hasta ahora son muy escasos los estudios e investigaciones con este enfoque y supondría un importante avance respecto al examen de estos compuestos y sus derivados, debido a las peculiares características de estas moléculas y a su dificultad de determinación y cuantificación en matrices tan complejas como el suelo.

Para la realización del estudio llevado a cabo en este Trabajo Fin de Máster se ha procedido a:

- Buscar y desarrollar las condiciones óptimas para el análisis de este tipo de plaguicidas mediante UHPLC-Orbitrap-MS.
- Optimizar el método de extracción de plaguicidas ácidos en suelos agrícolas.
- Validar el método analítico optimizado.
- Aplicar el método desarrollado a muestras reales de suelos.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Situación actual y planteamiento del problema

Durante los últimos 20-30 años, el uso de productos fitosanitarios, tanto plaguicidas como fertilizantes, ha ido creciendo ya que en el ámbito de la agricultura el objetivo es aumentar el rendimiento de producción y evitar las pérdidas producidas por entes bióticos. El modelo de agricultura intensiva que prima actualmente en nuestra sociedad hace necesario el uso de estos productos, pero cada vez hay más voces críticas hacia ellos y sus posibles efectos adversos tanto en la salud humana y animal, como en el medioambiente, por lo que su utilización, aunque sigue en aumento no crece a un ritmo tan acelerado como cuando se inició su comercialización (Figura 1) [1].

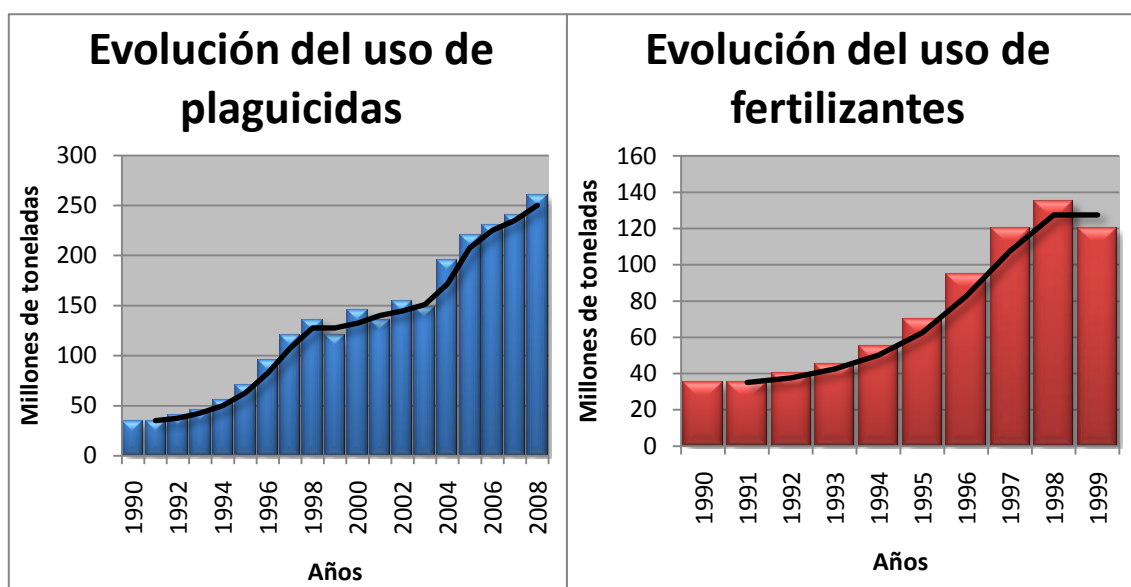


Figura 1. Incremento del uso de plaguicidas y fertilizantes a nivel mundial.

La tendencia en la actualidad es la reducción del uso de plaguicidas, centrándose las nuevas investigaciones en el uso de productos naturales para combatir los efectos no deseados en producción agrícola de insectos, plantas o microorganismos y el control integrado de plagas, sustituyendo, en cierta medida, los fitosanitarios por organismos o agentes biológicos que luchan contra las plagas.

El empleo sistemático de plaguicidas ha supuesto, sin lugar a dudas, una gran mejora en la calidad de vida mundial. Sin embargo, a pesar de los importantes resultados obtenidos al comienzo de su utilización, han surgido problemas asociados, al observarse que la aplicación masiva e indiscriminada de estos productos tenía consecuencias sobre la

salud humana, el medio ambiente, e incluso, sobre la efectividad del tratamiento. Los productos fitosanitarios tienen que estar rigurosamente controlados y su aplicación debe realizarse correctamente, respetando la dosis indicada y los plazos de seguridad previstos. El análisis de residuos debe realizarse tanto sobre el cultivo en el que es aplicado el fitosanitario como en su entorno medioambiental, fundamentalmente en aire, agua y suelo. En este sentido, la clave está en buscar un equilibrio entre la aplicación de plaguicidas, el uso racional del agua y los fertilizantes, así como la introducción de avances biotecnológicos en el mundo de la agricultura. La agricultura sostenible se basa en utilizar los aspectos positivos de la agricultura intensiva combinándolos con los de la agricultura ecológica, de manera que se obtenga una óptima rentabilidad y aprovechamiento de los recursos. El abusar de cualquiera de estos medios no favorece la producción, ni al ser humano, ni al medioambiente, pero una correcta utilización e interrelación entre todos ellos nos ayudaría a obtener mejores cosechas, mayores rendimientos y, en definitiva, un óptimo aprovechamiento de la agricultura y los avances relacionados [2, 3].

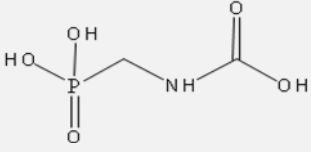
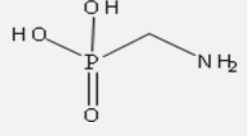
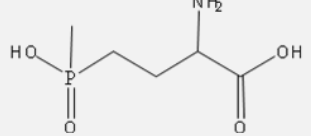
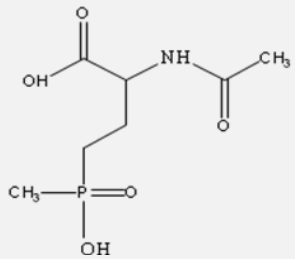
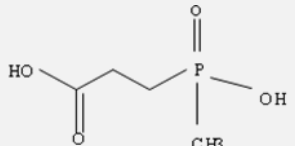
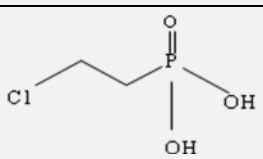
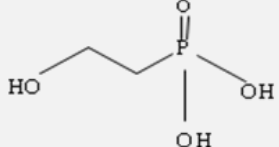
Desde el punto de vista del problema analítico, la dificultad en el análisis de plaguicidas viene condicionada por la variedad de estructuras y propiedades físico-químicas existentes en estos compuestos, así como a la complejidad de algunas matrices y a los bajos niveles permitidos por la legislación, que suelen estar en el orden de los  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (niveles traza). El control de estos productos se suele realizar sobre el plaguicida inalterado, pero en ciertos casos se consideran también los productos de transformación que derivan de estas materias activas [4]. Además, ciertos productos fitosanitarios tienen unas peculiares características que dificultan su análisis, como puede ser bajo peso molecular y alta polaridad (carácter iónico). Por otro lado, en relación a la matriz estudiada, la consideración de los niveles de residuos de plaguicidas y fitosanitarios en suelos agrícolas es importante ya que sobre ellos se cultivan los alimentos y plantas que posteriormente serán la base de nuestra cadena alimentaria, además de tener en cuenta que mediante lixiviación o escorrentía se podrían contaminar acuíferos o aguas superficiales, lo cual es de relevancia a nivel medioambiental.

## **2.2. Compuestos objeto de estudio**

Los plaguicidas ácidos objeto de estudio, glifosato (N-fosfometilglicina), glufosinato (ácido 2-amino-4-(hidroxi(metil)fosfonil)butanoico), etefón (ácido 2-

cloroetilfosfónico) y sus productos de transformación (TPs), AMPA (ácido aminometilfosfónico), NAG (N-acetilglufosinato), MPP (ácido 3-(hidroxi(metil)fosfinoil)propiónico y HEPA (ácido 2-hidroxietilfosfónico) presentan ciertas dificultades en su determinación, debido a su carácter ácido y a que son moléculas con un reducido tamaño (Tabla 1).

**Tabla 1.** Compuestos objeto de estudio.

Compuesto	Fórmula molecular	Masa Monoisotópica	Estructura
Glifosato	$C_3H_8NO_5P$	169.01400	
AMPA	$CH_6NO_3P$	111.00852	
Glufosinato	$C_5H_{12}NO_4P$	181.05039	
NAG	$C_7H_{14}NO_5P$	223.06095	
MPP	$C_4H_9O_4P$	152.02384	
Etefón	$C_2H_6ClO_3P$	143.97430	
HEPA	$C_2H_7O_4P$	126.00819	

El glifosato es un ácido orgánico débil que se utiliza como herbicida no selectivo de amplio espectro, de naturaleza post-emergente, desarrollado para eliminación de hierbas y arbustos, en ambientes agrícolas, forestales y paisajísticos [5 - 7]. Esta materia activa se absorbe por las hojas (absorción foliar), no actúa sobre las semillas que existieran por debajo del suelo y tampoco en las raíces (es un herbicida sistémico). Se caracteriza por su buena traslocación (transporte de agua, minerales o compuestos orgánicos en el interior de la planta), tiene una alta actividad y un amplio campo de acción [8]. La actividad herbicida del glifosato es debida a que suprime la capacidad de generar aminoácidos aromáticos. La adsorción del glifosato en suelos es la responsable de la mayor pérdida de la acción herbicida. El glifosato se queda fuertemente unido a las partículas del suelo, razón por la cual es menos proclive a contaminar corrientes de agua, como consecuencia de la escorrentía o la percolación de residuos provenientes de aplicación del herbicida [9, 10]. El glifosato no es un herbicida de acción residual prolongada y su efecto es de corta duración en los suelos, siendo degradado por procesos fotoquímicos, químicos y biológicos, aunque el más importante es la descomposición enzimática por efecto de los microorganismos del suelo, la cual origina metabolitos, tales como el AMPA. Además, dióxido de carbono, agua, nitrógeno y ciertos fosfatos son otros productos generales de degradación del glifosato [11].

En lo que respecta al glufosinato [12, 13], también se trata de un herbicida no selectivo, de contacto, con acción sistémica parcial, absorbido principalmente por las hojas y en menor medida por las partes verdes de los tallos, ejerciendo un ligero efecto de traslocación que varía de unas especies a otras [14]. El glufosinato es un inhibidor de la glutaminasintetasa, una enzima que cataliza la combinación de ácido glutámico y amoníaco, lo que conlleva que la planta tratada muera debido a la acumulación de amoníaco y el cese de la fotosíntesis por la falta de glutamina [15]. Esta materia activa se degrada biológicamente en el suelo muy rápidamente y no se lixivia porque es adsorbido por los coloides del suelo en los estratos superiores. La presencia de sus dos principales productos de transformación, el NAG y el MPP, implica una utilización previa del glufosinato. Otros productos de degradación que pueden originarse son ácido fosfórico, metano, amoníaco, dióxido de carbono y agua [16].

El último compuesto considerado es el etefón [17, 18]. En este caso, no se trata de un plaguicida, si no de un fitoregulator de crecimiento de las plantas muy ampliamente utilizado, con propiedades sistémicas que actúa sobre la maduración y coloración de los frutos [19]. En el suelo y en las plantas, el etefón se degrada a ácido fosfórico, etileno y ácido clorhídrico. La degradación es rápida y su vida media es de 7 días en condiciones

aerobias y de 5 días, en anaerobias. El etefón es adsorbido fuertemente por el suelo y por su baja movilidad, no se lixivia. El producto de transformación más importante del etefón es el HEPA [20].

### **2.3. Legislación**

La aplicación y el uso de productos fitosanitarios en agricultura y ganadería no están exentos de riesgos, puesto que dichos productos pueden quedar en forma de residuos e incorporarse en la cadena alimentaria. Así, estudios conducidos por la Agencia de Protección Medioambiental estadounidense (EPA) [21] para evaluar la magnitud de exposición no laboral a plaguicidas entre la población general, concluyen que la exposición dietaria es la ruta que genera el mayor impacto.

Fundamentalmente toda la legislación relacionada con el uso de plaguicidas se centra en la Seguridad Alimentaria y el establecimiento y control de los llamados límites máximos de residuos (LMR) de los analitos de interés [22 - 26]. El LMR es el límite legal superior de concentración de un residuo de plaguicida en alimentos o piensos [27]. En caso de no especificarse legalmente, se entiende que el LMR es por defecto de 0.01 mg/kg.

Tanto a nivel de la Unión Europea (UE) como en los EEUU y en otros países occidentales, los LMRs son vigilados estrictamente y el objetivo de este control es asegurar que los niveles de residuos se mantengan conforme a la legalidad.

Sin embargo, y a pesar de la extensa legislación en el ámbito alimentario, la normativa en el campo medioambiental es mucho más reducida, y especialmente en el caso de los analitos estudiados. Es posible encontrar documentación referente a los efectos en la salud de los plaguicidas objeto de estudio: glifosato [28, 29], glufosinato [30, 31], etefón [32, 33] y sus correspondientes TPs, pero paradójicamente, no hay legislación específica referente a niveles máximos o concentraciones máximas permitidas en matrices medioambientales tales como suelo. Esta legislación es escasa y está poco actualizada, aunque a nivel comunitario hay una gran preocupación en este campo que poco a poco se va actualizando y sobre el que cada vez se realizan controles más estrictos. El objetivo fundamental de todo este entramado legislativo es la protección de la salud humana y del medioambiente frente a cualquier agente que pueda causar daño en ellos [34]. Por este motivo, se puede tomar como referencia la legislación vigente en relación a los niveles de

plaguicidas en suelos agrícolas, dentro del marco medioambiental. Finalmente, aunque la matriz objeto de estudio, suelo, no es de tipo alimentaria, hay que tener en cuenta que estos pueden servir como reservorio de plaguicidas, encontrándose residuos de los mismos que pueden afectar a futuros cultivos y, consecuentemente, puede tener lugar la contaminación de los frutos finales.

En el ámbito legislativo nacional cabe destacar el Real Decreto 9/2005 [35]. Este Real Decreto clasifica los diferentes usos del suelo (incluidos suelos agrícolas), hace referencia a las actividades potencialmente contaminantes del mismo y establece los estándares para la declaración de suelos contaminados. En dicho documento se definen los niveles genéricos de referencia (NGRs), como la concentración de una sustancia contaminante en el suelo que no conlleva un riesgo superior al máximo aceptable para la salud humana o los ecosistemas, siendo éstos comparables a los LMRs definidos para alimentos. Hay definidos NGRs para ciertos plaguicidas, aunque fitosanitarios como los incluidos en este estudio están fuera de consideración en esta legislación nacional.

Debido a la ausencia de LMRs definidos en suelos agrícolas y teniendo en cuenta que los NGRs definidos en el Real Decreto 9/2005 no están establecidos para los analitos en estudio, se ha considerado como referencia los LMRs establecidos en vegetales por la UE. En la Tabla 2 se muestra un resumen de los LMRs definidos para las matrices alimentarias más relevantes en relación al uso de los productos fitosanitarios seleccionados [36].

**Tabla 2.** LMRs descritos para plaguicidas ácidos en hortalizas y cereales.

<b>Matriz</b>	<b>Glifosato</b>	<b>Glufosinato</b>	<b>Etefón</b>
	<b>LMR (mg/kg)</b>	<b>LMR (mg/kg)</b>	<b>LMR (mg/kg)</b>
<b>Soja</b>	20.00	2.00	0.10
<b>Maíz</b>	0.10	0.10	0.05
<b>Pimiento</b>	0.10	0.10	0.05
<b>Tomate</b>	0.10	0.10	1.00
<b>Pepino</b>	0.10	0.10	0.05

Destacar que a efectos de cumplimiento de los LMRs, hay que tener en cuenta la definición de residuo para cada uno de estos compuestos. Así, se establece como residuo la

suma de la materia activa y sus productos de degradación, que en el caso de glifosato, glufosinato y etefón vienen definidos de la siguiente forma:

$$\text{Residuo de glifosato} = [\text{Glifosato}] + [\text{AMPA}]$$

$$\text{Residuo de glufosinato} = [\text{Glufosinato}] + [\text{NAG}] + [\text{MPP}]$$

$$\text{Residuo de etefón} = [\text{Etefón}] + [\text{HEPA}]$$

#### **2.4. Técnicas de pre-tratamiento de muestra**

La extracción es la primera etapa de la preparación de la muestra y una etapa crítica en el proceso analítico, debido a que la optimización de esta etapa conlleva una serie de dificultades como consecuencia de la complejidad de la matriz y la baja concentración que suelen presentar las materias activas objeto de estudio. El objetivo de esta etapa del método analítico es aislar los analitos de la matriz de la forma más completa posible evitando la presencia de interferencias. Por tanto, hay que evaluar la naturaleza no sólo del analito sino también de la matriz, para que la extracción sea lo más eficiente posible.

Una de las técnicas de extracción más empleadas es la extracción sólido-líquido (SLE). La SLE es fácil de utilizar y no requiere un equipamiento especial; sin embargo, presenta varias desventajas debido al uso de volúmenes relativamente elevados de disolventes orgánicos. Además, los extractos orgánicos obtenidos normalmente tienen que ser concentrados y sometidos a procesos de purificación con el fin de alcanzar los bajos límites de detección requeridos. Los métodos clásicos que emplean SLE son, normalmente, laboriosos y difíciles de automatizar.

De manera general y especialmente en los laboratorios de rutina, existe un gran interés en el desarrollo de nuevas técnicas de extracción para la preparación de las muestras y su posterior análisis, que resulten rápidas, selectivas, de bajo coste y cuya automatización sea posible. Entre estas nuevas técnicas de extracción utilizadas en la preparación de muestras para el análisis de residuos de plaguicidas podemos destacar la extracción y microextracción en fase sólida (SPE y SPME, respectivamente) [37], extracción mediante barra agitadora (SBSE) [38], extracción con líquidos presurizados (PLE) [39] y las metodologías tipo QhEChERS [40, 41].



1. Extracción sólido-líquido (SLE, *solid liquid extraction*)

Esta técnica consiste en mezclar la muestra con un disolvente adecuado de manera que los analitos se transfieran hacia dicho disolvente; la extracción se basa en la diferente afinidad de los analitos por dos fases. El analito se transfiere desde una matriz sólida a un disolvente seleccionado (fase líquida) [42]. Marín *et al.* [43] utiliza este procedimiento para la extracción de etefón de manzana, cereza y tomate. Aunque la matriz objeto de estudio es muy diferente, el fundamento es el mismo, ya que el analito se transfiere desde una matriz sólida a un disolvente seleccionado. Se puede realizar de distintas formas dependiendo de la fortaleza de las interacciones entre los analitos y la matriz. La extracción con agitación [44], la extracción Soxhlet y la extracción asistida por ultrasonidos (USE) [38, 45, 46] son procedimientos SLE utilizados para la determinación de plaguicidas.

2. Extracción en fase sólida (SPE, *solid phase extraction*)

La SPE es una de las técnicas más populares y ampliamente utilizadas en los laboratorios analíticos, dada su gran versatilidad y variedad de aplicaciones. Esta técnica se basa en la diferente afinidad de los analitos por una fase sólida que está contenida en un cartucho o disco de extracción. Shenck *et al.* [47] describe dos estrategias aplicables en SPE: el aislamiento del analito ó el aislamiento de la matriz. En la primera modalidad, el objetivo es conseguir la máxima retención de los analitos y la mínima de los compuestos de la matriz; mientras que en la segunda variante, se pretende la elución de los analitos, habiendo quedado retenidas las interferencias de la matriz en el relleno. El proceso que normalmente se lleva a cabo es la primera modalidad. Incluye una etapa de acondicionamiento del relleno con disolvente, paso de la muestra y elución de los analitos. Los rellenos o fases sólidas utilizados en SPE son básicamente iguales que los que se usan en las columnas de cromatografía de líquidos, sólo que con un tamaño de partícula bastante mayor. Entre los más utilizados se encuentran la octadecilsílice (C18), octilsílice (C8), estireno-divinil-benceno (SDVB), aminopropilo (NH<sub>2</sub>), amina primaria secundaria (PSA), de intercambio aniónico fuerte con trimetilamonio (SAX), carbón grafitizado (GBC), Florisil, sílice y alúmina, etc., siendo el primero de ellos el más ampliamente utilizado [37, 42].

3. Extracción con líquidos presurizados (PLE, *pressurized liquid extraction*)

La técnica de PLE también es conocida por su nombre comercial como *extracción acelerada con disolventes (ASE, accelerated solvent extraction)*. El equipo de PLE permite realizar la extracción con un determinado disolvente o mezcla de disolventes a alta presión y elevadas temperaturas [42]. Consiste en la extracción de los analitos con un disolvente en caliente y presurizado. Las temperaturas elevadas permiten acelerar la cinética del proceso extractivo mientras que las altas presiones evitan que el disolvente alcance su punto de ebullición, lo que permite una rápida y segura extracción de los analitos de interés. Como señalan Martínez *et al.* [39] es frecuente mezclar la muestra con un agente desecante y homogeneizador (ej.: Hydromatrix) para favorecer de esta manera la penetración del disolvente a través de la matriz y facilitar la transferencia del analito al disolvente. Con esta técnica se consigue un menor consumo de disolventes, que puede llegar a ser un 95 % menor que el empleado en otros métodos de extracción. Además del analito hay que tener en cuenta las propiedades físicas de la muestra ya que tienen una gran influencia en la extracción [38, 39, 46, 48].

4. Método QuEChERS

El método QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*, acrónimo de rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro) surgió de la necesidad de desarrollar métodos multiresiduo rápidos y económicos pero que proporcionaran resultados de gran calidad y fiabilidad [40]. Este método se basa en una SLE de una pequeña cantidad de muestra con un disolvente miscible con el agua, como acetonitrilo, seguida de la adición de sales como el cloruro sódico o el sulfato magnésico. La adición de éstas induce la partición/separación de las dos fases y que el analito migre de la fase acuosa a la fase orgánica consiguiéndose recuperaciones muy altas incluso con plaguicidas polares y solubles en agua. Además de estas sales, también se pueden añadir agentes que regulen el pH como el citrato para estabilizar plaguicidas de carácter básico y patrones internos. El sobrenadante se puede analizar directamente [49, 50] o se puede concentrar para reconstituirlo en un disolvente adecuado para su análisis. El método QuEChERS se ha extendido rápido y es ampliamente utilizado en análisis multiresiduo de plaguicidas [51], ya que abarca un amplio rango de compuestos que pueden ser extraídos. Además, presenta también otra serie de ventajas en relación con otros métodos más antiguos y

tediosos, como son el rápido tratamiento de las muestras y el reducido consumo de disolventes. En consecuencia, se reducen los costes, manipulación de material de vidrio y la exposición del personal a disolventes peligrosos [52, 53].

#### 5. *Técnicas de limpieza (Clean up)*

Una de las mayores dificultades que se presentan en el análisis de residuos y contaminantes a niveles traza es la gran cantidad de compuestos de la matriz y posibles interferentes que pueden ser co-extraídos junto con los analitos durante el proceso de extracción. En este sentido, y como se puede ver en el artículo de Lesueur *et al.* [40], es frecuente realizar una etapa de limpieza ó *clean up* de los extractos obtenidos, principalmente por dos razones: primero, para eliminar la mayor cantidad posible de componentes de la matriz que puedan afectar negativamente en la posterior determinación de los analitos, tanto en la etapa de separación como en la de detección; segundo, en beneficio del sistema instrumental utilizado en la separación-detección de los analitos, puesto que determinados componentes de la matriz pueden influir en el correcto funcionamiento de dicho sistema instrumental. Paralelamente, hay que considerar el tipo de técnica instrumental que se va a emplear en la detección de los analitos, así como el procesado de datos, dado que de alguna manera éstos pueden discriminar entre la señal del analito y la de un interferente, por ejemplo, bien mediante el uso de espectrómetros de masas, bien mediante deconvolución de señales analíticas. En otras palabras, la selectividad del sistema de detección empleado puede reducir y simplificar el procedimiento de limpieza [42].

## **2.5. Técnicas de determinación**

### **2.5.1. Técnicas de separación: cromatografía de líquidos**

La cromatografía es un método de separación físico en el cual los compuestos a separar se distribuyen selectivamente entre dos fases inmiscibles: una fase móvil que fluye a través de una fase estacionaria estática [54]. La cromatografía es actualmente una de las técnicas más utilizadas para la separación de especies químicas estrechamente relacionadas entre sí [55], empleándose en identificación (análisis cualitativo) y determinación (análisis cuantitativo). El uso extendido de la cromatografía es debido, entre otras razones a su

sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general [56]. Adicionalmente, las técnicas cromatográficas se pueden acoplar a sistemas de detección muy distintos y variados, lo que incrementa su versatilidad.

Uno de los tipos de cromatografía más utilizados es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Figura 2), la cual ha sido una técnica de separación ampliamente usada como técnica cromatográfica para la resolución de numerosos problemas analíticos.

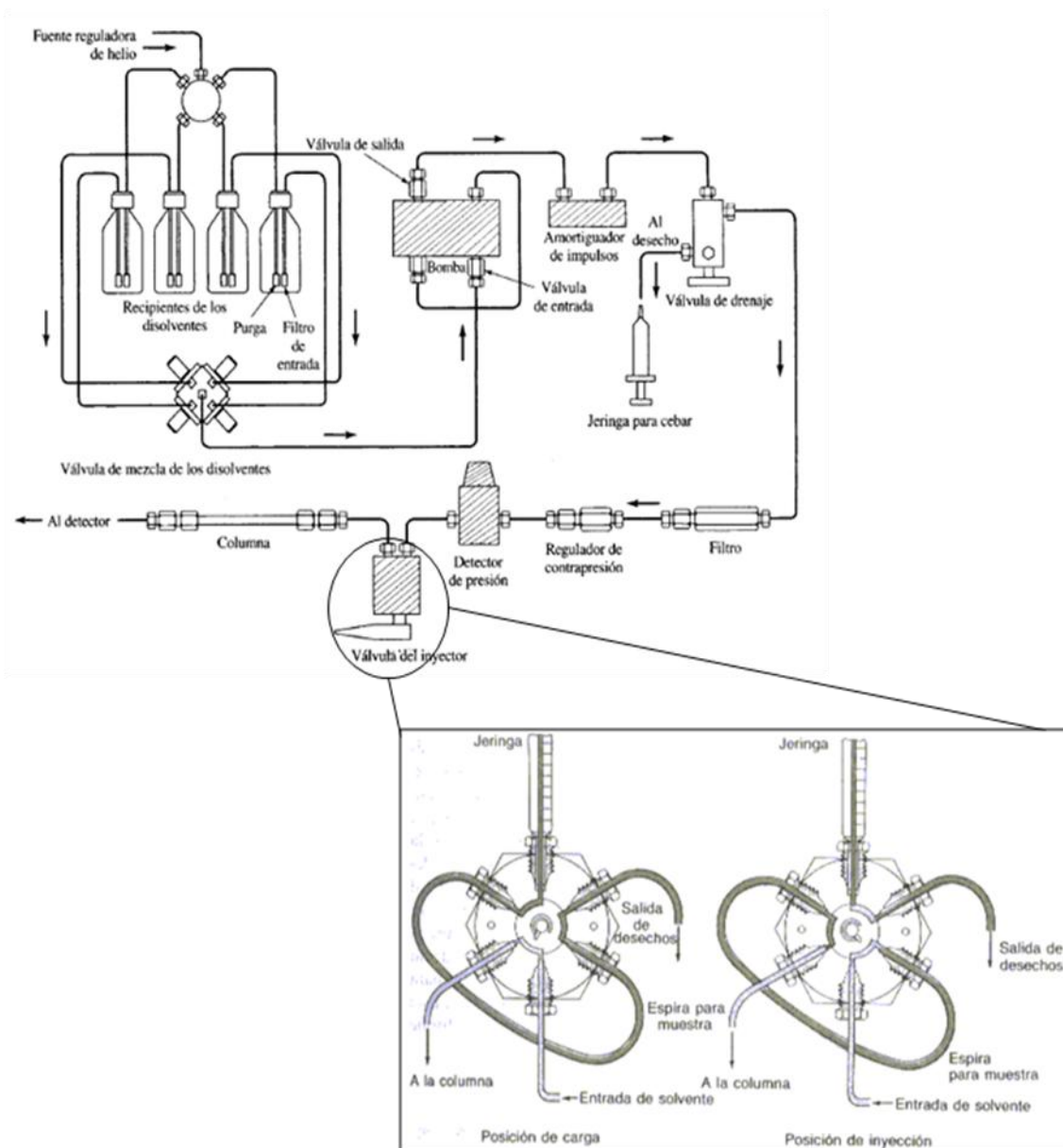


Figura 2. Esquema de un equipo de cromatografía de líquidos.

Durante los últimos años se han incorporado a los sistemas de HPLC convencionales mejoras sustanciales, como el empleo de distintos materiales en fases estacionarias, permitiendo análisis más rápidos y mejores eficiencias de separación. Estos avances fueron principalmente dirigidos hacia la necesidad de hacer frente tanto a un creciente número de análisis como a muestras más complejas. En este sentido, el desarrollo de columnas con tamaños de partícula más pequeños ( $< 2 \mu\text{m}$ , frente a los utilizados en HPLC convencionales que están comprendidos entre  $3\text{-}5 \mu\text{m}$ ) ha permitido simultáneas mejoras en eficiencia, velocidad y transferencia de masa, así como la reducción de los tiempos de análisis, permitiendo trabajar a altas velocidades lineales de flujo dando lugar a una mayor resolución cromatográfica, una reducción del tiempo de análisis y un incremento de la señal. El uso de estas columnas ha dado lugar a la denominada LC de ultra alta eficacia (UHPLC), que incrementa muy significativamente la resolución y la eficiencia en la separación de los analitos, reduciendo a la vez los tiempos de análisis. En UHPLC, se utilizan sistemas de bombeo que soportan presiones más altas ( $10.000 - 15.000 \text{ psi}$ ) que en HPLC debidas a que la reducción del tamaño de partícula utilizado en estas columnas provoca un sustancial aumento en la presión [57, 58].

En relación a las columnas empleadas en UHPLC, los diferentes fabricantes han avanzado significativamente en materiales empacados, existiendo desde 2004 columnas empacadas con rendimientos eficaces en comparación con aquellas con diámetro de partícula convencional. Su aplicación en la determinación de plaguicidas es muy extensa, tal y como se puede comprobar en la bibliografía relacionada, llegándose a determinar un número muy elevado de compuestos (p. ej.  $> 100$ ) en tiempos relativamente cortos (p. ej. 10 min) [59 - 61]. Para hacer efectivo el potencial en velocidad de análisis, resolución, sensibilidad y trabajar a estas presiones ha sido necesario el desarrollo de nuevas fases estacionarias de partícula híbrida que tienen un componente inorgánico y un componente orgánico (Figura 3). Éstas son mecánicamente fuertes, con alta eficiencia y pueden utilizarse en un amplio rango de pH [39, 50, 62, 63].

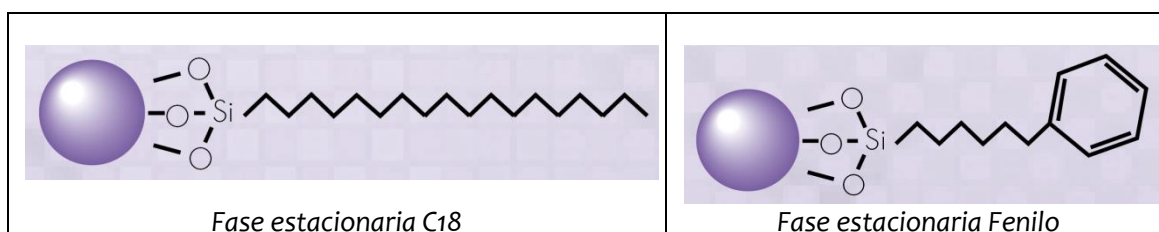
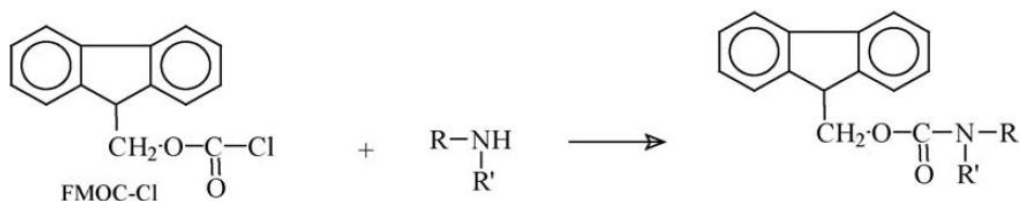


Figura 3. Fase estacionaria C18 y Fenilo.

Independientemente del tamaño de partícula, la fase estacionaria más utilizada en el análisis de plaguicidas es la de relleno de C18. Estas columnas son utilizadas por su versatilidad para un gran número de separaciones y pueden trabajar en un amplio rango de pH, lo que permite una gran flexibilidad en el desarrollo de métodos [39]. Dichas columnas se emplean en la modalidad de fase reversa, dado que la fase estacionaria es de naturaleza apolar y la fase móvil, de mayor polaridad. Sin embargo, en ocasiones es necesario emplear estrategias alternativas o fases más específicas. Así, debido a la dificultad y especiales características de los compuestos objeto de estudio, como su pequeño tamaño y elevada acidez y polaridad, se pueden seguir diferentes estrategias para mejorar la separación cromatográfica, como puede ser la derivatización [38, 48, 64 - 69] o la utilización de pares iónicos [43, 70, 71]. Estas estrategias influyen en las interacciones entre los analitos y las fases estacionarias, proporcionando que aumente la eficiencia del procedimiento separativo.

La derivatización es una estrategia analítica que consiste en la modificación química de un compuesto para obtener otro con propiedades más adecuadas para su determinación. Es un procedimiento que se emplea cuando las características del analito hacen muy difícil su separación y determinación con las técnicas cromatográficas habituales; así, tras la derivatización se pueden mejorar tanto la separación cromatográfica como la selectividad y sensibilidad. Para poder llevar a cabo el procedimiento de derivatización se deben considerar varios factores tales como la formación de un derivado único del compuesto padre, la reproducibilidad de la reacción en el tiempo y las condiciones específicas de reacción. Además, los subproductos de reacción, si los hay, no deberían interferir con el análisis cromatográfico, o con la detección de la muestra. Los objetivos más generales e importantes que se persiguen con las técnicas de derivatización son distintos, según se trate de LC o cromatografía de gases (GC). En LC, la transformación de los analitos está fundamentalmente orientada a posibilitar o mejorar la detección, mientras que en GC la derivatización se utiliza fundamentalmente para mejorar o conseguir la separación cromatográfica. Esta afirmación no es absolutamente general, ya que existen también casos en que la derivatización en LC se utiliza para favorecer o posibilitar la separación y en GC para beneficiar la detección [72].

La derivatización es una metodología que se ha empleado para el análisis de glifosato, glufosinato y sus TPs correspondientes, siendo los principales agentes derivatizantes utilizados el 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNP) [ 73 ] y el 9-fluoroenilmetilclorofomato (FMOC-Cl), [38, 48, 64 - 66] (Figura 4).



**Figura 4.** Reacción de derivatización con FMOC-Cl.

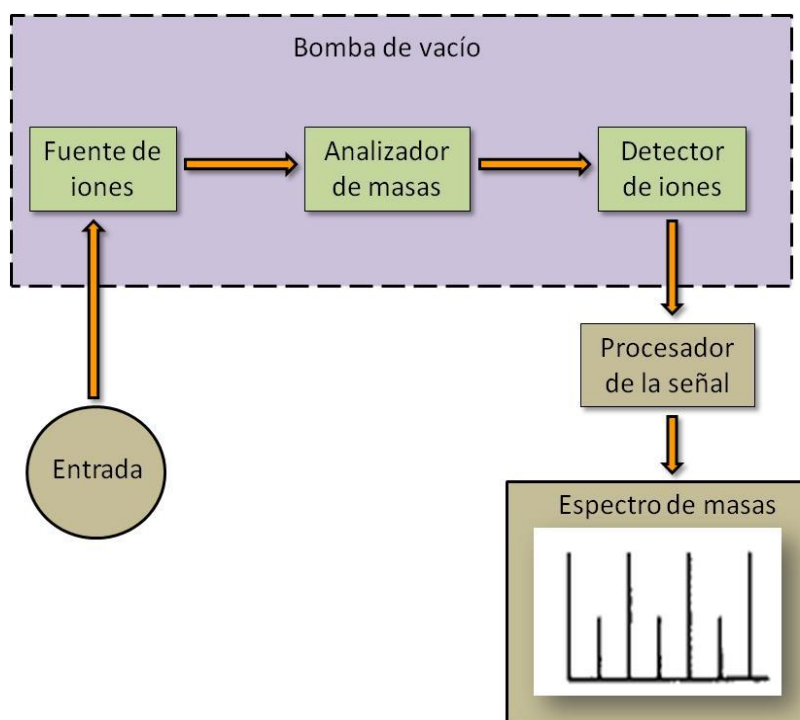
Como se ha comentado, otra estrategia para mejorar la separación y detección de analitos polares y ácidos es el empleo de pares iónicos. Este tipo de cromatografía se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas y consiste en poner en contacto los analitos con un contra-ión de carga opuesta, de manera que se dé lugar a la formación de un complejo neutro. Usando pares iónicos se consigue mejorar la retención de los compuestos polares en la fase estacionaria [43, 70, 71, 74]. En el caso del etefón y el HEPA, es más frecuente el uso de pares iónicos [43], que llevar a cabo un proceso de derivatización, habiendo sido empleado como agente formador de pares de iones el tetrabutilamonio (TBA).

El empleo de columnas específicas para una determinada familia de compuestos es otra opción. Cuando se trabaja con grupos de compuestos que poseen una característica muy marcada, como por ejemplo una elevada polaridad, puede ser recomendable el empleo de columnas iónicas. Este tipo de columnas proporcionan una mayor selectividad para estos compuestos, originándose más interacción entre los analitos y la fase estacionaria y, como consecuencia, se produce una mejor separación de los mismos. En este sentido, el Laboratorio de Referencia de la UE para el análisis de residuos de plaguicidas polares en alimentos y plantas (CVUA Stuttgart) utiliza una columna iónica [75].

### 2.5.2. Técnicas de detección: espectrometría de masas

Como se ha comentado previamente, la LC puede ser acoplada a una variedad de sistemas de detección, aunque la espectrometría de masas es la técnica de detección más empleada en el análisis de residuos de plaguicidas, proporcionando información cualitativa y cuantitativa de gran calidad. Actualmente, la LC acoplada con instrumentos de MS (LC-MS) es una de las técnicas analíticas más empleadas en análisis de plaguicidas y otros compuestos a niveles traza.

La MS se basa en la producción de iones que a continuación se separan o filtran de acuerdo con su relación masa-carga ( $m/z$ ) [76]. El espectro de masas resultante es un gráfico de la abundancia relativa de los iones generados en función de su relación  $m/z$  [77]. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado como "huella química" para caracterizar el analito. Un espectrómetro de masas siempre contiene un sistema de introducción del compuesto o mezcla de compuestos que se van a analizar, una fuente para ionizar estos compuestos, uno o varios analizadores de masas para separar los iones producidos, un detector o contador de iones y, finalmente, un sistema de procesamiento de datos (Figura 5) [78].

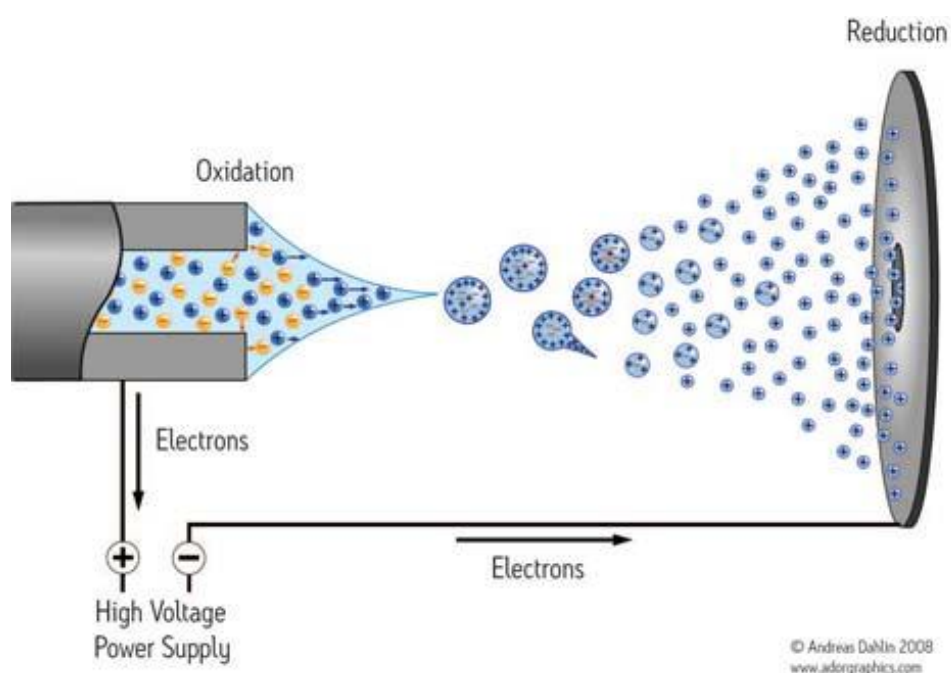


**Figura 5.** Componentes básicos de un espectrómetro de masas.

La fuente de ionización más utilizada en LC-MS es la ionización por electrospray (ESI), un tipo de ionización a presión atmosférica (tipo API), que proporciona una ionización "blanda" gracias a la cual es posible detectar el ion pseudo-molecular [79]. En ESI se produce la ionización de los analitos a presión atmosférica, mediante la aplicación de una diferencia de potencial entre el extremo del capilar por donde fluye la muestra líquida y el electrodo situado en la entrada del analizador de masas. Por efecto de este intenso gradiente eléctrico, la muestra emerge del capilar en forma de un aerosol de pequeñas gotas cargadas. A medida que estas gotas avanzan hacia el orificio de entrada del espectrómetro, su tamaño se va reduciendo, se van desolvatando, hasta que las fuerzas coulombianas de repulsión entre los iones con múltiple carga generados en su interior son



capaces de vencer la tensión superficial. En ese momento pasan a la fase gaseosa. En algunas ocasiones se suele favorecer la desolvatación de las gotas y la obtención de iones en fase gas empleando nitrógeno a alta presión y a temperatura moderada. Globalmente, el proceso de ionización genera iones moleculares cargados. La estructura y las propiedades físico-químicas de la molécula determinan su capacidad intrínseca para ionizarse al pH de la fase móvil o del electrolito donde está disuelta, pero la eficacia de su ionización y, por lo tanto, la sensibilidad en la detección, están íntimamente relacionadas con las propiedades de esta disolución (Figura 6) [80, 81].



**Figura 6.** Ionización por electrospray.

De manera general, las fuentes tipo ESI (Figura 7) permiten trabajar tanto en modo positivo (ESI+) como negativo (ESI-), variando la polaridad de los voltajes. El modo de trabajo será elegido en función de los grupos funcionales que posean las moléculas objeto de estudio. Además, puede ser necesaria la adición de aditivos para favorecer la ionización. Por ejemplo, cuando trabajamos en modo ESI- es conveniente adicionar bases para favorecer la formación de aniones; por el contrario, en ESI+ adicionaremos ácidos para favorecer la formación de cationes. En cualquier caso, los aditivos que se añaden tienen que ser volátiles para evitar que se depositen en la fuente.



**Figura 7.** Fuente de iones (fuente ESI).

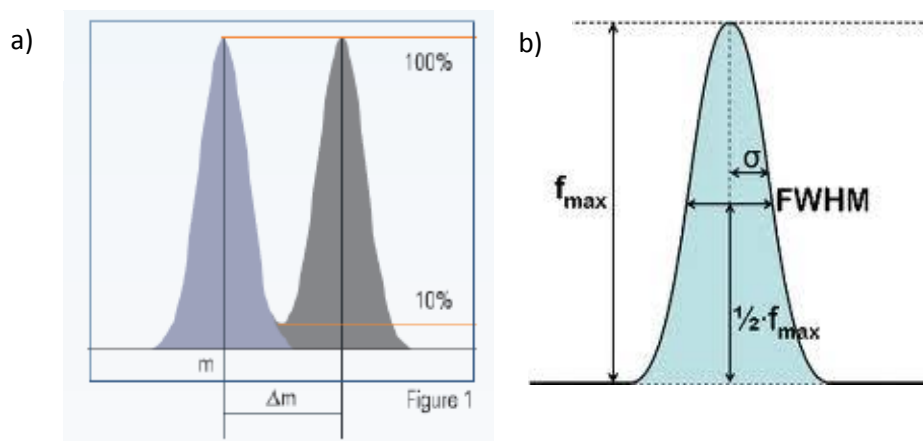
Una de las características más importantes de los analizadores de masas es la resolución espectrométrica o de masas. Así, la resolución de masas se define como la capacidad de generar señales diferentes para dos iones con una pequeña diferencia de masa ( $\Delta m$ ), es decir, es la capacidad que tiene el analizador de masas para distinguir entre las masas de dos picos muy próximos:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

donde:  $m \rightarrow$  es la masa del ion de menor masa.

$\Delta m \rightarrow$  es la diferencia entre picos adyacentes que están resueltos.

Dos masas próximas se consideran resueltas cuando la altura del valle entre ellos no sobrepasa el 10 % de la altura media de ambos (Figura 8), es la llamada resolución al 10 %. Otra definición ampliamente utilizada de la resolución es aquella que considera la anchura de pico a la mitad de la altura máxima ó *full width at half of the maximum height* (FWHM) [82].



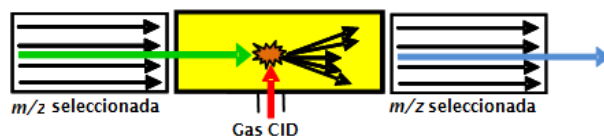
**Figura 8.** Resolución en MS definida: (a) al 10 % del valle y (b) a media altura.

En función de la resolución, hay analizadores de baja y alta resolución, pudiendo hablar de MS de baja resolución (LRMS) y alta resolución (HRMS):

- Baja resolución  $\Rightarrow R < 10000$ . Ejemplo: Con  $R = 500$  nos permite distinguir entre  $m/z$  de 500 y 501.
- Alta resolución  $\Rightarrow R > 10000$ . Ejemplo: Con  $R = 100000$  podremos distinguir entre iones con  $m/z$  de 500.0032 y 500.0033.

Hay que comentar, que si bien esta diferenciación es generalmente aceptada, hay otros foros en los cuales se incluye una tercera categoría, la media resolución, definida cuando el analizador tiene una resolución superior a 10000 pero inferior a 25000, de manera aproximada.

La HRMS puede resultar muy útil a la hora de identificar sustancias desconocidas, gracias a la posibilidad de realizar medidas de masas exacta de manera que en función de la masa registrada, se puede asignar, con una elevada probabilidad, una estructura química concreta. Actualmente, la HRMS se emplea en identificación (análisis cualitativo), mientras que LRMS es utilizada predominante en análisis cuantitativo. En este sentido, el analizador de LRMS por excelencia utilizado en el análisis multiresiduo de plaguicidas acoplado a GC y LC es el analizador de triple cuadrupolo (QqQ) [83, 84], el cual se emplea en el modo de adquisición de MS en tándem (MS/MS) de monitorización de reacciones seleccionadas (SRM, *selected reaction monitoring*) (Figura 9) [85]. El analizador QqQ es ampliamente utilizado debido a su versatilidad, aplicabilidad y bajo coste en relación a espectrómetros de masas de alta resolución más recientes, como pueden ser el analizador de tiempo de vuelo (TOF) [86] y el analizador Orbitrap [87].



**Figura 9.** Monitorización de reacciones seleccionadas (SRM).

En el presente TFM se ha utilizado un instrumento de MS con analizador tipo Orbitrap. Este analizador fue desarrollado por Alexander Makarov (Thermo Fisher Scientific) y consiste en una modificación de la trampa de iones desarrollada por Kingdon en la década de 1920 [88, 89]. El equipo consta de tres componentes principales (Figura 10):

- Una fuente de iones
- Un dispositivo de almacenamiento intermedio
- Un analizador de masas Orbitrap con Transformada de Fourier



**Figura 10.** Espectrómetro de masas de alta resolución (Orbitrap-Exactive).

Con este tipo de analizadores se pueden alcanzar resoluciones de hasta 100000 (a  $m/z$  200) y trabajando en un rango de  $m/z$  50-4000 [90]. Básicamente, el análisis de masas comprende tres etapas: (i) ionización de la muestra, (ii) separación y análisis de los iones y fragmentos cargados según su relación  $m/z$ , y (iii) detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

El principio físico por el cual se realiza el proceso de medida es el siguiente: en el analizador de masas, trayectorias de iones estables con rotación alrededor de un electrodo

central axial se combinan con oscilaciones armónicas entorno a éste. La frecuencia  $\omega$  de estas oscilaciones armónicas a lo largo del eje z depende solamente de la relación  $m/z$  del ion y de la constante instrumental k:

$$\omega = \sqrt{\frac{q}{m}} \times k$$

A continuación, el analizador (Figura 11) relaciona la frecuencia del movimiento oscilante en torno al electrodo axial con la relación  $m/z$  de los mismos mediante la transformada de Fourier. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, amplificada y enviada a un ordenador, obteniendo así el correspondiente espectro de masas.

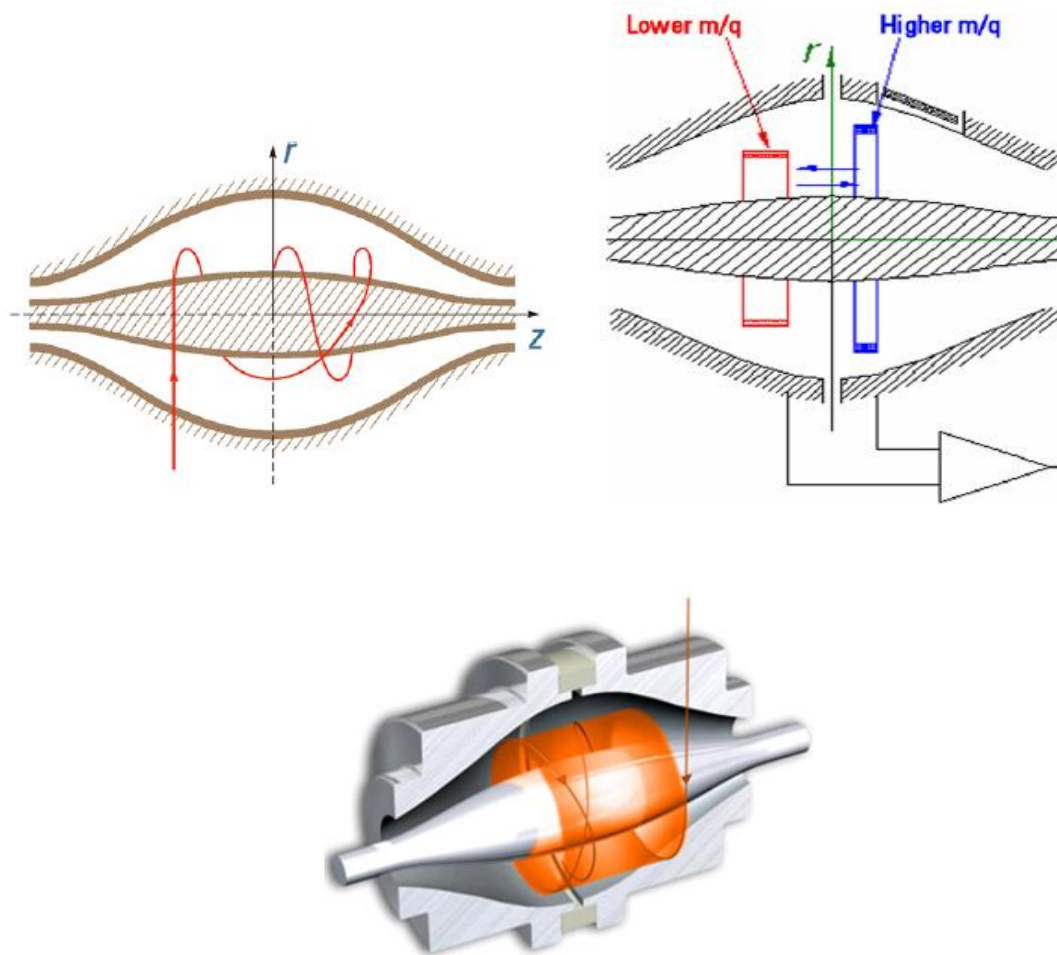


Figura 11. Trayectorias de los iones en un analizador Orbitrap.

De manera más detallada, los iones son inyectados tangencialmente en un campo eléctrico donde tiene lugar el confinamiento orbital de estos alrededor de un electrodo axial mediante la aplicación de un campo electrostático. Los iones comienzan a girar alrededor del electrodo central y también a lo largo del mismo, moviéndose hacia delante y detrás. La frecuencia de estas oscilaciones armónicas es independiente de la velocidad del ion y es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación  $m/z$ . Los iones oscilan a través del electrodo axial y la medición se realiza relacionando la frecuencia del movimiento oscilante con la relación  $m/z$  de los iones mediante la transformada de Fourier. La frecuencia de oscilación de los iones dependerá de su relación  $m/z$  [91].

Existen diferentes tipos de instrumentos de MS basados en Orbitrap, como el Orbitrap Exactive (Figura 12) o el analizador híbrido LTQ Orbitrap, el cual cuenta con un analizador de trampa de iones adicional. El instrumento más sencillo es el Orbitrap Exactive, empleado en este trabajo. Este instrumento cuenta con la llamada C-Trap, un dispositivo de almacenamiento de iones intermedio que permite transferir los iones en paquetes dentro del analizador. Además, el analizador Orbitrap cuenta con una celda de colisión HCD (*higher energy collision induced dissociation*) que consiste en un multipolo recto conectado directamente con la C-Trap. Así, los iones se pasan a través de la C-Trap hacia la celda HCD, donde pueden ser fragmentados, o bien directamente hacia el analizador Orbitrap.

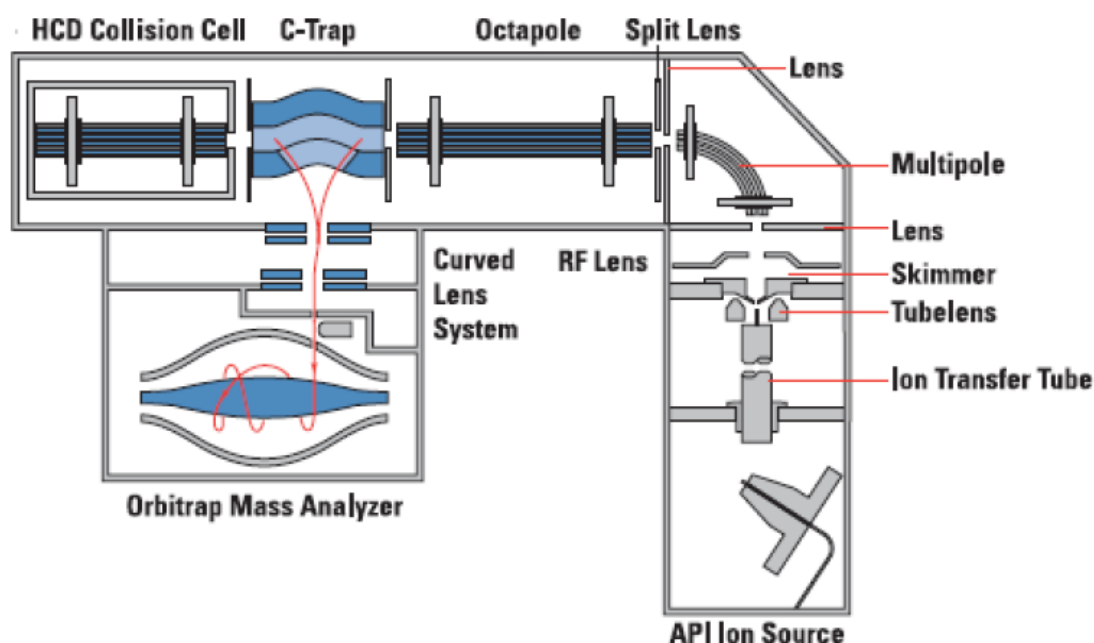


Figura 12. Esquema general de un espectrómetro de masas de alta resolución Orbitrap-Exactive.

Una cuestión importante, que hay que destacar, es que estos sistemas trabajan en el modo de adquisición *full scan*, es decir, en modo MS. Sin embargo, gracias a la celda HCD, también es posible trabajar realizando segundas rupturas, en un proceso que se podría denominar como de pseudo-MS/MS, debido a que no hay selección de ion precursor como por ejemplo en QqQ, sino que se fragmenta todo aquello que llega a la celda. Esta opción puede resultar muy útil para la obtención de información estructural, ya que se pueden asignar los diferentes iones del espectro con las partes en las que ha podido romperse el compuesto original. No obstante, el protocolo usual consiste en la comparación del espectro obtenido con el espectro teórico o bien con librerías espectrales (menos frecuente), para buscar la molécula de interés por comparación con espectros ya conocidos (análisis cualitativo).

En relación a las medidas de masa exacta, una vez obtenida la masa experimental y mediante el empleo del software del equipo, es posible determinar la fórmula molecular del compuesto. Si conocemos esta información previamente, se procede de forma más directa, de manera que la masa exacta proporcionada por el equipo se compara con la masa teórica (conocida la fórmula del compuesto) y de esta forma se determina el error de masa exacta ó exactitud de masa, que se puede expresar como error absoluto (mDa) o como error relativo (ppm). Esta última nomenclatura es la más utilizada debido a que es independiente de la masa del compuesto y se calcula mediante la expresión:

$$\text{Error de masa (ppm)} = \frac{m/z_{\text{medido}} - m/z_{\text{teórico}}}{m/z_{\text{teórico}}} \times 10^6$$

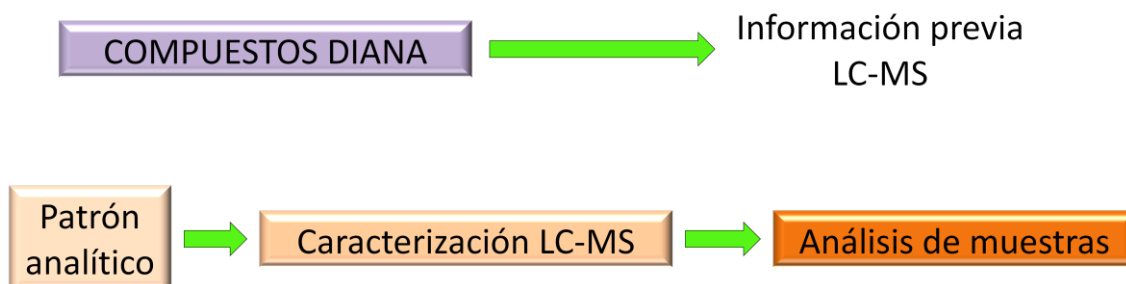
De manera general, se considera un error relativo de masa aceptable cuando es inferior a 5 ppm. Es muy importante tener en cuenta que en los cálculos de la masa exacta de cada ion se deben emplear los valores de masa de los isótopos más abundantes en la naturaleza de cada elemento, es decir, se debe calcular la masa monoisotópica de cada compuesto, definida como la masa obtenida considerando las masas de los isótopos individuales más abundantes en la naturaleza para cada elemento que forma el compuesto. La masa nominal del ion es la masa del ion calculada con la masa del isótopo más abundante en la naturaleza de cada elemento considerando sólo su parte entera (Tabla 3). Por otro lado, la masa promedio es la masa del elemento calculada con la masa promedio de cada elemento (Tabla 3) [92].

**Tabla 3.** Abundancia relativa, masa nominal, masa exacta y masa promedio de los elementos que componen los analitos de interés.

Elemento	Masa nominal	Abundancia relativa (%)	Masa exacta	Masa promedio	
H	<sup>1</sup> H	1	100	1.0078	1.008
	<sup>2</sup> H	2	0.016	2.0141	
C	<sup>12</sup> C	12	100	12.000	12.011
	<sup>13</sup> C	13	1.08	13.0034	
N	<sup>14</sup> N	14	100	14.0031	14.007
	<sup>15</sup> N	15	0.38	15.0001	
O	<sup>16</sup> O	16	100	15.9949	15.999
	<sup>17</sup> O	17	0.04	16.9991	
	<sup>18</sup> O	18	0.2	17.9992	
P	<sup>31</sup> P	31	100	30.9738	30.974
Cl	<sup>35</sup> Cl	35	100	34.9689	35.453
	<sup>37</sup> Cl	37	32.5	36.9659	

Como se ha comentado anteriormente, el analizador Orbitrap opera en modo *full scan*, monitorizando los iones generados en un rango de masas fijado. En este sentido, para mejorar la sensibilidad se suele reducir el rango de masas e incrementar el tiempo de monitorización (*scan time*). Al reducir el rango de masas tendremos menos masas en un mismo intervalo de tiempo, por lo tanto, hay más tiempo para cada masa, pero el inconveniente es que perdemos información estructural (al monitorizar menos masas). El *full scan* tiene interés desde el punto de vista cualitativo y de elucidación estructural.

Una vez que se obtiene el cromatograma, se procede a monitorizar los iones correspondientes a cada compuesto de interés (*target* ó compuestos diana) (Figura 13).



**Figura 13.** Análisis de compuestos diana.



Este modo de trabajo a efectos prácticos se denomina “extraer la masa” del cromatograma total de iones (TIC, *total ion current* ó *chromatogram*) y obtener lo que se conoce como cromatograma extraído de iones (XIC, *extracted ion chromatogram*) (Figura 14). Una vez hecho esto, para identificar los analitos se utiliza el tiempo de retención y el error de masa exacta. Este modo de trabajo permite también llevar a cabo análisis de desconocidos y análisis retrospectivo.

Otro parámetro que nos ayuda a la confirmación de los analitos en los que se ha basado esta investigación es el defecto isotópico de masa ( $R\Delta m$ ). Como indican Thurman et al. [93], para calcular el  $R\Delta m$  se tiene en cuenta la proporción de cada uno de los isótopos de una determinada molécula (esta proporción se realiza en función de la relación isotópica natural entre los isótopos de un mismo elemento).

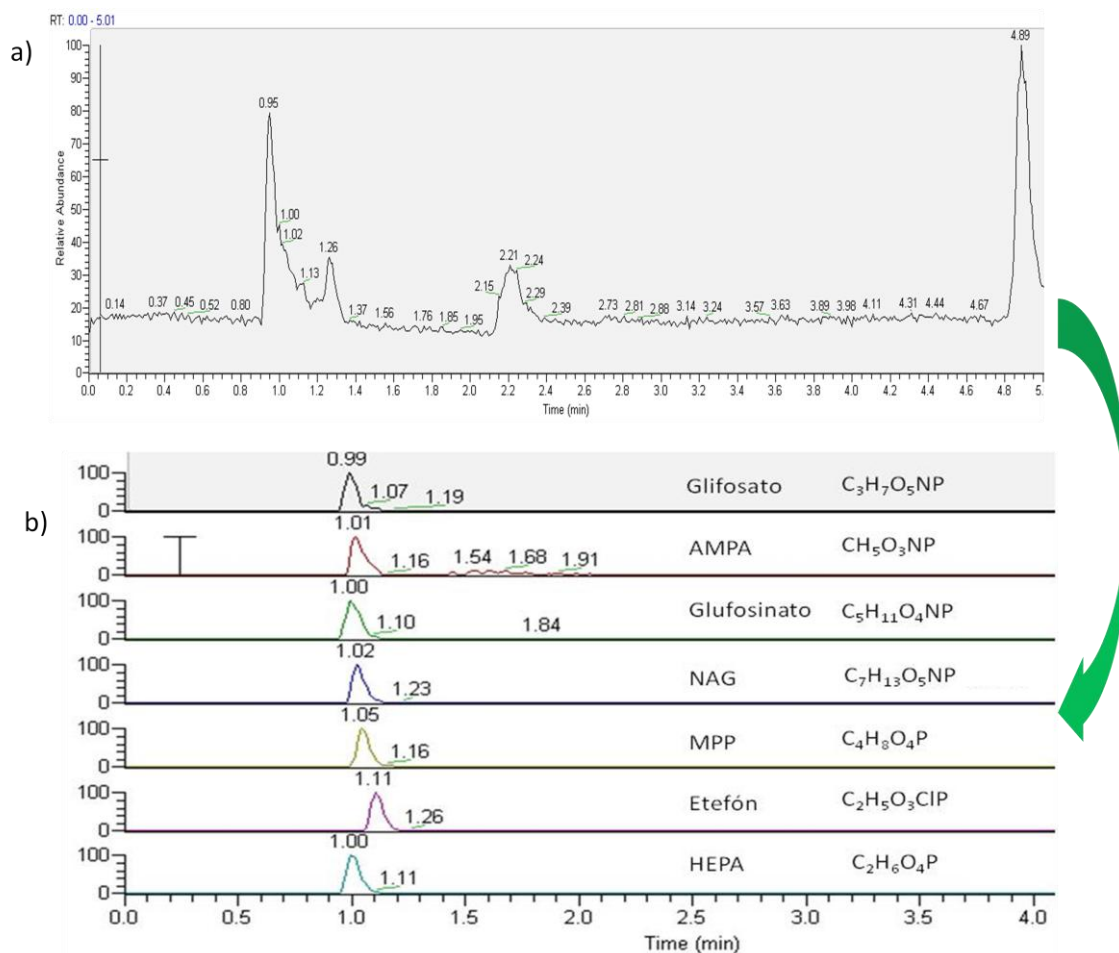


Figura 14. TIC (a) y XIC (b) de los analitos estudiados.

Esta abundancia natural de determinados isótopos de elementos comunes encontrados en algunas moléculas orgánicas es característica de cada compuesto de manera natural, y es muy importante en el cálculo de la intensidad de los clústeres isotópicos, siendo la intensidad de estos proporcional a la abundancia isotópica de dichos elementos. Es importante destacar que una molécula no solo tiene una masa exacta calculada asociada a su fórmula monoisotópica, también hay una masa exacta calculada asociada a los principales isótopos de la molécula. Los isótopos tienen una composición isotópica diferente a la molécula, que se incrementa en [ion molecular] + 1, [ion molecular] + 2, ... [ion molecular] + n clústeres isotópicos de una molécula. La abundancia relativa es muy utilizada para moléculas que tienen átomos de halógenos (como en el caso de uno de los analitos, el etefón). El  $R\Delta m$  se define como la diferencia en masa exacta entre la masa monoisotópica de una molécula o ion y la masa de su clúster isotópico (misma fórmula molecular pero diferente masa exacta).

En la Figura 15 vemos el defecto isotópico relativo de masa de los elementos más comunes y sus isótopos estables que podemos encontrar en muchos compuestos orgánicos.

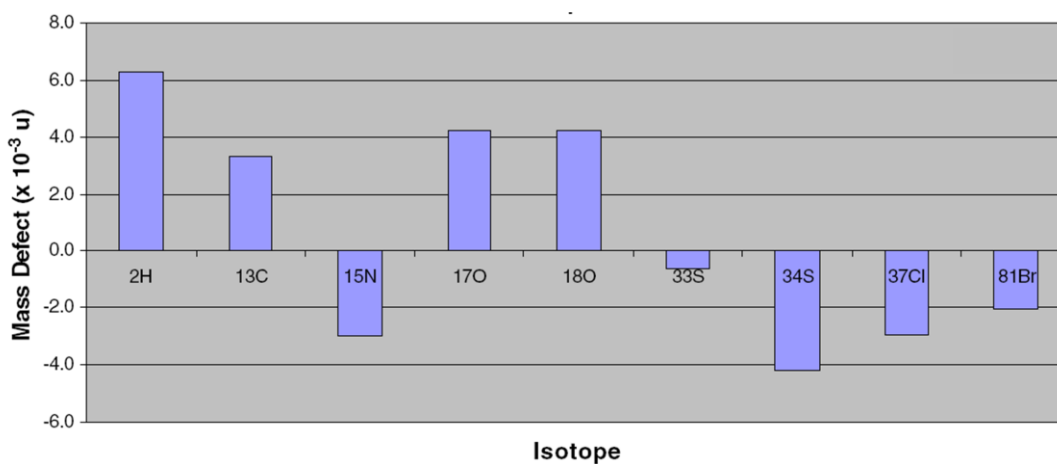


Figura 15. Defecto isotópico relativo de masa.

### 3. Experimental

#### 3.1. Reactivos y aparatos

Los patrones certificados de glifosato (99 %), glufosinato (95,1 %), etefón (98,1 %) y AMPA (99 %) se obtuvieron de Riedel de Haen (Seelze, Alemania); el MPP (96,3 %) fue suministrado por Fluka (Buchs, Suiza), mientras que NAG (98 %) y HEPA (98 %) fueron

adquiridos de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania). Se prepararon soluciones individuales de cada uno de estos patrones certificados (con concentraciones comprendidas entre los 200 y 300 mg/L), pesando exactamente el patrón certificado y disolviendo éste en 50 mL de una solución metanol/agua (1:1, v/v). Estas soluciones se almacenaron bajo refrigeración ( $T < 5^{\circ}\text{C}$ ). Una solución patrón de trabajo con los 7 compuestos (con una concentración de 2 mg/L de cada compuesto) se preparó por dilución adecuada de las soluciones madre con metanol/agua (1:1, v/v) y se almacenó bajo refrigeración ( $T < 5^{\circ}\text{C}$ ).

El metanol (MeOH), el hidróxido de amonio (28 % de amoniaco acuoso) y el ácido fórmico (98 %) fueron adquiridos de Fluka (Buchs, Suiza). El MeOH y el agua de calidad LC-MS fueron suministrados por Scharlab (Barcelona, España). Agua ultrapura se obtuvo de un sistema de agua Milli-Q Gradient Millipore (Bedford, MA, EE.UU.). Para la etapa de limpieza SPE, se utilizaron cartuchos de C18 Sep-Pak (500 mg, 3 cm<sup>3</sup>) suministrados por Waters (Milford, MA, EE.UU.).

El PDFOA (ácido pentadifluorooctanoico) fue adquirido de Fluka (Buchs, Suiza) mientras que el TBA (tetrabutilamonio) y la DMA (dimetilamina) fueron suministrados por Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

Los cartuchos C18 (Sep-Pak, 500 mg, 3 cm<sup>3</sup>), Florisil (Bond Elut Jr, 500 mg) y de intercambio iónico (Bond Elut, 300 mg, 6 cm<sup>3</sup>) empleados durante la investigación se obtuvieron de Waters (Milford, MA, USA), Varian (Harbour City, CA, EE.UU.) y Scharlab (Barcelona), respectivamente. Se utilizaron filtros de nylon de 0.20 µm suministrados por Millipore (Bedford, MA, EE.UU.).

Durante este estudio se empleó una centrifugadora de alto volumen Centronic II de JP Selecta (Barcelona, España), un agitador rotatorio Reax-2 de Heidolph (Schwabach, Alemania) y tubos de polipropileno de 50 mL se emplearon en la extracción.

### **3.2. Análisis mediante UHPLC-Orbitrap-MS**

La separación de los analitos se llevó a cabo utilizando un Transcend 600 LC (Thermo Scientific Transcend™, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EE.UU.) equipado con una columna analítica columna Hypersil GOLD Phenyl (100 x 2.1 mm, 1.9 µm de tamaño de partícula) de Thermo (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EE.UU.) y un horno para la

columna (Crocrodile). La fase móvil consistió en una disolución acuosa de ácido fórmico, 0.01 %, v/v (eluyente A) y MeOH (eluyente B). El análisis se inició con 95 % de eluyente A y se mantuvo esta composición durante 1 min. A continuación, el % de A se redujo de forma lineal hasta el 50 % en 2.5 min, para volver a reducirlo hasta el 10% en 0.5 min. Posteriormente, se volvió a la composición inicial (95 % eluyente A) en 0.5 min, seguido de un tiempo de re-equilibrado de 1 minuto (tiempo total de análisis = 5.30 min) (Figura 16). El caudal fue de 0.3 mL/min y la temperatura de la columna se fijó en 25 ° C. Alícuotas de 10 µL de extracto de la muestra se inyecta en el sistema cromatográfico.

El sistema de UHPLC fue acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap (Exactive™, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania), utilizando como fuente de ionización ESI (HESI-II, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EE.UU.), en modo negativo (ESI -).

Step	Start	Sec	Flow	Grad	%A	%B	%C	%D	Tee	Loop	Flow	Grad	%A	%B	%C	%D
1	00:00	60	0.01	Step	100.0	-	-	-	=====	out	0.30	Step	95.0	5.0	-	-
2	01:00	150	0.01	Step	100.0	-	-	-	=====	out	0.30	Ramp	50.0	50.0	-	-
3	03:30	30	0.01	Step	100.0	-	-	-	=====	out	0.30	Ramp	10.0	90.0	-	-
4	04:00	30	0.01	Step	100.0	-	-	-	=====	out	0.30	Ramp	95.0	5.0	-	-
5	04:30	60	0.01	Step	100.0	-	-	-	=====	out	0.30	Step	95.0	5.0	-	-

Figura 16. Flujo y gradiente del método UHPLC-Orbitrap-MS desarrollado.

Los parámetros de la fuente de ionización son los siguientes: Voltaje de spray → 4 kV; gas cortina (*sheath gas*) → 35 (ad.); gas auxiliar (*auxiliary gas*) → 10 (ad.); voltaje *skimmer* → - 18 V; voltaje *tube lens* → - 95 V; temperatura del calentador → 305 ° C y temperatura capilar → 300 ° C (Figura 17). El control automático de ganancia (AGC) se fijó en un valor objetivo de  $1 \times 10^6$ . Los espectros de masas fueron adquiridos mediante un poder de resolución de la masa de 50000 FWHM, para la detección y análisis de confirmación, y la velocidad de escaneado de 0.5 Hz. El rango de masas en los experimentos se estableció entre *m/z* 60-300. El Orbitrap fue calibrado una vez a la semana a través de una mezcla de dodecilsulfato sódico, sal hidratada de ácido taurocólico y Ultramark 1621 en ácido acético. Los datos fueron adquiridos utilizando el modo de calibración externa.

Sheath gas flow rate	<b>35</b>
Aux gas flow rate	<b>10</b>
Sweep gas flow rate	<b>0</b>
Spray voltage (  kV  )	<b>4.00</b>
Spray current (μA)	
Capillary temp. (°C)	<b>300</b>
Capillary voltage (V)	<b>-35.00</b>
Tube lens voltage (V)	<b>-95.00</b>
Skimmer voltage (V)	<b>-18.00</b>
Heater temp (°C)	<b>305</b>

**Figura 17.** Parámetros de la fuente de ionización del método UHPLC-Orbitrap-MS desarrollado.

Todos los datos fueron procesados con el módulo Quan-Browser de Xcalibur, versión 2.2.1 (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, Francia).

### 3.3. Tratamiento de muestra

Para llevar a cabo el proceso de extracción se pesaron 10 g de muestra en tubos de polipropileno de 50 mL. A continuación, se añadieron 10 mL de agua (amoníaco 5 %, v/v) y la mezcla se agitó durante 1 minuto manualmente. Después de esta agitación, los tubos de polipropileno se colocaron en un agitador rotatorio durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm (4.136 x g) durante 5 min. (Figura 18). Del sobrenadante se transfirieron 2 mL a los cartuchos de C18 para llevar a cabo una etapa de limpieza. Los extractos fueron filtrados utilizando filtros de 0.20 μm de nylon que se colocaron directamente en los cartuchos de C18. El filtrado fue recogido en viales y alícuotas de 10 μL fueron inyectadas en el sistema cromatográfico.

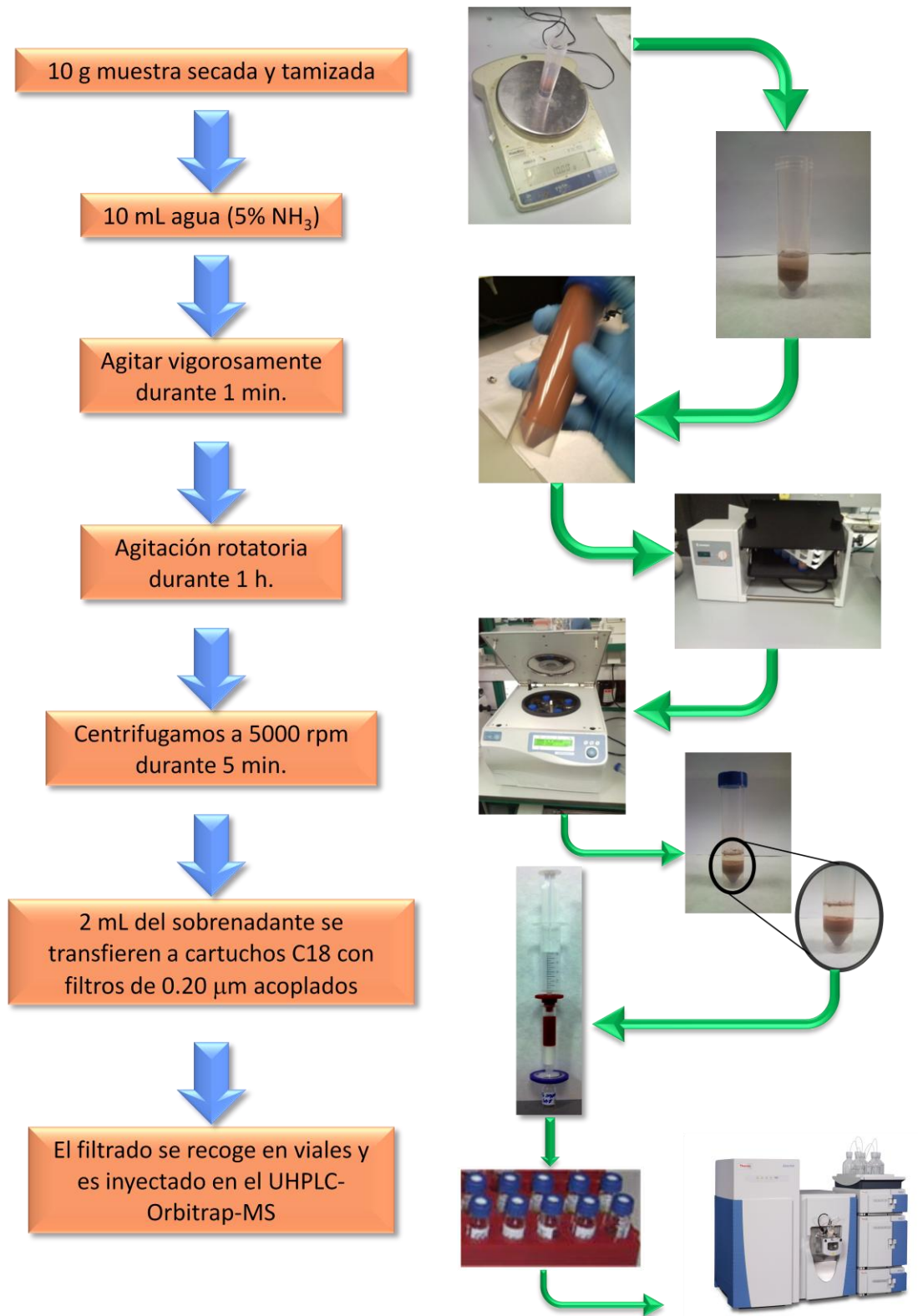


Figura 18. Procedimiento de extracción.

## **4. Resultados y discusión**

El objetivo de este proyecto ha sido desarrollar una metodología para la determinación de plaguicidas y un fitoregulator, de carácter ácido en suelos agrícolas, en concreto, glifosato, glufosinato, etefón y sus correspondientes TPs. Los compuestos objeto de estudio son difíciles de incluir en un método de análisis multiresiduo debido a sus peculiares características, como pueden ser su marcado carácter ácido y polaridad y bajo peso molecular. Su determinación requiere el empleo de metodologías alternativas, como por ejemplo, la utilización de columnas específicas para compuestos polares o el uso de la derivatización para su análisis [38, 48, 64 - 69, 75].

### **4.1. Identificación y confirmación de los analitos**

El analizador utilizado en este trabajo, Exactive Orbitrap, permite trabajar en *full scan* con una resolución comprendida entre los 10000 y los 100000 FWHM. Para la investigación llevada a cabo la resolución empleada fue 50000 FWHM. El hecho de utilizar equipos de alta resolución junto con la posibilidad de poder hacer medidas de masa exacta y el establecimiento de una ventana de masa óptima, proporciona una potente herramienta de análisis de residuos de plaguicidas y contaminantes. Como se ha comentado previamente, el equipo puede proporcionar una alta selectividad y permite obtener el XIC de los iones moleculares de los analitos usando la masa exacta de éstos.

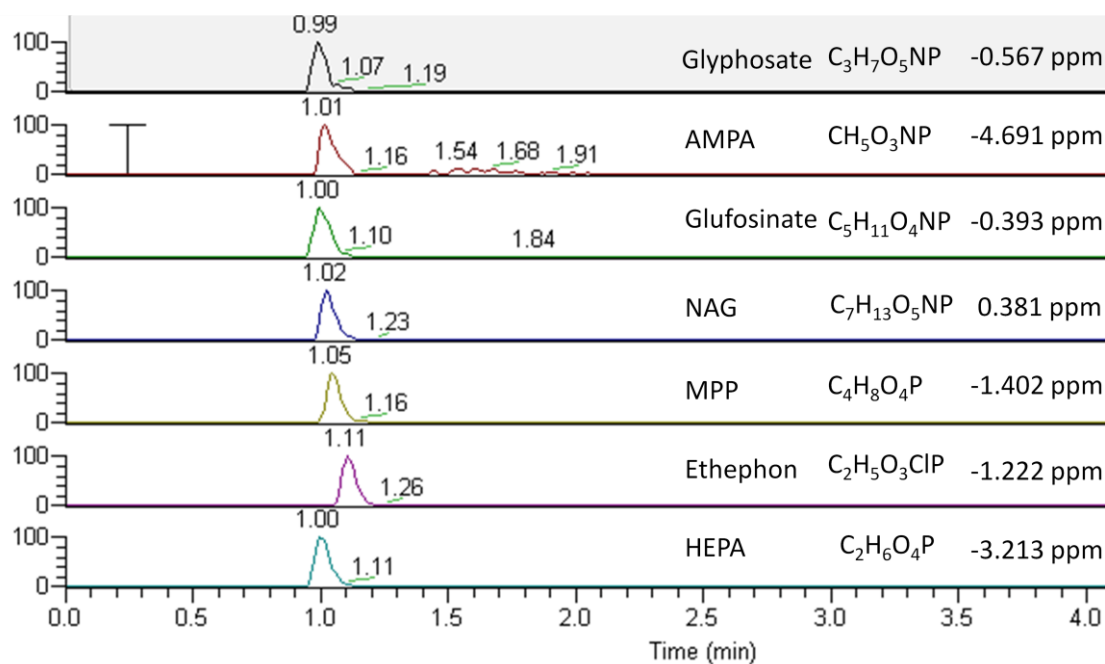
La identificación de los analitos fue realizada utilizando el tiempo de retención de cada analito. Para la confirmación nos basamos en el error de masa y el  $R\Delta m$ . Como criterio de confirmación de las medidas, valores por debajo de 5 ppm en el error de masa son aceptables, como ya se ha mencionado anteriormente (Tabla 4).

Los compuestos en los que se centra este trabajo son moléculas con una elevada polaridad y acidez, fundamentalmente debido al grupo fosfato y al grupo amino presente en la estructura (Tabla 1). Se empleó el modo de ionización negativo (ESI-) ya que todos los compuestos de este estudio al poseer un grupo fosfato pierden un  $H^+$  fácilmente, de manera que se monitorizaron mediante el ion molecular  $[M-H]^-$ .

**Tabla 4.** Caracterización de los compuestos objeto de estudio.

Compuesto	[M-H] <sup>-</sup>	Masa [M-H] <sup>-</sup> calculada	Masa [M-H] <sup>-</sup> medida	Ventana tr (min)	Error de masa (ppm)
Glifosato	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>5</sub> P	168.00564	168.00554	0.98 - 1.02	-0.567
AMPA	CH <sub>5</sub> NO <sub>3</sub> P	110.00016	110.00006	0.99 - 1.03	-4.691
Glufosinato	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub> P	180.04202	180.04195	0.98 - 1.02	-0.393
NAG	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub> P	222.05259	222.05267	1.00 - 1.04	0.381
MPP	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> P	151.01547	151.01526	1.03 - 1.07	-1.402
Etefón	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> Cl	142.96593	142.96576	1.08 - 1.12	-1.222
HEPA	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> P	124.99982	124.99942	0.98 - 1.02	-3.213

En la Figura 19 podemos ver el XIC de los 7 compuestos, con el error de masa (en ppm) correspondiente a cada uno en una muestra de suelo fortificada a 50 µg/kg.



**Figura 19.** XIC de los compuestos diana en un patrón en matriz (50 µg/kg).

La comparación de las masas experimentales y las teóricas, así como el tiempo de retención obtenido, permite una adecuada identificación y confirmación de los compuestos. Sin embargo, un análisis más detallado del espectro de masas del etefón nos puede proporcionar información adicional para su confirmación, teniendo en cuenta que este compuesto tiene átomos de cloro en su estructura, y por tanto, se pueden considerar las



relaciones isotópicas correspondientes. La abundancia relativa en la naturaleza de los dos isótopos más abundantes de cloro es de un 75 %  $^{35}\text{Cl}$  y un 25 %  $^{37}\text{Cl}$  (Tabla 3), lo que nos da lugar a un patrón característico en el espectro, mostrando dos iones con una diferencia de masa de 2 Da, viendo un pico en  $[\text{M}-\text{H}]^-$  y otro en  $[\text{M}-\text{H}]^- + 2$  y cuya relación es de 3:1, que corresponde con la abundancia isotópica del átomo de Cl presente en la molécula de etefón (Figura 20).

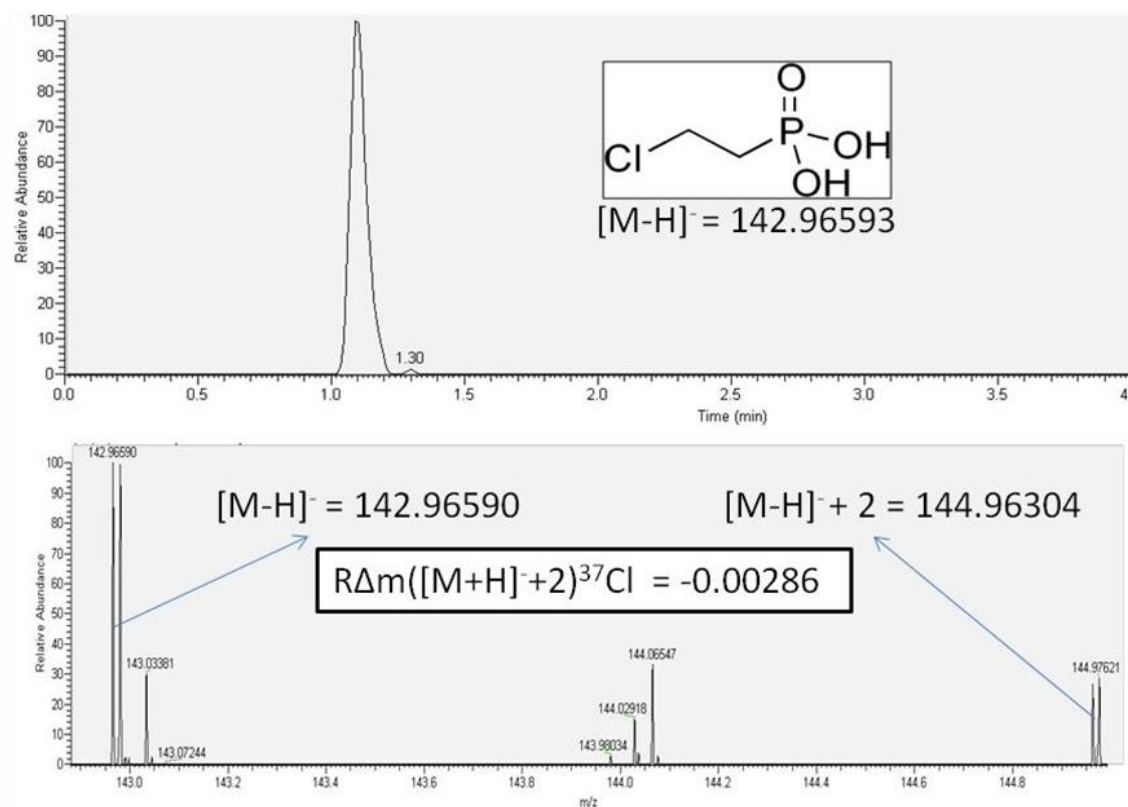


Figura 20. XIC del etefón con su espectro de masas.

Éste es un claro ejemplo de la utilidad de los clúster isotópicos en la identificación de determinados átomos en las moléculas objeto de estudio, y por extensión, en la fórmula del analito. Por otra parte, también es interesante utilizar una herramienta que permite detectar y verificar la presencia de este tipo de átomos,  $R\Delta m$  comentado anteriormente. En el caso del etefón, el  $R\Delta m$  correspondiente a  $[\text{M}-\text{H}]^- + 2$ , determinado experimentalmente, es decir, el ion que sólo contiene  $^{37}\text{Cl}$  es de -0.00286 Da.

$$\begin{aligned}
 ({}^{37}\text{Cl} - {}^{35}\text{Cl}) - 2 \text{ u} &= R\Delta m_{(\text{A}+2)37\text{C}} \\
 (36.9659 \text{ u} - 34.9689 \text{ u}) - 2 \text{ u} &= R\Delta m_{(\text{A}+2)37\text{C}} \\
 1.9970 \text{ u} - 2 \text{ u} &= R\Delta m_{(\text{A}+2)37\text{C}} \\
 -0.0030 \text{ u} &= R\Delta m_{(\text{A}+2)37\text{C}}
 \end{aligned}$$

Como se puede ver en la Figura 20, el  $R\Delta m [M-H]^+ + 2$  medido por el instrumento es prácticamente idéntico al valor teórico, proporcionándonos así un elemento adicional en la identificación y confirmación de etefón [93].

#### 4.2. Optimización del método UHPLC-Orbitrap-MS

La separación cromatográfica fue una cuestión estudiada y optimizada durante este trabajo. En primer lugar, se llevó a cabo un proceso de caracterización de los analitos objeto de estudio, para lo cual en la fuente de ionización fueron utilizados unos parámetros estándar para el análisis de residuos de plaguicidas (Figura 17).

En lo que respecta al flujo y gradiente, como punto de partida fueron utilizados unos parámetros previamente optimizados. A lo largo del método se hicieron ligeras modificaciones en relación a estas variables observando que los mejores resultados fueron los obtenidos con los parámetros de flujo y gradiente que podemos observar en la Figura 16, y que resumimos en la Tabla 5.

Tabla 5. Flujo y gradiente de elución.

Etapa	Tiempo	Duración (s)	Flujo (mL/min)	Gradiente	% A	% B
1	00:00	60	0.03	Constante	95.0	5.0
2	01:00	150	0.03	Rampa	50.0	50.0
3	03:30	30	0.03	Rampa	10.0	90.0
4	04:00	30	0.03	Rampa	95.0	5.0
5	04:30	60	0.03	Constante	95.0	5.0

Como se ha comentado previamente, los analitos de interés son compuestos con un marcado carácter ácido. En ocasiones, es necesaria la adición de aditivos que favorezcan esta ionización. Así, para sustancias ácidas la ionización se verá favorecida al adicionar bases, ya que estas captarían  $H^+$  y se facilitaría la formación del ion  $[M-H]^+$ . En bibliografía se describe de manera general el uso de medio básico para llevar a cabo la extracción de este tipo de compuestos, en concreto empleando KOH [64],  $KH_2PO_4$  [94], NaOH [95] y  $NH_4OH$  [96], entre otros aditivos. Sin embargo, en LC-MS no es recomendable usar aditivos poco volátiles, ya que pueden producir obstrucción del capilar o depositarse en la fuente, además de dificultar la volatilización de los compuestos. En concreto, durante este trabajo, como

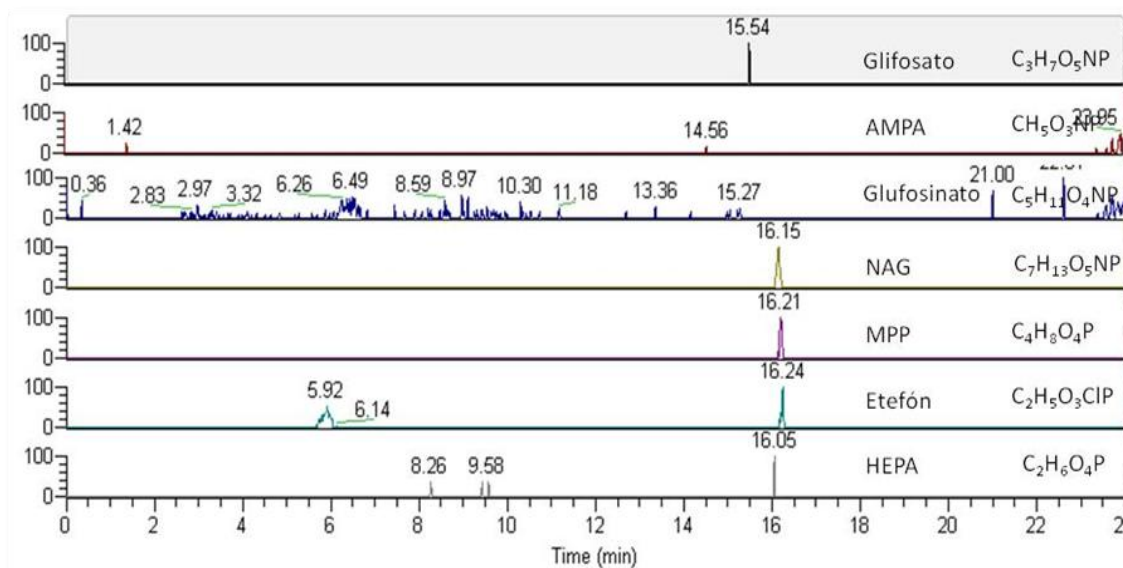
aditivo para favorecer la ionización se utilizó  $\text{NH}_3$ , añadiendo alícuotas de 30  $\mu\text{L}$  a cada vial. No es recomendable utilizar grandes cantidades de aditivos porque estos pueden competir en la fuente de ionización con la muestra y disminuir el número de moléculas de muestra ionizadas que entran al detector.

A lo largo del desarrollo de este estudio fueron probados varios tipos de columnas cromatográficas con diferentes fases móviles con el objetivo de obtener la mejor separación y resolución cromatográfica posible para los compuestos de interés. En bibliografía se observó el empleo de diversos tipos de columnas para análisis de esta familia de compuestos, desde columnas apolares convencionales [38, 43, 64, 66] hasta columnas iónicas con una alta especificidad para compuestos de carácter ácido [75].

La primera columna utilizada en este trabajo fue una Acquity UPLC HILIC (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 100 mm) de Waters [97]. Este tipo de columna es utilizada para la separación de compuestos muy polares, como es nuestro caso. En estas columnas tienen lugar interacciones hidrofílicas produciendo una mayor interacción con analitos polares. Como fase móvil para esta columna fueron utilizadas ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (formiato 5 mM) y MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (0.01 % HCOOH), obteniéndose mejores resultados con esta última fase móvil. Esta columna fue descartada porque incluso a altas concentraciones no proporcionó una buena sensibilidad de los analitos (datos no mostrados).

La columna más utilizada en el análisis de residuos en control alimentario y ambiental, debido a su versatilidad, es la columna Hypersil GOLD (1.9  $\mu\text{m}$ , C18 2.1 x 100 mm) de Thermo [38, 43, 64, 66,]. Este tipo de columnas son apolares lo que da lugar a una pobre interacción con los compuestos estudiados y como consecuencia no tiene lugar una separación adecuada a las necesidades específicas de análisis de compuestos polares. Con esta columna se probaron como fases móviles MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (0.01 % HCOOH) y MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (0.12 % PDFOA), no llegando a detectar ninguno de los analitos de interés. La utilización de ácido fórmico en la fase móvil aun cuando se está trabajando en ESI-, proporcionaba un pH bajo para que favorezca que los analitos ácidos estén en estado neutro (protonados) y exista una mayor interacción con la fase estacionaria. Otra estrategia diferente, pero con el mismo fin, es la utilización de PDFOA, que es un formador de pares iónicos. Los resultados obtenidos con esta columna y las fases móviles empleadas tampoco proporcionaron resultados satisfactorios (datos no mostrados).

El método oficial de la UE de análisis de residuos de plaguicidas polares en alimentos y vegetales [75] utiliza una columna de intercambio iónico. Este tipo de columna fue otra de las opciones evaluadas; en concreto se utilizó una columna PL SAX 1000 Å 8 µm 150 x 2.1 mm de Varian. En concreto, en esta columna de intercambio aniónico se producen fuertes interacciones entre las aminas cuaternarias de la fase estacionaria con los analitos estudiados. Debido a esta intensa interacción aumenta considerablemente los tiempos de retención en relación a las otras columnas. Como fase móvil se utilizó la misma que se emplea en el método oficial de la UE, H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1 mM ácido cítrico, ajustado a pH 11 con dimetilamina, DMA). Uno de los inconvenientes de este método de análisis es el tiempo de análisis cromatográfico, que es relativamente elevado (24 min). Si se tiene en consideración que entre los propósitos de este trabajo estaba el realizar un método de análisis rápido y sencillo, se intentó, por tanto, acortar este tiempo de análisis, pero los resultados conseguidos no mejoraron. Otra opción fue modificar la composición de la fase móvil; hasta el momento los mejores resultados se habían obtenido con MeOH/H<sub>2</sub>O (0.01 % HCOOH). Con esta columna y empleando como fase móvil, la indicada por el método oficial de la UE, H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1 mM ácido cítrico, ajustado a pH 11 con DMA), se obtenían buenas separaciones, excepto para el AMPA y glufosinato (Figura 21).

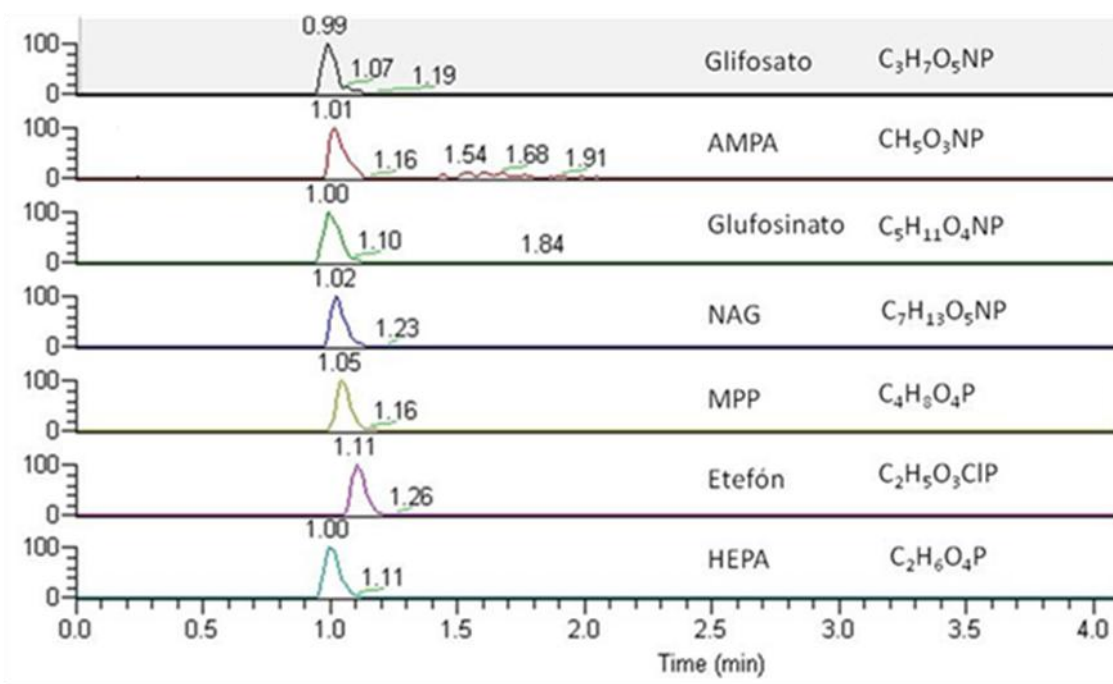


**Figura 21.** Cromatogramas obtenidos con la columna iónica PL SAX 1000 Å 8 µm 150x2.1 mm de Varian.

Finalmente, se evaluó una columna Hypersil GOLD Phenyl (1.9 µm, 2.1 x 100 mm) de Thermo. En este caso, las partículas de sílice cuentan con un grupo fenilo, que es el responsable de la interacción. Las fases fenilo son π-básicas (donadores de electrones) y

son similares de manera muy general en la retención a las fases con cadenas carbonadas. Sin embargo, la selectividad alternativa de las fases fenilo se explica debido a las interacciones  $\pi$ - $\pi$  que aparecen en los anillos fenilo. Así, esta estructura presenta una deslocalización de orbitales  $\pi$  por el anillo lo que crea una mayor densidad de carga por encima y por debajo del anillo, favoreciendo la interacción con los compuestos objeto de estudio. Entre los compuestos que suelen presentar diferente selectividad en la fase fenilo se encuentran bases hidrofóbicas (p. ej. ciertos antibióticos), bases moderadas (anestésicos, analgésicos narcóticos), algunos compuestos ácidos, etc. Por tanto, esta columna podría ajustarse para la separación de los analitos. A tal fin se utilizó como fase móvil MeOH/H<sub>2</sub>O (0.12 % PDFOA) y MeOH/H<sub>2</sub>O (0.01 % HCOOH), obteniéndose los mejores resultados hasta el momento con esta última fase móvil (Figura 22), con lo que la columna fenilo fue, por tanto, seleccionada para las posteriores experiencias.

Es importante destacar que el tiempo total de análisis es de 5.30 min., es decir, se trata de un método cromatográfico rápido.



**Figura 22.** Cromatogramas obtenidos con la columna Hypersil GOLD Phenyl (Thermo) 1.9  $\mu$ m 2.1x100 mm.

Los analitos estudiados son compuestos con elevada polaridad lo que da lugar a que sean muy poco retenidos por la columna utilizada para su separación (columna fenilo). Esto se traduce en unos tiempos de retención cortos, eluyendo prácticamente todos los analitos entorno al minuto 1; además todos los compuestos salen cuanto mayor es el porcentaje de

fase acuosa, lo que es otro indicativo de la poca interacción de éstos con la fase estacionaria; prácticamente no es necesario fase orgánica (la de mayor poder de elución) para eluir estos compuestos. Debido al poder de elución de la fase orgánica durante nuestro método el porcentaje de esta es aumentado hasta el 90 %, este paso se puede considerar como una etapa de limpieza de la fase estacionaria de interferentes orgánicos que puedan quedar retenidos en ella (Figura 16).

### **4.3. Optimización del método de extracción**

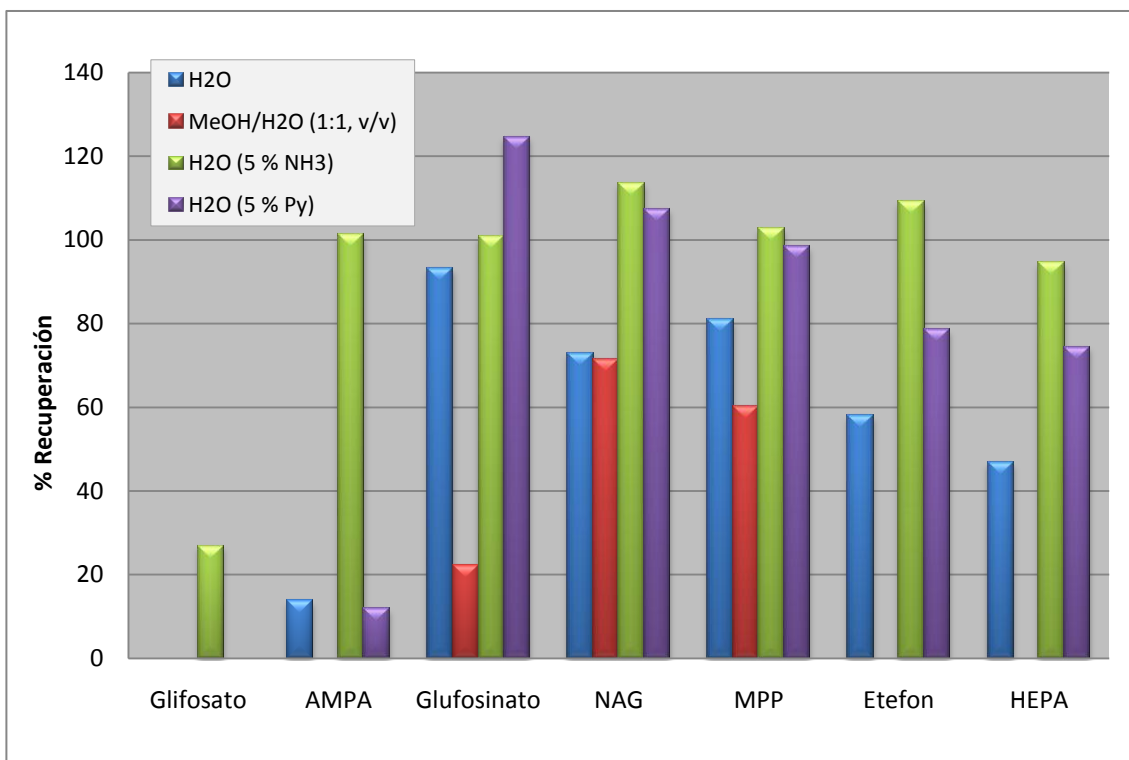
Uno de los métodos por excelencia para la extracción de plaguicidas y su posterior análisis de residuos es el método QuEChERS. Este método es ampliamente utilizado, tanto en matrices vegetales como en suelos, debido a su rapidez y sencillez [49, 50]. Considerando los analitos en estudio, el método QuEChERS no puede ser aplicado como tal, ya que en la partición inducida, los compuestos no quedarían en la fase orgánica, que es la que posteriormente se somete a análisis. Esto es debido a que glifosato, glufosinato, etefón y sus TPs son altamente solubles en agua por lo que permanecerían en la fase acuosa predominantemente.

Como se mencionó, otro aspecto muy importante a la hora de llevar a cabo la extracción de este grupo de compuestos es su solubilidad en agua. Se trata de compuestos con una elevada solubilidad, por lo que el procedimiento de extracción más utilizado en bibliografía incluye una SLE empleando agua como disolvente [38, 44 - 46]. El principal problema que surge al utilizar agua como disolvente extractante es la imposibilidad de realizar preconcentraciones para incrementar la sensibilidad del método. No obstante, se decidió evaluar diferentes disolventes y mezclas, evaluando los resultados en términos de recuperaciones. De manera general, para llevar a cabo el procedimiento de extracción se utilizaron 10 g de suelo y 10 mL de disolvente extractante para realizar la extracción. Dichas recuperaciones se determinaron mediante el uso de muestras de suelo blancas fortificadas a concentraciones de 50 y 100 µg/kg. A continuación se detallan los resultados obtenidos cuando se evalúan distintas soluciones de extracción:

- Agua: Como se ha comentado anteriormente, los compuestos objeto de estudio son compuestos altamente solubles en agua. Mediante el tratamiento de la muestra directamente con agua se consigue la extracción de estos analitos pasando estos al extracto acuoso, que será el que, una vez tratado,

analizaremos. Como se puede ver en la Figura 23, las recuperaciones obtenidas fueron bastante bajas, incluso hay compuestos como el glifosato que no llegaron a extraerse.

- Agua/metanol (1:1, v/v): Con esta extracción lo que se pretendía era combinar la solubilidad de los analitos en agua con el poder extractante del MeOH. Sin embargo, fue la experiencia con la que peores resultados se obtuvieron: no se extraían ni glifosato, AMPA, etefón ni HEPA, mientras que los analitos extraídos lo hicieron con una recuperación muy baja (Figura 23).



**Figura 23.** Recuperaciones obtenidas con los diferentes disolventes evaluados en la extracción (muestras fortificadas a 50 µg/kg).

- Agua con un 5 % de amoníaco (v/v): Al trabajar con compuestos ácidos la adición de amoníaco genera un medio básico que favorece la desprotonación, lo que se traduce en una mejor transferencia de los analitos a la fase acuosa. Empleando estas condiciones se obtuvieron mejores resultados (Figura 23). Sin embargo, el glifosato mostraba unas recuperaciones no demasiado adecuadas ( $R \approx 30\%$ ). Aun así fue el extractante con el que mejor se comportaba este compuesto.

- Agua con un 5 % de piridina (v/v): Con el objetivo de incrementar la recuperación para glifosato, se evaluó una base de distinta naturaleza como la piridina. Sin embargo, al tratarse de una base voluminosa y más débil que el amoniac (pK<sub>a</sub><sub>NH<sub>3</sub></sub> = 9.24 vs. pK<sub>a</sub><sub>py</sub> = 5.16), no hay una buena transferencia de analitos a la fase acuosa, ya que la desprotonación no es tan favorable como en el caso del amoniac. Esto pude justificar que se obtuvieran buenos resultados para todos los compuestos, excepto para glifosato y AMPA, que no se conseguían extraer (Figura 23).

A la vista de los resultados anteriores, la extracción con amoniac resultó la más prometidora; en este sentido, para intentar incrementar la recuperación de glifosato, se evaluó la extracción en caliente, pero los datos obtenidos fueron prácticamente idénticos a la extracción en frío, por lo que se descartó esta experiencia.

En un intento adicional para mejorar la recuperación del glifosato, se estudió la aplicación de un procedimiento extractivo basado en PLE, utilizando como disolvente extractor agua con un 5 % de amoniac, la mezcla que proporcionaba mejores resultados. Hay que destacar que no es nada habitual realizar un proceso de extracción PLE utilizando agua como disolvente extractor. Esto es debido a que normalmente, una vez realizado el procedimiento de extracción, se debe evaporar el disolvente y recomponer con un volumen conocido, es decir, concentrar los extractos. Obviamente, esto es muy difícil llevarlo a cabo cuando se utiliza agua como disolvente extractante, ya que esta tiene un elevado punto de ebullición y los analitos de interés podrían degradarse al utilizar altas temperaturas para evaporarla. En consecuencia, la estrategia seguida fue utilizar una etapa de SPE para llevar a cabo la preconcentración, tratando de retener los analitos de la muestra sobre un sólido. Una vez separados del resto de componentes de la muestra, los compuestos retenidos se solubilizan de nuevo con un determinado eluyente, de manera que obtenemos estos analitos en un menor volumen. Ahora este volumen sí es conocido y se puede determinar la concentración de analito que teníamos en la muestra.

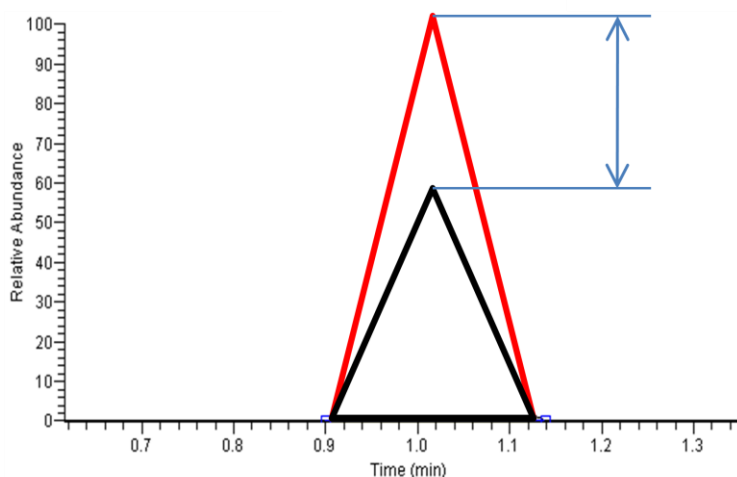
Dadas las características de los analitos, se emplearon cartuchos de intercambio aniónico que permiten retener compuestos ionizados y de elevada polaridad, para a continuación, ser eluidos hasta un volumen final de 2 mL con diferentes mezclas de eluyente: agua (5 % amoniac, v/v)/metanol (50:50, v/v) y agua (5 % amoniac, v/v). Los resultados obtenidos tampoco fueron satisfactorios (datos no mostrados), dando lugar a



unas bajas recuperaciones e incrementando mucho el tiempo, material y manipulación de muestra necesarios para llevar a cabo la extracción.

#### 4.3.1. Etapa de limpieza: Reducción del efecto matriz

Hay que tener en cuenta que el suelo es una matriz muy compleja, con gran número de componentes que pueden interferir en la señal de los analitos, dando lugar a lo que se conoce como efecto matriz. El efecto matriz consiste en la disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes [98]. En LC-MS, el efecto matriz se manifiesta principalmente en la fuente de ionización, en lo que se conoce como supresión iónica, que consiste en la pérdida de sensibilidad o incluso la pérdida completa de la señal de analito, como describe Kaufmann *et al.* [99] (Figura 24).

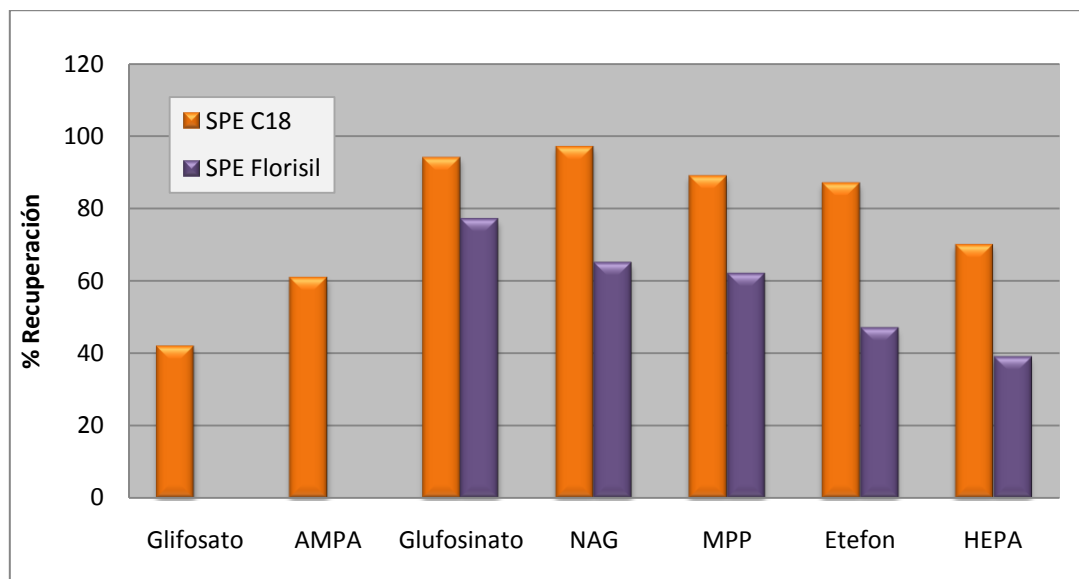


**Figura 24.** Reducción de la señal como consecuencia del efecto matriz.

La supresión iónica es consecuencia de que ciertos componentes de la matriz coeluyen con los analitos de interés en la fuente de ionización, lo que da lugar a que no todas las moléculas de analito sean ionizadas. Tiene lugar una competencia por la ionización entre los componentes de la matriz y los compuestos objeto de estudio. Durante la optimización y el desarrollo de la metodología de análisis, fueron numerosos los problemas debido a este efecto, hasta el punto de no poder monitorizar correctamente los compuestos en matriz y sí en disolvente. Los compuestos objeto de estudio tienen un bajo peso molecular y eluyen al principio del cromatograma. Esta zona suele ser conflictiva para

trabajar con ella, porque se ve influenciada por gran cantidad de interferentes procedentes de la matriz, sobre todo cuando se trabaja con matrices complejas, como suelos agrícolas. Aparentemente, interferentes de la matriz coelúan o aparecían a tiempos casi idénticos a los de los analitos de interés, reduciendo la ionización en éstos. La principal causa se debe, precisamente, a dichos tiempos de retención: los componentes de la matriz generalmente eluyen a tiempos de retención muy bajos con lo que aquellos compuestos que eluyan a esos mismos tiempos se verán más afectados por una posible supresión iónica. En este caso, una de las soluciones es diluir el extracto final a inyectar para reducir la cantidad de matriz presente, de manera que se evaluaron distintas diluciones para intentar minimizar el efecto matriz (diluciones 1:5 y 1:10). Adicionalmente, se estudiaron distintos volúmenes de inyección de muestra para así intentar minimizar el efecto de la carga de matriz. Sin embargo, con ninguna de estas estrategias se obtuvieron resultados aceptables (datos no mostrados).

Por tanto, se llegó a la conclusión de que era necesaria una etapa previa de limpieza para eliminar interferentes de la matriz y reducir la supresión iónica observada. A tal fin, se estudió la inclusión de una etapa de limpieza mediante SPE. Se utilizaron cartuchos Florisil y C18, consiguiendo los mejores resultados con éstos últimos (Figura 25).



**Figura 25.** Recuperación obtenida tras la aplicación de la limpieza mediante SPE (muestras fortificadas a 50 µg/kg).

Tanto el efecto de supresión iónica como la presencia de interferentes pudieron reducirse notablemente con la etapa de limpieza con cartuchos SPE C18. La inclusión de esta etapa de limpieza permitía, por tanto, la determinación de los analitos con adecuadas recuperaciones incluso a niveles de concentración muy bajos.

#### **4.4. Validación de la metodología optimizada**

Se llevó a cabo un proceso de validación de nuestro método de análisis, con el objetivo de lograr una adecuada identificación, confirmación y cuantificación de los compuestos analizados. Se estudiaron parámetros tales como linealidad, veracidad (expresada como recuperación), precisión intra-día e inter-día (expresada en términos de desviación estándar relativa, RSD), límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

Para la identificación y confirmación de nuestros compuestos en UHPLC-Orbitrap se utilizaron las ventanas de tiempo de retención, que son definidas como la media del tiempo de retención  $\pm$  tres veces la desviación estándar (SD) del tiempo de retención (RT), según la expresión  $RT \pm 3 SD$ , empleando para ello muestras fortificadas a 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Por otra parte, la masa exacta de cada ion  $[M-H]^+$ , fue usada para la confirmación. En el caso del etefón, adicionalmente se recurrió a la relación isotópica debida a la presencia de un átomo de cloro en la molécula, utilizando también para la confirmación el defecto isotópico relativo de masa ( $R\Delta m$ ) (Tabla 5).

Para la cuantificación de los analitos se tuvo en cuenta que el suelo es una matriz compleja, habida cuenta de los problemas de efecto matriz descritos anteriormente. Para el estudio y evaluación de este efecto se analizaron patrones en disolvente a concentraciones desde 1 a 300  $\mu\text{g}/\text{L}$ , y patrones en matriz de suelo en el mismo rango. Las curvas de calibración obtenidas en el caso de la recta en matriz fueron significativamente diferentes a las obtenidas en disolvente, comprobándose así la influencia clara del efecto matriz mencionado anteriormente (Figura 26). A la vista de estos resultados, para compensar el efecto producido por la matriz objeto de estudio en la cuantificación, se utilizó calibrado en matriz.

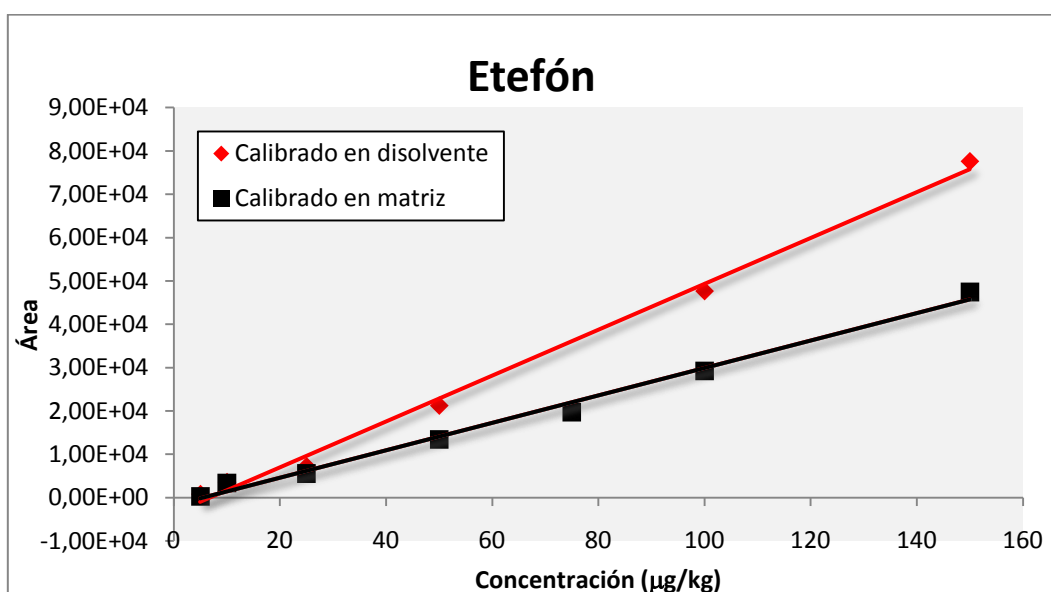
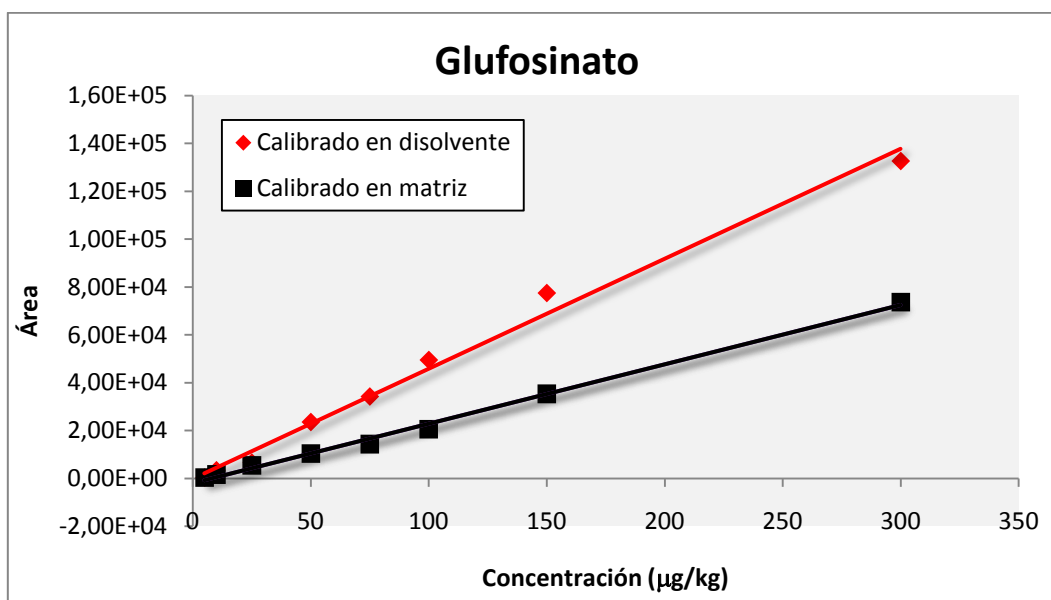
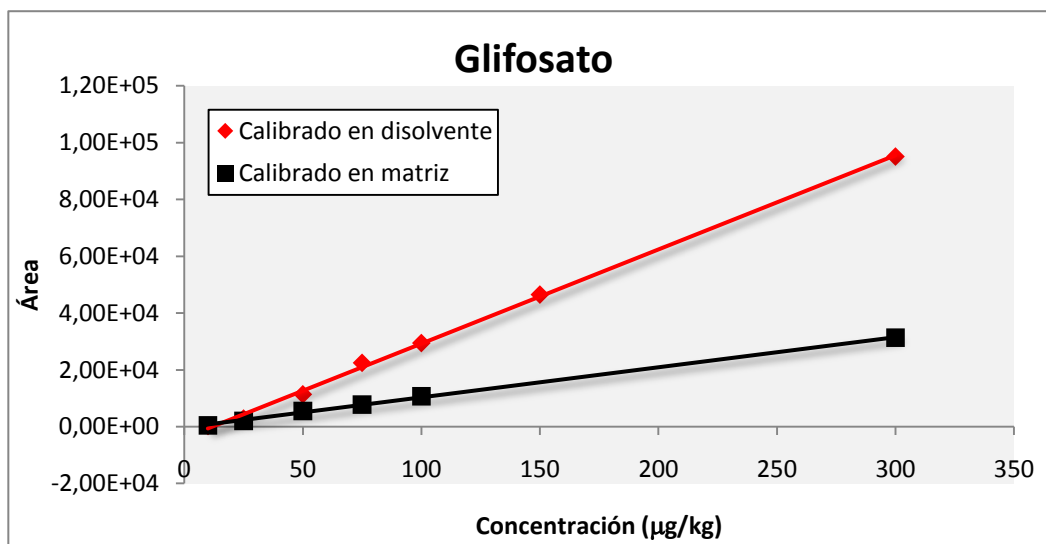


Figura 26. Curvas de calibrado para glifosato, glufosinato y etefón en disolvente y en matriz.

En relación al resto de parámetros de validación estudiados, los resultados obtenidos se resumen a continuación:

- **Linealidad** → Fue evaluada en el rango comprendido entre 10-150 µg/kg y las rectas de calibrado fueron ajustadas por mínimos cuadrados representando el área de pico del analito en función de la concentración de estándar de calibración. El coeficiente ( $R^2$ ) de determinación está comprendido entre 0.9922 (etefón) y 0.9990 (glifosato) (Tabla 6). En el caso de muestras con una concentración por encima del límite superior (150 µg/kg), deberán ser diluidas para trabajar dentro del rango, teniendo posteriormente en cuenta esta dilución a la hora de cuantificar la cantidad de analito encontrado.
- **Veracidad** → Se evaluó en términos de recuperación, para lo que se utilizaron muestras blancas de suelo fortificadas a cuatro niveles diferentes de concentración (10, 25, 50 y 100 µg/kg), tomando como referencia los LMR establecidos por la legislación para estos componentes en vegetales. Para cada nivel de fortificación se procesaron cinco réplicas. Las recuperaciones (Tabla 6) están en el rango de 60-113 % a 10 µg/kg, 65-97 % para 25 µg/kg, 73-97 % 50 µg/kg y 71-96 % para 100 µg/kg. Para el glifosato el intervalo de recuperaciones es 30 % y 34 % para 50 y 100 µg/kg, respectivamente. Sin embargo, la repetibilidad observada nos permitía asegurar resultados adecuados en el análisis de muestras reales aplicando un factor de corrección. Además, considerando la máxima concentración permitida por la legislación actual en vegetales, el método validado se ajusta a estos niveles de concentración en muestras reales de suelos, incluso para glifosato, cuyo mínimo LMR en vegetales es 100 µg/kg.
- **Precisión** → Expresada como la desviación estándar relativa (RSD). Para su evaluación se realizaron estudios intra-día e inter-día. La precisión intra-día fue estudiada analizando cinco muestras de suelo fortificadas, las cuales fueron extraídas durante el mismo día y a los mismos niveles de concentración a los que fueron hechos los estudios de recuperación antes comentados. Como puede verse en la Tabla 6, los valores de RSD intra-día están comprendidos en el intervalo de 3 % al 19 % para todos los componentes. La precisión inter-día fue estudiada analizando muestras fortificadas a 10 y 50 µg/kg para todos los componentes (excepto AMPA y glifosato, los cuales fueron estudiados a 50 µg/kg), realizándose la extracción en

diferentes días ( $n = 3$ ). El rango de RSD obtenido en este caso fue 4-29 % a 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 7-19 % a 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tabla 6).

- Límites de detección y cuantificación → Fueron estimados analizando patrones en matriz en un rango de concentraciones decreciente (50, 25, 10, 5, 3 y 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Ambos fueron calculados como la concentración a la cual la relación S/N es 3 y 10, respectivamente. El rango de límite de detección y cuantificación en suelos fue de 3-25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 10-50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. Con el fin de simplificar los controles de calidad rutinarios, el LOQ fue establecido en 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para todos los componentes (excepto para AMPA y glifosato, cuyo límite de cuantificación es de 25 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente). Es importante tener en cuenta que los límites establecidos fueron remitidos a las concentraciones en el suelo antes de llevar a cabo la extracción, por lo que estos límites pueden ser descritos como los límites del método analítico. A la vista de estos resultados se puede destacar que los LOQs obtenidos en la determinación de los analitos de interés se encuentran por debajo de las concentraciones máximas permitidas por la legislación actual, con la importancia que esto conlleva (Tabla 6).

**Tabla 6. Parámetros de validación**

Compuesto	Linealidad ( $R^2$ )	Repetibilidad <sup>1</sup>				Reproducibilidad <sup>2</sup>		LOD $\mu\text{g}/\text{kg}$	LOQ $\mu\text{g}/\text{kg}$
		% Recuperación (RSD intra-día)				RSD inter-día			
		10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$		
Glifosato	0.9990	N.D. <sup>3</sup>	N.D.	<b>30</b> (9)	<b>34</b> (13)	N.D.	13	25	50
AMPA	0.9953	N.D.	<b>65</b> <sup>4</sup> (11)	80(14)	90(5)	N.D.	17	10	25
Glufosinato	0.9959	93(16)	91(14)	88(8)	84(9)	4	15	5	10
NAG	0.9964	85(5)	88(3)	93(3)	96(10)	10	19	5	10
MPP	0.9937	85(4)	88(6)	97(7)	101(6)	14	10	3	10
Etefón	0.9922	60(11)	75(7)	73(3)	73(3)	19	7	5	10
HEPA	0.9934	113(9)	97(6)	88(5)	78(6)	<b>29</b>	14	3	10

<sup>1</sup>  $n = 5$

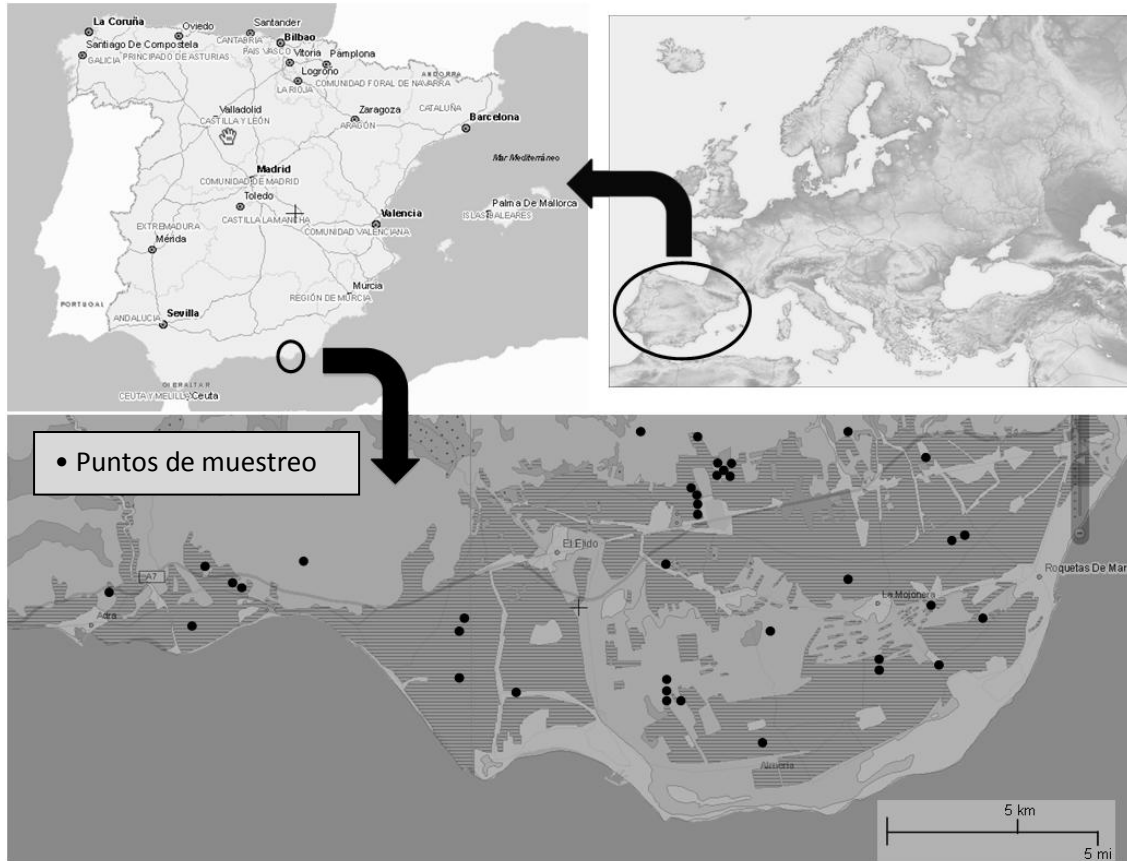
<sup>2</sup>  $n = 3$

<sup>3</sup> N.D.: No detectado

<sup>4</sup> Los números en negrita indican que los valores están fuera de los límites (recuperación y precisión) establecidos en los requerimientos de la validación.

#### 4.5. Aplicación del método de análisis a muestras reales

El método validado se aplicó a 37 muestras reales de suelo tomadas durante este año de varios invernaderos de la zona de Almería (Figura 27).



**Figura 27.** Zonas de muestreo en la provincia de Almería.

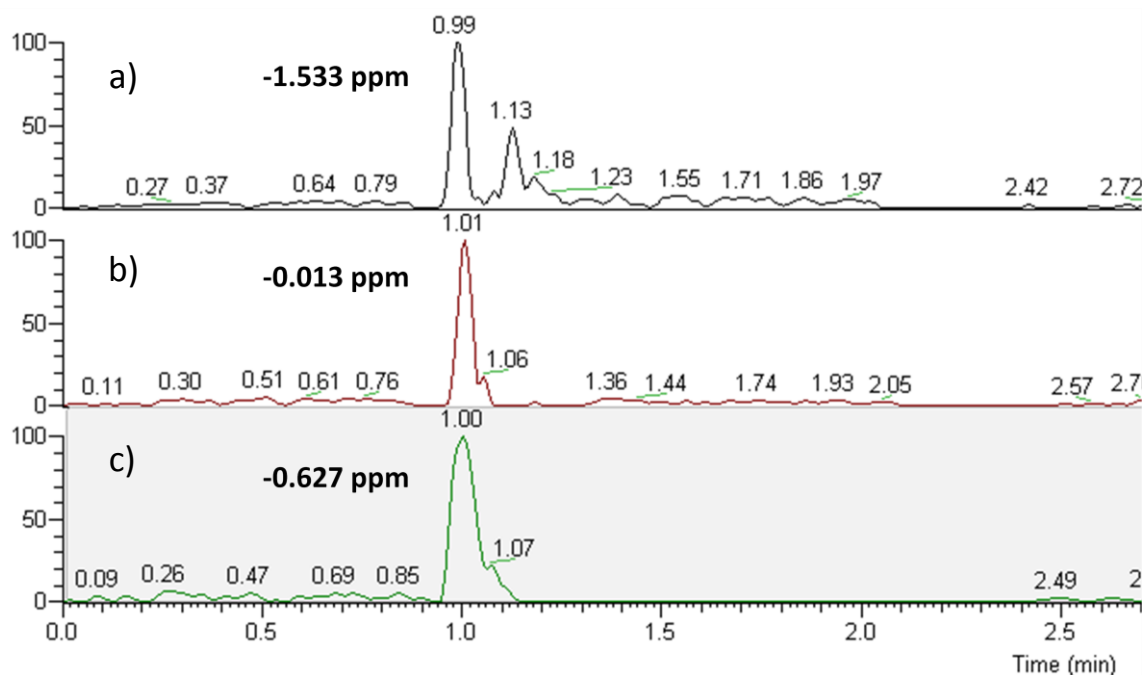
Para evitar errores y asegurar la calidad de los resultados, se llevó a cabo un control de calidad interno (IQC). Este control de calidad se basó en el uso de extracto de blanco, para eliminar la posibilidad de falsos positivos causados por una contaminación en el procedimiento de extracción o por la presencia de interferencias; un blanco reactivo (obtenido por la realización de todo el procedimiento pero sin muestra), evitando así la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación en los instrumentos y reactivos empleados; un blanco fortificado a 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , para evaluar la eficiencia de la extracción; y una curva de calibrado a diferentes concentraciones que nos permitía comprobar la linealidad y sensibilidad de nuestro método.

En nueve de las muestras analizadas se encontró HEPA en concentraciones por encima del LOD del método comprendidas entre 21-48  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tabla 7), mientras que el resto de compuestos no fueron detectados a niveles superiores a los LODs obtenidos con la metodología desarrollada.

**Tabla 7.** Positivos de HEPA en muestras reales de suelos agrícolas.

Muestra	[ ] ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Muestra	[ ] ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Muestra	[ ] ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Adr0221	47	Eji0424	21	Mat0321	48
Adr0223	26	Eji0624	24	Moj0122	46
Adr0321	26	Mat0121	33	Vic0426	30

En la Figura 28 se puede ver el XIC de dos muestras de suelo positivas de este componente a 46  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 47  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente, y la comparación con el XIC del punto de la recta de calibrado que corresponde a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



**Figura 28.** XIC de muestras de suelo agrícola reales conteniendo HEPA a a) 46 y b) 47  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , comparadas con c) patrón en matriz a 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , y el error de masa exacta en cada caso).



### III. CONCLUSIONES

A continuación se destacan las principales conclusiones derivadas del presente Trabajo Fin de Máster:

1. Se ha desarrollado un método nuevo, rápido y de bajo coste para el análisis de glifosato, glufosinato, etefón y sus respectivos TPs en suelos agrícolas.
2. El procedimiento de extracción más adecuado consistió en una SLE, empleando agua (5 % NH<sub>3</sub>) como disolvente, seguida de una etapa de limpieza mediante SPE (C18).
3. El método instrumental desarrollado resultó de 5.30 min, siendo significativamente más corto que el Método Oficial de Análisis de la UE (24 min), evitando además el empleo de columnas específicas y caras.
4. La determinación no necesitó de la inclusión de una etapa de derivatización, muy común para análisis de estos compuestos, reduciendo considerablemente la manipulación de muestra, tiempo y coste del análisis.
5. Para la identificación y confirmación de los analitos se usaron características proporcionadas por HRMS, como pueden ser la medida de masa exacta y el defecto isotópico relativo de masa ( $R\Delta m$ ), en el caso del etefón.
6. El método propuesto ha sido validado permitiendo una determinación adecuada de estos compuestos, con recuperaciones comprendidas en el rango 65-113 %, excepto para glifosato, cuyas recuperaciones a 50 y 100 µg/kg fueron de 30 y 34 %, respectivamente, pero con adecuada repetibilidad (< 15 %). La precisión inter-día se encontraba en el rango de 4-29 % a 10 µg/kg, y de 7-19 % a 50 µg/kg. Los LODs y LOQs alcanzados permiten el análisis de los compuestos estudiados con buenos resultados a bajas concentraciones. 10 µg/kg y 50 µg/kg son los LOQ alcanzados para etefón y glifosato respectivamente, los cuales están por debajo de los LMR establecidos para estos componentes en vegetales en la legislación vigente actualmente.
7. El método optimizado fue aplicado al análisis de 37 muestras de suelo agrícola real, encontrando en 9 de ellas HEPA por encima del LOQ del método en un rango comprendido entre 21 y 48 µg/kg.

#### **IV. PROPUESTAS DE CONTINUACIÓN DEL TRABAJO**

A continuación se muestran una serie de propuestas futuras para la continuación de este trabajo:

- Para una mayor seguridad, a la hora de confirmar los positivos en muestras reales, se deberían fragmentar los iones en la celda de colisión HCD del analizador Orbitrap y ver los fragmentos resultantes de estos analitos. Una vez identificados los fragmentos provenientes de cada analito, se podrían buscar en las muestras positivas, siendo una prueba evidente de la presencia de un determinado analito en la muestra.
- Desarrollo de un método de extracción y análisis, con las ventajas del método desarrollado (sencillez y rapidez), de estos compuestos en vegetales.
- Ampliar el número de materias activas ácidas y de elevada polaridad en el método.
- Mejorar el proceso de separación cromatográfica, para tratar de incrementar ligeramente los tiempos de retención de los compuestos y, así, reducir el efecto matriz por coelución con interferentes.

## V. REFERENCIAS

- [1] <http://www.marm.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/informacion-ambiental-indicadores-ambientales/indicadores-ambientales-perfil-ambiental-de-espana/perfil-ambiental-de-espana-2009/default.aspx> (Último acceso Junio 2011)
- [2] [http://www.fao.org/ag/agn/agncs/chemicals\\_pesticide\\_es.asp](http://www.fao.org/ag/agn/agncs/chemicals_pesticide_es.asp) (Último acceso Junio 2011)
- [3] <http://www.who.int/topics/pesticides/es/> (Último acceso Junio 2011)
- [4] 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" (2009) *Journal of Chromatography A*, 1216, 6767–6788
- [5] International Union of Pure & Applied Chemistry (IUPAC). Pesticide Properties Database, Glyphosate. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/373.htm> (Último acceso Junio 2011)
- [6] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3376.html> (Último acceso Junio 2011)
- [7] [http://www.pesticideinfo.org/Detail\\_Chemical.jsp?Rec\\_Id=PC33138](http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC33138) (Último acceso Junio 2011)
- [8] [http://www.terralia.com/vademecum\\_de\\_productos\\_fitosanitarios\\_y\\_nutricionales/index.php?proceso=buscar&tipo=ingredientes&texto=GLIFOSATO](http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=buscar&tipo=ingredientes&texto=GLIFOSATO) (Último acceso Junio 2011)
- [9] Borggaard, O.K., Gimsing, A.L. "Review Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review" (2008) *Pest Management Science*, 64, 441–456
- [10] Liu, Y., Wu, X., Yang, M., Zhu, G. "The environmental risk assessment of herbicide Glyphosate on various chinese cultivated soils" (2010) *International Conference on Digital Manufacturing & Automation*
- [11] Al-Rajab, A. J., Schiavon, M. "Degradation of <sup>14</sup>C-glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in three agricultural soils" (2010) *Journal of Environmental Sciences*, 22(9) 1374–1380
- [12] International Union of Pure & Applied Chemistry (IUPAC). Pesticide Properties Database, Glufosinate. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/1540.htm>
- [13] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4630.html> (Último acceso Junio 2011)
- [14] [http://www.bayercropscience.com/BCSWeb/CropProtection.nsf/id/glufosinate\\_ammonium\\_nsu.htm?open&l=EN&ccm=200020](http://www.bayercropscience.com/BCSWeb/CropProtection.nsf/id/glufosinate_ammonium_nsu.htm?open&l=EN&ccm=200020) (Último acceso Junio 2011)
- [15] Hoerlein, G. "Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties" (1994) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 138, 73–145
- [16] [http://www.terralia.com/vademecum\\_de\\_productos\\_fitosanitarios\\_y\\_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=1393](http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=1393) (Último acceso Junio 2011)
- [17] International Union of Pure & Applied Chemistry (IUPAC). Pesticide Properties Database, Ethephon. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/274.htm> (Último acceso Junio 2011)
- [18] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.26031.html> (Último acceso Junio 2011)
- [19] <http://www.bayercropscience.com/bcsweb/cropprotection.nsf/id/ethephon.htm?open&l=EN&ccm=200020050> (Último acceso Junio 2011)
- [20] [http://www.terralia.com/vademecum\\_de\\_productos\\_fitosanitarios\\_y\\_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=1611&id\\_marca=18107&base=2011](http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=1611&id_marca=18107&base=2011) (Último acceso Junio 2011)
- [21] <http://www.epa.gov/> (Último acceso Junio 2011)
- [22] Reglamento (CE) N° 839/2008 de la Comisión, de 31 de julio de 2008, que modifica el Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a los

anexos II, III y IV relativos a límites máximos de residuos de plaguicidas en el interior o en la superficie de determinados productos (DOCE L 234 de 30/08/2008)

[23] Reglamento (CE) N° 149/2008 de la Comisión, de 29 de enero de 2008, por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo mediante el establecimiento de los anexos II, III y IV que estipulan límites máximos de residuos para los productos que figuran en el anexo I de dicho Reglamento (DOCE L 58 de 1/03/2008)

[24] Reglamento (CE) N° 459/2010 de la Comisión, de 27 mayo 2010, por el que se modifican los anexos II, III y IV del Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de determinados plaguicidas en determinados productos (DOCE L 129 de 28/05/2010)

[25] Orden PRE/2556/2002, de 14 de octubre, por la que se incluyen las sustancias activas denominadas glifosato, tifensulfuron-metil y el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), en el anexo I del Real Decreto 2163/1994, de 4 de noviembre, por el que se implanta el sistema armonizado comunitario de autorización para comercializar y utilizar productos fitosanitarios (BOE n° 249 de 17/10/2002)

[26] Reglamento (CE) N° 901/2009 de la Comisión, de 28 de septiembre de 2009, relativo a un programa comunitario plurianual coordinado de control para 2010, 2011 y 2012 destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal y animal o sobre los mismos, así como a evaluar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos (DOCE L 256 de 29/09/2009)

[27] Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo (DOCE L 70 de 16/03/2005)

[ 28 ] [http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/94\\_eva/glyphos.pdf](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/94_eva/glyphos.pdf) (Último acceso Mayo 2011)

[29] [http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration\\_review/glyphosate/index.htm](http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/glyphosate/index.htm) (Último acceso Mayo 2011)

[ 30 ] [http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/94\\_eva/glufosin.pdf](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/94_eva/glufosin.pdf) (Último acceso Mayo 2011)

[ 31 ] [http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration\\_review/glufosinate\\_ammonium/index.htm](http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/glufosinate_ammonium/index.htm) (Último acceso Mayo 2011)

[32] [http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/94\\_eva/ethephon.pdf](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/94_eva/ethephon.pdf) (Último acceso Mayo 2011)

[ 33 ] [http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration\\_review/ethephon/index.html](http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/ethephon/index.html) (Último acceso Mayo 2011)

[34] <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/pesticides.htm?wtrl=01> (Último acceso Mayo 2011)

[35] 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 (BOE n° 15 de 18/01/2005)

[ 36 ] [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm?event=substance.resultat&s=1](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=substance.resultat&s=1) (Último acceso Junio 2011)

[37] Picó, Y., Font, G., Moltó, J.C., Mañes, J. "Solid-phase extraction of quaternary ammonium herbicides" (2000) *Journal of Chromatography A*, 885, 251–271

[38] Druart, C., Delhomme, O., Vaufléury, A., Ntcho, E., Millet, M. "Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and

aminomethylphosphonic acid in soil" (2011) *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 1725–1732

[39] Martínez Vidal, J. L., Padilla-Sánchez, J. A., Plaza-Bolaños, P., Garrido-Frenich, A., Romero González, R. "Using pressurized liquid extraction for the simultaneous analysis of 28 polar and 94 nonpolar pesticides in agricultural soils by GC/QqQ-MS/MS and UPLC/QqQ-MS/MS" (2010) *Journal of AOAC International*, 93, 1715–1731

[40] 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" (2003) *Journal of AOAC International*, 86, 412–431

[41] Lesueur, C., Gartner, M., Mentler, A., Fuerhacker, M. "Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–ion trap–mass spectrometry" (2008) *Talanta* 75, 284–293

[42] Turiel, E., Martín-Esteban, A., Tadeo, J.L., "Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples", (2008) CRC Press, Boca Ratón (FL, USA)

[43] Marín, J.M., Pozo, O.J., Beltrán, J., Hernández, F. "An ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of ethephon residues in vegetables" (2006) *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 20, 419–426

[44] Park, J-H., Mamun, Md., Choi, J-H., Abd El-Aty, A.M., Assayed, M. E., Choi, W.J., Yoon, K.S., Han, S., Kim, H.K., Park, B.J., Kim, K., Kim, S, Choi, H.G., Shim, J-H. "Development of a multiresidue method for the determination of multiclass pesticides in soil using GC" (2010) *Biomedical Chromatography*, 24, 893–901

[45] Castro, J., Sánchez-Brunete, C., Tadeo, J.L. "Multiresidue analysis of insecticides in soil by gas chromatography with electron–capture detection and confirmation by gas chromatography–mass spectrometry" (2001) *Journal of Chromatography A*, 918, 371–380

[46] Barco-Bonilla, N., Martínez Vidal, J.L., Garrido Frenich, A., Romero-González, R. "Comparison of ultrasonic and pressurized liquid extraction for the analysis of polycyclic aromatic compounds in soil samples by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry" (2009) *Talanta*, 78, 156–164

[47] Shenck, F.J., Wong, J.W., Tadeo, J.L. "Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples", CRC Press, Boca Ratón (FL, USA), 2008

[48] Hanke, I., Singer, H., Hollender, J. "Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection" (2008) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 2265–2276

[49] Padilla-Sánchez, J.A., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Garrido-Frenich, A., Martínez Vidal, J.L. "Application of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe-based method for the simultaneous extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in agricultural soils, analyzed by using gas chromatography–triple quadrupole-mass spectrometry/mass spectrometry" (2010) *Journal of Chromatography A*, 1217, 5724–5731

[50] Mastovska, K., Dorweiler, K.J., Lehotay, S.J., Wegscheid, J.S., Szpylka, K.A. "Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques" (2010) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5959–5972

- [51] Drożdżyński, D., Kowalska, J. "Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry" (2009) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 2241–2247
- [52] Schenck, F.J., Hobbs, J.E. "Evaluation of the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) approach to pesticide residue analysis" (2004) *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73, 24–30
- [53] Lehotay, S.J. "Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach for Determining Pesticide Residues" in *Methods in Biotechnology*, Vol. 19, Pesticide Protocols, Martinez Vidal, J.L. and Garrido Frenich, A. (Eds.) Humana Press, Totowa, NJ, 2005, pág. 239–261.
- [54] Niessen, W.M.A. "Liquid Chromatography–Mass Spectrometry" Ed. Taylor and Francis Group, 3rd Edition (2006) Chapter 1. Liquid Chromatography and Sample Pretreatment, pág. 3
- [55] Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., "Principios de Análisis Instrumental" Ed. McGraw Hill 5ª Edición (2001) Capítulo 26. Introducción a las separaciones cromatográficas, pág. 730
- [56] Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., "Principios de Análisis Instrumental" Ed. McGraw Hill 5ª Edición (2001) Capítulo 28. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia, pág. 785
- [57] <http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/data/articlestandard//lcgc/242005/164646/article.pdf> (Último acceso Junio 2011)
- [58] Ferrer, I., Thurman, E.M., Zweigenbaum, J., Woodman, M., Stone, P. "Environmental applications of a UHPLC system: The evolution of chromatography" (2010) *American Laboratory* 42 (2), 22-27
- [59] Kin-Chai, M., Huan-Tan, G. "Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in fruits and vegetables" (2009) *Food Chemistry*, 117, 561–567
- [60] Bolaños, P.P., Romero-González, R., Frenich, A.G., Vidal, J.L.M. "Application of hollow fibre liquid phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in alcoholic beverages by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry" (2008) *Journal of Chromatography A*, 1208, 16–24
- [61] 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" (2008) *Analytical Chemistry*, 80, 9450–9459
- [62] Drożdżyński, D., Kowalska, J. "Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry" (2009) *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 2241–2247
- [63] Kovalczuk, T., Jech, M., Hajslova, J. "Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A novel challenge in multiresidue pesticide analysis in food" (2006) *Analytica Chimica Acta*, 577, 8–17
- [64] Ibáñez, M., Pozo, O. J., Sancho, J. V., López, F. J., Hernández, F. "Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry" (2005) *Journal of Chromatography A*, 1081, 145–155
- [65] Ghanem, A., Bados, P., Kerhoas, L., Dubroca, J., Einhorn, J. "Glyphosate and AMPA analysis in sewage sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOC derivatization on strong anion-exchange resin as solid support" (2007) *Analytical Chemistry*, 79, 3794–3801

- [66] Ibáñez, M., Pozo O., Sancho J., López, F., Hernández, F. "Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry" (2006) *Journal of Chromatography A*, 1134, 51–55
- [67] García de Llasera, M.P. , Gómez-Almaraz, L., Vera-Avila, L.E., A. Peña-Alvarez, A. "Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit" (2005) *Journal of Chromatography A*, 1093, 139–146
- [68] Bernal, J., Bernal, J. L., Martín, M. T., Nozal, M. J., Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Martínez, M. A. "Development and validation of a liquid chromatography–fluorescence–mass spectrometry method to measure glyphosate and AMPA in rat plasma" (2010) *Journal of Chromatography B*, 878, 3290–3296
- [69] Qian, K., He, S., Tang, T., Shi, T., Li, J. "A rapid liquid chromatography method for determination of glufosinate residue in maize after derivatisation" (2011) *Food Chemistry* 127, 722–726
- [70] ChuanWang, K., Ming Chen, S., Hsu, J.F., Guey Cheng, S., Lee, C.K. "Simultaneous detection and quantitation of highly water-soluble herbicides in serum using ion-pair liquid chromatography–tandem mass spectrometry" (2008) *Journal of Chromatography B*, 876, 211–218
- [71] Sancho, J.V., Ibáñez, M., Grimalt, S., Pozo, J., Hernández, F. "Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry" (2005) *Analytica Chimica Acta*, 530, 237–243
- [72] Valcárcel Cases, M., Gómez Hens, A. "Técnicas analíticas de separación" Editorial Reverté, S.A. Ed. 1988 Capítulo 21. Derivatización en cromatografía en columna, pg. 677
- [73] Lundgren, L. N. "A new method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid residues in soils" (1986) *J. Agric. Food Chem.*, 34, 535–538
- [74] Niessen, W.M.A., "Liquid Chromatography–Mass Spectrometry" Ed. Taylor and Francis Group, 3rd Edition (2006) Chapter 1. Liquid Chromatography and Sample Pretreatment, pg. 11
- [75] EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides "Quick method for the analysis of residues of highly polar pesticides in foods of plant origin involving simultaneous extraction with methanol and LC-MS/MS determination", Authors: M. Anastassiades; D. I. Kolberg; D. Mack; I. Sigalova; D. Roux; D. Fügél, Version 5 (November 2010)
- [76] Dass, Ch., "Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry" Ed. John Wiley & Sons (2007) Chapter 1. Basics of Mass Spectrometry, pág. 3
- [77] Niessen, W.M.A., "Liquid Chromatography–Mass Spectrometry" Ed. Taylor and Francis Group, 3rd Edition (2006) Chapter 2. Mass Spectrometry, pág. 23
- [78] Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., "Principios de Análisis Instrumental" Ed. McGraw Hill 5ª Edición (2001) Capítulo 11. Espectrometría de masas atómica, pág. 271
- [79] Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., "Principios de Análisis Instrumental" Ed. McGraw Hill 5ª Edición (2001) Capítulo 20. Espectrometría de masas molecular, Ionización por electronebulización, pág. 548
- [80] Dass, Ch., "Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry" Ed. John Wiley & Sons (2007) Chapter 2.17 Electrospray Ionization (Modes of Ionization), pág. 48

- [81] Niessen, W.M.A., "Liquid Chromatography–Mass Spectrometry" Ed. Taylor and Francis Group, 3rd Edition (2006) Chapter 6.3 Electrospray Ionization (Atmospheric-Pressure Ionization), pág. 144
- [82] Dass, Ch., "Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry" Ed. John Wiley & Sons (2007) Chapter 3.1 Mass Resolving Power (Mass Analysis and Ion Detection), pág. 68
- [83] Niessen, W.M.A., "Liquid Chromatography–Mass Spectrometry" Ed. Taylor and Francis Group, 3rd Edition (2006) Chapter 7 LC-MS Analysis of Pesticides, pág. 179
- [84] Dagnac, T., Bristeau, S., Jeannot, R., Mouvet, C., Baran, N. "Determination of chloroacetanilides, triazines and phenylureas and some of their metabolites in soils by pressurised liquid extraction, GC–MS/MS, LC–MS and LC–MS/MS" (2005) *Journal of Chromatography A*, 1067, 225–233
- [85] Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., "Principios de Análisis Instrumental" Ed. McGraw Hill 5ª Edición (2001) Capítulo 11. Espectrometría de masas atómica, pág. 274
- [86] Dass, Ch., "Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry" Ed. John Wiley & Sons (2007) Chapter 3. Analysis and ion detection, pág. 80
- [87] Dass, Ch., "Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry" Ed. John Wiley & Sons (2007) Chapter 3. Analysis and ion detection, pág. 99
- [88] Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Cooks, G. "The Orbitrap: a new mass spectrometer" (2005) *Journal of Mass Spectrometry*, 40, 430–443
- [89] Makarov, A., Scigelova, M. "Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry" (2010) *Journal of Chromatography A*, 1217, 3938–3945
- [90] <http://www.thermoscientific.com/ecommerce/servlet/productsdetail?productId=13901132&groupType=PRODUCT&searchType=0&storeId=11152> (Último acceso Junio 2011)
- [91] Dass, Ch., "Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry" Ed. John Wiley & Sons (2007) Chapter 3.9 Orbitrap Mass Analyzers (Mass Analysis and Ion Detection), pág. 99
- [92] Niessen, W.M.A., "Liquid Chromatography–Mass Spectrometry" Ed. Taylor and Francis Group, 3rd Edition (2006) Chapter 2. Mass Spectrometry, pág. 27
- [93] Thurman, M., Ferrer, I. "The isotopic mass defect: a tool for limiting molecular formulas by accurate mass" (2010) *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 2807–2816
- [94] Miles, C. J., Moye, H. A. "Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils" (1988) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 488–491
- [95] Glass, R. L. "Liquid Chromatographic Determination of Glyphosate in Fortified Soil and Water Samples" (1983) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 280–282
- [96] Alferness, P.L., Iwata, Y. "Determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in soil, plant and animal matrices, and water by capillary gas chromatography with mass-selective detection" (1994) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2751–2759
- [97] Li, X., Xu, J., Jiang, Y., Chen, L., Xu, Y., and Pan, C. "Hydrophilic-interaction liquid chromatography (HILIC) with DAD and mass spectroscopic detection for direct analysis of glyphosate and glufosinate residues and for product quality control" (2009) *Acta Chromatographica*, 21, 559–576
- [98] Grimalt Brea, S. "Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal" Tesis Doctoral (2009) Universitat Jaume I de Castellón, Apartado I.5.1. Efecto matriz, pág. 43



---

[99] Kaufmann, A., Widmer, M. Maden, K. "Post-interface signal suppression, a phenomenon observed in a single-stage Orbitrap mass spectrometer coupled to an electrospray interfaced liquid chromatograph" (2010) *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 2162–2170