



**Departament de Ciències Experimentals
Química Analítica**

**DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS
Y ORGANOCORADOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS
HUMANAS**

**Tesis Doctoral
ELENA PITARCH ARQUIMBAU
2001**

Dr. Félix Hernández Hernández, Catedrático de Química Analítica, y Dr. Roque Serrano Gallego, profesor Titular de Química Analítica, de la Universitat Jaume I de Castellón,

Certifican: que la Tesis Doctoral “*Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas*” ha sido desarrollada bajo su dirección, en el área de Química Analítica del Departamento de Ciències Experimentals de la Universitat Jaume I de Castelló, por Elena Pitarch Arquimbau.

Lo que certificamos para los efectos oportunos en Castellón de la Plana, a 3 de Diciembre de 2001

Fdo. Dr. Félix Hernández Hernández

Fdo. Dr. Roque Serrano Gallego

Als meus pares

Este trabajo responde al compromiso adquirido con la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Comunitat Valenciana por la concesión de una beca predoctoral para la Formación de Personal Investigador (FPI), desde el 1 de Marzo de 1999.

Elena Pitarch Arquimbau ha sido beneficiaria de una beca concedida por la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Comunitat Valenciana, para la realización de una estancia en el *Laboratory of Organic-Analytical Chemistry (LOC)* en el *National Institute of Public Health and the Environment (RIVM)* en Holanda, llevada a cabo desde el 26 de Marzo al 6 de Julio de 2001. El trabajo de investigación llevó por título: “Optimization and validation of a method for the determination of freely dissolved poly aromatic hydrocarbons (PAHs) in pore water samples”, bajo la dirección de los Drs. *Elbert Hogendoorn* y *Ad de Jong*, y permitió ampliar los conocimientos de la doctoranda en el análisis de contaminantes orgánicos mediante técnicas cromatográficas, en especial la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). Además, los resultados de esta investigación han sido utilizados para la preparación de un artículo científico.

Asimismo, al inicio de los trabajos, Elena Pitarch Arquimbau realizó en 1998 una estancia de un mes de duración en el Departamento de Hidrogeología y Química Analítica de la Universidad de Almería, llevando a cabo trabajos de análisis de plaguicidas en fluidos biológicos usando técnicas de GC-MS.

Los trabajos realizados en la presente Memoria han sido en parte financiados por el proyecto: “*Nuevas estrategias en la determinación de residuos de plaguicidas y de metabolitos en fluido biológicos. Simplificación de la etapa de preparación de muestra*”, Fundació Caixa-Castelló, Ref: P1B98-08.

Esta Tesis ha sido realizada, y consecuentemente será defendida, de forma adecuada para la obtención del título de *Doctorado Europeo*.

Previamente a la defensa de la Tesis Doctoral, este trabajo ha sido evaluado por tres censores extranjeros independientes, Prof. Ettore Capri (*Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy*), Prof. Stefano Girotti (*Istituto Scienze Chimiche, Bologna, Italy*) y Prof. Michel Montury (*Universidad Bordeaux 1, Laboratoy de Physico-Toxicochimie des Systemes Naturels, Perigueux Cedex, France*).

Aquesta sembla una bona oportunitat per poder agrair a molta gent el seu suport per aquesta Tesi, resultat, no sols d'un treball, sino també d'un esforç i d'una etapa important de la meua formació colmada de moments d'optimisme, encara que d'altres de desànims, sobretot en la part d'acabament.

No em resulta difícil escollir a les dos primeres persones a qui m'agradaria donar les gràcies: a Félix per haver confiat en mi, per acceptar dirigir-me aquest treball, i sobretot perquè sense ell, no només no estaria dins d'aquest Grup Analític, sinò que segurament tampoc haguera gaudit de la beca FPI; a Roque, no sols per tutoritzar-me, sino també per saber escoltar-me, per la seua paciència infinita i per oferir-me la seua amistat. Gràcies als dos per fer que aquesta tesi doctoral haja tingut un començament i un acabament.

També vull agrair el suport rebut pels companys de Química Analítica:

A Paco, per ser el meu "comodí", per la seua paciència, pels seus consells i perquè junts hem lluitat les elaboracions dels treballs científics; a Ximo, per tota la seua ajuda i transmissió dels seus coneiximents de SPME i "gasos"; a Toni pels seus "cafes matinals" i per fer-me somriure sovint; a Joanvi per la seua capacitat mental i les seues intel·ligents explicacions; a Angel, per la Q36.

A les veteranes, Carmen i Maria, pels bons moments que hem passat juntes i per la seua disponibilitat d'ajuda constant (no vull oblidar donar-li les gràcies especials a Carmen per ser la millor "font de mostra"). A Sonia, perquè no sols hem compartit la SPME i el "crono", sino també aquells moments de convivència universitària. A la casi espanyola Tati, simplemente por su gran corazón y su cariño. A la parella, Mercedes y Susana, per la seua amistat i el seu bon caràcter. A Oscar per "Cai" i per confiar en els "meus colors".

A Jose (I) per la seua tranquil.litat i per compartir aquells bons moments de la cultura Argentina, encara que no el mate. A Yolanda, especialment perquè les dos juntes vam començar aquest procés de tesi.

A la resta dels companys, que s'han incorporat a l'àrea de Química Analítica en moments més avançats de la elaboració d'aquest treball: Jose, Carlos, Angela, Arantxa, Macarena, Ana, Alicia, Cruchenka y Laura. Agrair a tots ells, i als que han estat esporàdicament treballant en el grup d'investigació.

També vull agrair els ànims del hidrogeòlegs, Ignacio i Juan, així com l'interés d'altres companys universitaris, del mateix corredor o d'aquells que s'ubiquen dalt o baix meu.

Graag wil ik de mensen van het RIVM-LOC bedanken voor hun steun, adviezen en gezelligheid. Elbert en Ad voor hun begeleiding, steun en geduld en voor het verrijken van mijn kennis. Elbert, nogmaals, voor onze communicatie in Engels-Spaans en omdat hij een geweldige persoonlijkheid heeft. Rene, voor zijn interesse in mijn onderzoek en voor het zijn van een uitstekende gids. Niño Robert voor het zijn van mijn broekepoeper, voor onze fantastische kastelen toer en voor zijn steun, zelfs in de verschrikkelijkste momenten. Grace, voor de Chinese lesen. Mijn tweede moeder (Ingrid) in Nederland voor de geweldige momenten in haar tuin.

Gràcies a J.L. Martínez Vidal per l'estància d'investigació al Departament de Hidrogeologia i Química Analítica de la Universitat de Almeria. A Javier Arrebola per ensenyar-me la tècnica d'anàlisi i per la seua ajuda.

Gràcies a J.L.Villamarin (Conselleria de Sanitat de Castelló), a M^a Jose Saez i Carmen Armelles (Gabinet de Seguretat e Higiene en el Treball de la Conselleria de Treball de la Generalitat Valenciana, Castelló) i al Dr.Navarro (Hospital General de Castelló), per abastir-me de mostres biològiques humanes. Un agraïment molt especial es mereixen totes aquelles persones, sense nom ni identitat, que amb els seus fluids i teixits biològics han format part del desenvolupament d'aquesta tesi.

Finalment, el més gran agraïment per a la meua família i amics, especialment als meus pares i germans, perquè ells han sigut els que realment han patit els pitjors moments d'aquesta etapa i han sabut donar-me ànims i consells a tot hora. Gràcies de tot cor per estar al meu costat i respectar sempre les meues decisions. I a la, ja no tan petita, M^o Amparo per ser la millor neboda del món.

ÍNDICE

Objetivos de la Tesis Doctoral y Plan de trabajo	1
Objectives of the Doctoral Thesis. Work plan	7
CAPÍTULO 1. Introducción general.....	13
1.1. Introducción.....	15
1.2. Evaluación de la exposición a plaguicidas	21
1.2.1. Toxicología humana.....	23
1.2.2. Control biológico	26
1.3. Metodología analítica para la determinación de residuos de plaguicidas en muestras biológicas de origen humano.....	36
1.3.1. Aplicación de la extracción con disolventes orgánicos	41
1.3.2. Aplicación de la extracción en fase sólida	48
1.4. Microextracción en fase sólida.....	53
1.4.1. Introducción. Principios básicos de SPME	53
1.4.1.1. Modos de extracción	54
1.4.1.2. Aspectos termodinámicos	57
1.4.1.3. Recubrimiento de la fibra.....	58
1.4.1.4. Optimización SPME.....	59
1.4.1.5. Selección del método de calibración.....	63
1.4.2. Aplicación al análisis de fluidos biológicos.....	64

1.5. Purificación de muestras grasas mediante cromatografía líquida de alta resolución previa a la determinación de compuestos organoclorados mediante GC	71
1.5.1. Antecedentes	72
1.5.2. Aplicación a muestras de tejido adiposo humano	80
1.6. Selección de los plaguicidas a estudiar.....	84
1.6.1. Plaguicidas organofosforados.....	90
1.6.2. Plaguicidas organoclorados	97
1.7. Referencias	111

CAPÍTULO 2. Determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en fluidos biológicos humanos mediante extracción con disolventes..... 133

2.1. Introducción	135
2.2. Experimental.....	136
2.2.1. Reactivos, material y equipos instrumentales	137
2.2.2. Análisis multiresidual en muestras de orina	139
2.2.3. Análisis multiresidual en muestras de suero	142
2.3. Referencias	144

CAPÍTULO 3. Determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en fluidos biológicos humanos mediante extracción en fase sólida..... 145

3.1. Introducción	147
-------------------------	-----

4.2.3.1. Determinación de plaguicidas organofosforados en suero.....	208
4.2.3.2. Determinación de plaguicidas organoclorados en suero	211
4.2.3.3. Determinación de plaguicidas organofosforados en orina.....	213
4.2.3.4. Determinación de plaguicidas organoclorados en orina	215
4.2.3.5. Artículo científico 2.....	216
4.2.4. Optimización de la técnica SPME en medio acuoso por espacio de cabeza	238
4.2.4.1. Plaguicidas organoclorados	238
4.2.4.2. Plaguicidas organofosforados.....	245
4.2.5. Análisis de sangre total mediante SPME en modo espacio de cabeza	247
4.2.5.1. Etapa preliminar de optimización para plaguicidas organoclorados	247
4.2.5.2. Etapa preliminar de optimización para plaguicidas organofosforados	250
4.2.5.3. Optimización del método cromatográfico GC-MS/MS	251
4.2.5.4. Determinación de plaguicidas organoclorados y organofosforados en muestras de sangre	258
4.2.5.5. Artículo científico 3.....	262

4.2.6. Análisis de suero mediante SPME en modo de espacio de cabeza	286
4.2.6.1. Optimización del método cromatográfico GC-MS ...	286
4.2.6.2. Determinación de plaguicidas organoclorados y organofosforados en muestras de suero.....	290
4.2.6.3. Artículo científico 4	296
4.3. Referencias	320
CAPÍTULO 5. Determinación de compuestos organoclorados en muestras de tejido adiposo humano	323
5.1. Introducción.....	325
5.2. Experimental	327
5.2.1. Reactivos, material y equipos instrumentales	329
5.2.2. Estudio de la etapa de purificación mediante HPLC en fase normal	333
5.2.3. Optimización del método cromatográfico GC-MS/MS	340
5.2.4. Artículo científico 5	345
5.2.5. Artículo científico 6	373
5.3. Referencias	397
CAPÍTULO 6. Conclusiones	399
Sugerencias para posteriores trabajos	411

Artículos de la tesis	415
Otros artículos relacionados	419

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Esquema de la relación entre la exposición externa, dosis interna y efectos adversos y los correspondientes tipos de control. (Obiols, 1998).....	27
Figura 1.2.	Esquema general de una reacción de inhibición enzimática (A) y del caso concreto de la acetilcolinesterasa (AchE) con el sustrato acetilcolina (B).....	29
Figura 1.3.	Diseño y componentes del sistema de operación de SPME.	54
Figura 1.4.	Modos de operar en SPME: (A) inmersión directa, (B) espacio de cabeza, (C) con membrana de protección. 1. muestra. 2. recubrimiento de la fibra.....	56
Figura 1.5.	Efecto del volumen del inserto del inyector de un sistema GC en la desorción de la fibra.....	62
Figura 1.6.	Rutas metabólicas de endosulfan (α y β)	102
Figura 2.1.	Cromatogramas GC-ECD obtenidos después de la aplicación del procedimiento de LLME a una muestra de orina fortificada a 10 ng ml^{-1} con las dos diferentes mezclas de plaguicidas OCs. (1) α -HCH, (2) HCB, (3) β -HCH, (4) lindano, (5) δ -HCH, (6) endosulfan-éter, (7) heptaclor, (8) aldrin, (9) heptacloro epóxido, (10) α -endosulfan, (11) dieldrin, (12) p,p'-DDE, (13) endrin, (14) β -endosulfan, (15) p,p'-DDD, (16) endosulfan-sulfato, (17) p,p'-DDT, (18) metoxiclor, (*) clorfenson, patrón interno.....	142

Figura 3.1.	Estabilidad de los plaguicidas OPs seleccionados en orina humana almacenada a 4°C.....	153
Figura 3.2.	Estabilidad de los plaguicidas OPs seleccionados en suero humano almacenado a 4°C.....	154
Figura 3.3.	Estabilidad de los plaguicidas OCs seleccionados en suero humano almacenado a 4°C.....	155
Figura 3.4.	Cromatogramas GC-NPD correspondientes a una muestra de orina fortificada a 200 ng ml ⁻¹ después de la elución SPE con 5 ml de MTBE (A) y 5 ml de acetato de etilo (B). (1) dimetoato, (2) diazinon, (3) paration-metil, (4) fenitroton, (5) malation, (6) fention, (7) clorpirifos, (8) metidation, (9) fosmet, (10) azinfos-metil.	159
Figura 3.5.	Esquema del procedimiento SPE desarrollado para la determinación de plaguicidas en fluidos biológicos.....	160
Figura 4.1.	Respuestas cromatográficas de los plaguicidas OPs obtenidas tras la extracción por SPME de una muestra de agua fortificada a 10 ng ml ⁻¹ usando distintos tipos de fibras.....	197
Figura 4.2.	Recuperaciones de los plaguicidas OCs obtenidas tras la extracción por SPME de una muestra de agua fortificada a 10 ng ml ⁻¹ usando distintos tipos de fibras.....	199
Figura 4.3.	Respuestas obtenidas para los compuestos OCs en función de la temperatura de desorción para las fibras PDMS y PA.....	200
Figura 4.4.	Respuestas obtenidas para los compuestos OCs en función del tiempo de desorción para las fibras PDMS y PA.....	201

Figura 4.5.	Efecto de la adición de NaCl en la eficacia de la extracción de plaguicidas OCs en agua por SPME utilizando las fibras PDMS y PA	203
Figura 4.6.	Curvas del tiempo de extracción para plaguicidas OCs obtenidas a partir de la ecuación (1) mediante SPME con inmersión directa. (A) fibra PDMS; (B) fibra PA	206
Figura 4.7.	Cromatograma (GC-ECD) correspondientes a una muestra de agua fortificada de concentración 0.5 ng ml^{-1} , respectivamente, de los plaguicidas estudiados. (1) α -HCH, (2) HCB, (3) lindano, (4) δ -HCH, (5) endosulfan-éter, (6) heptaclor, (7) aldrin, (8) heptacloroepoxido, (9) α -endosulfan, (10) endrin, (11) β -endosulfan, (12) p,p'-DDD, (13) endosulfan-sulfato, (14) p,p'-DDT, (15) metoxiclor	207
Figura 4.8.	Comparación de áreas de picos de los plaguicidas OPs en agua y suero diluido (manteniendo una concentración final en la muestra extraída de 10 ng ml^{-1}) tras la extracción por SPME	208
Figura 4.9.	Efecto de la dilución del suero sobre la respuesta en la SPME de plaguicidas OPs (concentración final en el suero diluido, 5 ng ml^{-1}).	210
Figura 4.10.	Efecto de la dilución del suero con agua nanopure sobre la respuesta en la SPME de plaguicidas OCs (concentración final en el suero diluido, 5 ng ml^{-1})	212
Figura 4.11.	Comparación de áreas de picos de los plaguicidas OPs en agua y orina tras la extracción por SPME (nivel de fortificación, 10 ng ml^{-1})	214

Figura 4.12. Respuestas de plaguicidas OCs obtenidas tras la extracción por HS-SPME (90°C) de una muestra de agua fortificada a 10 ng ml ⁻¹ para distintos tipos de fibra	239
Figura 4.13. Efecto de la adición de NaCl en la eficacia de la extracción de plaguicidas OCs en agua por HS-SPME utilizando la fibra de PA	240
Figura 4.14. Eficacia de la extracción de los plaguicidas OCs en función del volumen de muestra utilizado en la extracción HS-SPME con la fibra de PA	241
Figura 4.15. Curvas del tiempo de extracción para plaguicidas OCs obtenidas a partir de la ecuación (1) mediante SPME con inmersión directa y fibra PA	242
Figura 4.16. Cromatograma GC-ECD correspondiente a una disolución de agua fortificada a 0.1 ng ml ⁻¹ con los OCs estudiados y tras la extracción mediante HS-SPME.(1) α-HCH, (2) HCB, (3) lindano, (5) endosulfan-éter, (6) heptaclor, (7) aldrin, (8) heptacloro epóxido, (9) α-endosulfan, (10) endrin, (12) p,p'-DDD, (13) endosulfan-sulfato, (14) p,p'-DDT, (15) metoxiclor.....	244
Figura 4.17. Áreas de picos de los plaguicidas OPs obtenidas tras la extracción por HS-SPME (90°C) de una muestra de agua fortificada a 10 ng ml ⁻¹ para distintos tipos de fibra.....	245

Figura 4.18. Cromatogramas GC-ECD correspondientes a la extracción de algunos plaguicidas OCs en sangre por HS-SPME en distintas condiciones de acidez. A: H ₂ SO ₄ 9M; B: H ₂ SO ₄ 4.5M; C: HCl 9M; D: HCl 4.5M. (1) HCB, (2) lindano, (3) endosulfan-éter, (4) heptaclor, (5) aldrin, (6) heptacloro éxoxido, (7) α-endosulfan	248
Figura 4.19. Cromatogramas GC-ECD correspondientes a la extracción de algunos plaguicidas OCs en sangre por HS-SPME. A: H ₂ SO ₄ 9M/0.15 g NaCl; B: disolución H ₂ SO ₄ 9M/0.15 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ; C: 0.15 g NaCl; D. 0.15 g (NH ₄) ₂ SO ₄ . (1) HCB, (2) lindano, (3) endosulfan-éter, (4) heptaclor, (5) aldrin, (6) heptacloro éxoxido, (7) α-endosulfan	249
Figura 4.20. Áreas de picos de los plaguicidas OPs obtenidas tras la extracción por HS-SPME de una muestra de sangre para la optimización de la adición de ácido y su concentración.....	251
Figura 4.21. Espectros MS/MS obtenidos para diferentes voltajes de fragmentación de HCB (ión precursor seleccionado m/z 284).....	254
Figura 4.22. Espectros MS/MS obtenidos para diferentes voltajes de fragmentación de p,p'-DDT (ión precursor seleccionado m/z 235).....	254
Figura 4.23. Cromatograma GC-MS/MS correspondiente a una mezcla de patrones de OCs y OPs a 50 ng ml ⁻¹ .(1) HCB, (2) β-HCH, (3) lindano, (4) fonofos, (5) endosulfan-éter, (6) clorpirifos, (7) α-endosulfan, (8) p,p'-DDE, (9) p,p'-DDD, (10) etion, (11) p,p'-DDT.....	255

Figura 4.24. Espectros MS/MS correspondientes a los plaguicidas OCs y OPs estudiados	256
Figura 4.25. Curvas de calibrado correspondientes a la extracción por HS-SPME de disoluciones patrón de plaguicidas OCs y OPs preparadas en sangre y usando patrones internos HCB ¹³ C ₆ (para HCB) y p,p'-DDE D ₈ (para el resto de los compuestos).....	260
Figura 4.26. Espectros de masas correspondientes a los plaguicidas OPs estudiados	287
Figura 4.27. Espectros de masas correspondientes a los plaguicidas OCs estudiados.....	288
Figura 4.28. Áreas correspondientes a los plaguicidas OCs en suero tras la extracción por HS-SPME, en función del agente desproteinizante	291
Figura 4.29. Curvas de calibrado correspondientes a la extracción por HS-SPME de disoluciones patrón de plaguicidas OPs preparadas en suero y usando patrón interno (fenitrothion D ₆)	293
Figura 4.30. Curvas de calibrado correspondientes a la extracción por HS-SPME de disoluciones patrón de plaguicidas OCs preparadas en suero y usando patrones internos HCB ¹³ C ₆ (para α-HCH, HCB, lindano y endosulfan éter) y p,p'-DDE D ₈ (para α-endosulfan, p,p'-DDE, p,p'-DDD, endosulfan sulfato y p,p'-DDT	294
Figura 5.1. Curva de calibración de triglicéridos mediante el método colorimétrico de Zöllner y Kersch.....	334

Figura 5.2.	Modelo de elución de endosulfan y metabolitos y de lípidos presentes en extracto de tejido adiposo humano en columnas de HPLC-Silicagel. (A) α -endosulfan, (B) endosulfan éter, (C) β -endosulfan, (D) endosulfan sulfato y (E) endosulfan lactona.....	336
Figura 5.3.	Cromatogramas MS/MS correspondientes a la mezcla de 7 PCBs en patrón hexánico a 50 ng ml^{-1} (A) y en extracto purificado (0.5 g ml^{-1}) de tejido adiposo, fortificado a 100 ng g^{-1} (B)	342
Figura 5.4.	Espectros MS/MS correspondientes a plaguicidas OCs en extracto purificado de tejido adiposo humano.....	343
Figura 5.5.	Espectros MS/MS correspondientes a PCBs en extracto purificado de tejido adiposo humano	344

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.	Plaguicidas listados en la Directiva 76/464/ECC de la Contaminación causada por ciertas sustancias peligrosas descargadas en el medio acuático de la comunidad (Lista Negra) (Barceló, 1993). En negrita los plaguicidas estudiados en el presente trabajo	18
Tabla 1.2.	Producción y uso permitido para algunos plaguicidas OCs en proceso de eliminación según datos de la Conferencia del Convenio de Estocolmo (UNEP/POPS/CONF/4, 5 Junio 2001)	19
Tabla 1.3.	Clasificación y valores de LD-50 (mg Kg ⁻¹) de los plaguicidas según grado de peligrosidad aguda	25
Tabla 1.4.	Determinantes biológicos de exposición a plaguicidas adoptados por la ACGIH (1996).....	34
Tabla 1.5.	Aplicaciones de la extracción con disolventes orgánicos para la determinación de plaguicidas en fluidos biológicos	45
Tabla 1.6.	Aplicaciones de SPE para la determinación de plaguicidas en muestras de fluidos biológicos	51
Tabla 1.7.	Criterio de selección del modo de extracción (Pawliszyn, 1997).....	57
Tabla 1.8.	Clasificación polimérica de las fibras SPME atendiendo a su polaridad, color comercial característico y volumen de la fase (Scheppers Wercinski, 1999).....	59

Tabla 1.9.	Aplicaciones de SPME para la determinación de plaguicidas en muestras de fluidos biológicos humanos	68
Tabla 1.10.	Aplicaciones de SPME para la determinación de distintos analitos (principalmente drogas) en fluidos biológicos	69
Tabla 1.11.	Aplicaciones de HPLC en la purificación de muestras grasas previa a la determinación de compuestos OCs	78
Tabla 1.12.	Plaguicidas más utilizados en la provincia de Castellón para combatir plagas de cítricos. (En negrita los plaguicidas estudiados en este trabajo).....	85
Tabla 1.13.	Frecuencia de detección de plaguicidas en cítricos según el Programa de Vigilancia de residuos de plaguicidas de la Generalitat Valenciana de 1998.....	88
Tabla 1.14.	Plaguicidas OPs seleccionados.....	94
Tabla 1.15.	Ejemplos de plaguicidas OCs detectados con mayor frecuencia en grupos poblacionales.....	98
Tabla 1.16.	Plaguicidas OCs seleccionados	104
Tabla 2.1.	Recuperaciones y coeficientes de variación (%) (n =5) para plaguicidas OCs después de la aplicación del procedimiento LLME a muestras de orina	141
Tabla 3.1.	Recuperaciones y coeficientes de variación (%) (n =5) correspondientes a los plaguicidas OCs estudiados después de la aplicación del procedimiento SPE a muestras de orina	162
Tabla 4.1.	Fibras utilizadas para la optimización de SPME.....	193

Tabla 4.2.	Parámetros obtenidos por ajuste matemático (ecuación (1)) de la cantidad absorbida frente al tiempo de extracción (3 ml muestra de agua fortificada a un nivel de 10 ng ml ⁻¹) para las dos fibras estudiadas. Constantes de extracción para SPME obtenidas a 24 horas (ecuación (2)).	205
Tabla 4.3.	Parámetros obtenidos por ajuste matemático (ecuación (1)) de la cantidad absorbida frente al tiempo de extracción (30 ml muestra de agua fortificada a 10 ng ml ⁻¹) para el procedimiento HS-SPME con la fibra de PA. Constantes de extracción para SPME obtenidas a 24 horas (ecuación (2)).	243

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACGIH	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>
	Conferencia Americana de la Higiene Industrial Gubernamental
AchE	<i>Acetylcholinesterase</i>
	Acetilcolinesterasa
ADI	<i>Admissible Daily Ingestion</i>
	Ingestión Diaria Aceptable
AOAC	<i>Association Official Analytical Chemists</i>
	Asociación Oficial de Químicos Analíticos
ARP	Análisis de Residuos de Plaguicidas
BAT	<i>Biological Tolerance Values for working materials</i>
	Valores de Tolerancia Biológica para materiales de trabajo
BC	Bifenilos clorados
BEI	<i>Biological Exposition Index</i>
	Indice Biológico de Exposición
ChE	<i>Cholinesterase</i>
	Colinesterasa
CV	<i>Coefficient of Variation</i>
	Coeficiente de Variación
CW	<i>Carbowax</i>
	Carbowax

CX*Carboxen*
Carboxen

DAD*Diode Array Detector*
Detector de Barrido de Diodos

DCM.....*Dichloromethane*
Diclorometano

DFG*Deutsche Forschungsgemeinschaft*
Comisión Alemana para los Plaguicidas

DVB.....*Divinylbenzene*
Divinilbenceno

ECD*Electron Capture Detector*
Detector de Captura de Electrones

EI*Electron Impact*
Impacto Electrónico

EPA*Environmental Protection Agency*
Agencia de Protección Medioambiental

FID.....*Flame Ionization Detector*
Detector Ionizador de Llama

FPD.....*Flame Photometric Detector*
Detector Fotométrico de LLama

GC*Gas Chromatography*
Cromatografía de Gases

GPC	<i>Gel Permeation Chromatography</i>
	Cromatografía de Permeación en Gel
HPLC.....	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>
	Cromatografía de Capa Fina de Alta Resolución
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
HS.....	<i>Headspace</i>
	Espacio de cabeza
Kow	Constante de distribución octanol-agua
LC.....	<i>Liquid Chromatography</i>
	Cromatografía Líquida
LD	Límite de Detección
LD-50	<i>Lethal Dosis for 50% of test organism</i>
	Dosis Letal para el 50% de la población
LLE	<i>Liquid Liquid Extraction</i>
	Extracción Líquido Líquido
LLME.....	<i>Liquid Liquid Micro-Extraction</i>
	Microextracción Líquido Líquido
LMR	Límite Máximo de Residuos
LQ	Límite de Cuantificación

MS	<i>Mass Spectrometry</i>
	Espectrometría de Masas
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
	Spectrometría Masas en tándem
MSD	<i>Mass Spectrometric Detector</i>
	Detector Espectrométrico de Masas
MTBE.....	Metil- <i>tert</i> butil-éter
m/z.....	relación masa/carga
NCI	<i>Negative Chemical Ionization</i>
	Ionización Química Negativa
NOAEL	<i>No Observable Adverse Effect Level</i>
	Nivel de Efecto Adverso No Observable
NPD	<i>Nitrogen-Phosphorus Detector</i>
	Detector de Nitrógeno-Fósforo
OC	<i>Organochlorine</i>
	Organoclorado
OMS	Organización Mundial de la Salud
OP	<i>Organophosphorus</i>
	Organofosforado
PA.....	<i>Polyacrylate</i>
	Poliacrilato
PCB	<i>Polychlorinated Biphenyl</i>
	Bifenilo policlorado

PchE	<i>Pseudocholinesterase</i>
	Pseudocolinesterasa
PDMS	<i>Polidimethylsiloxane</i>
	Polidimetilsiloxano
PGC	<i>Porous Graphitized Carbonblack</i>
	Carbón Grafitizado Poroso
POP	<i>Persistent Organic Pollutant</i>
	Contaminante Orgánico Persistente
PYE	<i>2-(1-Pyrenyl)-Ethyldimethylsilylated silica</i>
SIM.....	<i>Selected Ion Monitoring</i>
	Visualización Selectiva de Iones
SPE.....	<i>Solid Phase Extraction</i>
	Extracción en Fase Sólida
SPME	<i>Solid Phase Micro-Extraction</i>
	Microextracción en Fase Sólida
RF	Radiofrecuencia
TCA	<i>Trichloroacetic</i>
	Tricloroacético
TPR	<i>Template Resin</i>
TLV	<i>Threshold Limit Value</i>
	Valor Límite Umbral
UNEP	<i>United Nations Environmental Programme</i>
	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

UV *Ultraviolet*

Ultravioleta

VLB Valor Límite Biológico

OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL. PLAN DE TRABAJO

Objetivos

La exposición a contaminantes tóxicos y peligrosos es un problema de la población en general, especialmente de los residentes en zonas cercanas a áreas industriales o contaminadas. La población agrícola se encuentra así mismo expuesta a los plaguicidas, utilizados en la agricultura convencional para el control de diversas plagas. Atendiendo a la necesidad de controlar y evaluar esta exposición humana, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral consiste en el estudio y puesta a punto de procedimientos analíticos basados en cromatografía de gases capilar para la determinación de plaguicidas organofosforados (OPs) y organoclorados (OCs) en muestras biológicas de origen humano.

Para alcanzar el objetivo principal se detallan a continuación los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Estudio y optimización de metodología analítica para la determinación de plaguicidas OPs y OCs en muestras de orina y suero, aplicando en primer lugar técnicas tradicionales, tales como la micro-extracción líquido-líquido (LLME) y la extracción en fase sólida (SPE), así como otras más novedosas, como la microextracción en fase sólida (SPME) en modo de inmersión directa.
- ✓ Estudio y optimización de métodos cromatográficos acoplados a espectrometría de masas simple (GC-MS) y en tándem (GC-MS/MS) para la determinación de compuestos OPs y OCs.
- ✓ Estudio de metodología analítica para la determinación de plaguicidas OPs y OCs en muestras de suero y sangre total mediante SPME en modo espacio de cabeza, previo a la detección con GC-MS o GC-MS/MS.
- ✓ Desarrollo de metodología analítica multiresidual que permita la determinación de endosulfan y de sus principales metabolitos por un lado, así como de otros plaguicidas OCs y bifenilos policlorados (PCBs) por otro, en muestras humanas de tejido adiposo mediante purificación automatizada por HPLC y posterior detección por GC-MS o GC-MS/MS.

- ✓ Aplicación de todos los procedimientos desarrollados a muestras reales de orina, suero, sangre y tejido adiposo humano.

Plan de trabajo

Para conseguir los objetivos anteriormente propuestos se detalla el Plan de Trabajo seguido en la presente Tesis Doctoral:

- Selección de los compuestos a estudiar. En los casos en que sea posible, como por ejemplo en los plaguicidas OPs y algunos OCs, la elección será en función de su utilización en la zona Mediterránea, y en especial en la Comunidad Valenciana. En otros casos, la selección se realizará en base a la frecuencia e importancia de detección en las matrices biológicas objeto del presente trabajo. También se tendrá en cuenta, en todos los casos, la peligrosidad y las propiedades físico-químicas de los analitos seleccionados.
- Selección de las matrices biológicas humanas para la realización del presente trabajo, en función de su importancia en el control biológico, así como de su disponibilidad.
- Revisión bibliográfica sobre antecedentes y estado actual de la determinación de los plaguicidas seleccionados en muestras de fluidos y tejidos biológicos.
- Puesta a punto de metodología analítica previa para la determinación de los plaguicidas OPs y OCs seleccionados mediante GC-NPD (FPD) y GC-ECD, respectivamente.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas y de los espectros de masas para la determinación de plaguicidas OPs y OCs mediante GC-MS.
- Estudio de las condiciones óptimas para la determinación de plaguicidas OPs, OCs y PCBs mediante GC-MS/MS. Optimización de las condiciones de fragmentación para cada analito estudiado.

- Estudio de la estabilidad de los plaguicidas OPs y OCs seleccionados en muestras de orina y suero.
- Optimización del procedimiento multiresidual basado en LLME para plaguicidas OPs y OCs seleccionados en muestras de orina y suero.
- Optimización del procedimiento multiresidual basado en SPE para plaguicidas OPs y OCs seleccionados en muestras de orina y suero.
- Optimización de las etapas de absorción y de desorción de la técnica SPME para la determinación de los plaguicidas OPs y OCs en medio acuoso en modo de inmersión directa.
- Optimización de las etapas de absorción y de desorción de la técnica SPME para la determinación de los plaguicidas OPs y OCs en medio acuoso en modo espacio de cabeza (HS).
- Aplicación del procedimiento SPME (en inmersión directa) a la determinación de plaguicidas OPs y OCs en muestras de orina y suero. Evaluación de las características analíticas y validación del procedimiento desarrollado.
- Aplicación del procedimiento HS-SPME a la determinación de plaguicidas OPs y OCs en muestras de suero. Evaluación de las características analíticas y validación del procedimiento desarrollado.
- Aplicación del procedimiento HS-SPME a la determinación de plaguicidas OPs y OCs en muestras de sangre total. Evaluación de las características analíticas y validación del procedimiento desarrollado.
- Estudio de la etapa de purificación, mediante HPLC en fase normal, previa a la determinación de endosulfan y sus principales metabolitos en tejido adiposo humano mediante GC-MS.
- Aplicación del procedimiento multiresidual completo, basado en purificación mediante HPLC en fase normal y determinación por GC-MS, a la determinación de endosulfan y sus metabolitos en muestras de tejido adiposo

humano. Evaluación de las características analíticas y validación del procedimiento desarrollado

- Estudio de la etapa de purificación, mediante HPLC en fase normal, previa a la determinación de plaguicidas OCs y PCBs en tejido adiposo humano mediante GC-MS/MS.
- Aplicación del procedimiento multiresidual completo, basado en purificación mediante HPLC en fase normal y determinación por GC-MS/MS, a la determinación de plaguicidas OCs y PCBs en muestras de tejido adiposo humano. Evaluación de las características analíticas y validación del procedimiento desarrollado
- Aplicación de los procedimientos desarrollados, basados en LLME y SPE ó en SPME, a muestras reales de suero, orina y sangre procedentes de población expuesta y no-expuesta.
- Aplicación de los procedimientos desarrollados, basados en purificación por HPLC y detección con GC-MS o GC-MS/MS, a muestras reales de tejido adiposo humano.

El presente trabajo ha quedado reflejado en seis artículos científicos, ya publicados o pendientes de publicación, en revistas de carácter internacional. Todos estos artículos se han incluido en la parte experimental de esta Memoria.

OBJECTIVES OF THE DOCTORAL THESIS. WORK PLAN

Objectives

Exposure to hazardous pesticides is a concern of general population, especially residents living near industrial of contaminated places and, obviously, in the agricultural population that is the most exposed to pesticides used nowadays to pest control. In order to measure this human exposure, the main objective of this Doctoral Thesis is the study and development of analytical procedures based on the use of capillary gas chromatography for the determination of organophosphorus (OPs) and organochlorine (OC) pesticides in human biological samples.

In order to reach this aim, the specific objectives are shown:

- ✓ Study and optimisation of analytical methodology for the determination of OPs and OC pesticides in urine and serum samples, firstly by means of conventional techniques as liquid-liquid microextraction (LLME) and solid phase extraction (SPE), and then by means of direct immersion solid phase micro-extraction (SPME), a newer technique.
- ✓ Study and optimisation of chromatographic methods coupled to simple mass spectrometry (GC-MS) and tandem (GC-MS/MS) for the determination of OPs and OC compounds.
- ✓ Development of analytical methodology for the determination of OPs and OC pesticides in serum and whole blood samples by means of headspace SPME, previously to the detection by GC-MS or GC-MS/MS.
- ✓ Development of analytical multiresidue methodology for the determination of endosulfan and its metabolites, and other OC pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs), in human adipose tissue samples by means of automated HPLC cleanup prior to GC-MS or GC-MS/MS detection.
- ✓ Application of the developed procedures to real urine, serum, blood and human adipose tissue samples.

Work plan

In order to reach the above objectives, this Doctoral Thesis has been carried out according to the following work plan:

- Selection of the compounds to be studied. For this, the first characteristic considered is the use of those pesticides in the Mediterranean areas, especially in Comunidad Valenciana, as for example in the case of OPs and some OC pesticides. For other compounds, the selection will be based on the frequent detection of the pesticides in the studied biological samples. The hazard and the physical-chemical properties of those compounds will always be considered.
- Selection of the human biological samples, based on their importance for the biological control and their availability.
- A review on the literature about antecedents and current determination of the chosen pesticides in biological fluids and tissues samples.
- Development of analytical methodology for the determination of selected OPs and OC pesticides by means of GC-NPD (FPD) and GC-ECD, respectively.
- Optimisation of the chromatographic conditions and mass spectra for the determination of OPs and OC pesticides by means of GC-MS.
- Optimisation of the chromatographic conditions for the determination of OPs and OC pesticides and PCBs by means of GC-MS/MS. Optimisation of the fragmentation conditions for each studied compound.
- Study of the stability of selected OPs and OC pesticides in urine and serum samples.
- Development of a LLME multiresidue procedure for the determination of selected OPs and OC pesticides in urine and serum samples.
- Development of a SPE multiresidue procedure for the determination of selected OPs and OC pesticides in urine and serum samples.

- Optimisation of the absorption and desorption steps in SPME for the determination of OPs and OC pesticides in aqueous samples in the direct immersion mode.
- Optimisation of the absorption and desorption steps in SPME for the determination of OPs and OC pesticides in aqueous samples in the headspace (HS) mode.
- Application of the direct immersion SPME procedure for the determination of OPs and OC pesticides in urine and serum samples. Evaluation of the analytical characteristics and validation of the developed procedure.
- Application of the HS- SPME procedure for the determination of OPs and OC pesticides in serum samples. Evaluation of the analytical characteristics and validation of the developed procedure.
- Application of the HS-SPME procedure for the determination of OPs and OC pesticides in whole blood samples. Evaluation of the analytical characteristics and validation of the developed procedure.
- Study of the cleanup step by means of normal phase HPLC previous to the determination of endosulfan and its main metabolites in human adipose tissue by GC-MS.
- Application of the overall multiresidue procedure- normal phase HPLC cleanup and GC-MS detection - for the determination of endosulfan and its metabolites in human adipose tissue samples. Evaluation of the analytical characteristics and validation of the developed procedure.
- Study of the normal phase HPLC cleanup prior to the determination of OC pesticides and PCBs in human adipose tissue by means of GC-MS/MS.
- Application of the overall multiresidue procedure- normal phase HPLC cleanup and GC-MS/MS detection - for the determination of OC pesticides and PCBs in human adipose tissue samples. Evaluation of the analytical characteristics and validation of the developed procedure.

- Application of the developed procedures, based on LLME, SPE or SPME, to serum, urine and blood samples from exposed and non-exposed population.
- Application of the developed procedures, based on HPLC cleanup and GC-MS or GC-MS/MS detection, to real human adipose tissue samples.

The work developed in the current Thesis has allowed writing six scientific articles in international journals. Some of them have been already published and others are still in press or in revision process. All these papers have been included in the experimental part of this Manuscript.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Introducción

Los plaguicidas se pueden definir como sustancias que sirven para combatir los parásitos de los cultivos, del ganado, de los animales domésticos y del hombre y su ambiente (Primo y Carrasco, 1986).

Los plaguicidas se conocen desde la antigüedad, aunque fue a partir de los años 20-30 del siglo XX, y especialmente a partir de la Segunda Guerra Mundial, cuando su empleo se extendió exponencialmente. La utilización de los plaguicidas ha conseguido aumentar la producción de alimentos y mejorar la salud humana. Sin embargo, deben vigilarse los daños ambientales ocasionados por su uso a gran escala, de manera que puedan hacerse las correcciones pertinentes. Es importante conocer los riesgos y la toxicidad de estos compuestos, especialmente para las especies que no son su objetivo, antes de que sean aplicados masivamente, así como para asegurar que la aplicación se lleve a cabo de una manera adecuada minimizando los daños posibles.

El uso generalizado de los plaguicidas en la agricultura, así como en la industria, caminos, carreteras, vías férreas y en uso doméstico, puede llegar a producir un empobrecimiento de la biodiversidad, contaminar las aguas subterráneas y superficiales y amenazar la salud humana, tanto por exposición directa como a través de sus residuos en alimentos o en aguas potables.

La preocupación por los efectos nocivos derivados de la utilización de plaguicidas en las actividades agrícolas es una constante de nuestra sociedad actual. Como ya es conocido, la Comunidad Valenciana tiene una gran tradición en cultivos intensivos, con lo que el consumo de estos productos de síntesis es muy elevado. Además, el número de plaguicidas usados en la actualidad es muy alto y su composición química muy variada, con lo que los efectos tóxicos y los problemas ambientales derivados de su amplia utilización en la agricultura son complejos y muy variados.

En los productos fitosanitarios utilizados en la agricultura debe diferenciarse entre *principio* o *materia activa*, con poder plaguicida, y el *preparado comercial*, que además, en las prácticas agrícolas se emplea diluido y es aplicado de diferentes formas. Debido al elevado número de principios activos existentes actualmente y a la continua aparición de nuevos compuestos, por la necesidad de hacer frente a nuevas plagas o como sustitutos de otros de mayor impacto ambiental, es necesario disponer de una o más clasificaciones de los diferentes compuestos. Para ello se suele utilizar diferentes criterios de clasificación como son, *campo de aplicación*, *tipo de lucha*, *modo de aplicación* o *estructura química* (Ware, 1983; García y Herranz, 1987).

Asimismo, el destino y comportamiento de los plaguicidas en el medio ambiente dependen básicamente de las propiedades físico-químicas del compuesto, así como de la forma en la que es liberado y de las condiciones del ecosistema.

Atendiendo a su movilidad, la contaminación por plaguicidas puede tener lugar en el aire, suelo, agua y biosfera (Barberá, 1989). La contaminación en y a través del **aire** tiene importancia especial cuando se trata de aplicaciones por medios aéreos, afectando no sólo a los operarios, sino que los tratamientos extensivos por avión pueden incidir tanto en la salud humana como en la fitotoxicidad a cultivos, y en buena extensión a la fauna ornitológica al ser sometida a nubes contaminantes que reducen en buena parte sus posibilidades de supervivencia. Además, las partículas más livianas pueden ser arrastradas a zonas lejanas del punto de tratamiento, lo que explica la presencia de residuos de insecticidas en zonas que nunca fueron tratadas. Tal es el caso de los compuestos organoclorados (OCs) o de algunos bifenilos policlorados (PCBs), los cuales han sido detectados en la fauna de zonas subantárticas (De Boer y Wester, 1991).

Por lo que respecta a la contaminación en el **suelo**, se debe tanto a tratamientos específicos (insecticidas del suelo, desinfectantes, tratamientos de surco o de semillas, y de modo especial herbicidas de pre-siembra y pre-emergencia), como también por contaminación proveniente de otros tratamientos, como los aéreos, cuando los residuos volátiles caen al suelo o son arrastrados por la lluvia.

Muchos plaguicidas (la mayoría de ellos herbicidas polares, derivados fosfóricos y carbámicos, etc.) se degradan rápidamente en el suelo y sus residuos desaparecen en un corto plazo de tiempo. Sin embargo, la aplicación de derivados clorados de difícil eliminación lleva consigo una elevada persistencia en el medio ambiente. Debido a estos riesgos, las legislaciones de muchos países actuales consideran que el uso de tales derivados clorados está prohibido o sujeto a restricciones.

El **agua** es una vía muy importante a través de la cual los plaguicidas se extienden por el medio ambiente, bien por el uso de plaguicidas destinados a la higiene pública (por ejemplo la lucha contra larvas de mosquitos en charcas y aguas estancadas), o indirectamente por la movilización de contaminaciones de aire y suelos (por ejemplo, arrastres por agua de lluvia). De este modo, el plaguicida disuelto en el agua puede ser desplazado horizontalmente, por escorrentía superficial, o verticalmente a través de la zona no saturada (lixiviación) pudiendo alcanzar el agua subterránea; durante su paso a través del suelo, el plaguicida puede quedar adsorbido, y/o sufrir transformaciones químicas o microbianas (dependiendo de la reactividad intrínseca de sus grupos funcionales), así como degradación, proceso que reduce o elimina la presencia del plaguicida en el medio ambiente.

Como consecuencia de las contaminaciones de los tres compartimentos citados anteriormente, de forma directa o indirecta, puede producirse la contaminación de la **biosfera**. Los plaguicidas pueden entrar en los organismos vivos directamente por partición entre el agua y los tejidos a través de la piel, durante la respiración, o por medio de la alimentación. La eliminación de éstos puede tener lugar por excreción o por biotransformaciones metabólicas. Los parámetros que afectan a estos procesos incluyen la solubilidad en agua y la liposolubilidad del compuesto, el grado de ionización, la estabilidad química y el tamaño molecular.

En el estudio del comportamiento de los plaguicidas en el compartimento biótico se pueden distinguir tres procesos diferenciados: *bioconcentración*, *bioacumulación* y *biomagnificación*. La bioconcentración es el proceso por el que un compuesto entra en un organismo acuático directamente desde el agua a través de

las agallas o de los tejidos epiteliales; la biocacumulación incluye tanto la bioconcentración como los procesos de entrada de residuos químicos a través de la comida; mientras que la biomagnificación hace referencia a la totalidad de procesos por los cuales la concentración tisular de un compuesto químico bioacumulado se incrementa a medida que este material pasa a través de dos o más nivel tróficos.

La Unión Europea ha propuesto una lista de los productos considerados más peligrosos para el Medio Ambiente popularmente conocida como Lista Negra, formada por 39 plaguicidas (76/464/EEC) (Barceló, 1993). De todos los plaguicidas que la forman (**Tabla 1.1**), 19 de ellos pertenecen a la familia de los OPs, 8 son plaguicidas OCs, 2 triazinas, 2 fenilureas y 5 fenoxiácidos. Si bien *clorpirifos* no está incluido en esta Lista Negra, cabe destacarlo porque, junto con *dimetoato* son dos de los plaguicidas OPs más utilizados en Europa en los últimos tiempos.

Tabla 1.1. Plaguicidas listados en la Directiva 76/464/ECC de la Contaminación causada por ciertas sustancias peligrosas descargadas en el medio acuático de la comunidad (Lista Negra) (Barceló, 1993). En negrita los plaguicidas estudiados en el presente trabajo.

Aldrin	Disulfoton	Monolinuron
Atrazina	Endosulfan	Ometoato
Azinfos etil	Endrin	Oxidemeton/metil
Azinfos metil	Fenitrotion	Paration etil
Clordane	Fention	Paration metil
Coumafos	Heptaclor	Phoxim
2,4-D	HCB	Propanilo
DDT	Linuron	Pirazona
Demeton	Malation	Simazina
Diclorpop	MCPA	2,4,5-T
Diclorvos	Mecoprop	Triazofos
Dieldrin	Metamidofos	Troclorfon
Dimetoato	Mevinfos	Trilufalina

Según datos de la UNEP (United Nations Environment Programme Chemicals), y en relación a los contaminantes orgánicos persistentes (POPs, Persistent Organic Pollutants), la **Tabla 1.2** muestra la producción y el uso permitido de algunos OCs que se encuentran en proceso de eliminación, según datos

de la Conferencia de Plenipotenciarios para el Convenio de Estocolmo sobre POPs (UNEP/POPS/CONF/4, 5 Junio 2001).

Tabla 1.2. Producción y uso permitido para algunos plaguicidas OCs en proceso de eliminación según datos de la Conferencia del Convenio de Estocolmo (UNEP/POPS/CONF/4, 5 Junio 2001).

Plaguicidas	Producción	Uso
<i>Aldrin</i>	Ninguna	Ectoparasiticida local Insecticida
<i>Clordano</i>	Sólo la permitida	Ectoparasiticida local Insecticida Termicida en edificios y presas Termicida en carreteras Aditivo para adhesivos de contrachapado
<i>DDT*</i>	<u>Finalidad aceptable:</u> Uso en la lucha contra los vectores de algunas enfermedades. <u>Exención específica:</u> Intermediario en la producción de dicofol. Intermediario	<u>Finalidad aceptable:</u> Uso en la lucha contra los vectores de algunas enfermedades <u>Exención específica:</u> Producción del dicofol Intermediario
<i>Dieldrin</i>	Ninguna	En actividades agrícolas
<i>Endrin</i>	Ninguna	Ninguno
<i>Heptaclor</i>	Ninguna	Termicida Termicida en estructuras de casas Termicida subterráneo Tratamiento de la madera Cajas de cableado subterráneo
<i>HCB</i>	Sólo la permitida	Intermediario Solvente en plaguicidas Intermediario en un sistema cerrado limitado a un emplazamiento
<i>Mirex</i>	Sólo la permitida	Termicida
<i>PCBs</i>	Ninguna	Ver usos en la sección 1.6.2 de esta Memoria
<i>Toxafeno</i>	Ninguna	Ninguno

* producto en restricción

Como puede observarse en la tabla, de la lista de los 10 POPs, solamente el uso de *endrin* y *toxafeno* está totalmente prohibido. La Conferencia permite el uso de los plaguicidas (*HCB* y *DDT*) como intermediarios para la producción de otro material considerado como no POP, puesto que no se espera que cantidades significativas del producto químico lleguen a las personas y al medio ambiente durante la producción y uso en un sistema cerrado y limitado a un emplazamiento. Por otra parte, el uso de *DDT* es el único sujeto a restricción, de manera que cada Parte que produzca y/o utilice *DDT* registrará esa producción y/o utilización para el control de vectores de enfermedades (por ejemplo la malaria), de conformidad con las recomendaciones y directrices de la OMS (Organización Mundial de la Salud) sobre la utilización de *DDT*, y producirá y/o utilizará *DDT* cuando no disponga de alternativas locales seguras, eficaces y asequibles. Las Partes que actualmente todavía están utilizando *DDT*, deben promover la investigación y el desarrollo de productos químicos y no químicos, métodos y estrategias alternativos y seguros, que sean idóneos para las condiciones de esos países, y tengan por objeto disminuir la carga que representa la enfermedad para los seres humanos y la economía, principalmente en función a los riesgos para la salud humana y a las repercusiones ambientales.

Además, hay que tener en cuenta la producción no intencional de muchos de estos contaminantes orgánicos persistentes. Dibenzoparadioxinas y dibenzofuranos policlorados, *HCB*, y *PCBs*, se forman y se liberan de forma no intencionada a partir de procesos térmicos, que comprenden materia orgánica y cloro, como resultado de una combustión incompleta o de reacciones químicas. A modo de ejemplo, se muestran, a continuación, algunas fuentes industriales que tienen un potencial de formación y liberación de estos productos químicos al medio ambiente relativamente elevado:

- a) Incineradoras de desechos, incluidas las co-incineradoras de desechos municipales, peligrosos o médicos o de fango cloacal
- b) Desechos peligrosos procedentes de la combustión en hornos de cementos

- c) Producción de pasta de papel utilizando cloro elemental
- d) Procesos térmicos de la industria metalúrgica: producción secundaria de cobre, plantas de sinterización en la industria del hierro e industria siderúrgica, producción secundaria de aluminio, producción secundaria de zinc.

Pero no sólo existen esas categorías de fuentes industriales, también pueden provenir de otras vías más particulares tales como

- a) Quema a cielo abierto de desechos, incluida la quema de vertederos
- b) Fuentes de combustión doméstica
- c) Instalaciones de combustión de madera u otros combustibles de biomasa
- d) Crematorios
- e) Teñido (con cloranil) y terminación (con extracción alcalina) de textiles y cueros
- f) Combustión lenta de cables de cobre
- g) Desechos de refinerías de petróleo, etc.

1.2. Evaluación de la exposición a plaguicidas

La actividad en la que el consumo de plaguicidas es mayor es la **agricultura**. Las cosechas se ven afectadas por una gran diversidad de plagas así como por la competencia de las malas hierbas. Además, la introducción por el agricultor de especies nuevas más productivas genera desequilibrios ecológicos que tienen como consecuencia la proliferación de plagas debidas a la desaparición de los predadores naturales. El *sector agrícola* es considerado como el grupo poblacional con más alto riesgo de exposición a estos contaminantes tóxicos, como consecuencia de la elevada importancia que ha ido adquiriendo en los países desarrollados el uso de insecticidas, fungicidas, molusquicidas, bactericidas, herbicidas y fumigantes.

Pero no solamente el sector agrícola se encuentra expuesto a plaguicidas, diferentes grupos y sectores de la población en general también están expuestos a ellos, aunque en distinto grado. Uno de los riesgos para la *población general* es la exposición a largo plazo provocada por la presencia de residuos de plaguicidas en los alimentos como consecuencia de los tratamientos fitosanitarios, así como por los contaminantes ambientales. Debe tenerse en cuenta que todos los plaguicidas, como biocidas que son, tienen una cierta toxicidad y, por tanto, sus residuos en los productos vegetales tratados pueden suponer un riesgo para la salud de los consumidores si superan unos determinados límites. Debido a esto, se debe respetar el período de seguridad para la recolección: tiempo que debe transcurrir entre el tratamiento fitosanitario y la recolección de los productos a consumir (López *et al.*, 1998).

El grupo poblacional constituido por *manipuladores de plaguicidas*, en cualquier punto de su ciclo productivo y durante su uso agrícola, sufre una importante exposición a largo plazo, si no se toman las medidas de protección adecuadas. En este apartado se incluyen los trabajadores de la industria que manufactura estos productos, los aplicadores de plaguicidas, los trabajadores agrícolas y los ganaderos que también utilizan insecticidas para combatir los parásitos del ganado. Además de la exposición en el momento de la aplicación, es necesario considerar el período de reentrada, que es el tiempo que ha de transcurrir entre la aplicación y la reentrada a zonas tratadas, aunque se desconocen o no se aplican estos períodos en muchos casos (López *et al.*, 1998). Relacionado con este grupo de población está *el colectivo de mujeres* que trabaja en actividades agrícolas, que aunque en su mayoría no aplican productos sí que trabajan en otras tareas del campo y pueden estar expuestas al contacto indirecto de los plaguicidas.

Por último existen exposiciones *accidentales o intencionales*. Según datos de la OMS se producen anualmente en el mundo alrededor de 1.000.000 de intoxicaciones agudas graves accidentales entre los aplicadores de plaguicidas. A esta cifra hay que sumar unos 2 millones de intoxicaciones intencionadas, fundamentalmente suicidios (López *et al.*, 1998).

1.2.1. Toxicología humana

Prácticamente todos los plaguicidas son tóxicos para los mamíferos, en mayor o menor grado; por ello, su manejo acarrea unos riesgos de intoxicación que deben ser tenidos en cuenta, especialmente en las personas que los manipulan y los aplican.

Los efectos de los plaguicidas en el hombre, es decir, el cuadro toxicológico que provocan, no depende solamente de la clase y dosis del tóxico y de la forma de las exposiciones, sino también de la naturaleza de los coadyuvantes (p.e. disolventes). Es muy importante la sensibilidad particular del individuo; las mujeres son, generalmente, más sensibles que los hombres. Por otra parte, los niños, las mujeres gestantes, los ancianos y los enfermos con rutas metabólicas alteradas, son especialmente sensibles a la actividad tóxica de los plaguicidas (Klimmer, 1967).

La toxicidad de los plaguicidas presenta distintos aspectos según su trascendencia. Por lo que a sus efectos más inmediatos se refiere, se consideran tres clases de toxicidad, cuya determinación previa mediante estudios de experimentación animal es hoy día obligada, cada vez que un nuevo producto se presenta en el mercado:

1. Toxicidad oral aguda. Se refiere a la ingestión “de una sola vez” de un producto tóxico y se expresa en términos “dosis letal media” LD-50 que significa *la cantidad de tóxico que es necesario ingerir de una sola vez para producir la muerte del 50% de los animales en ensayo* (Barberá, 1989). Esta dosis suele expresarse en miligramos de plaguicida por kilogramo de peso del animal ensayado. En este tipo de ensayo el *efecto punto final* que se mide es la muerte del animal

La LD-50 oral aguda da una idea de la toxicidad relativa de los plaguicidas y extrapolando más o menos razonablemente estos resultados puede deducirse una LD-50 teórica para los seres humanos, aunque la extrapolación sea puramente orientativa puesto que suele variar de una especie a otra.

2. Toxicidad subaguda. Se refiere a exposiciones repetidas durante un mes o menos. Aquí el efecto que se toma en consideración no es la muerte del animal. Puesto que las dosis administradas son más bajas que en la exposición aguda, los efectos son también menos extremos y se registran todas las alteraciones producidas en todos los tejidos y fluidos corporales. Este tipo de experimentación permite obtener el llamado NOAEL (No Observable Adverse Effect Level), la dosis máxima a la que ninguno de los animales muestra efectos tóxicos, que es una medida cuantitativa de la toxicidad de un compuesto, y también presenta una amplia variabilidad con respecto a la especie ensayada. Teóricamente, el NOAEL hallado experimentalmente en animales permite obtener una estimación de los niveles a los que el agente ensayado será tóxico para el hombre.
3. Toxicidad dérmica. Se refiere a los riesgos tóxicos debidos al contacto y absorción del plaguicida por la piel. Al igual que la anterior se expresa en términos de LD-50 y en miligramos/kilo peso. Estos ensayos se efectúan por aplicación del producto sobre la piel afeitada del animal de ensayo.
4. Toxicidad crónica. Está provocada por la acción prolongada e inadvertida de dosis pequeñas, pero ineficaces en toma única del producto. Se expresa como partes por millón de tóxico presente en la dieta alimenticia, durante los días que se especifiquen (siempre en un periodo largo de tiempo), y que produce los efectos que se señalen. Se establece incorporando el producto estudiado a la dieta de varios lotes de animales, en una proporción determinada; después se observan los efectos producidos (mortalidad, alteraciones metabólicas o en el desarrollo, etc.) en espacios de tiempo determinados. Un ensayo de este tipo es el que permite evaluar la carcinogenicidad de los agentes químicos frente a los animales estudiados.

Aparte de estas toxicidades que deben considerarse básicas, hay que tener en cuenta otros riesgos como son las reacciones inesperadas de hipersensibilidad o alergia, cuya intensidad no depende de la dosis del producto estudiado y, cuyos

síntomas, no son específicos, es decir, son diferentes del cuadro sintomático del producto causante. También en caso de manejo negligente o uso impropio, son frecuentes los síntomas de intoxicaciones por inhalación o por penetración en piel, boca u ojos. Asimismo, también hay estudios que relacionan a los plaguicidas con la neurotoxicidad, mutagénesis, carcinogenia y reproducción.

La Industria, comercio y empleo de los plaguicidas está regulado en España por la “Reglamentación Técnico-Sanitaria” que clasifica, según la peligrosidad para las personas, a los diversos productos autorizados en:

- a) de baja peligrosidad (antiguamente categoría A)
- b) nocivos (antiguamente categoría B)
- c) tóxicos (antiguamente categoría C)
- d) muy tóxicos (antiguamente categoría D)

La **Tabla 1.3** muestra los valores de la LD-50 aguda en mg/Kg peso de los plaguicidas según su grado de peligrosidad (Real Decreto 3349/30 noviembre de 1983). Estas toxicidades están referidas siempre al producto formulado.

Tabla 1.3. Clasificación y valores de LD-50 (mg Kg^{-1}) de los plaguicidas según grado de peligrosidad aguda.

	POR VÍA ORAL		POR VÍA DÉRMICA	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Muy tóxicos	<5	<25	<10	<50
Tóxicos	5-50	25-200	10-100	50-400
Nocivos	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
Baja peligrosidad	>500	>2000	>1000	>4000

1.2.2. Control biológico

La expresión Control Biológico (*Biological monitoring*) se define como la vigilancia o el control de la exposición a xenobióticos de los medios biológicos del individuo. En inglés el término “monitoring” en su concepto original significa la “medición continuada de una variable a lo largo del tiempo”. Partiendo de este significado, “Biological monitoring” designa la medida de la exposición interna mediante el análisis de un espécimen biológico, y que, evidentemente no puede ser llevado de forma continua, sino en uno o varios momentos en el tiempo (Obiols, 1998).

El **control biológico**, en el que, como se ha nombrado anteriormente, se analizan dosis internas de plaguicida, constituye un sistema distinto del **control ambiental** en el que se mide la exposición externa de la población. Por tanto, aquí es el propio trabajador el que se utiliza como muestreador de su propio lugar de trabajo. En muchos casos las determinaciones efectuadas en la sangre o la orina (los medios biológicos más frecuentemente utilizados) del trabajador o grupo de trabajadores son mucho más representativos de la exposición a la que realmente se encuentran sometidos que las efectuadas en el aire del lugar de trabajo.

La **Figura 1.1** muestra los tipos de control en la protección de la salud ocupacional y ambiental. El control ambiental valora el riesgo para la salud mediante el control de la exposición externa a los agentes químicos, es decir su concentración en aire, alimentos, agua, etc. y la referencia la constituyen los límites de exposición ambiental TLV (Threshold Limit Value). El control biológico de la exposición evalúa el riesgo para la salud por medio del control de la dosis interna de la sustancia química, es decir, de la sustancia química relativamente absorbida por el organismo, y en este caso el valor de referencia lo constituye el VLB (Valor Límite Biológico).

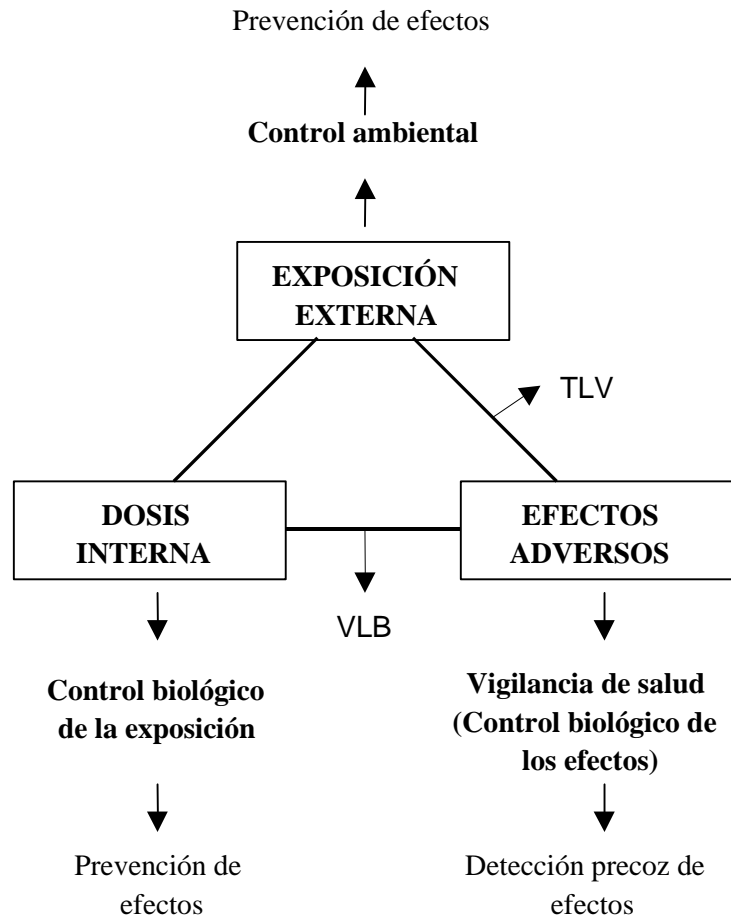


Figura 1.1. Esquema de la relación entre la exposición externa, dosis interna y efectos adversos y los correspondientes tipos de control (Obiols, 1998).

Teóricamente, la práctica del control biológico a una población expuesta requiere un profundo conocimiento previo de una serie de aspectos toxicológicos, del metabolismo, y toxicodinámicas referentes al compuesto en cuestión y al parámetro biológico que se va a utilizar con tal fin, así como de la relación de dicho parámetro con las concentraciones en aire. Desde el punto de vista práctico, el control biológico presenta una serie de exigencias, imprescindibles para la validez de los resultados obtenidos, tales como la determinación de la concentración de un determinado compuesto o metabolito, las condiciones de toma de muestra, el

método analítico a utilizar, el control de calidad, que debe ser específico para el analito, y el tipo de muestra a determinar.

El control biológico presenta importantes ventajas en aquellos casos en que los productos han sido bien estudiados, a pesar de las limitaciones que acarrea, puesto que actualmente existen pocos contaminantes a cuya exposición sean aplicables este tipo de técnicas de control. Por ello, es uno de los campos de la prevención higiénica hacia los cuales se dirigen los mayores esfuerzos de investigación.

Indicadores y determinaciones biológicas

Al realizar una determinación de un contaminante o metabolito en un medio biológico, se pretende obtener una medida de la dosis interna de dicho contaminante, que intuitivamente expresa la cantidad de contaminante existente en el organismo. Recibe el nombre de *indicador* el contaminante, metabolito o componente bioquímico a determinar y que de alguna manera es indicativo, directa o indirectamente, de esa exposición (Obiols, 1998).

Uno de los principales indicadores biológicos ampliamente utilizado para evaluar la exposición a algunos plaguicidas es la determinación de la actividad de las dos enzimas *colinesterásicas* (ChE): *acetilcolinesterásica* en los eritrocitos (AChE) o de la *pseudocolinesterasa* en suero o plasma (PchE). Estos indicadores sólo son válidos para plaguicidas que inhiben la acción de la colinesterasa (OPs y carbamatos). Se admite de una manera generalizada que una inhibición del 20% sobre el valor inicial es un indicador en el sentido de sobre-exposición del trabajador (De la Iglesia, NTP-199, 1988), aunque existen algunas discrepancias en cuanto al nivel de pre-exposición que justifica la separación del trabajador hasta que la actividad enzimática vuelva a ser normal, estando comprendido entre el 30 y el 50%. En la **Figura 1.2** se observa el esquema de la reacción de hidrólisis del sustrato fisiológico acetilcolina con la AChE obteniéndose colina y ácido acético (Conselleria de Sanitat i Consum, Generalitat Valenciana, 1993).

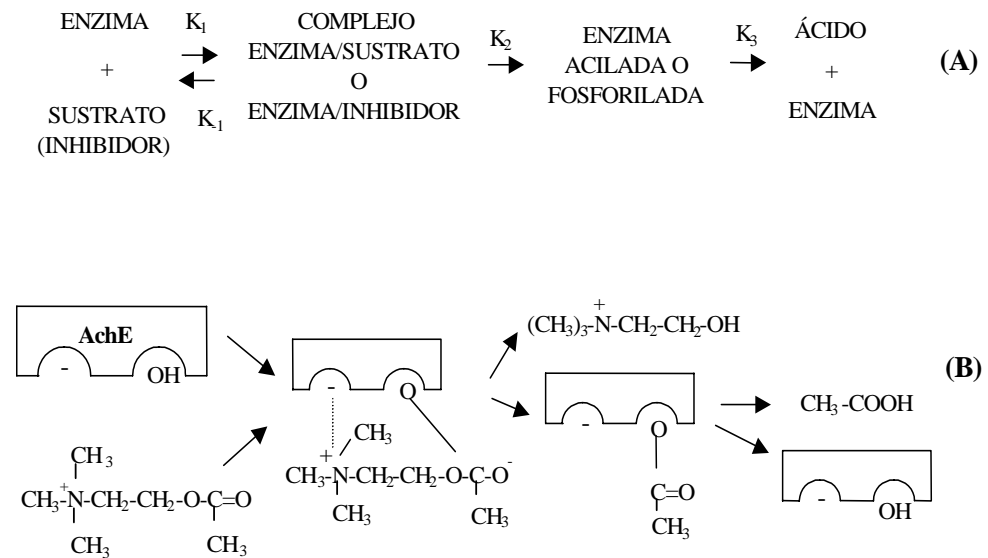


Figura 1.2. Esquema general de una reacción de inhibición enzimática (A) y del caso concreto de la acetilcolinesterasa (AChE) con el sustrato acetilcolina (B).

Aunque la determinación de la colinesterasa es un indicador útil y ampliamente usado, presenta grandes limitaciones: problemas analíticos, con graves dificultades para validar los resultados entre distintos laboratorios; sólo da información sobre sobreexposición a dos grupos de plaguicidas; no es específico, pues existen otros factores que también provocan la disminución de colinesterasas en sangre, como pueden ser problemas hepáticos, estrés, uremia, reacciones alérgicas, etc.; y, quizás, el más importante, la actividad colinesterásica en sangre está relacionada únicamente con la toxicidad aguda y subaguda de los plaguicidas y no da información, por tanto, sobre los efectos crónicos o neurotóxicos retardados (Conselleria de Sanitat i Consum, Generalitat Valenciana, 1993).

Es por eso que el control biológico de la exposición a plaguicidas debe contemplar otras medidas alternativas de control, para lo cual hay que hacer referencia, primeramente, al término *metabolismo* o biotransformación de los tóxicos que han ingresado en el organismo. En general, hay una serie de etapas que constituyen las vías metabólicas que siguen todas las sustancias exógenas. Aunque

algunas se eliminan sin sufrir transformación alguna, lo corriente es que sufran transformaciones a fin de aumentar su polaridad o solubilidad en agua y sean más fácilmente excretadas por el organismo. Por tanto, la mayoría de las transformaciones metabólicas de los plaguicidas son procesos de detoxificación.

Generalmente, los mecanismos de biotransformación de los xenobióticos se dividen en dos grandes grupos, que actualmente reciben el nombre de fase I (primaria) y fase II (secundaria o metabolismo de conjugación). La **fase I** comprende la formación de un metabolito libre por medio de transformaciones de tipo no sintético, que implican reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis. La **fase II** implica transformaciones de tipo sintético con la formación de un producto a partir de la sustancia original, o uno de sus metabolitos, y un metabolito endógeno. El caso más general es que la molécula original sufra una transformación del tipo I, según las disponibilidades enzimáticas de la especie y del individuo, y la molécula resultante, en general más hidrosoluble, sea conjugada con un componente endógeno, por ejemplo, el glutatión, el ácido glucurónico o el ión sulfato. Esto presenta un problema adicional a la hora de determinar analíticamente los xenobióticos que ingresan en el cuerpo humano, puesto que su forma química cambia respecto a la original.

El sistema básico de eliminación de las sustancias tóxicas (el propio contaminante o sus metabolitos) es la excreción urinaria. No obstante, esta vía no es la única, pues además hay que contar con la excreción biliar, por la que algunos metales como el plomo y ciertos compuestos orgánicos se eliminan parcialmente, y, sobre todo, la vía pulmonar, que es la más importante en la eliminación de aquellos gases que no se metabolizan y la de una fracción considerable de muchos compuestos volátiles, como los disolventes, que normalmente entran por esta misma vía.

Consecuentemente, el objetivo del control biológico va a ser la determinación del agente contaminante o de sus metabolitos en sangre, orina, tejido u otras muestras biológicas como la saliva, las heces, el aire exhalado, la leche materna, etc. La elección de la matriz a estudiar depende de una serie de variables que incluyen

los aspectos farmacocinéticos de los plaguicidas, la disponibilidad de la matriz, la facilidad de manipulación de la muestra, y el límite de detección del método analítico (Barr *et al.*, 1999).

Los plaguicidas OPs son ampliamente utilizados al haber sustituido a la mayoría de los OCs en las tareas agrícolas debido a su menor persistencia en el medio. Su control requiere, usualmente, una determinación en orina, y menos frecuentemente en sangre (sangre total, suero o plasma). Algunos autores valoran la exposición a plaguicidas OPs utilizando como indicador la determinación de alquil fosfatos en orina o sangre (Takamiya, 1994; Aprea *et al.*, 1997), o por determinación de metabolitos específicos en muestras de orina (Hill *et al.*, 1995; Aprea *et al.*, 1997; Byrne *et al.*, 1998; Macintosh *et al.*, 1999). Sin embargo, la presencia del plaguicida original ha sido detectada en la bibliografía. Así, Maroni *et al.* (1990) realizaron un control de orina de trabajadores durante una campaña de formulación para *acefato* y su metabolito *metamidofos*, pero solamente el primero de ellos estuvo presente en cantidades detectables. Del mismo modo, el plaguicida *clordimeform* pudo ser detectado en la orina de un trabajador que estuvo aplicando formulados que contenían dicho compuesto químico (Maddy *et al.*, 1986).

También en casos de intoxicación aguda resulta de interés extremo el análisis de residuos de plaguicidas en fluidos biológicos para determinar inmediatamente el compuesto que causó la intoxicación. La mayoría de los plaguicidas usados hoy en día son rápidamente metabolizados y consecuentemente es de esperar que muchos fenoles y otros compuestos polares aparezcan como conjugados en hígado y orina (Chambers *et al.*, 1995). Sin embargo, algunos plaguicidas originales han sido detectados en muestras de suero o sangre correspondientes a pacientes con intoxicación aguda como resultado accidental o de suicidio (Ameno *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1989; Namera *et al.* 1997; Futagami *et al.*, 1997; Musshoff *et al.*, 1999).

En el caso de los compuestos clorados (como plaguicidas OCs y PCBs), más lipofílicos, residuos del compuesto inicial o los metabolitos tienden a acumularse y almacenarse normalmente en el tejido adiposo. Residuos de estos contaminantes

también pueden encontrarse en la fracción lipídica de fluidos humanos como la leche materna, la sangre o el suero.

Valores Límite Biológicos (VLBs)

Existen intervalos de referencia para poblaciones sin exposición ocupacional, basados en modelos de distribución adecuadamente especificados, obtenidos a partir de resultados analíticos (valores de referencia) de una muestra definida y lo suficientemente grande (muestra de referencia) de una población (población de referencia). Excepto en lo que se refiere a la exposición, los individuos de esta población son similares a los de la población ocupacionalmente expuesta en cuanto a sexo, edad, alimentación, hábitos personales, etc. De los valores de referencia, en general, no interesa el límite inferior, pero sí el superior por ser el más próximo a las situaciones de intoxicación. Normalmente cuando el nivel del indicador supera este valor se considera que hay una exposición ocupacional.

Un **valor de referencia** se define como “*un intervalo de concentraciones de un elemento en muestras de una parte definida de un tejido humano blando o duro o de un fluido corporal seleccionadas al azar de un número suficiente de individuos sanos viviendo en un área geográfica definida, con una forma de vida y con unos hábitos de comida, bebida y tabáquicos definidos, con sexo y edad definidos, sin estar profesionalmente expuestos al agente contaminante estudiado*” (Obiols, 1998).

El establecimiento de un sistema de **VLBs** requiere enfoques sistemáticos en el campo de la toxicología, de la farmacología, de la epidemiología, a fin de determinar los niveles biológicos de seguridad, y los estudios indicadores de que a ciertos niveles biológicos de un factor de riesgo profesional, los riesgos correspondientes no se diferencian de los medidos en las poblaciones no expuestas. Del conjunto de todas estas actuaciones surge el valor de un límite biológico establecido independientemente del valor correspondiente al límite ambiental. El **Límite Biológico** se define como *el nivel de vigilancia de una sustancia y sus metabolitos presentes en compartimentos biológicos fácilmente explorables de*

sujetos expuestos a dicha sustancia con posibilidad de ser absorbida de algún modo (inhalación, ingestión o vía cutánea) (Obiols, 1998). Los límites de este tipo se basan, por tanto, en criterios de salud.

A continuación se comentan los BEIs y los valores BAT, establecidos respectivamente por EEUU y Alemania, como dos formas diferentes de medida de los VLBs. De un país va a depender el que se adopte uno de ellos, o los dos criterios (como es el caso de Reino Unido), como medida de los distintos agentes químicos.

Los índices biológicos de exposición (BEIs)

Los **BEIs** son valores de referencia propuestos como guía para la evaluación del riesgo potencial para la salud en la práctica de la higiene industrial. Asimismo, los TLVs (Threshold Limit a Industrial Hygienists) representan concentraciones de contaminantes en el aire del lugar del trabajo a las que se considera que casi todos los trabajadores pueden estar repetidamente expuestos un día tras otro sin que se presenten efectos adversos. De este modo, la ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) define los **BEIs** como *los niveles de determinantes que es más probable que se observen en especímenes recogidos de individuos sanos expuestos a sustancias en la misma medida que un trabajador con una exposición por inhalación al TLV* (ACGIH, 1996). Por determinante se entiende la misma sustancia química o sus metabolitos, o un cambio bioquímico reversible característico inducido por la sustancia. La medida puede realizarse en el aire exhalado, en la orina, en la sangre o en otros especímenes biológicos tomados del trabajador expuesto.

Por lo que respecta a los TLVs, la ACGIH ha incluido en las últimas ediciones de sus listas valores para un cierto número de plaguicidas OPs en el ámbito laboral. De esta lista puede destacar *fosdrin*, para el cual se expresa el valor de TLV como concentración en el medio ambiente (0.1 g/m^3). Para el resto de los OPs, el valor del TLV se expresa como riesgo a la exposición total por la vía cutánea (vía dérmica), bien por suspensión de la sustancia en el aire o bien de

manera más particular por contacto directo con esa sustancia. En orden de menor a mayor toxicidad figura en primer lugar *malation* (10 mg/m³); a éste le sigue *sulfatep* (0.2 mg/m³); en tercer lugar figuran *systox*, *paration* y *diazinon* (0.1 mg/m³); por último, se encuentra *TEPP*, cuyo TLV por vía dérmica es de 0.05 mg/m³, y que posee una mayor toxicidad (Gisbert y Villanueva, 1991). Otros ejemplos de plaguicidas con sus respectivos valores de TLVs son los siguientes: *DDT* (1 mg/m³), *toxafeno* y *diquat* (0.5 mg/m³), *paraquat* (0.1 mg/m³).

A modo de ejemplo en la **Tabla 1.4** se muestran dos grupos de plaguicidas con los correspondientes valores de BEIs adoptados por la ACGIH (1996).

Tabla 1.4. Determinantes biológicos de exposición a plaguicidas adoptados por la ACGIH (1996).

Determinante	Tiempo de muestreo	BEI	Notación
Organofosforados inhibidores de la colinesterasa (1989)			
Actividad colinesterásica en células rojas	Opcional	70% de la línea de base de la persona	<i>B, Ns, Sq</i>
Paration (56-38-2) (1989)			
p-Nitrofenol total en orina	Al final del turno	0.5 mg/g creatinina	<i>Ns</i>
Actividad colinesterásica en células rojas	Opcional	70% de la línea de base de la persona	<i>B, Ns, Sq</i>

B: Indica que el determinante generalmente está presente en una cantidad significativa en el espécimen biológico tomado de sujetos que no han estado expuestos laboralmente

Ns: Indica que el determinante no es específico puesto que puede encontrarse después de la exposición a otras sustancias

Sq: Indica que el determinante biológico es un indicador de exposición a la sustancia química, pero la interpretación cuantitativa de su medida es ambigua (semicuantitativa)

Los BEIs se aplican para exposiciones de 8 horas durante 5 días a la semana y no indican una distinción definida entre las exposiciones de riesgo o no riesgo. Debido a la variabilidad biológica es posible que las medidas individuales para un

determinado sujeto excedan los BEIs sin que haya un incremento de riesgo para su salud.

Los BEIs son, en definitiva, valores guía para concentraciones de productos químicos en el aire del lugar de trabajo y no están basados en concentraciones observadas en una población.

Los valores BAT (Biological Tolerance values for working materials)

Los valores **BAT** están establecidos por la DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) que los define como *la cantidad máxima permisible de un compuesto químico, sus metabolitos o cualquier desviación de la norma de los parámetros biológicos inducida por esas sustancias en personas expuestas* (Obiols, 1998). Según los conocimientos actuales estas condiciones generalmente no alteran la salud de los trabajadores, aun cuando la exposición sea repetida y de larga duración.

Estos valores también se aplican a exposiciones de 8 horas y cinco días a la semana. Para su establecimiento, que sólo es posible para aquellos agentes que pueden penetrar en el organismo por los pulmones u otras superficies corporales, se requiere una experiencia suficiente con el compuesto en materia de salud ocupacional y toxicológica y los datos deben apoyarse en observaciones en el hombre. Por tanto, y a diferencia de los BEIs, los BAT están basados en un criterio de salud y han sido establecidos como límites superiores aceptables

1.3. Metodología analítica para la determinación de residuos de plaguicidas en muestras biológicas de origen humano

La elevada toxicidad de los plaguicidas presentes en el medio ambiente obliga a disponer de métodos analíticos fiables, rápidos, económicos y suficientemente sensibles que permitan el control de los compuestos tóxicos en diversos tipos de muestras, sobre todo en muestras biológicas de origen humano. La Química Analítica frente al análisis de residuos de plaguicidas tiene ante sí un reto importante, ya que existe una fuerte demanda social exigiendo el control de todo tipo de contaminantes en el medio ambiente. Por otro lado, sólo es posible establecer legislaciones restrictivas sobre niveles de contaminantes cuando existan métodos adecuados para su análisis.

Mientras que en *análisis ambiental* están bien definidos los métodos de toma de muestras, de análisis, los parámetros y sus límites máximos permitidos, en *control biológico* no existen métodos específicos de toma de muestras y de análisis, no suele haber métodos normalizados y aunque las técnicas analíticas son similares a las empleadas en la evaluación ambiental, la naturaleza de las matrices y la existencia de metabolitos hace que la preparación y extracción de las muestras sea más complicada.

Con el objeto de realizar correctamente la evaluación de la exposición humana a plaguicidas, es fundamental el conocimiento de acción y/o el metabolismo de los analitos para poder determinar el parámetro biológico adecuado, aunque en algunos casos la información disponible sea insuficiente o inexistente. También es importante el conocimiento de las vías de absorción por las cuales el tóxico entra en el organismo, que en el caso de la exposición laboral a plaguicidas son principalmente la respiratoria, la dérmica y, en ocasiones, la vía oral. Por otra parte, hay que tener en cuenta la posibilidad de bioacumulación y en el caso de intoxicación, si se trata de intoxicación aguda, crónica, retardada (que se manifieste semanas o meses después de interrumpida la exposición que pudo ser única) o

reintoxicación endógena (por persistencia del tóxico en el tubo gastrointestinal o en los depósitos grasos y posterior paso a la sangre).

Uno de los primeros factores a tener en cuenta para llevar a cabo el control biológico es la elección de la matriz a analizar, la cual es dependiente de un número de variables tales como la farmacocinética del contaminante, la disponibilidad de la matriz, la facilidad de manipulación de la matriz, y el límite de detección del método analítico (Barr *et al.*, 1999). Por ejemplo, medir la dosis interna del plaguicida en *sangre* (o *suero* o *plasma*) presenta la ventaja principal de poder determinar directamente el compuesto original, en lugar de los metabolitos, y por tanto no se requieren detalles sobre el metabolismo del analito. Además, se trata de un fluido regulado y la concentración de contaminantes absorbidos normalmente permanece constante. Sin embargo, el análisis de sangre presenta los inconvenientes de la obtención de la muestra, la limitación de la cantidad de sangre disponible y los bajos niveles de concentración de los contaminantes presentes en la matriz.

Por otra parte, las ventajas de llevar a cabo el control biológico en *orina* son las siguientes: mayor facilidad de obtención de muestra, mayor disponibilidad de volumen para realizar el análisis, y posibilidad de utilizar instrumentos menos sensibles, puesto que las concentraciones de los compuestos en orina son mayores que en sangre debido a su rápido metabolismo y excreción. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la orina no es un fluido regulado como la sangre, y la concentración del contaminante o metabolito puede cambiar, incluso si la dosis interna permanece constante (Barr *et al.*, 1999).

Generalmente, la determinación de plaguicidas en muestras biológicas humanas no se puede realizar de forma directa en la muestra, sino que son necesarias una serie de etapas previas que constituyen el proceso analítico:

1. Toma de muestra: almacenamiento y conservación
2. Preparación de la muestra (etapa de extracción y separación, etapa de purificación y etapa de pre-concentración)
3. Determinación instrumental

Por lo que respecta a la **toma de muestras** de fluidos biológicos, hay que tener en cuenta que en muchas ocasiones la representatividad de la muestra, es decir, su capacidad de reflejar la exposición del trabajador, depende del momento de la toma. Para aquellos contaminantes que tienen una semivida muy larga (varias semanas) y su cinética de eliminación transcurre en una sola fase, la toma puede realizarse en cualquier momento del día. Para aquellos indicadores que, por el contrario, tienen una semivida muy corta o se metaboliza en diferentes fases, la toma debe llevarse a cabo en el momento más adecuado con relación al turno de trabajo. De una manera general, se puede decir que, según sea su vida media, un indicador nos informará de la exposición reciente (en las últimas horas), de la exposición a lo largo del día, la semana, el mes o toda la vida, a la que ha estado sometido el sujeto estudiado.

Generalmente, existen procedimientos estandarizados de toma de muestra de fluidos biológicos. En el caso concreto de la obtención de la sangre el método más utilizado es por punción venosa en el pliegue del codo, o en otro punto si éste no es accesible. Normalmente se suele extraer un volumen de diez mililitros, que se recoge en un tubo adecuado. La adición o no de anticoagulante a la muestra depende del tipo de determinación a efectuar. Cuando el contaminante se encuentra prioritariamente en el plasma, su uso es obligatorio a fin de poder llevar a cabo su posterior separación por centrifugación. Si el determinante se encuentra distribuido tanto el plasma como en los glóbulos rojos, se procede de la misma manera. En ocasiones, interesa realizar la determinación en suero, por lo que la recogida se lleva a cabo sin anticoagulante; a continuación, se deja reposar la muestra durante una hora a temperatura ambiente, se procede a su centrifugación y, finalmente, a la separación del suero por decantación o por aspiración mediante una pipeta.

En cuanto al transporte de este tipo de muestras, debe ser tal que evite contaminaciones, evaporaciones, derrames, roturas, etc., que son las causas más frecuentes de que se malogren las muestras, bien durante su transporte al laboratorio, bien durante su almacenamiento. Por tal motivo, una vez finalizada la toma, el cierre perfecto de los frascos, tubos o recipientes conteniendo las muestras biológicas, su

colocación en cajas adecuadas provistas de material de relleno para evitar choques fortuitos y las consiguientes roturas, el mantenimiento de aquellas en nevera, lejos de la luz solar en todo momento, y su colocación en las condiciones adecuadas de conservación a partir del momento de la llegada al laboratorio, son cuestiones que no pueden ser pasadas por alto si se desea obtener una buena fiabilidad en los resultados. Las muestras de sangre destinadas a la determinación de plaguicidas deberán mantenerse a -20°C , procediéndose a su congelación inmediata tras la extracción cuando se deba operar con sangre total, y las determinaciones de metabolitos en orina se pueden efectuar perfectamente en muestras previamente conservadas entre -20 y -25°C (Obiols, 1998).

En la etapa de **preparación de la muestra** se incluye generalmente un paso de extracción de los plaguicidas o metabolitos y otro alternativo de purificación, que debe ser lo suficientemente efectiva para separar a los analitos de los interferentes que están formando parte de la matriz correspondiente a una muestra extremadamente compleja. Muchos factores deben ser considerados para la elección de la técnica de extracción a desarrollar, principalmente los relacionados con el tipo de matriz objeto de estudio. Típicamente, la mayoría de los procedimientos publicados en la bibliografía requieren la extracción de los plaguicidas mediante **disolventes orgánicos** o mediante **extracción en fase sólida (SPE)**, en algunos casos junto con la aplicación de pasos adicionales de purificación para eliminar interferencias y conseguir reducir los límites de detección del método. Otras técnicas más novedosas, como la **microextracción en fase sólida (SPME)** se están aplicando cada vez más en la determinación de plaguicidas en fluidos biológicos, debido a su simplicidad y a la poca manipulación de la muestra (Lee *et al.*, 1996; Namera *et al.*, 1997; Röhrig *et al.*, 1998; Musshoff *et al.*, 1999; López *et al.*, 2001).

La elección de la técnica analítica para la **determinación instrumental** depende de una variedad de factores incluyendo coste, disponibilidad, selectividad, sensibilidad, propiedades de los analitos y capacidad de análisis. En el caso de los plaguicidas, esta determinación se lleva a cabo mediante técnicas cromatográficas, **cromatografía de gases (GC)** o **cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**,

acopladas a detectores que permitan la obtención de una sensibilidad y selectividad adecuadas. Aunque una gran variedad de detectores, especialmente el de *captura de electrones (ECD)* o el de *nitrógeno fósforo (NPD)*, han sido tradicionalmente utilizados, actualmente tiene mucha más importancia la ***espectrometría de masas (MS)*** como sistema de detección en el análisis multiresidual de plaguicidas mediante GC o LC. La técnica MS se presenta como una herramienta confirmatoria básica en todo laboratorio de análisis de plaguicidas, especialmente en matrices complejas. Además, el uso de MS permite mejorar la cuantificación empleando la técnica de la ***dilución isotópica*** mediante patrones marcados análogos a los analitos a estudiar.

Aunque GC es la técnica más ampliamente utilizada para la determinación de plaguicidas en fluidos biológicos, la aplicación de la LC también se ha extendido considerablemente desde su introducción en el campo del análisis de residuos de plaguicidas alrededor de 1980. Como cabe esperar, la LC se utiliza especialmente para la determinación de algunos plaguicidas y de muchos metabolitos en la orina, que no pueden analizarse directamente por GC debido a su baja volatilidad, alta polaridad y/o inestabilidad térmica. A modo de ejemplo, se pueden citar los trabajos de Chang y Lin (1995) y Chang *et al.* (1996), que desarrollaron un procedimiento para medir la exposición a *fenitrotion* y *clorpirifos* mediante la determinación de los metabolitos específicos (3-metil-4-nitrofenol y 3,5,6-tricloro-2-piridinol, respectivamente) en orina por HPLC, sin necesidad de adicionar ningún paso de derivatización.

Debido a la necesidad de determinar concentraciones extremadamente bajas de analitos en las muestras biológicas reales, ha surgido el interés por incrementar la sensibilidad en el método de detección. Una solución podría ser el uso de MS en modo de ***selected ion monitoring (SIM)***, el cual aumenta la sensibilidad pero reduce la información cualitativa del espectro en *full scan*. El uso de ***ionización química negativa en masas (NCI-MS)*** también ha sido recomendada por algunos autores para la determinación de metabolitos de piretroides (Leng *et al.*, 1997) y de OPs (Bartels y Kastl, 1992) en orina, de carbamatos en fluidos y tejidos biológicos

(Suzuki *et al.*, 1990) y de OCs en suero humano (Chaler *et al.*, 1998; Otero *et al.*, 1997).

Más recientemente, técnicas como la *espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)* y *espectrometría en tándem masas (MS/MS)* han sido satisfactoriamente aplicadas para la determinación de plaguicidas y/o metabolitos en matrices biológicas (Hill *et al.*, 1995; Guardino *et al.*, 1996; Leng *et al.*, 1997; Rohrbaugh y Sarver, 1998; Martínez Vidal *et al.*, 1998; Beeson *et al.*, 1999; Arrebola *et al.*, 1999a; Garrido Frenich *et al.*, 2000; Martínez Vidal *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, en prensa 1; Hernández *et al.*, enviado). Ambas técnicas son consideradas altamente específicas y sensibles. En general, la sensibilidad de MS/MS es menor que la de HRMS porque hay una considerable pérdida de iones en el proceso de transformación MS/MS. Sin embargo, mediante MS/MS se obtiene más información estructuralmente específica, lo cual conlleva a una disminución del ruido de fondo en el análisis de las muestras compensando la pérdida de iones (Barr *et al.*, 1999).

1.3.1. Aplicación de la extracción con disolventes orgánicos

La extracción con disolventes orgánicos, o más comúnmente conocida como extracción líquido-líquido (LLE), es una de las técnicas de tratamiento de muestra más ampliamente utilizada para la determinación de plaguicidas en matrices de fluidos biológicos debido a su simplicidad puesto que no precisa de ningún tipo de instrumentación compleja.

Una de las variables a tener en cuenta en el proceso de extracción es el disolvente orgánico utilizado como extractante. En la selección de éste se han de considerar aspectos como su polaridad, volatilidad y compatibilidad con las técnicas analíticas. En el análisis de orina y sangre, es frecuente el uso de hexano como disolvente para la extracción de metabolitos de piretroides (Kühn *et al.*, 1996) y de plaguicidas OCs (Rosell *et al.*, 1993; Edwards y Priestly, 1994; Luo *et al.*, 1997; Otero *et al.*, 1997; Matos Lino *et al.*, 1998). También se usan, en muchas ocasiones,

mezclas de hexano con acetato de etilo (Futagami *et al.*, 1997), con acetona (Minelli y Ribeiro, 1996; Matos Lino *et al.*, 1998), con diclorometano (Gill *et al.*, 1996), y especialmente en igual proporción con éter etílico o dietílico para la determinación de compuestos OCs (Kocan *et al.*, 1994; Atuma y Aune *et al.*, 1999; Najam *et al.*, 1999; Garrido Frenich *et al.*, 2000; Martínez Vidal *et al.*, 2000). Otros disolventes utilizados son diclorometano (Pitarch *et al.*, 2001), metanol (Guardino *et al.*, 1996) y tolueno (To-Figueras *et al.*, 1997).

A pesar de la simplicidad de esta técnica de extracción, hay que considerar también algunos de sus inconvenientes en el análisis de fluidos biológicos, entre los cuales hay que destacar que la separación entre las dos fases es, a menudo, problemática por la formación de las emulsiones y por la limitación de trabajar con bajos volúmenes de disolventes (Waliszewski y Szymczynski, 1991; Chang *et al.*, 1993; Martínez Vidal *et al.*, 1998; Pitarch *et al.*, 2001). Por este motivo, muchas veces se adiciona un paso de centrifugación posterior a la extracción para romper las emulsiones obtenidas y generar una mejor separación entre las dos fases. Waliszewski y Szymczynski (1991) desarrollaron un método mediante extracción con éter de petróleo/acetona (9+1), para la determinación de plaguicidas OCs en 5 ml de sangre adicionando previamente ácido acético (1+1). El objetivo de añadir este ácido no era solamente para el proceso de desproteínización, sino también para generar unas condiciones ácidas favorables que impidieran la formación de emulsiones durante el paso de extracción.

La **Tabla 1.5** muestra algunos ejemplos de aplicaciones de la técnica de extracción con disolventes para la determinación de residuos de plaguicidas en muestras de fluidos biológicos (orina, sangre total, suero y plasma). Como puede observarse, existen algunos casos de procedimientos en los que se adiciona un paso de hidrólisis previa, bien sea hidrólisis ácida (Kühn *et al.*, 1996) o básica (To-Figueras *et al.*, 1997) para la obtención de los compuestos libres y facilitar el análisis. Estos pasos son necesarios cuando lo que se determina en la matriz son los metabolitos correspondientes al plaguicida objeto de estudio, puesto que

normalmente el metabolismo hace que los derivados sean expulsados, por ejemplo en la orina, total o parcialmente conjugados como glucurónidos.

En muchos casos, y debido a la presencia de proteínas en las muestras de sangre (sangre total, suero o plasma), se adiciona a la extracción un paso de pretratamiento de desproteinización para liberar a los analitos. Los agentes más utilizados son ácidos, tales como el ác. sulfúrico (Otero *et al.*, 1997), el ác. acético (Waliszewski y Szymczynski, 1991; Gill *et al.*, 1996) o el ác. fórmico (Luo *et al.*, 1997), o bien otros disolventes orgánicos como el metanol (Kocan *et al.*, 1994; Atuma y Aune, 1999; Najam *et al.*, 1999; Garrido Frenich *et al.*, 2000; Martínez Vidal *et al.*, 2000).

Los análisis de muestras de fluidos biológicos, y en especial el análisis de sangre, mediante extracción con disolventes no suelen ser tan sencillos, y requieren la aplicación de pasos de purificación de distinta complejidad para eliminar las interferencias y reducir los límites de detección de los procedimientos. Se han aplicado diferentes técnicas de purificación en la literatura, especialmente para la determinación de compuestos OCs, puesto que son los analitos más estudiados en muestras de sangre. Se han utilizado ampliamente tratamientos de eliminación de interferencias con ácido sulfúrico (Waliszewski y Szymczynski, 1991; Otero *et al.*, 1997; To-Figueras *et al.*, 1997). En algunos casos, se ha usado el ácido sulfúrico en combinación con SPE usando adsorbentes tales como Florisil (Gill *et al.*, 1996). Por otra parte, también se ha utilizado SPE con fines de purificación para la determinación de diferentes OCs en muestras de sangre y suero, usando Florisil (Matos Linos *et al.*, 1998), C₁₈ (Guardino *et al.*, 1996), o en dos pasos de purificación con Florisil y Silicagel (Najam *et al.*, 1999).

Atuma y Aune (1999) propusieron un procedimiento laborioso para la determinación de insecticidas OCs y PCBs en suero, en el cual, después de una extracción con hexano-éter dietílico, aplicaron dos tratamientos con ácido sulfúrico y una purificación mediante HPLC en una columna de Silicagel. De este modo, se consiguieron obtener límites de detección muy satisfactorios (2-7 pg g⁻¹ para PCBs y

1-7 pg g⁻¹ para plaguicidas OCs), permitiendo la determinación de bajos niveles de compuestos OCs tanto en población expuesta como no-expuesta.

Posteriormente, Garrido y colaboradores (2000) desarrollaron un procedimiento similar mediante extracción con hexano-éter dietílico para la determinación de compuestos OCs también en muestras de suero. En este caso, se aplicaron dos pasos de purificación, uno mediante ácido sulfúrico, y otro con HPLC usando una columna LiChrospher Si 250 x 4 mm d.i. La selectividad del método se mejoró con la introducción de la técnica de detección GC-MS/MS, obteniendo límites de detección adecuados, incluso en algunos casos del orden de 3 pg ml⁻¹ (para PCB 136) y permitiendo la eliminación de picos interferentes.

Para la determinación de α - y β -endosulfan y sus metabolitos (-sulfato, -éter y -lactona) en suero, Martínez Vidal y colaboradores (2000) aplicaron un procedimiento muy semejante al presentado anteriormente: una extracción con hexano-éter dietílico y dos pasos de purificación con ácido sulfúrico y HPLC. Mediante la determinación por MS/MS, también obtuvieron unos límites de detección satisfactorios (0.05 – 0.6 ng ml⁻¹).

Tabla 1.5. Aplicaciones de la extracción con disolventes orgánicos para la determinación de plaguicidas en fluidos biológicos.

Analitos	Matriz	Desprot.	Hidrólisis previa	Disolvente	Purificación	Determinación cromatográfica	Observaciones	LD (ng ml ⁻¹)	Ref
OCs	Suero y sangre total (5 ml)	Ac acético	–	Éter de petróleo-Acetona (9+1)	H ₂ SO ₄	GC-ECD	La adición de ac. acético además de desproteinizar, evita la formación de emulsiones	–	Waliszewski y Szymczynski, 1991
OCs	Sangre total	–	–	Hexano	–	GC-ECD GC-MSD	–	0.1	Rosell <i>et al.</i> , 1993
Dieldrin	Plasma (2 ml)	–	–	Hexano	–	GC-ECD	Adicionan un paso de centrifugación después de la extracción	–	Edwards y Priestly, 1994
OCs	Suero (5 ml)	MeOH	–	Hexano-Éter etílico (1:1)	Columna de Florisil, Silicagel y sulfato sódico	GC-ECD	Adicionan un paso de centrifugación después de la extracción	–	Kocan <i>et al.</i> , 1994
OCs y PCBs	Suero y sangre (1 ml)	Ac. acético	–	Hexano-DCM (9:1)	1° H ₂ SO ₄ 2° H ₂ SO ₄ 3° SPE (Florisil)	GC-MSD	Adicionan un paso de centrifugación después de la extracción	–	Gill <i>et al.</i> , 1996
DDTs	Sangre (5 ml)	–	–	MeOH	SPE (C ₁₈)	GC-ECD GC-MS/MS	Adicionan un paso de centrifugación después de la extracción	0.01-0.06	Guardino <i>et al.</i> , 1996
Metabolitos piretroides	Orina (5 ml)	–	HCl (1 h, 90°C)	Hexano	–	GC-MSD	Previa derivatización del ac. fenoxibenzoico a ésteres metilados utilizando H ₂ SO ₄ en MeOH	0.5-1	Kühn <i>et al.</i> , 1996

Tabla 1.5 (cont.). Aplicaciones de la extracción con disolventes orgánicos para la determinación de plaguicidas en fluidos biológicos.

Analitos	Matriz	Desprot.	Hidrólisis previa	Disolvente	Purificación	Determinación cromatográfica	Observaciones	LD (ng ml ⁻¹)	Ref
OCs	Suero (1 ml)	–	–	Silica (1% agua) + Hexano - Acetona (9:1)	Columna cromatográfica de Alumina	GC-ECD	–	–	Minelli y Ribeiro, 1996
OPs	Suero	–	–	Hexano-AcOEt (75:25)	–	HPTLC	Adicionan un paso de centrifugación para separar mejor la fase orgánica	100-1100	Futagami <i>et al.</i> , 1997
DDT y DDE	Suero (1 ml)	Ac. fórmico	–	Hexano	–	GC-ECD	Adicionan un paso de centrifugación después de la extracción	0.5	Luo <i>et al.</i> , 1997
HCHs	Suero (2 ml)	H ₂ SO ₄	–	Hexano	H ₂ SO ₄	GC-ECD GC-NICI-MS	Comparan la digestión ácida (H ₂ SO ₄) con una digestión básica (KOH)	0.2-0.6 (ECD) 0.1-1.4 (MSD)	Otero <i>et al.</i> , 1997
HCB	Orina (4 ml)	–	NaOH (3 h, 70 °C)	Tolueno	H ₂ SO ₄	GC-ECD GC-MSD	Después de la extracción adicionan diazoetano para la derivatización de los metabolitos	0.15	To-Figueras <i>et al.</i> , 1997
OCs	Suero (1 ml)	–	–	Hexano Hexano-Acetona (90:10)	SPE (florisil)	GC-ECD	–	–	Matos Lino <i>et al.</i> , 1998

Tabla 1.5 (cont.). Aplicaciones de la extracción con disolventes orgánicos para la determinación de plaguicidas en fluidos biológicos.

Analitos	Matriz	Desprot.	Hidrólisis previa	Disolvente	Purificación	Determinación cromatográfica	Observaciones	LD (ng ml ⁻¹)	Ref
OCs y PCBs	Suero (4 g)	MeOH	–	Hexano-Éter dietílico (1:1)	1° H ₂ SO ₄ 3° H ₂ SO ₄ 3° HPLC (Silicagel)	GC-ECD	Adicionan un paso de centrifugación después de la extracción	0.001-0.007	Atuma y Aune, 1999
OCs y PCBs	Suero (2 ml)	MeOH	–	Hexano-Éter etílico (1:1)	1° Columna Florisil 2° Columna Silicagel	GC-ECD	–	0.1-0.5	Najam <i>et al.</i> , 1999
OCs y PCBs	Suero (4 ml)	MeOH	–	Hexano-Éter dietílico (1:1)	1° H ₂ SO ₄ 2° HPLC	GC-ECD GC-MS/MS	Adicionan un paso de centrifugación después de la extracción	0.10-0.16 (ECD) 0.003-2 (MS/MS)	Garrido Frenich <i>et al.</i> , 2000
Endosulfan y metabolitos	Suero (4 ml)	MeOH	–	Hexano-Éter dietílico (1:1)	1° H ₂ SO ₄ 2° HPLC	GC-ECD GC-MS/MS	Para evitar los efectos de la matriz, preparan las curvas de calibrado usando extractos de blanco de matriz	0.12-0.15 (ECD) 0.05-0.6 (MS/MS)	Martínez Vidal <i>et al.</i> , 2000
OPs y OCs	Orina (5ml) Suero (2 ml)	–	–	DCM		GC-NPD GC-ECD	Aplican una LLME En el caso del suero adicionan un paso de centrifugación	0.7-6 (OPS)	Pitarch <i>et al.</i> , 2001 (<i>Presente Memoria</i>)

1.3.2. Aplicación de la extracción en fase sólida

Otra alternativa para la extracción de plaguicidas en fluidos biológicos es la extracción en fase sólida (SPE), técnica actualmente más utilizada que la extracción con disolventes, puesto que es bastante más simple y rápida, reduce el consumo de disolvente orgánico utilizado, posee una mayor capacidad de análisis y es más fácil de automatizar. Además, comercialmente existe una gran diversidad de materiales que pueden utilizarse como adsorbentes, y eso supone que el campo de aplicación de esta técnica sea muy amplio y que pueda ser todavía incrementado con el desarrollo de nuevos materiales.

La elección del adsorbente es de gran importancia pues debe retener significativamente a los plaguicidas. La capacidad de adsorción de un adsorbente depende, en parte, de su tratamiento, de las condiciones de manufactura y de la composición. Uno de los adsorbentes más utilizados en el análisis de plaguicidas en fluidos biológicos es un derivado de sílice enlazada que incluye grupos funcionales de hidrocarburos C_{18} . La sílice octadecil-enlazada C_{18} se ha utilizado para extraer compuestos de diferentes familias químicas desde plaguicidas OPs (Liu *et al.*, 1989; Pitarch *et al.*, 2001), carbamatos (Suzuki *et al.*, 1990), piretroides y sus metabolitos en orina (Junting y Chuichang, 1991; Arrebola *et al.*, 1999a), insecticidas OCs (Petty *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 1997), hasta PCBs (Brock *et al.*, 1996). El mecanismo de extracción con adsorbente C_{18} está basado en interacciones no polares entre los enlaces C-H del adsorbente y la parte apolar del analito. También se han aplicado otros adsorbentes para la determinación de compuestos OCs como Florisil en plasma (Singh *et al.*, 1998), y un copolímero de estireno-divinilbenceno (Isolute ENC+) en sangre total (Janák *et al.*, 1999).

Típicamente, para llevar a cabo la técnica SPE se hace pasar la muestra a través de cartuchos rellenos con 100-500 mg de adsorbente. Posteriormente, se han introducido en el mercado discos para llevar a cabo la SPE. Así, Pauwels *et al.* (1999) desarrollaron satisfactoriamente un método para la extracción de compuestos OCs en suero desproteinizado utilizando discos C_{18} . Según los autores, el uso de discos SPE permitió una importante reducción del volumen de disolvente y la

obtención de un extracto final más limpio que el obtenido mediante el uso de los tradicionales cartuchos, lo cual permitió la determinación de ultratrazas.

La **Tabla 1.6** muestra algunas aplicaciones de la técnica SPE para la determinación de plaguicidas en muestras de fluidos biológicos. Como puede observarse, en general, los procedimientos descritos en la tabla son menos complejos, puesto que mayoritariamente incluyen menos pasos de purificación en comparación a los que se estudiaron en la **Tabla 1.5**, correspondiente a la extracción con disolventes orgánicos.

Por lo general, el análisis de muestras de orina no necesita pasos adicionales de purificación cuando se aplica SPE como etapa de extracción, aunque a veces sí que es necesario la adición de un paso de pre-tratamiento de hidrólisis ácida para liberar al metabolito conjugado en la orina (Asakawa *et al.*, 1996a; Angerer y Ritter, 1997). Sin embargo, Arrebola *et al.* (1999a) desarrollaron un método para la determinación de metabolitos de piretroides en orina mediante extracción con cartuchos C₁₈ y seguido de un paso de purificación LLE con hexano. El método propuesto, junto con la cuantificación mediante GC-MS/MS, permitió obtener una buena reproducibilidad y una elevada sensibilidad con límites de detección en el rango 2-19 pg ml⁻¹.

Con respecto al análisis de muestras de sangre total, suero o plasma, muchos autores adicionan un paso de purificación tras la extracción mediante SPE utilizando diversas técnicas. Brock *et al.* (1996) propusieron un procedimiento para compuestos OCs en suero humano, en el cual después de la extracción con SPE mediante cartuchos C₁₈, fue aplicado un paso de purificación también mediante SPE (Florisil). Johnston *et al.* (1997) estudiaron la extracción de plaguicidas OCs mediante SPE en plasma animal, y también adicionaron un tratamiento de purificación mediante SPE con adsorbente Silica. En algunos casos, se utilizó el tratamiento con ácido sulfúrico en la purificación de trazas de plaguicidas OCs y PCBs en muestras de suero humano (Pauwels *et al.*, 1999).

Posteriormente, Janák y colaboradores (1999) estudiaron la extracción, mediante SPE, de PCBs en la matriz compleja de sangre total desproteinizada con una mezcla de ácido fórmico y 2-propanol. Antes de la elución de los analitos con diclorometano, se adicionaron 4 ml de ácido sulfúrico concentrado directamente a los cartuchos SPE (Isolute ENC) para la descomposición de los lípidos presentes en la matriz. El procedimiento incorporó una etapa final de purificación a través de una pipeta Pasteur rellena con óxido de aluminio (30 mm), sulfato sódico anhidro (5 mm), Silicagel impregnada con una solución de ácido sulfúrico al 60% (10 mm) y, de nuevo, sulfato sódico anhidro (5 mm). La aplicación del procedimiento global disminuyó el riesgo de contaminación de la muestra, obteniendo un bajo ruido de fondo y límites de detección en el rango de 2-10 pg ml⁻¹.

Tabla 1.6. Aplicaciones de SPE para la determinación de plaguicidas en muestras de fluidos biológicos.

Analitos	Matriz	Desprot.	Hidrólisis previa	SPE (eluyente)	Purificación	Determinación cromatográfica	Observaciones	LD (ng ml ⁻¹)	Ref
Dipterex	Suero (1 ml)	–	–	C ₁₈ (MeOH 50%)	–	GC-FTD	Estudian suero de cadáveres y estudian precursor y no metabolitos	2.5	Ameno <i>et al.</i> , 1989
OPs	Orina y plasma (1 ml)	–	–	C ₁₈ (Cloroformo-Isopropanol, 9:1)	–	GC-FID	–	–	Liu <i>et al.</i> , 1989
Carbamatos	Orina, plasma y sangre (1 ml)	–	–	C ₁₈ (Cloroformo)	–	GC-MSD	–	500-1000	Suzuki <i>et al.</i> , 1990
Piretroides	Orina y plasma (1 ml)	–	–	C ₁₈ (Cloroformo)	–	GC-FID	–	–	Junting y Chuichang, 1991
Metabolitos piretroides	Orina (5 ml)	–	H ₂ SO ₄	C ₁₈ (Cloroformo)	–	GC-MSD	Derivatización con anhídrido de pentafluoropropionico y pentafluoropropanol	700	Asakawa <i>et al.</i> , 1996a
OCs y PCBs	Suero (2 ml)	Ac. fórmico	–	C ₁₈ (2,2,4-Trimetil pentano)	SPE (Florisil)	GC-ECD	–	0.2-0.6	Brock <i>et al.</i> , 1996
Metabolitos piretroides	Orina (10 ml)	–	H ₂ SO ₄ (1h, 90°C)	C ₁₈ (MeOH)	–	GC-MSD	Previa derivatización a ésteres con ac. sulfúrico, y después extraídos con hexano	0.3-0.5	Angerer y Ritter, 1997
OCs	Plasma animal (1 ml)	–	–	C ₁₈	SPE (Silica)	GC-ECD	Centrifugan el plasma antes de hacerlo pasar por los cartuchos de SPE	7-25	Johnston <i>et al.</i> , 1997

Tabla 1.6 (cont.). Aplicaciones de SPE para la determinación de plaguicidas en muestras de fluidos biológicos.

Analitos	Matriz	Desprot.	Hidrólisis previa	SPE (eluyente)	Purificación	Determinación cromatográfica	Observaciones	LD (ng ml ⁻¹)	Ref
OCs	Orina animal (3 ml)	–	–	C ₁₈ (Hex-Éter etílico, 1:1)	–	GC-ECD	Centrifugan la orina antes de hacerla pasar por los cartuchos de SPE	1.3-2.7	Petty <i>et al.</i> , 1997
OCs y PCBs	Plasma (1 ml)	Acetonitrilo	–	Florisil (Acetonitrilo)	–	GC-MSD	–	25-40	Singh <i>et al.</i> , 1998
Endosulfan y metabolitos	Orina (3 ml)	–	–	C ₁₈ (Hex-Éter dietílico, 80:20)	–	GC-MS/MS	–	0.006-0.018	Martínez Vidal <i>et al.</i> , 1998 Arrebola <i>et al.</i> , 1999b
Metabolitos piretroides	Orina (3 ml)	–	H ₂ SO ₄ (1h, 90°C)	C ₁₈ (Acetona)	LLE (hexano)	GC-MS/MS	Fue necesaria una derivatización con hexafluoroisopropanol	0.002-0.019	Arrebola <i>et al.</i> , 1999a
PCBs	Sangre total (5 g)	Ac. fórmico/ 2-propanol, 4:1	–	Isolute ENC+ (DCM)	Adsorción pipeta rellena de sulfato, Silicagel y Alumina.	GC-ECD	Descomposición de los lípidos con ac. sulfúrico en la columna SPE	0.002-0.01	Janák <i>et al.</i> , 1999
OCs y PCBs	Suero (1 ml)	Ac. fórmico + acetonitrilo + trietilamina	–	Discos C ₁₈ (AcOEt-Hex-TEA, 80:20:0.2)	H ₂ SO ₄	GC-ECD GC-MSD	La utilización de los discos de SPE está indicada para el análisis de ultratrazas	0.1-0.4 (OCs) 0.04-0.12 (PCBs)	Pauwels <i>et al.</i> , 1999
OPs y OCs	Orina (5 ml) Suero (2 ml)	–	–	C ₁₈ (MTBE)	–	GC-NPD GC-ECD	–	0.5-10 (OPS) 0.7-3.6 (OCs)	Pitarch <i>et al.</i> , 2001 (<i>Presente Memoria</i>)

1.4. Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME) ha sido introducida en la Química Analítica como una técnica novedosa de preparación de muestra libre de disolventes y bastante más rápida y simple que los métodos convencionales, puesto que los pasos de extracción y concentración en la preparación de la muestra quedan simplificados en un solo paso. Actualmente, muchos autores la están considerando como una técnica de extracción muy adecuada para el análisis de muestras de fluidos biológicos por su baja manipulación de muestra.

1.4.1. Introducción. Principios básicos de SPME

Las primeras aplicaciones de la técnica de microextracción en fase sólida fueron publicadas en 1989 por Belardi y Pawliszyn. A partir de aquí, la técnica se desarrolló rápidamente obteniéndose en 1990 el primer sistema de SPME (Arthur y Pawliszyn, 1990). Posteriormente, Supelco comercializó en 1993 el sistema de SPME basado en una microjeringa reutilizable junto con las fibras recubiertas de un polímero para la extracción, las cuales fueron inicialmente de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA).

El principio básico de esta técnica es el uso de una pequeña cantidad de fase extractante, normalmente menos de 1 μL (Pawliszyn, 1999). Aunque el volumen de muestra utilizado suele ser pequeño (por debajo de 3 ml), cabe la posibilidad de realizar la extracción con volúmenes mucho más grandes cuando el sistema investigado es muestreado directamente, como por ejemplo el aire de una habitación o el agua de un lago. La fase extractante puede ser un polímero líquido de elevado peso molecular y similar en naturaleza a la fase estacionaria en cromatografía, o puede ser un polímero sólido, típicamente de elevada porosidad para aumentar el área superficial disponible para la absorción.

La configuración del sistema de SPME consiste en una pequeña fibra de sílice fundida, normalmente recubierta de una fase polimérica. La fibra está instalada sobre un soporte, obteniéndose un sistema con cierta semejanza a una jeringa modificada (**Figura 1.3**). La fibra queda expuesta a la muestra durante un tiempo de

absorción optimizado, normalmente con agitación para favorecer el fenómeno de difusión y, de esta manera, el transporte de los analitos desde la fase acuosa a la fase absorbente. Una vez transcurrida la etapa de absorción, los analitos son desorbidos térmicamente desde la fibra a la columna capilar del GC directamente a través del puerto de inyección, o a una columna de HPLC mediante elución con disolventes.

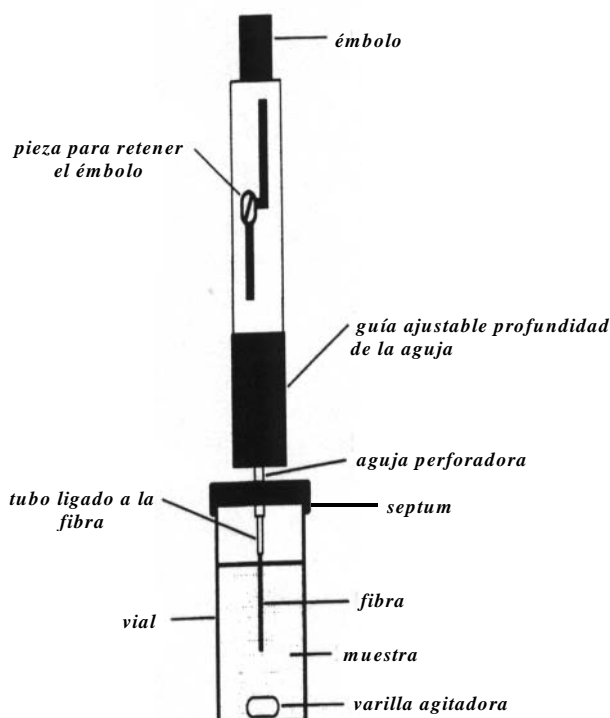


Figura 1.3. Diseño y componentes del sistema de operación de SPME.

1.4.1.1. Modos de extracción

La extracción por SPME puede llevarse a cabo de tres maneras distintas: inmersión directa, extracción con espacio de cabeza y extracción con membrana protectora. La **Figura 1.4** ilustra los tres modos mencionados de SPME. En la *inmersión directa* (**Figura 1.4(A)**), la fibra recubierta es introducida directamente dentro de la muestra y los analitos son transportados desde la matriz de la muestra a

la fase extractante. Para obtener una rápida extracción, se requiere la agitación de la muestra para facilitar la difusión de los analitos desde la muestra a los alrededores de la fibra.

En el modo de *espacio de cabeza (HS)* (**Figura 1.4(B)**), los analitos necesitan ser transportados a través de una barrera de aire antes de ser absorbidos por la fibra. Esta variación sirve principalmente para evitar el daño de las fibras por contacto directo con interferentes de elevado peso molecular y otras sustancias no volátiles presentes en la muestra, tales como materiales húmicos o proteínas. Este modo de extracción también permite una modificación en el pH, sin dañar la fibra. La elección del modo de extracción es significativa en los aspectos cinéticos. En el modo espacio de cabeza, los analitos son extraídos de la fase vapor equilibrada con la muestra, por tanto mediante una extracción indirecta desde la matriz. Por este motivo, los analitos más volátiles son extraídos más rápidamente que los semivolátiles. La temperatura tiene un efecto significativo en la cinética del proceso, puesto que determina la presión de vapor de los analitos. En general, los tiempos de equilibrio para compuestos volátiles son más cortos en el modo de extracción por espacio de cabeza que por inmersión directa bajo condiciones de agitación similares, debido principalmente a tres razones: i) una importante fracción de los analitos está presente en la fase vapor antes del comienzo del proceso de extracción, ii) existe normalmente una gran interfase entre la matriz de la muestra y el espacio de cabeza, iii) los coeficientes de difusión en la fase gas son normalmente más altos (4 órdenes de magnitud) que en la líquida.

En el tercer modo, *extracción con membrana protectora* (**Figura 1.4(C)**), la extracción es similar a la de inmersión directa, pero la fibra queda separada de la muestra con una membrana selectiva, la cual permite el paso a su través de los analitos y bloquea el paso de los interferentes. El principal objetivo, es el de proteger la fase absorbente en muestras muy sucias. Aunque el propósito sea el mismo que en el modo espacio de cabeza, la membrana protectora permite la determinación de compuestos menos volátiles. El proceso de extracción es más lento que en inmersión

directa, porque los analitos necesitan difundirse a través de la membrana antes de alcanzar el recubrimiento.

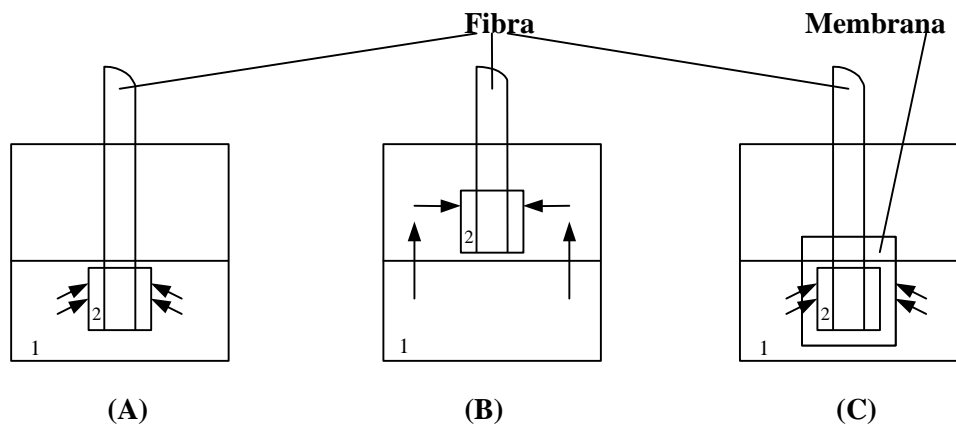


Figura 1.4. Modos de operar en SPME: (A) inmersión directa, (B) espacio de cabeza, (C) con membrana de protección. 1. muestra. 2. recubrimiento de la fibra.

Por consiguiente, la selección del modo de extracción debe hacerse considerando tres aspectos importantes: la matriz de la muestra, la volatilidad del analito y su afinidad por la matriz (**Tabla 1.7**). Para muestras muy sucias, las cuales contienen sustancias que pueden dañar la fibra, los modos de espacio de cabeza y de membrana protectora serían los más adecuados. Sin embargo, en matrices limpias la inmersión directa debería considerarse en primer lugar. Para analitos más volátiles, el modo de espacio de cabeza es todavía preferible debido a sus más bajos tiempos de equilibrio. En principio, la membrana protectora sólo se recomienda en muestras muy sucias y en el caso de no poderse utilizar ninguno de los otros dos modos.

Tabla 1.7. Criterio de selección del modo de extracción (Pawliszyn, 1997).

<i>Modo SPME</i>	Propiedades analito	Matrices
<i>Inmersión directa</i>	de media a baja volatilidad	muestras gaseosas, líquidas (preferentemente simples)
<i>Espacio de cabeza</i>	de alta a media volatilidad	líquidas (incluyendo complejas), sólidas
<i>Membrana protectora</i>	baja volatilidad	muestra complejas

1.4.1.2. Aspectos termodinámicos

La microextracción en fase sólida es un proceso de equilibrio multifásico: (i) entre el recubrimiento de la fibra y la fase acuosa, (ii) entre la fase espacio de cabeza y la fase acuosa, (iii) entre el recubrimiento de la fibra y el espacio de cabeza. La cantidad de analito extraída por la fibra esta relacionada con todos los equilibrios, y la masa total del analito debe mantenerse constante durante la extracción:

$$C_o V_s = C_f^\infty V_f + C_h^\infty V_h + C_s^\infty V_s \quad (1)$$

donde C_o es la concentración inicial del analito en la matriz; C_f^∞ , C_h^∞ y C_s^∞ son las concentraciones en el equilibrio del analito en la fibra, en la fase espacio de cabeza, y en la muestra, respectivamente; V_f , V_h y V_s son los volúmenes del recubrimiento de la fibra, del espacio de cabeza y de la solución acuosa, respectivamente.

Desarrollando la ecuación (1) y considerando las expresiones de las constantes de distribución (ver Scheppers Wercinski, 1999) se puede obtener una ecuación general para describir las condiciones de equilibrio:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_o V_s}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad (2)$$

donde n expresa el número de moles de analito absorbido en la fibra, K_{fs} es la constante de distribución entre la fase estacionaria y la fase acuosa; K_{hs} es la constante de distribución entre la fase espacio de cabeza y la acuosa.

En el caso en que no exista espacio de cabeza (por ejemplo en la extracción por inmersión directa), el término $K_{hs}V_h$ puede ser eliminado, con lo cual la ecuación queda simplificada a la siguiente expresión:

$$n = \frac{K_{fs}V_fC_oV_s}{K_{fs}V_f + V_s} \quad (3)$$

1.4.1.3. Recubrimiento de la fibra

Desde los comienzos de la aplicación de la técnica de SPME, ha habido un importante desarrollo en la aplicación de nuevas fibras desarrolladas para SPME/GC, con motivo de mejorar la eficacia de los analitos más polares y de bajo peso molecular. Más tarde, se empezó a estudiar el acoplamiento SPME/HPLC, lo cual dio lugar al desarrollo de nuevas fibras específicas para absorber moléculas grandes y para asegurar una duración más larga en presencia de fases móviles orgánicas.

La clave de la técnica de SPME está en la capacidad de absorber selectivamente los analitos de interés en un medio acuoso o en el espacio de cabeza. La cantidad de analito extraído depende, como se ha visto anteriormente, de la constante de distribución K_{fs} , la cual, a su vez, depende de la fase estacionaria (grosor de la película, polaridad o porosidad), que afecta a la selectividad y a los límites de detección. Modificaciones en la muestra, como puede ser la adición de sal o el ajuste del pH, también pueden afectar a la constante de distribución.

En la **Tabla 1.8** se muestra una posible clasificación de las fibras atendiendo a su polaridad, incluyendo el color comercial característico de cada una de ellas. También se incluye el volumen de la fase polimérica, que puede ser calculado teniendo en cuenta que el diámetro de la fibra central de sílice fundida es de 110 μm para la mayoría de las fibras (a excepción de las usadas para HPLC cuyo valor es 160 μm) y la longitud de la fibra de 1 cm.

Tabla 1.8. Clasificación de las fibras SPME atendiendo a su polaridad, color comercial característico y volumen de la fase polimérica (Scheppers Wercinski, 1999).

Polaridad	Fibras	Color	Vol. fase (μl)
<i>No Polares</i>	PDMS, 100 μ m	rojo	0.612
	PDMS, 30 μ m	amarillo	0.132
	PDMS, 7 μ m	verde	0.026
<i>Polares</i>	PA, 85 μ m	blanco	0.521
	CW-DVB, 65 μ m	naranja	0.357
	CW-TPR, 60 μ m (HPLC)	marrón	0.330
<i>Bipolares</i>	PDMS-DVB, 65 μ m	azul	0.357
	CX-PDMS, 75 μ m	negro	0.436
	PDMS-DVB, 60 μ m (HPLC)	morado	0.415
<i>PDMS: Polidimetilsiloxano</i>		<i>PA: Poliacrilato</i>	<i>CW: Carbowax</i>
<i>DVB: Divinilbenceno</i>		<i>TPR: Template Resin</i>	<i>CX: Carboxen</i>

La selección de la fase estacionaria se basa principalmente en la polaridad y volatilidad del analito a estudiar. Por lo general, la polaridad de la fase polimérica ha de ser semejante a la de los analitos, ya que los compuestos tienen tendencia por las fases de polaridades similares y, para obtener un buen rendimiento en la extracción el analito debe tener más tendencia a estar en la fase estacionaria que en la acuosa. La fase PDMS es la más útil y debería ser considerada en primer lugar. Es muy robusta y puede ser sometida a altas temperaturas en el inyector del GC (Pawliszyn, 1999). PDMS es una fase líquida no polar, así que extrae muy bien a analitos no polares. Sin embargo, puede también ser aplicada con éxito para la determinación de compuestos más polares, particularmente después de una optimización de las condiciones de extracción.

1.4.1.4. Optimización SPME

En la técnica de SPME se distinguen claramente dos procesos: la absorción (retención de los analitos en la fibra) y la desorción. El desarrollo de un procedimiento para la determinación de analitos por medio de SPME usualmente

requiere la optimización de una serie de variables relacionadas con las etapas mencionadas.

- Absorción

Algunas de las variables que afectan el grado de absorción son: el tipo de fibra (ya se ha nombrado anteriormente), el tiempo de extracción, la fuerza iónica (contenido de sal), el pH, la temperatura, los efectos de matriz, el volumen de muestra, la agitación, la posición de la fibra, así como la dilatación térmica de la fase polimérica.

La *fuerza iónica* y el *pH* se pueden utilizar para aumentar el rendimiento de la extracción, de forma parecida a los métodos basados en la extracción con disolventes orgánicos. La concentración de sal adecuada o la disolución tampón se han de añadir a la propia muestra. Asimismo, la *temperatura* ha de ser controlada porque, en el caso de utilizar una extracción con inmersión directa, temperaturas más elevadas hacen que los analitos tengan tendencia a estar en la fase gaseosa y esto disminuiría el rendimiento de la extracción.

El *tiempo* requerido para alcanzar el equilibrio puede ser desde algunos minutos hasta varias horas, dependiendo de las características del analito y del método utilizado de agitación. Aunque, generalmente, la fibra sólo extrae una parte de analito en solución, se suelen obtener límites de detección favorables comparados con las técnicas de extracción convencionales, ya que todo el analito extraído es transferido a la columna cromatográfica, y no sólo una pequeña parte como ocurre en otras técnicas de extracción en las que se inyectan unos pocos microlitros del extracto final. También es importante *considerar la dilatación térmica de la fase polimérica*, ya que al variar el radio de la película podría alterar la eficacia de la extracción.

La efectividad de la técnica utilizada para la *agitación* determina el tiempo de equilibrio de las muestras acuosas. Por lo general, el análisis de muestras gaseosas suele ser rápido y frecuentemente limitado por el movimiento de difusión de los analitos en la fibra. Una situación similar ocurre con la extracción de los analitos

volátiles por el modo de espacio de cabeza, en la cual, aun en el caso de no utilizar agitación, la extracción suele ser rápida. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la agitación es necesaria porque facilita el transporte de los compuestos de las muestras acuosas a la fibra.

Hay varios modos de aplicar la agitación en SPME. La técnica más comúnmente utilizada en los tres modos de SPME es la agitación magnética, en la cual es muy importante mantener constante la velocidad de rotación de la varilla agitadora. Otras técnicas alternativas deben tenerse en cuenta, sobre todo con fines de automatización: la vibración de la fibra (limitada a un volumen pequeño de muestra), la agitación en vortex, la agitación por flujo y la agitación por ultrasonidos. Esta última es el método de agitación más eficaz y la que obtiene tiempos de extracción más cortos, pero sin embargo introduce una gran cantidad de energía al sistema, lo cual conlleva a un calentamiento no deseado de las muestras.

- Desorción

Una vez se ha extraído el analito, la fibra es desorbida en el inyector de GC o de HPLC para el análisis.

En el caso de GC es importante optimizar algunas variables de desorción como son la *temperatura del inyector*, el *tiempo de desorción* y la *temperatura inicial del horno*. Pero no sólo estas condiciones han de tenerse en cuenta, otros aspectos son también cruciales en la desorción del analito, como es el uso de un *inserto de inyección* adecuado. Los inyectores cromatográficos estándar, tales como el típico de *split/splitless*, requieren insertos de grandes volúmenes para acomodar la expansión del disolvente evaporado que es introducido durante la inyección. El objetivo de estos insertos es el de producir flujos lineales muy lentos en el inyector para una lenta transferencia de los analitos volatilizados a la cabeza de la columna analítica (**Figura 1.5**). En estos casos, el *split* abierto permite eliminar los vapores de disolventes restantes. Sin embargo, en SPME no se introduce ningún disolvente, con lo cual el *split* no sería necesario. Para una óptima sensibilidad, el *split* necesita estar cerrado durante la etapa de desorción con lo cual los analitos deben ser

eliminados rápidamente del inyector, para así conseguir bandas estrechas. Por consiguiente y para conseguir un flujo lineal elevado, es aconsejable reducir el diámetro del inserto del inyector.

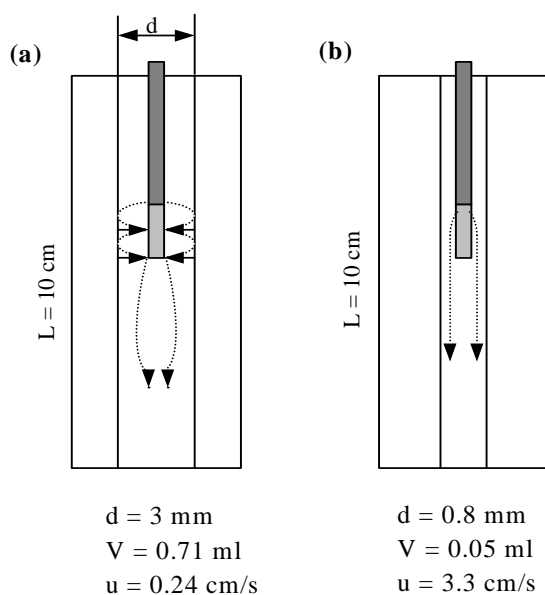


Figura 1.5. Efecto del volumen del inserto del inyector de un sistema GC en la desorción de la fibra.

Otro aspecto a tener en cuenta en la desorción del inyector del GC, es *la situación de la aguja*: la profundidad de la fibra debe ser tal que la posición esté en el centro de la zona caliente del inyector (normalmente es la zona central del inserto).

Por otro lado, la desorción *on-line* mediante HPLC implica una apropiada selección del disolvente. La forma más simple de acoplar SPME con HPLC es usar el mismo disolvente de desorción que el utilizado en la fase móvil. Este tipo de desorción es recomendado para los compuestos no volátiles y térmicamente lábiles.

1.4.1.5. Selección del método de calibración

Para muchas muestras, las recuperaciones de los analitos mediante la técnica SPME son relativamente bajas puesto que no son extraídos cuantitativamente de la muestra, sin embargo el grado de extracción obtenido con la SPME resulta satisfactorio con buena linealidad, precisión y eficacia.

La desventaja de trabajar con métodos de equilibrio es la necesidad de considerar los efectos de matriz. Así, en la cuantificación por SPME, tanto en inmersión directa como en espacio de cabeza, el efecto matriz juega un papel importante puesto que la existencia de interferentes en la muestra puede alterar las constantes de partición entre las fases.

Los procedimientos estándar usados para la calibración con otras técnicas también pueden ser adoptados para trabajar en SPME. Para matrices de muestras “limpias” (por ejemplo aire o agua limpia) puede aplicarse una calibración externa ya que las constantes de distribución son muy similares a las de la matriz pura, aunque en muchos casos esta calibración no resulta necesaria puesto que puede consultarse en la literatura u obtenerse a partir de los parámetros cromatográficos de retención. También una calibración externa puede aplicarse en matrices complejas, pero en este caso conviene preparar los patrones de calibración en la propia matriz, para lo cual se necesita disponer de un “blanco” de matriz que no contenga ninguno de los analitos de interés, aunque, en muchas ocasiones, no es difícil disponer de ese “blanco”.

Diferentes procedimientos de calibración, tales como el uso de patrones internos o las adiciones estándar, resultan adecuados para las muestras más complejas, en las cuales existen procesos de interacción analito-matriz.

1.4.2. Aplicación al análisis de fluidos biológicos

Una de las primeras aplicaciones de la técnica SPME fue el análisis de muestras de agua. Actualmente, sigue publicándose bibliografía donde esta matriz es el objeto de estudio (Beltrán *et al.*, 1998; Natangelo *et al.*, 1999; Aguilar *et al.*, 1999; Su y Huang, 1999). Esto no sólo es debido a la importancia medioambiental que tiene el agua, sino también a que la técnica SPME es muy apropiada para matrices acuosas. Además, incluso cuando se estudian otras matrices muchos autores incluyen una sección preliminar de optimización de las variables en agua (Boyd-Boland y Pawliszyn, 1995; Boyd-Boland *et al.*, 1996; Guan *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 2000a).

Aunque la mayoría de las aplicaciones de SPME en aguas se realiza por inmersión directa, por tratarse de una matriz limpia, existen en la bibliografía algunos trabajos como por ejemplo la determinación de plaguicidas OCs en aguas subterráneas (Page y Lacroix, 1997) o la de herbicidas dinitroanilínicos en agua superficial (Guan *et al.*, 1998), en los que se utiliza la técnica de espacio de cabeza.

Sin embargo, la técnica SPME no está solamente limitada al análisis de agua. Con la aplicación de una fase estacionaria adecuada, los analitos pueden quedar preconcentrados en las fibras de SPME desde otros tipos de matrices más complejas, como suelos, vino, frutas, miel, etc. Para algunas muestras complejas, muchos autores reconocen la necesidad de un pre-tratamiento de muestra para simplificar la matriz, o bien reducir el contenido de disolvente orgánico cuando sea requerida una extracción previa con disolventes (Beltrán *et al.*, 2000).

Asimismo, la técnica SPME también ha sido aplicada a muestras biológicas (sangre y orina), no sólo en investigaciones analíticas, sino también en clínicas y forenses. Para el análisis cualitativo y cuantitativo de contaminantes y drogas en fluidos biológicos, el paso de la extracción del analito desde la matriz endógena es muy importante. Hay muchos trabajos publicados que utilizan técnicas convencionales, como la LLE o la SPE, pero suelen ser métodos largos, complejos y muy tediosos, requiriéndose la aplicación de varios pasos adicionales para eliminar

interferencias y reducir los límites de detección del procedimiento (Brock *et al.*, 1996; Matos Lino *et al.*, 1998; Atuma y Aune, 1999; Najam *et al.*, 1999). Los métodos por LLE suelen producir emulsiones (Waliszewski y Szymczynski, 1991; Martínez Vidal *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1993), y requieren disolventes orgánicos para la extracción del compuesto. Para la aplicación de la SPE también se necesita disolvente orgánico y además un paso de evaporación. Otra desventaja de los métodos tradicionales es que, a veces, las contaminaciones de la muestra pueden proceder de los disolventes o incluso de los diferentes aparatos o materiales utilizados en la extracción (Namera *et al.*, 1999). Cualquier contaminación en este tipo de análisis debe ser reducida o eliminada debido fundamentalmente a los bajos niveles en que son detectados los analitos en los fluidos biológicos. En este aspecto, la aplicación de SPME a muestras de fluidos biológicos puede resultar ventajosa por tratarse de una técnica simple, rápida y sensible, que minimiza el tratamiento/manipulación de la muestra.

Con los métodos convencionales, se necesitan volúmenes de muestra mayores que con SPME, sobre todo si la concentración de la muestra es baja, lo que supone un aumento del “ruido de fondo”. Debido a la limitación del volumen de muestra disponible en los fluidos biológicos, sobre todo en muestras de sangre, algunos autores prefieren utilizar métodos por SPME (Namera *et al.*, 1999).

Sin embargo, la recuperación absoluta con SPME es menor que con los métodos convencionales por tratarse de una técnica de equilibrio, en la que normalmente el analito no puede ser enteramente extraído de la matriz. Además, existen interacciones entre los analitos y las proteínas, que pueden influir sobre los valores de recuperación. Por este motivo, para la determinación de contaminantes o drogas en fluidos biológicos (sangre, suero o plasma) normalmente se incluye un paso de desproteínización adicionando, antes de la extracción por SPME, agentes desproteínizantes tales como ácidos fuertes: ácido tricloroacético (TCA) (Krogh *et al.*, 1997), ácido sulfúrico (Namera *et al.*, 1997; Musshoff *et al.*, 1999; Beltrán *et al.*, 2001), ácido clorhídrico (Lee *et al.*, 1996; Röhrig *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, en prensa 1), ácido perclórico (Kumazawa *et al.*, 1996), o ácido fosfórico (Takekawa *et*

al., 1998). Si el proceso de desproteinización mediante un ácido no es beneficioso para las recuperaciones, la adición de una base fuerte podría utilizarse para esta finalidad. La alcalinización fuerte provoca hemólisis y evita la formación de precipitado en el caso de la sangre total (Kumazawa *et al.*, 1996; Ulrich y Martens, 1997; DeBruin *et al.*, 1998; Namera *et al.*, 2000).

Para la extracción por SPME de analitos en matrices biológicas, la mayoría de trabajos descritos en la bibliografía utilizan el modo de espacio de cabeza (HS). Además, después de la adición de un ácido fuerte o una base fuerte, es conveniente el uso de HS para evitar posibles daños en la fibra. Sin embargo, existen algunos trabajos en los cuales se aplica el modo de inmersión directa de la fibra previa dilución de la muestra: López *et al.* (2001) han estudiado la determinación de plaguicidas OPs y OCs en suero y orina por inmersión directa, mostrando la necesidad de diluir el suero y la orina 50 y 10 veces con agua, respectivamente; Chiarotti *et al.* (1997) diluyeron la orina 2 veces con bicarbonato sódico para la determinación de compuestos anoréticos por inmersión directa; Luan *et al.* (2000) desarrollaron un método, también por inmersión directa, para determinar tetramina en sangre diluida 1:1 con agua; y Koster *et al.* (1998) utilizaron tampón borato para diluir la orina de 2-5 veces y poder determinar lidocaina por inmersión directa de la fibra. Asimismo, también existen aplicaciones de análisis de fluidos biológicos por inmersión directa en los que se ha adicionado un paso extra de centrifugación de la muestra previa a la extracción por SPME (Kumazawa *et al.*, 1996; Krogh *et al.*, 1997).

La **Tabla 1.9** muestra las aplicaciones de la técnica SPME para la determinación de plaguicidas en fluidos biológicos. Como se puede observar son muy escasos los antecedentes, limitándose a insecticidas OPs y OCs, junto con los herbicidas dinitroanílicos que han sido, por el momento, los únicos grupos objeto de estudio por esta técnica en este tipo de matrices. Por lo que respecta a la optimización del efecto salino (*salting out*) de estos analitos en fluidos biológicos, parece ser que la adición de sales mono- o divalentes (NaCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄) a muestras de sangre, suero o plasma no aumenta la eficacia de la extracción. Lee *et*

al. (1996) dieron una posible explicación a este efecto alegando que la adición de sales a la muestra de sangre estabilizaba las membranas de los eritrocitos, lo cual podría causar una absorción de los plaguicidas dentro de las vesículas de las membranas y de este modo disminuir su recuperación en la extracción. Sin embargo, se han encontrado algunas discrepancias en ciertos casos, sin apuntar ninguna relación directa entre la eficacia de la extracción y la adición de sales (Namera *et al.*, 1997; Musshoff *et al.*, 1999). El caso de López *et al.* (2001) en cuanto a la determinación de plaguicidas OPs y OCs en suero sería diferente puesto que adicionan NaCl a una muestra de suero diluida con un factor de 50, obteniendo un comportamiento muy parecido al de una muestra acuosa.

Aunque el control de la temperatura de extracción no es uno de los parámetros críticos en la determinación de plaguicidas por SPME por inmersión directa, sí lo es cuando se aplica HS-SPME. En la **Tabla 1.9** puede observarse que para la extracción de los plaguicidas por HS es recomendable aumentar la temperatura a 70 -100°C para obtener una mejor recuperación del analito.

Por otra parte, los análisis de alcohol o de drogas en el cuerpo humano son frecuentemente investigados en los laboratorios utilizando también la técnica SPME. La **Tabla 1.10** muestra algunos ejemplos de estas aplicaciones.

Tabla 1.9. Aplicaciones de SPME para la determinación de plaguicidas en muestras de fluidos biológicos humanos.

Grupo de plaguicidas	Matriz	Tipo de fibra	Modo de SPME	Determinación cromatográfica	Procedimiento	LD (ng ml ⁻¹)	Ref
OPs	sangre, orina	PDMS	HS	GC-NPD	0.5 ml muestra y adición de 0.5 ml de agua, 0.4 g NaCl, 0.4 g (NH ₄) ₂ SO ₄ (sales sólo para orina) y pH ajustado a 3 con HCl se extrajeron con agitación durante 20 min a 100°C; desorción a 180°C durante 5 min	1-50 (sangre) 0.4-6 (orina)	Lee <i>et al.</i> , 1996
OPs (malation)	sangre	PDMS	HS	GC-MSD	0.2 g de sangre con adición de 2 ml H ₂ SO ₄ 0.1N y 0.2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ se extrajeron durante 5 min a 90°C; desorción a 250°C durante 3 min	1000	Namera <i>et al.</i> , 1997
OCs	sangre	PA	HS	GC-ECD	0.5 ml muestra con adición de 1 ml de agua desionizada y 0.5 ml HCl 2M se extrajeron durante 40 min a 100°C con agitación; desorción a 280 °C durante 10 min	0.08-1.6	Röhrig <i>et al.</i> , 1998
Herbicidas dinitroanilicos	sangre, orina	PDMS	HS	GC-ECD	1 ml de orina (0.5 ml de sangre + 0.5 ml de agua) con adición de 0.28 g de Na ₂ SO ₄ anh. (sólo para orina) se extrajeron con agitación durante 30 min a 70°C; desorción a 270°C durante 5 min	0.1 (orina) 1 (sangre)	Guan <i>et al.</i> , 1998
OPs (paration-metil y paration-etil)	sangre	PDMS	HS	GC-MSD	0.5 g de sangre con adición de 0.5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ y 2 ml H ₂ SO ₄ 0.1M se extrajeron durante 15 min a 90°C (15 min de precalentamiento); desorción a 250°C durante 5 min	20 (metil) 50 (etil)	Musshoff <i>et al.</i> , 1999
OPs y OCs	suero	PDMS	Inmersión directa	GC-FPD GC-ECD	3 ml muestra (suero diluido 50 veces) con 15% NaCl se extrajeron con agitación durante 30 min (OPs) o 45 min (OCs); desorción a 270°C durante 4 min (OPs) o a 250°C durante 5 min (OCs)	1-15 (OPs) 1-20 (OCs)	López <i>et al.</i> , 2001 (<i>Presente Memoria</i>)
OPs	orina	PDMS	Inmersión directa	GC-FPD	3 ml muestra (orina diluida 10 veces) con 15% NaCl se extrajeron con agitación durante 30 min; desorción a 270°C durante 4 min	0.1-20	López <i>et al.</i> , 2001 (<i>Presente Memoria</i>)
OCs y OPs	suero	PDMS	HS	GC-MSD	1 ml suero con adición de 50 µl H ₂ SO ₄ 9M y 2 ml de agua se extrajeron durante 30 min a 90°C (30 min de precalentamiento); desorción a 250°C durante 5 min	0.1- 6	Beltrán <i>et al.</i> , 2001 (<i>Presente Memoria</i>)
OCs y OPs	sangre	PA	HS	GC-ECD GC-FPD GC-MS/MS	0.5 ml sangre con adición de 50 µl HCl 4.5M y 0.5 ml agua se extrajeron con agitación durante 30 min a 90°C (30 min de precalentamiento); desorción a 240°C durante 4 min	0.02-3 (MS/MS)	Hernández <i>et al.</i> , en prensa 1 (<i>Presente Memoria</i>)

Tabla 1.10. Aplicaciones de SPME para la determinación de distintos analitos (principalmente drogas) en fluidos biológicos.

Analitos	Matriz	Tipo de fibra	Modo de SPME	Determinación cromatográfica	Procedimiento	LD (ng ml ⁻¹)	Ref
Anestésicos locales	sangre	PDMS	Inmersión directa	GC-FID	1 ml de sangre con adición de 1 ml de ácido perclórico 1M se centrifugó y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante con adición de 500 µg NaCl y ajuste del pH a 7 con NaOH 10M se extrajeron a temperatura ambiente durante 40 min; desorción a 250°C durante 1 min	55 - 111	Kumazawa <i>et al.</i> , 1996
Compuestos anoréticos	orina	PDMS	Inmersión directa	GC-MSD	400 µl de orina (diluida dos veces con bicarbonato sódico) se extrajeron durante 20 min; desorción a 250°C durante 1 min	30 - 40	Chiarotti <i>et al.</i> , 1997
Diazepam	plasma	PA	Inmersión directa (uso 1-octanol como modificador de la fibra)	GC-NPD	450 µl de plasma con adición de 50 µl de metanol y 100 µl de TCA 1M se centrifugó y al sobrenadante se le añadió 100 µl de tampón acetato 5M (pH 7). 150 µl del sobrenadante se extrajo con agitación con la fibra modificada. Desorción a 300°C durante 1 min	0.1 nmol ml ⁻¹	Krogh <i>et al.</i> , 1997
Esteroides	suero	PA	Inmersión directa (para la extracción) HS (para la derivatización)	GC-MSD	1.5 ml de suero se extrajeron a temperatura ambiente durante 30 min; derivatización con 5 µl de BSTFA a 60°C durante 1 h; desorción a 280°C durante 5 min	–	Okeyo <i>et al.</i> , 1997
Drogas antidepresivas	plasma	PDMS	Inmersión directa	GC-NPD	2 ml de plasma con adición de 0.5 ml NaOH 1M se extrajo durante 10 min; desorción a 260°C durante 1 min	90 - 200	Ulrich y Martens, 1997
Etanol	sangre, orina	CX-PDMS	HS	GC-FID	0.5 ml de muestra con adición de 0.4 ml (para sangre) o 0.5 ml (para orina) de agua, 0.6 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , y 0.1 ml solución de ditionito sódico 5 mg ml ⁻¹ (sólo para sangre) se extrajeron con agitación a 60°C durante 15 min (5 min de precalentamiento); desorción a 280°C durante 4 min	500 (sangre) 200 (orina)	Lee <i>et al.</i> , 1998

Tabla 1.10 (cont.). Aplicaciones de SPME para la determinación de distintos analitos (principalmente drogas) en fluidos biológicos.

Analitos	Matriz	Tipo de fibra	Modo de SPME	Determinación cromatográfica	Procedimiento	LD (ng ml ⁻¹)	Ref
Cianuro	sangre	CW-DVB	HS	GC-NPD	0.5 ml de sangre con adición de 0.2 ml de solución 5 ppm acetonitrilo agua (de patrón interno), 0.3 g Na ₂ SO ₄ anh. y 0.2 ml H ₃ PO ₄ 50% se extrajeron con agitación a 50°C durante 45 min; desorción a 150°C durante 30 s	20	Takekawa <i>et al.</i> , 1998
Lidocaina	orina	PDMS	Inmersión directa	GC-FID LC-UV	Se diluye la orina 2-5 veces con tampón borato (pH 9.5) y con adición de NaCl 0.3 g ml ⁻¹ se extrae; desorción (GC) a 250°C durante 10 min; desorción estática (LC) durante 10 min y luego paso de fase móvil a 1 ml min ⁻¹ durante 0.25 min	25 (GC) 125 (LC)	Koster <i>et al.</i> , 1998
PAHs	orina	PA	Inmersión directa (extracción) HS (derivat.)	GC-MS	5 ml orina (hidrolizada enzimáticamente) se extrajeron con agitación a 35°C durante 45 min; derivatización con 10 µl BSTFA a 60°C durante 45 min; desorción a 270°C durante 3 min	–	Gmeiner <i>et al.</i> , 1998
Aminas aromáticas monocíclicas	orina, sangre	PDMS-DVB	HS	GC-FID GC-MS	5 ml de muestra con adición de 1 ml KOH 2M, y NaCl 4M se extrajeron con agitación a 45°C durante 15 min; desorción a 220°C durante 1 min	0.4 (orina) 7.7 (sangre)	DeBruin <i>et al.</i> , 1998
Tetramina	sangre	PDMS	Inmersión directa	GC-NPD	3 ml de sangre diluida (con agua 1:1) se extrajeron a temperatura ambiente durante 10 min; desorción a 240°C durante 3 min	1	Luan <i>et al.</i> , 2000
Anfetaminas	sangre	PDMS	HS	GC-MS	0.5 g de sangre con adición de 0.5 NaOH 1M se extrajeron a 70°C durante 15 min. Después se llevó a cabo una derivatización en el inyector; desorción a 250°C durante 3 min	5 - 10	Namera <i>et al.</i> , 2000
Tetracloroetileno y tricloroetileno	orina, sangre	–	HS	GC-ECD GC-MS	270 µl de muestra se extrajeron a 60°C durante 1 min (5 min de precalentamiento); desorción a 250°C durante 15 s	3 - 5	Dehon <i>et al.</i> , 2000

1.5. Purificación de muestras grasas mediante cromatografía líquida de alta resolución previa a la determinación de compuestos organoclorados mediante GC

La determinación de residuos de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos (p.e. PCBs, dibenzodioxinas cloradas y dibenzofuranos) en muestras grasas requiere el uso de etapas adicionales en la preparación de la muestra, comúnmente conocidas como *cleanup* o purificación. Muchos de estos contaminantes persistentes, como pueden ser los plaguicidas OCs o los PCBs, se caracterizan por su alta liposolubilidad y tienden a bioacumularse a lo largo de la cadena trófica implicando a todos los niveles que la forman. Así, es bien conocida la capacidad que poseen los mamíferos marinos, último nivel del ecosistema, de acumular grandes cantidades de estos contaminantes teniendo en cuenta, además, que tienen poca capacidad metabólica para degradarlos (De Boer y Wester, 1991; Wania y Mackay, 1993; Lee *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2000b).

Asimismo, los seres humanos también estamos expuestos a estos contaminantes a través de la dieta, o mediante otras vías de exposición, pudiéndose encontrar elevados niveles de concentración en la grasa corporal, incluyendo tejidos adiposos, los lípidos de la sangre y la leche humana. Incluso en la población de las regiones polares, por ejemplo los Inuit en Groenlandia, se han detectado elevadas concentraciones de compuestos OCs (Bjerregaard *et al.*, 2001).

Debido a esta elevada capacidad de acumulación que poseen los compuestos OCs en muestras con alto contenido lipídico, resulta necesario disponer de métodos analíticos fiables para la determinación de este tipo de compuestos en estas matrices complejas. Para ello, se requiere la utilización de técnicas de purificación que permitan la eliminación de los compuestos interferentes (grasas co-extraídas) del extracto graso para la subsecuente determinación analítica.

1.5.1. Antecedentes

Como es bien conocido, un procedimiento global para la determinación de plaguicidas en muestras biológicas incluye diferentes etapas:

1. Toma de muestras. Almacenamiento y conservación
2. Separación y concentración (extracción)
3. Eliminación de interferencias (purificación)
4. Determinación analítica mediante técnicas cromatográficas

Normalmente, la técnica utilizada para la determinación de compuestos OCs en muestras grasas es la GC, la cual requiere la eliminación de los lípidos presentes en el extracto antes de su inyección en el sistema cromatográfico. Incluso pequeñas cantidades de lípidos pueden causar daños en la columna y contaminación en el detector. Por este motivo, en este apartado se va a estudiar con profundidad la etapa de la purificación, puesto que es crucial en este tipo de muestras de alto contenido lipídico.

La purificación de muestras grasas es una etapa crítica del análisis de compuestos organoclorados (como plaguicidas OCs y PCBs) y suele ser causa de pérdidas de analitos y/o contaminación. Además, la purificación insuficiente de los extractos es la causa de un deterioro rápido de los sistemas cromatográficos, produciendo resultados poco fiables. Los lípidos (grasas, aceites y ceras) de origen animal y vegetal están formados principalmente por mezclas complejas de alcoholes de cadena larga, ácidos y ésteres. Las características comunes de estos constituyentes incluyen grupos polares, alto peso molecular y baja volatilidad. La separación de lípidos y de plaguicidas y otros compuestos similares se basa en sus diferentes propiedades físico-químicas.

Las técnicas para la purificación de muestras de alimentos grasos para la posterior determinación de plaguicidas por medio de GC fueron revisadas por Walters en 1990. El método oficial de la AOAC para el análisis de plaguicidas OCs y OPs en alimentos grasos (incluyendo peces) utiliza la cromatografía convencional

con Florisil después de una primera etapa de purificación por medio de partición líquido-líquido (acetonitrilo/éter de petróleo) (AOAC, 2000 sec 970.52.). Estos procedimientos están presentes en casi todos los métodos oficiales actualmente utilizados, haciendo el análisis largo y tedioso, obteniéndose, además, bajas recuperaciones para algunos plaguicidas (Gillespie *et al.*, 1995; Nakagawa *et al.*, 1995; Dejonckheere *et al.*, 1996; Dogheim *et al.*, 1996).

También se han ensayado otras técnicas convencionales de purificación para la determinación de plaguicidas OCs y PCBs en muestras grasas tales como el *tratamiento con ácido sulfúrico* (Murphy, 1971; Hernández *et al.*, 1987), *partición líquido-líquido* con diferentes disolventes orgánicos como acetonitrilo:hexano, éter de petróleo:dimetil formamida (DFG, 1987; Carson, 1981; Ernst y Doe, 1986; Miyahara *et al.*, 1994; Hernández *et al.*, 1996), *cromatografía de penetración en gel (GPC)* (Hopper y Griffitt, 1987; Grob y Kalin, 1991; Poustka *et al.*, 1994; Marquis *et al.*, 1994) y la *cromatografía de adsorción en columna* utilizando diferentes adsorbentes tales como Silicagel (Marquis *et al.*, 1994; Alder y Vieth, 1996; Hernández *et al.*, 1996) o Florisil (DFG, 1987). En los últimos años, se han utilizado técnicas menos tediosas y con mayor posibilidad de automatización, tales como la *extracción en fase sólida (SPE)*, aplicada, por ejemplo, en la purificación de extractos de aceites vegetales y mantequillas (Gillespie *et al.*, 1995) previa a la determinación de OCs por GC, o la *cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*.

En este apartado, se va a estudiar más extensamente la **purificación mediante HPLC** aplicada a la determinación de compuestos OCs en muestras grasas. La técnica utiliza columnas que contienen fases microparticuladas, esféricas, de diámetro y tamaño de poro uniforme y una superficie que ofrece ventajas de reproducibilidad y resolución mucho mayores que las empacadas tradicionales usadas en sistemas de flujo por gravedad. Además, se produce un menor consumo de disolventes, las separaciones son rápidas, y tiene una capacidad de carga superior.

Gillespie y Walters (1986) publicaron un primer trabajo en el que estudiaron la posibilidad de aplicar columnas comerciales de HPLC *Silicagel* en el

fraccionamiento de plaguicidas OCs y PCBs en mantequilla. Las muestras se inyectaron en hexano y se utilizó como fase móvil hexano-diclorometano. La elución de la grasa se visualizó mediante un detector UV a 254 nm. Las fracciones en las que eluyeron los analitos libres de grasa se analizaron por medio de GC-ECD. Las columnas ensayadas (25 cm x 4.6 y 9.4 mm) permitieron la separación de los analitos inyectando 100 mg de grasa. En este mismo estudio se ensayó el uso de una columna de HPLC con esferas de sílice porosa, la cual actuaba simultáneamente por exclusión molecular y adsorción. El solapamiento de las grasas con los analitos hizo que el uso de esta columna se desestimara.

Posteriormente, estos mismos autores (Gillespie y Walters, 1989) aplicaron la HPLC en fase reversa para el fraccionamiento de plaguicidas OCs en grasas y aceites. Se utilizó una columna de *Sílice enlazada* para la separación de plaguicidas y grasas de origen animal y vegetal usando como fase móvil acetonitrilo. Los plaguicidas estudiados, que cubrían un amplio rango de polaridades, eluyeron en los primeros 40 minutos. Debido a la co-elución de los lípidos y de los analitos en algunas fracciones, éstas se purificaron de nuevo mediante Florisil. Los plaguicidas se determinaron por GC (ECD y FPD). Si bien este procedimiento consiguió una purificación eficaz de los extractos, la utilización de disolventes incompatibles con los detectores de GC hicieron necesario el cambio de disolvente previamente a su inyección. Otras desventajas son la imposibilidad de procesamiento simultáneo de varias muestras, el coste del equipo, y la regeneración de la columna tras cada inyección.

Otros autores han utilizado la HPLC en fase reversa (*Cyano* y *Nucleosil ODS*) para la purificación de muestras grasas, como peces (Hyvönen *et al.*, 1992), y matrices biológicas (Mostert y Ramsteiner, 1989) previa a la determinación de PCBs y plaguicidas OCs, respectivamente.

Hogendoorn *et al.* (1989) publicaron un método para la purificación automatizada de muestras de leche humana previa a la determinación de compuestos OCs por medio de un sistema basado en LC en fase normal con *Silicagel*. Mediante la técnica de columnas acopladas se consiguió una separación total de grasas y

analitos que eluían entre los 4 minutos (*HCB*) y más de 2 horas (*dieldrin*). Las experiencias se realizaron inyectando 1 ml de extracto con 45 mg de grasa. Ésta era retenida en una primera columna (pre-columna) y los analitos pasaban a una segunda columna con fines analíticos. El procedimiento se puede visualizar en continuo mediante un detector UV, facilitando la optimización del procedimiento. Las desventajas de este procedimiento residen en el coste del equipo y la imposibilidad de procesar varias muestras simultáneamente. Sin embargo, la reproducibilidad y eficacia de la purificación y la posibilidad de la automatización mediante autoinyectores le dan claras ventajas frente a la cromatografía controlada por gravedad. Además, obtuvieron valores de límites de detección de 0.5 ng ml⁻¹ para *PCBs*, 1 ng ml⁻¹ para *HCHs*, y 5 ng ml⁻¹ para *DDTs*).

Asimismo, van der Hoff *et al.* (1997) desarrollaron un procedimiento multiresidual de purificación LC en fase normal *on-line* con GC-ECD, para la determinación de compuestos OCs, también en leche humana. Para la determinación de los plaguicidas OCs, 35 µl del extracto hexánico se inyectaron en una columna *Hypersil*, mientras que para los PCBs, el volumen de inyección y la columna utilizada fueron 100 µl y *Spherisorb*, respectivamente. El método en continuo LC-GC/ECD se aplicó para determinar plaguicidas OCs a niveles por debajo de µg kg⁻¹ con sólo unos pocos mg de muestra. Los límites de detección obtenidos estuvieron en el rango de ng kg⁻¹ y la precisión fue excelente para todos los analitos a excepción de *dieldrin*, el cual tuvo el tiempo de retención más alto en la columna LC.

Recientemente, en nuestro laboratorio, se ha desarrollado un procedimiento para la determinación de compuestos OCs en tejidos de ballena, también automatizado, mediante HPLC utilizando columnas de fase normal de *Silicagel* e inyectando el extracto en hexano (Serrano *et al.*, 1999). El sistema permitió una fácil optimización de los procedimientos de purificación por HPLC para diferentes muestras de tejidos, así como la visualización en continuo de la elución de los lípidos usando un detector DAD ($\lambda = 280$ nm). La razón de desarrollar este trabajo, fue el interés en investigar la causa de la muerte de una ballena (*Balaenoptera physalus*, hembra) encontrada en la costa Valenciana en Marzo de 1998. El

procedimiento global permitió el análisis de aproximadamente 30 muestras por día de grasa corporal y 15-20 muestras de riñón o hígado.

Los materiales basados en carbón tienen un importante potencial en la purificación de compuestos OCs. Las ventajas del *carbón grafitizado poroso (PGC)* sobre el carbón activo son las siguientes: i) el primero normalmente aplica una elución isocrática en vez de un gradiente, ii) obtiene picos más estrechos debido a la naturaleza homogénea del PGC. Sin embargo, el uso de PGC lleva consigo la desventaja de adicionar tratamiento preliminares en los extractos debido a su baja capacidad para los orgánicos co-extraídos, causando sobrecarga en las columnas (Djien, 1999).

Tuinstra *et al.* (1990) usaron una columna *Hypercarb* para la determinación de PCBs en grasa de caballo. Las muestras fueron extraídas y posteriormente purificadas con GPC y Alúmina antes de la separación por HPLC. También Hong *et al.* (1992) utilizaron una columna *Hypercarb*, y un solo eluyente (hexano), en la segunda etapa de purificación por HPLC, previa a la determinación por GC-ECD de PCBs en leche humana. De Boer *et al.* (1992) aplicaron una separación mediante *Hypercarb PGC* como paso final de purificación, previa a la determinación por GC/NCI-MS de PCBs en muestras de tejidos de peces y delfines. Previamente a la purificación por HPLC, los extractos de las muestras fueron purificados con columnas de Alúmina y Silica.

Otro sorbente con un potencial similar al PGC es el *2-(1-pyrenyl)-ethyltrimethylsilylated silica (PYE)*. PYE es un material considerado como intermedio entre Silica y PGC en cuanto a su selectividad. Las ventajas de PYE con respecto a PGC son: mayor eficacia, colas menores en los picos y una mejor reproducibilidad (Djien, 1999). El uso de *PYE* para la separación de PCBs en muestras biológicas (peces y animales) fue demostrado por Haglund *et al.* (1990). Más tarde, Wells y Echarri (1992) aplicaron un método similar con *PYE* para la determinación de bifenilos clorados (BCs) en mamíferos marinos, pero haciendo uso de otros dos pasos previos de purificación con Alúmina y Silica.

Más recientemente, Grimvall *et al.* (1997) utilizaron una columna de *dinitroanilino-propyl (DNAP) Silica* en un procedimiento de purificación automatizada para la determinación de PCBs en plasma humano. Antes de la aplicación de HPLC, los extractos fueron purificados en Silica usando hexano como disolvente. El procedimiento *on-line* LC-GC/MS permitió obtener límites de detección para no-orto PCBs del nivel de 0.04 pg g^{-1} , y para mono- y di-orto PCBs de 5 pg g^{-1} .

En la **Tabla 1.11** se muestran las aplicaciones de HPLC como técnica de purificación para la determinación de compuestos OCs en muestras grasas, mostrando el tipo de sorbente utilizado en la columna de HPLC, así como la técnica de extracción y las etapas adicionales de purificación.

Tabla 1.11. Aplicaciones de HPLC en la purificación de muestras grasas previa a la determinación de compuestos OCs.

Analitos	Muestra	Extracción	Purificaciones previas	Purificación HPLC	Detección	Ref
insecticidas OCs y PCBs	Mantequilla	LLE (hexano)	–	Silicagel	GC-ECD	Gillespie y Walters, 1986
fungicida OC	Matrices biológicas	LLE (metanol– 0.1% ac fosfórico (9:1,v/v)	–	Nucleosil CN	GC-ECD (<i>on line</i>)	Mostert y Ramsteiner, 1989
insecticidas OCs y PCBs	Leche humana	LLE (acetona/hexano, 50:50, v/v)	–	Silicagel	GC-ECD	Hogendoorn <i>et al.</i> , 1989
insecticidas OCs	Grasas y aceites	LLE (éter de petróleo)	–	Sílice enlazada ODS	GC-ECD	Gillespie y Walters, 1989
PCBs	Muestras biológicas	H ₂ SO ₄	–	PYE	GC-ECD GC-MSD	Haglund <i>et al.</i> , 1990
PCBs	Grasa de caballo	LLE (ciclohexano/ acetato de etilo, 1:1)	1° GPC (Bio Beads SX3) 2° SPE (alumina)	Hypercarb	GC-ECD GC-MSD	Tuinstra <i>et al.</i> , 1990
PCBs	Peces	1° Saponificación (KOH-etanol) 2° LLE (hexano)	–	Cyano	GC-ECD (<i>on line</i>)	Hyvönen <i>et al.</i> , 1992

Tabla 1.11 (cont.). Aplicaciones de HPLC en la purificación de muestras grasas previa a la determinación de compuestos OCs.

Analitos	Muestra	Extracción	Purificaciones adicionales	Purificación HPLC	Detección	Ref.
PCBs	Leche humana	LLE (hexano)	1° LC (Florisil)	Hypercarb	GC-ECD	Hong <i>et al.</i> , 1992
PCBs	Peces y delfines	Saponificación (etanol-KOH)	1° LC (Alúmina) 2° LC (Silica)	Hypercarb PGC	GC-MSD	De Boer <i>et al.</i> , 1992
CBs	Mamíferos marinos	1° Soxhlet (DCM) 2° LLE (hexano)	1° LC (Alúmina) 2° LC (Silica)	PYE	GC-ECD	Wells y Echarri, 1992
PCBs	Plasma humano	LLE (hexano/ MTBE, 1:1)	LC (Silica)	DNAP Silica	GC-MSD (<i>on line</i>) GC-ECD	Grimvall <i>et al.</i> , 1997
insecticidas OCs y PCBs	Leche	LLE (oxalato sódico + metanol + dietil éter + éter petróleo)	–	Hypersil (OCs) Spherisorb, (PCBs)	GC-ECD (<i>on line</i>)	van der Hoff <i>et al.</i> , 1997
insecticidas OCs y PCBs	Leche humana	LLE (cloruro de metileno)	LC (Silica-Alúmina)	–	GC-ECD	Gladen <i>et al.</i> , 1999
insecticidas OCs y PCBs	Tejidos de ballena	Reflujo con hexano	–	Silicagel	GC-MSD	Serrano <i>et al.</i> , 1999

1.5.2. Aplicación a muestras de tejido adiposo humano

Anteriormente, ya se ha hecho mención al riesgo de la población humana a la exposición de plaguicidas persistentes, como son los compuestos OCs. La vía más probable de entrada de estos analitos en el organismo es la dieta, y especialmente a través de las partes más grasas de los alimentos ingeridos, ya que debido a la alta lipofilia de estos plaguicidas, el organismo los absorbe más rápidamente desde el tracto digestivo cuando están disueltos en grasas.

En la mayoría de los estudios, la medida de la exposición a los compuestos OCs suele llevarse a cabo mediante el análisis de muestras de suero. Sin embargo, los niveles que pueden alcanzar estos compuestos en el tejido adiposo de seres humanos son entre 200-1000 veces mayores que los niveles en suero (Aronson *et al.*, 2000) y pueden mantenerse acumulados en el organismo durante años, incluso cuando no ha habido exposición durante ese período de tiempo. De este modo, incluso en una pequeña cantidad de muestra de tejido adiposo se pueden detectar concentraciones bastante elevadas de estos compuestos OCs. Por lo tanto, la medida de contaminantes OCs en tejido adiposo puede dar una buena información de la exposición acumulada.

Muchos de estos contaminantes OCs, como *DDT* y sus *metabolitos*, *metoxiclor*, *kepone*, *toxafen*, *dieldrin*, *endosulfan* y *PCBs*, poseen actividad estrógena (Soto *et al.*, 1995; Johnson-Thompson y Guthrie, 2000; Jaga, 2000). La exposición prenatal a estos compuestos o más tarde en la vida postnatal, puede modificar el desarrollo del sistema y órganos endocrinos que responden a las señales de las hormonas. Por este motivo han recibido el nombre de “**disruptores ambientales hormonales**” (Johnson-Thompson y Guthrie, 1999). Son muchas las veces que han sido estudiados para comprobar alguna relación directa con el cáncer de mama (Dorgan *et al.*, 1999; Aronson *et al.*, 2000; Laden *et al.*, 2001), sarcoma de tejido blando y cáncer de tiroides (Grimalt *et al.*, 1994) y con problemas reproductores en hombres (Olea *et al.*, 1996; Olea y Olea-Serrano, 1996), aunque lo más probable es que la relación no sea de causa-efecto. Algunos investigadores (Porta *et al.*, 1999) han apuntado que las anomalías genéticas observadas en algunos

cánceres, como el de páncreas, están asociadas a algunas de estas sustancias ambientales. Estos autores han descubierto que existe una relación entre la mutación del oncogén *K-ras* y compuestos OCs, concretamente *DDT*, *DDE* y *PCBs*. Sin embargo, establecer una relación directa entre compuestos OCs y cáncer es muy difícil y confuso, puesto que no existe todavía suficiente información, ni técnicas epidemiológicas disponibles e inequívocas (Georgellis *et al.*, 1999).

En la sección anterior se ha tratado la determinación de plaguicidas OCs y PCBs en muestras grasas, haciendo hincapié en muestras de alimentos, peces y leche. En las muestras grasas humanas (principalmente tejido adiposo) también es necesaria una etapa de purificación cuando la determinación de los analitos OCs se vaya a llevar a cabo mediante GC, con el fin de eliminar los lípidos antes de la inyección en el sistema cromatográfico. Además, debe tenerse en cuenta la elevada cantidad de lípidos presentes en el tejido (75-85%).

Los métodos de purificación convencionales aplicados a la determinación de OCs en muestras grasas humanas, y particularmente en tejido adiposo humano, normalmente implican pasos de *digestiones con ácidos* (Gómez-Catalán *et al.*, 1993; Moriya y Hashimoto, 1999), *cromatografía de adsorción en columna* (Ludwicki y Góralczyk, 1994; Dewailly *et al.*, 1999) o *SPE* (Asakawa *et al.*, 1996b). En la bibliografía se pueden encontrar algunos trabajos, aunque no muchos, que aplican la técnica de *HPLC* para la determinación de OCs en este tipo de muestras obteniendo bajos tiempos de purificación, alto grado de automatización y elevada eficacia en la eliminación de los lípidos.

Ansari *et al.* (1986) publicaron un trabajo en el que determinaban residuos de plaguicidas OCs en diferentes tipos de tejidos adiposos. El extracto hexánico (0.05 g/ml) era dividido en dos fracciones. Una de ellas (para determinar *HCB*) era sometida a una etapa de purificación por HPLC utilizando una columna *BioBeads SX-2* (30 cm x 20 mm d.i.) y ciclohexano como eluyente. El resto de plaguicidas OCs y PCBs fueron estudiados en la otra fracción. Todos los analitos se determinaron mediante GC-ECD. No sólo estudiaron la variabilidad de la

concentración de los compuestos en función de la procedencia de la grasa, sino también en función de la edad y el sexo de los pacientes investigados.

La técnica de HPLC en fase normal, asociada con GC-ECD, fue utilizada para la determinación de *p,p'*-DDE y PCBs en extractos de tejido adiposo (Gort *et al.*, 1997). Este trabajo fue diseñado como un estudio EURAMIC (multi-center EUROpean case-control on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Cancer of the breast) implicando un total de 286 casos de cáncer de pecho y 358 controles de diferentes países europeos. La columna LC instalada fue de 3 μm *Hypersil Silica* (50 x 1 mm d.i.), utilizando n-hexano como fase móvil e inyectando un volumen de 50 μl de extracto. La separación entre los analitos y la matriz lipídica pudo ser visualizada en continuo mediante un detector UV. Uno de los plaguicidas objeto de estudio β -HCH no pudo ser incluido en la investigación porque no se recuperó en las condiciones utilizadas debido a su mayor tiempo de retención en la columna LC. El método resultó ventajoso por utilizar un procedimiento de purificación poco laborioso y costoso, y ser poco sensible a los errores.

Rivas *et al.* (1997), en su estudio de los agentes químicos considerados como disruptores hormonales, aplicaron un procedimiento semipreparativo por HPLC que permitía la separación entre los xenoestrógenos y los estrógenos naturales, sin destruir a los primeros. Los xenoestrógenos fueron eluidos por gradiente con dos fases móviles: n-hexano y n-hexano:metanol:2-propanol (40:45:15, v/v). Se recogieron tres fracciones por HPLC: fracción α (en los primeros 11 min) conteniendo xenobióticos como los plaguicidas OCs; fracción χ (min 11- 13); y la fracción β (min 13-25), que contenía aditivos y monómeros tales como bisfenoles y hormonas naturales.

En la presente Memoria se ha utilizado HPLC en fase normal para la determinación multiresidual de plaguicidas OCs y PCBs en muestras de tejido graso humano (Hernández *et al.*, en prensa 2; Hernández *et al.*, enviado). Este análisis es especialmente problemático debido a las diferencias de polaridades de los analitos investigados (sobre todo en el caso de *endosulfan* y *metabolitos*) y también al

amplio rango de polaridades de los lípidos, lo cual dificulta todavía más la separación. Se ha utilizado un sistema automatizado de HPLC con una columna 4 μm Silica Novapack y como fase móvil n-hexano o mezclas de n-hexano/acetato de etilo. En el caso de *endosulfan* y *metabolitos* es necesario utilizar dos procedimientos de purificación: uno para α -*endosulfan* (también se aplicó para los PCBs y el resto de OCs), y otro para los más polares β -*endosulfan* y *metabolitos*. La aplicación de técnicas como GC-MS y GC-MS/MS para la detección, permite la confirmación inequívoca de los analitos en las muestras reales donde es frecuente la aparición de picos interferentes en los cromatogramas para este tipo de matrices.

1.6. Selección de los plaguicidas a estudiar

Una de las etapas previas para empezar un estudio analítico es la selección de un número determinado de plaguicidas a estudiar atendiendo a sus características químicas y a su importancia como contaminantes del medio que se desea investigar.

Es bien conocida la importante actividad agrícola que se desarrolla en la zona Mediterránea española, destacando la Comunidad Valenciana en el cultivo de cítricos. Según datos obtenidos de la Conselleria de Agricultura i Pesca y de algunas Cooperativas Agrícolas de la provincia de Castellón, los productos más utilizados actualmente para el control de las plagas y enfermedades en cítricos son los que se muestran en la **Tabla 1.12**. Los plaguicidas que aparecen en negrita son los que se han seleccionado para realizar las experiencias del presente trabajo.

Como puede observarse en la tabla, los plaguicidas más utilizados en esta provincia para combatir las plagas de los cítricos pertenecen a diferentes campos de aplicación tales como acaricidas (*amitraz*, *dicofol*, *bromopropilato*, *hexitiazox*), fungicidas (*captan*, *mancozeb*), molusquicidas (*metaldehido*), y en mayor medida insecticidas pertenecientes a diferentes familias: carbamatos (*metiocarb*, *butocarboxim*, *etiofencarb*, *pirimicarb*), OCs (*endosulfan*, *lindano*) y OPs (*diazinon*, *fosmet*, *triclorfon*, *clorpirifos*, *fenitrotion*, *metidation*, *metil azinfos*, *malation*, *dimetoato*, *metil pirimifos*, entre otros).

Muchos de los compuestos que aparecen en la lista coinciden con algunos de los plaguicidas detectados en controles anuales realizados por nuestro Grupo de Investigación en el análisis de aguas superficiales de la provincia de Castellón (Borriana y Almenara, principalmente). A modo de ejemplo, se puede comentar que en 1999 los insecticidas más frecuentemente encontrados fueron *metil azinfos*, *dimetoato* y *metidation*, especialmente en el mes de Septiembre. También el acaricida organoclorado *dicofol*, fue detectado en alguna ocasión durante los meses de Septiembre y Octubre del mismo año.

Tabla 1.12. Plaguicidas más utilizados en la provincia de Castellón para combatir plagas de cítricos. (En negrita los plaguicidas estudiados en este trabajo).

Plaga	Materia activa
Acaro rojo	amitraz dicofol dicofol+tetradifon
Acaro de las maravillas	bromopropilato endosulfan piridafention
Aguado	captan mancozeb oxicloruro de cobre
Araña roja y araña parda	dicofol hexitiazox fenbutestan
Barreneta	diazinon fosmet triclorfon
Cacoecia	clorpirifos fenitrothion triclorfon
Caparreta	fosmet metidation ^C metil azinfos ^C
Caracoles y babosas	metaldehido metiocarb
Ceratitidis	malation
<i>Chinche verde</i>	dimetoato (espolvoreo) malation (espolvoreo)

^C *productos tóxicos de categoría C*

Tabla 1.12 (cont.). Plaguicidas más utilizados en la provincia de Castellón para combatir plagas de cítricos. (En negrita los plaguicidas estudiados en este trabajo).

Plaga	Materia activa
<i>Cotonet</i>	clorpirifos
	diazinon
	metil pirimifos
	metil clorpirifos
<i>Hormigas</i>	diazinon
	foxim
<i>Mosca blanca</i>	butocarboxim
	fenitrothion
<i>Mosca frutas</i>	fention
	malation
<i>Piojo gris</i>	aceite mineral
	mecarbam ^C
	metil azinfos^C
	metidation^C
	ometoato
	metil pirimifos
	quinalfos
<i>Piojo blanco y piojo rojo</i>	metidation^C
	metil pirimifos
	ometoato ^C
	quinalfos
<i>Prais</i>	clorpirifos
	endosulfan
	metil azinfos^C
	lindano

^C productos tóxicos de categoría C

Tabla 1.12 (cont). Plaguicidas más utilizados en la provincia de Castellón para combatir plagas de cítricos. (En negrita los plaguicidas estudiados en este trabajo).

Plaga	Materia activa
Cotonet	clorpirifos
<i>Pulgones</i>	dimetoato etiofencarb metil-osidemeton ^C pirimicarb tiometon
<i>Serpetas</i>	aceite mineral malation mecarbam ^C metidation ^C metil pirimifos quinalfos

^C *productos tóxicos de categoría C*

En la **Tabla 1.13** se indica la frecuencia de detección en cítricos (limones, mandarinas y naranjas) de los plaguicidas determinados en el Laboratorio Agrario de la Generalitat Valenciana, según datos llevados a cabo bajo el Programa de Vigilancia de residuos fitosanitarios en el año 1998. De nuevo, se muestran en negrita los plaguicidas que se han seleccionado en la presente Memoria.

Como se observa en la tabla, los plaguicidas más detectados fueron los insecticidas OPs, *metidation* en limones y *clorpirifos* en mandarinas y naranjas. Sin embargo, fueron pocos los casos en los que la concentración del compuesto determinado superaba el límite máximo de residuos (LMR): 3 casos para *clorpirifos*, 1 para *dicloran*, 2 para *fention*, 2 para *imazalil* y 1 para *metil paration*.

Tabla 1.13. Frecuencia de detección de plaguicidas en cítricos según el Programa de Vigilancia de residuos de plaguicidas de la Generalitat Valenciana de 1998.

Cultivo de cítricos	Plaguicidas detectados	Frecuencia	Nº de casos >LMR
LIMÓN (30)	clorpirifos	3	
	dicofol	8	
	dimetoato	2	
	etion	3	
	imazalil	6	
	metil pirimifos	1	
	mecarbam	1	
	metidation	12	
	tetradifon	1	
	MANDARINA (215)	captan	1
clorpirifos		110	2
diazinon		4	
dicloran		11	1
diclorvos		1	
dicofol		68	
dimetoato		3	
etion		10	
fenitrothion		2	
fention		53	2
fentoato		1	
fosmet		6	
imazalil		49	1
metil azinfos		9	
metil clorpirifos		1	
metil pirimifos		15	
malation		64	
mecarbam		4	
metidation		85	
tetradifon		15	

LMR: Límite Máximo de Residuos

(Entre paréntesis se indica el número de muestras analizadas)

(En negrita los plaguicidas estudiados en este trabajo de investigación)

Tabla 1.13 (cont). Frecuencia de detección de plaguicidas en cítricos según el Programa de Vigilancia de residuos de plaguicidas de la Generalitat Valenciana de 1998.

Cultivo de cítricos	Plaguicidas detectados	Frecuencia	Nº de casos >LMR
NARANJA (280)	benzimidazol	10	
	carbendazima	6	
	clorfenvinfos	1	
	clorpirifos	156	1
	diazinon	18	
	dicloran	18	
	dicofol	39	
	dimetoato	10	
	ditiocarbamatos	20	
	etion	5	
	fenitrothion	4	
	fention	10	
	fentoato	2	
	fosmet	2	
	imazalil	85	1
	metil azinfos	4	
	metil clorpirifos	2	
	metil paration	1	1
	metil pirimifos	30	
	malation	25	
	mecarbam	8	
	metidation	49	
	piridafention	4	
quinalfos	6		
tetradifon	24		
tiabendazol	9		

LMR: Límite Máximo de Residuos

(Entre paréntesis se indica el número de muestras analizadas)

(En negrita los plaguicidas estudiados en este trabajo de investigación)

1.6.1. Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas OPs son, en general, sustancias biodegradables en la naturaleza, sin tendencia a acumularse en las grasas del organismo, y que forman parte del grupo de insecticidas llamados “de contacto”, por absorberse por medio de los lípidos del exoesqueleto de los insectos. Son posiblemente los insecticidas más utilizados en la actualidad. Desde 1942 se han sintetizado más de 50.000 derivados organofosforados, algunos de los cuales se han utilizado con fines bélicos (gas GB, gas nervino, trilon, sarín, tabún, etc.) y no menos de 50 derivados han sido comercializados como insecticidas (Gisbert y Villanueva, 1991).

A lo largo de los últimos 20 años se ha producido un profundo cambio en las prácticas agrícolas, de modo que los plaguicidas OPs han reemplazado ampliamente a los plaguicidas OCs. Este hecho se ha producido como consecuencia de la alta toxicidad y capacidad de bioacumulación en la cadena trófica de estos últimos, como consecuencia de sus características químicas. Aunque, en principio, los compuestos OPs son menos peligrosos para la vida salvaje que los OCs, la amplia variabilidad química de este grupo de plaguicidas y el uso masivo que de ellos se está haciendo en los países ribereños del mediterráneo (UNEP, 1991) hace necesario un estudio exhaustivo de sus propiedades tóxicas y de su capacidad de afección y bioconcentración en seres vivos que no son su objetivo.

En general, los compuestos OPs son productos de elevada reactividad química, lo que les confiere diversos alicientes para su uso; al tratarse de compuestos muy activos las dosis necesarias de materia activa son bajas. Además, se degradan con relativa facilidad, bien mediante reacciones de hidrólisis que dan lugar a productos inocuos para el medio ambiente, o por reacciones de oxidación, que conducen a metabolitos más o menos tóxicos, pero que son más fáciles de hidrolizar. Por último, son productos cuya toxicidad aguda es, en general, mayor que la de los OCs, mientras que la crónica es inferior, ya que tienden a hidrolizarse en vez de acumularse en las grasas (UNEP, 1991).

Algunos de ellos poseen una presión de vapor tal que presentan cierta volatilidad, incluso a la temperatura normal. Los insectos toman o inhalan estos productos a través de la piel ilesa o el tubo digestivo. En los animales de sangre caliente y en el hombre, se introducen en el cuerpo por ingestión, contacto con la piel o por los órganos respiratorios (vapores, polvos o nebulizadores), y se distribuyen rápidamente por vía sanguínea (Klimmer, 1967).

Una de las principales características de los compuestos OPs es que se tratan de ésteres orgánicos del ácido fosfórico. Estos compuestos pueden ser alquilados o arilados antes de ser oxidados y uno de los enlaces C-P resultantes puede ser sustituido por un enlace C-O-P. Además el oxígeno puede sustituirse por azufre, u ocasionalmente por nitrógeno, dando lugar así a varios grupos químicos distintos de OPs, como los fosfatoésteres, los fosforoditioatos O-alquilados o los fosforotioatos S-fosforilados. Por otra parte, el número de grupos químicos se ve aumentado por la gran variedad de radicales que pueden presentar, ya que si bien dos de los radicales orgánicos son siempre metilo o etilo, el tercer radical es diferente en cada clase de plaguicida (UNEP, 1991).

Los plaguicidas OPs, una vez en el interior del organismo, son activados por desulfuración oxidativa, transformándose los grupos P=S a P=O (Huckle y Millburn, 1990). El centro atacado por estos derivados P=O es el sistema nervioso y más concretamente la AchE, enzima encargada de hidrolizar la acetilcolina en colina y ácido acético a nivel de las sinapsis nerviosas. La población afectada por la acción tóxica de estos plaguicidas presenta esta actividad enzimática inhibida ya que su AchE se encuentra fosforilada, lo que provoca desde anoxia y dolores de cabeza a dosis bajas, hasta náuseas, contracciones musculares e incluso la muerte por fallo respiratorio y paro cardíaco a mayores dosis (Dreisbach y Robertson, 1987; Marrs, 1993).

Por otra parte, la biotransformación de la mayor parte de los plaguicidas comprende una combinación de varias reacciones químicas, que generalmente se desarrolla en dos fases (Millburn, 1995; Hutson y Paulson, 1995):

- *Fase I*: incluye fundamentalmente reacciones de preconjugación basadas en oxidación, reducción e hidrólisis, introduciendo de este modo un grupo polar (OH, NH₂, COOH y SH) en la molécula.
- *Fase II*: consiste fundamentalmente en reacciones de conjugación de los productos resultantes de la fase I con una o varias moléculas endógenas (ácido glucurónico, sulfato, glicina, etc.) para formar productos hidrosolubles y de esta forma eliminables por la excreción renal o hepática en la orina o en la bilis, respectivamente.

Aunque este metabolismo en el caso de los compuestos OPs es muy rápido, es posible la detección de los productos iniciales en sangre y orina, sobre todo en casos de intoxicaciones agudas o en exposiciones continuadas, siempre y cuando la muestra analizada sea reciente. De este modo, su cuantificación indicará el nivel de afectación del individuo o de la población expuesta.

En cuanto a la selección de los plaguicidas OPs para la realización de este trabajo, se ha tenido en cuenta tanto el grado de utilización en la ribera Mediterránea como su toxicidad, además de ciertos aspectos analíticos como la posibilidad de utilizar la técnica GC para el análisis, sin tener que recurrir a técnicas diferentes, como la HPLC.

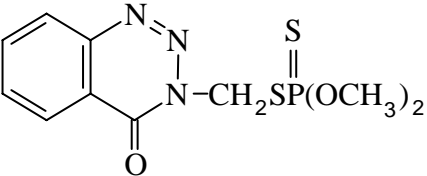
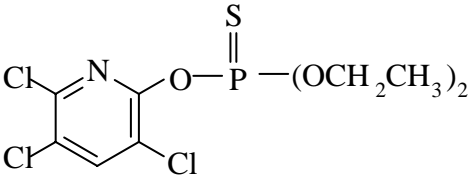
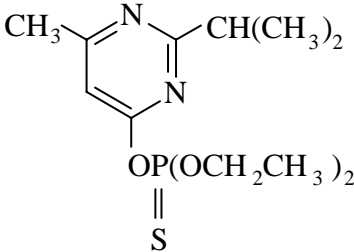
Los plaguicidas OPs seleccionados en el presente trabajo se muestran en la **Tabla 1.14**, donde también se recoge su fórmula molecular, así como algunas de sus propiedades físico-químicas, como datos relativos a su toxicidad para mamíferos (LD-50 para ratas); valores de ADI (Ingestión Diaria Aceptable) según la OMS (Organización Mundial de la Salud), que indica la dosis diaria que el hombre puede ingerir sin que existan riesgos apreciables; y datos de sus correspondientes presiones de vapor (p.v.), solubilidades (S) en agua y constantes de partición octanol-agua (Kow) (Noble, 1993; Tomlin, 1997).

En un principio, se seleccionaron 10 de ellos para llevar a cabo la primera fase del trabajo con la aplicación de las técnicas de análisis convencionales: *azinfos metil*

(S-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-ylmethyl O,O-dimethyl phosphorodithioate), *clorpirifos* (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate), *diazinon* (O,O-diethyl O-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate), *dimetoato* (O,O-dimethyl S-methylcarbamoyl methyl phosphorodithioate), *fenitrotion* (O,O-dimethyl O-4-nitro-m-tolyl phosphorothioate), *fention* (O,O-dimethyl O-4-methylthio-m-tolyl phosphorothioate), *fosmet* (O,O-dimethyl S-phthalimidomethyl phosphorodithioate), *malation* (diethyl (dimethoxyphosphinothioylthio) succinate), *metidation* (S-2,3-dihydro-5-metoxy-2-oxo-1,3,4-thiadiazol-3-ylmethyl O,O-dimethyl) y *paration metil* (O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate). En una etapa más avanzada, al aplicar nuevas técnicas de análisis, como SPME, se eliminaron alguno de ellos, para los cuales la técnica no ofrecía resultados óptimos, y se incorporaron a la lista dos nuevos plaguicidas OPs: *etion* (O,O,O',O'-tetraethyl S,S'-methylene bis (phosphorodithioate)) y *fonofos* (O-ethyl S-phenyl (RS)-ethylphosphonodithioate).

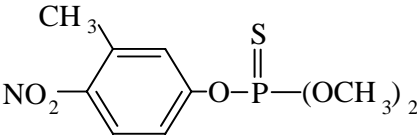
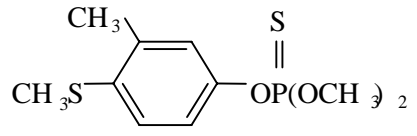
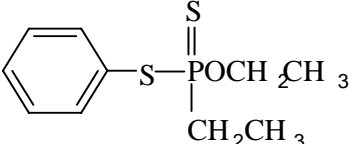
Respecto a sus características químicas, con los plaguicidas OPs estudiados se abarca un amplio rango de polaridades, de modo que será necesario desarrollar métodos de análisis que permitan la determinación de compuestos apolares (como *clorpirifos*) hasta bastante polares (como *dimetoato*).

Tabla 1.14. Plaguicidas OPs seleccionados.

Nombre	Fórmula	S (H ₂ O) (mg l ⁻¹)	Log Kow	LD-50 (mg Kg ⁻¹)	ADI (mg Kg ⁻¹)	p.v. (mPa)
Azinfos metil		28	2.69-2.96	10	0.005	5x10 ⁻⁴
Clorpirifos		1.4	4.96-5.11	135-165	0.01	2.7
Diazinon		60	3.11-3.3	1250	0.002	12

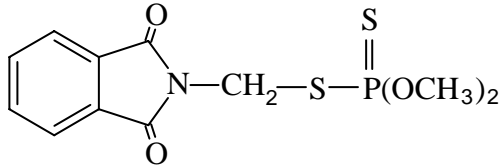
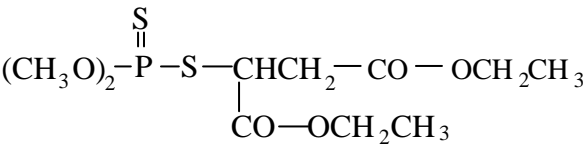
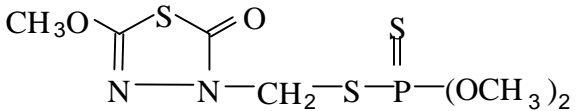
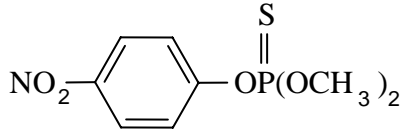
S: solubilidad; Kow: constante de distribución octanol-agua; LD-50: dosis letal media para ratas; ADI: dosis diaria aceptable; p.v.: presión vapor

Tabla 1.14 (cont). Plaguicidas OPs seleccionados.

Nombre	Fórmula	S (H ₂ O) (mg l ⁻¹)	Log Kow	LD-50 (mg Kg ⁻¹)	ADI (mg Kg ⁻¹)	p.v. (mPa)
Dimetoato	$\text{CH}_3\text{-NH-CO-CH}_2\text{-S-P(=S)(OCH}_3)_2$	25000	0.50-0.78	387	0.002	0.25
Etion	$(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P(=S)-S-CH}_2\text{-S-P(=S)(OCH}_2\text{CH}_3)$	2	5.07	208	0.002	0.2
Fenitroton		21	3.30-3.5	250	0.005	15
Fention		4.2	4.17-4.84	250	0.007	0.74
Fonofos		13	3.94	5.5-11.5	-	28

S: solubilidad; Kow: constante de distribución octanol-agua; LD-50: dosis letal media para ratas; ADI: dosis diaria aceptable; p.v.: presión vapor

Tabla 1.14 (cont). Plaguicidas OPs seleccionados.

Nombre	Fórmula	S (H ₂ O) (mg l ⁻¹)	Log Kow	LD-50 (mg Kg ⁻¹)	ADI (mg Kg ⁻¹)	p.v. (mPa)
<i>Fosmet</i>		25	2.95	113	0.01	0.065
<i>Malation</i>		145	2.74-2.94	1375-2800	0.02	5.3
<i>Metidation</i>		200	2.2	25-54	0.001	0.25
<i>Paration metil</i>		55	3	3	0.003	0.2

S: solubilidad; Kow: constante de distribución octanol-agua; LD-50: dosis letal media para ratas; ADI: dosis diaria aceptable; p.v.: presión vapor

1.6.2. Plaguicidas organoclorados

Aunque los plaguicidas OCs fueron uno de los grupos más importantes y de mayor uso hasta la década de los 70 del siglo XX, su persistencia en los distintos niveles de la biosfera es motivo de que aún hoy, en que su uso está estrictamente restringido, sigan estando presentes en el medio ambiente. Además, algunos de los más peligrosos, como DDT, siguen usándose en la lucha contra la malaria, enfermedad cuyos vectores son insectos.

Ejemplos que prueban la persistencia de estos compuestos son los residuos de plaguicidas OCs y PCBs detectados actualmente en animales marinos de zonas subantárticas, como es el caso de residuos de DDT encontrados en pingüinos y focas de la Antártida, donde estos compuestos sólo han podido llegar gracias a las corrientes marinas o aéreas, o a las migraciones de animales intoxicados (De Boer y Wester, 1991; Wania y Mackay, 1993). También por este motivo, la población aborigen de las regiones polares está expuesta a los compuestos OCs debido a su elevado consumo de mamíferos marinos, principalmente de focas, ballenas, pájaros de mar y peces. Bjerregaard y colaboradores (2001) realizaron un estudio sobre la exposición de la población Inuit (Groenlandia) a compuestos OCs en función de la edad, sexo y dieta. En algunos casos, las concentraciones de PCBs encontradas han resultado ser más altas que las detectadas en controles de países europeos.

Estos principios activos se emplean, principalmente, en la lucha contra insectos, ácaros, hongos, roedores y malas hierbas. Se aplican tanto en la agricultura como en el ambiente doméstico y han dado lugar a buen número de intoxicaciones, causadas y profesionales. A modo de ejemplo, se muestra la **Tabla 1.15**, donde se presentan algunos de los plaguicidas detectados con mayor frecuencia en la población, incluyendo también los rangos de concentraciones encontradas.

Tabla 1.15. Ejemplos de plaguicidas OCs detectados con mayor frecuencia en grupos poblacionales.

Plaguicidas	Rango (ng ml ⁻¹)	Referencia
<i>lindano</i>	0.02	Rosell <i>et al.</i> , 1993
<i>aldrin</i>	0.5	
<i>p,p'</i> -DDT	4	
<i>p,p'</i> -DDE	3-8	Guardino <i>et al.</i> , 1996
<i>p,p'</i> -DDD	0.5-1.5	
<i>p,p'</i> -DDT	0.3-1	
α -HCH	2-17	Dua <i>et al.</i> , 1996
β -HCH	5-24	
<i>lindano</i>	<12	
<i>p,p'</i> -DDE	<69	
β -HCH	0.9-3	Buchloski <i>et al.</i> , 1996
<i>lindano</i>	0.6-1.8	
HCB	3.3-10.5	
HCB	1-953	To-Figueras <i>et al.</i> , 1997
β -HCH	1-33	
<i>p,p'</i> -DDE	0.7-67	
<i>p,p'</i> -DDE	0.8-70	Schechter <i>et al.</i> , 1997
<i>p,p'</i> -DDT	0.2-10	
<i>p,p'</i> -DDE	1.5-88	Luo <i>et al.</i> , 1997
<i>p,p'</i> -DDT	0.22-8.9	
<i>p,p'</i> -DDE	<1.4-4	Roma <i>et al.</i> , 1998
β -HCH	1.4-5.4	
<i>dieldrin</i>	4	
α -endosulfan	<0.8	Martínez Vidal <i>et al.</i> , 1998
β -endosulfan	<0.8	
<i>endosulfan éter</i>	<0.1	
<i>endosulfan lactona</i>	<0.4	
<i>endosulfan sulfato</i>	<0.5	

Tabla 1.15 (cont.). Plaguicidas OCs con mayor frecuencia detectados en grupos poblacionales.

Plaguicidas	Rango (ng ml ⁻¹)	Referencia
α -endosulfan	1-5	Arrebola <i>et al.</i> , 1999b
β -endosulfan	0.5-1	
<i>p,p'</i> -DDE	7-124	Najam <i>et al.</i> , 1999
<i>p,p'</i> -DDT	0.3-1.6	
HCB	0.6-14	
β -HCH	1.6-8.7	
heptacloro epóxido	<0.4	

Generalmente los plaguicidas OCs son compuestos orgánicos de estructura muy diferente, en la cual se sustituyen uno o varios átomos de H por átomos de Cl. Pueden introducirse en el cuerpo por los órganos respiratorios en forma de polvo o como aerosol, por vía digestiva y a través de la piel. Tienen una acción neurotrópica y dan lugar a síndromes hepatorreñales. Se acumulan en el tejido adiposo, donde persisten durante muy prolongados períodos de tiempo y pueden ser, por este mecanismo, origen de intoxicaciones crónicas. No son biodegradables; esto unido a que en determinadas condiciones se han observado acciones carcinogénicas, ha dado lugar a que se haya prohibido su uso para aplicaciones agrícolas (Gisbert y Villanueva, 1991).

En un principio, para llevar a cabo este trabajo, se seleccionó un grupo amplio de 16 plaguicidas OCs (ver **Tabla 1.16**), la mayoría de ellos investigados por la EPA (Environmental Protection Agency) incluyendo también, cuatro metabolitos principales de *endosulfan*. Posteriormente, como se verá en los capítulos siguientes, el grupo de OCs estudiados se fue reduciendo en cuanto a las limitaciones de la técnica analítica empleada, de la matriz analizada, así como de su importancia desde el punto de vista de su persistencia y su uso.

Dependiendo de su estructura química, los compuestos estudiados en este trabajo se pueden dividir en los siguientes grupos:

1. *DDT y análogos*

Dentro de este grupo se han seleccionado los isómeros *p,p'* por ser los más activos como insecticidas: *p,p'*-*DDT* (1,1,1, tricloroetano-2,2-bis (4-clorofenil)etano), *p,p'*-*DDD* (1,1-bis(4-clorofenil)- 2,2,-dicloroetano) y *p,p'*-*DDE* (1,1-dicloro-2,2- bis(4-clorofenil) etileno).

El *DDT* ha sido el más importante de todos los insecticidas sintéticos, y sigue teniendo interés toxicológico, pues la gran mayoría de los seres vivos, incluido el hombre, estudiados hasta el momento contienen en su tejido adiposo y en el sistema nervioso central, cantidades medibles de este compuesto o sus productos de degradación.

El *DDT* sufre también la fase I de metabolismo: mediante una reacción de dehidrohalogenación tiene lugar la conversión enzimática de *DDT* a *DDE*. Por otra parte, el *DDT* puede también sufrir una decloración reductiva a *DDD*, siendo ésta última menos rápida que la primera. Ambos metabolitos son muy estables, y se estima que pueden perdurar en la naturaleza (y en el tejido adiposo) muchos años. Tanto *DDT* como sus dos metabolitos se encuentran en diversos tejidos: en relación con la cantidad global acumulada en tejido adiposo, la concentración en el sistema nervioso central es de alrededor del 1%, en hígado del 9% y en sangre del 0.33%. Puesto que la semivida plasmática más larga es la de *DDE*, cuando la proporción de éste es mayor que la de los otros, puede suponerse que la absorción de *DDT* no es reciente. El ser humano excreta muy lentamente *DDT*, salvo en el supuesto de lactación, pues el elevado contenido graso de la leche la convierte en un excelente vehículo de excreción (Hernández *et al.*, 1993; Quinsey *et al.*, 1995). Se calcula que en condiciones excepcionales de no absorción de nuevas dosis, son necesarios al menos 20 años para poder eliminar todo el *DDT* acumulado en el organismo.

2. Hexaclorociclodienos (HCH)

Dentro de este apartado se seleccionaron los 4 isómeros: α , β , δ y γ ; éste último es conocido como *lindano*, que es el de mayor valor comercial y eficacia como insecticida.

HCH es un importante insecticida que, al contrario de otros OCs, sigue teniendo vigencia. Es un insecticida con potente acción por contacto y por ingestión, presentando cada isómero presenta diferente actividad. Mientras que el isómero γ es el que presenta mayor toxicidad aguda, el β es el de mayor toxicidad crónica, gracias a su mayor estabilidad (Primo y Carrasco, 1986).

En fluidos biológicos y tejidos humanos, los isómeros α y δ -*HCH* son detectados en bajas concentraciones. El que suele dominar en muestras de sangre es el que tiene todos sus cloros en posición ecuatorial, β -*HCH*, debido principalmente a su bajo momento dipolar, su baja solubilidad en agua y su elevada estabilidad (Otero *et al.*, 1997).

3. Ciclodienos

El grupo de plaguicidas OCs estudiados con este tipo de estructura son: *heptacloro* (1,4,5,6,7,8,8 heptacloro-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7. metanoindeno) y su metabolito *heptacloro epóxido*; *aldrin* (1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4^a,5,8,8^a-hexahidro- 1,4, endo-exo 3,8-dimetanonaftaleno) y sus epóxidos *dieldrin* y *endrin*; los dos isómeros, α y β -*endosulfan* ((1,4,5,6,7,7-hexacloro-8,9,10- trinoborn-5-en-2,3-ylenebismetileno) sulfito) y sus metabolitos (*-diol*, *-éter*, *-lactona* y *-sulfato*).

Cabe destacar la importancia de *endosulfan*, ya que en España todavía está autorizado en cítricos (ver **Tabla 1.12**), así como en algunos otros cultivos.

En cuanto al metabolismo, el *endosulfan* se transforma rápidamente por oxidación a *endosulfan-diol*, *-éter*, *-lactona* o *-sulfato*, los cuales son excretados por la orina o heces (Martínez Vidal *et al.*, 1998; Arrebola *et al.*,

1999b). En la **Figura 1.6** pueden observarse las rutas metabólicas de α - y β -endosulfan.

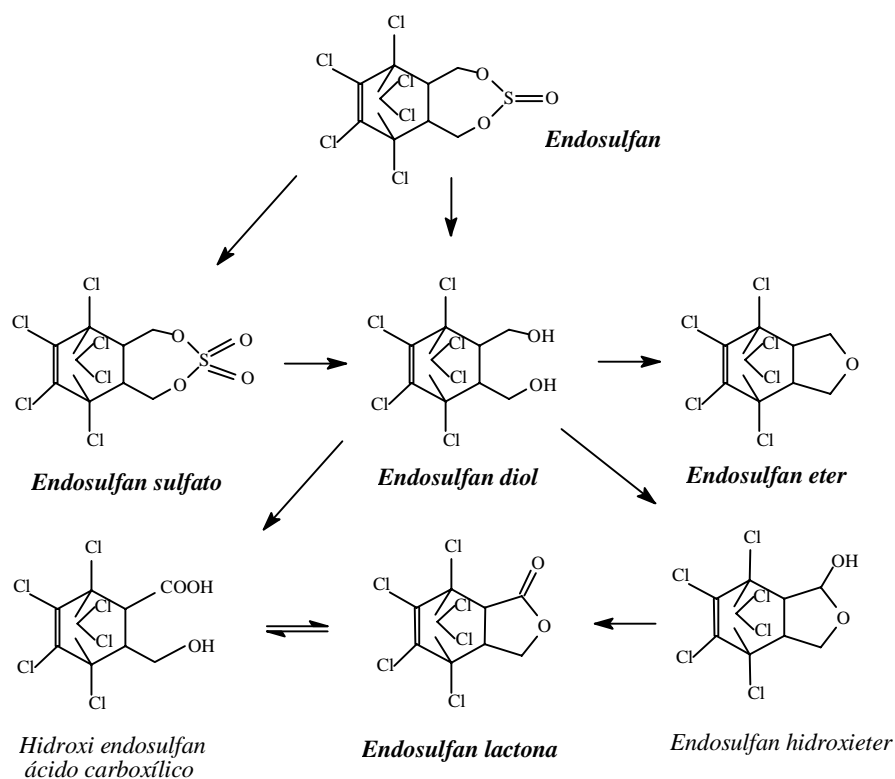


Figura 1.6. Rutas metabólicas de endosulfan (α y β).

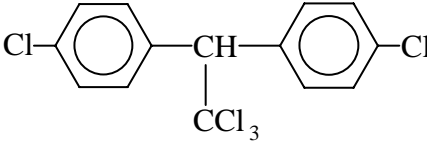
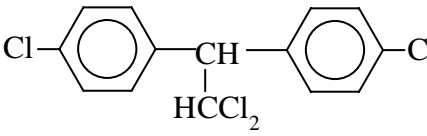
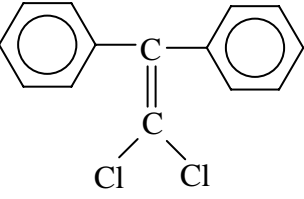
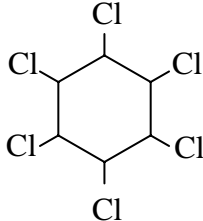
4. Metoxiclor (1,1,-tricloro-2,2-bis (4-metoxifenil)etano

5. Hexaclorobenceno (HCB)

El *HCB* se trata de un contaminante usado como fungicida y que se acumula en el sistema biológico. Normalmente, sus principales fuentes son las impurezas presentes en otros plaguicidas OCs y los productos emitidos por las industrias, principalmente en las industrias de disolventes a través de una manufacturación inapropiada o por una combustión incompleta (To-Figueras *et al.*, 1997; Sala *et al.*, 1999). El *HCB* es altamente lipofílico y se detecta

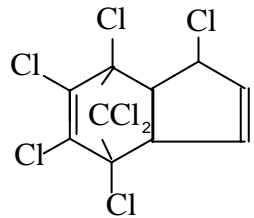
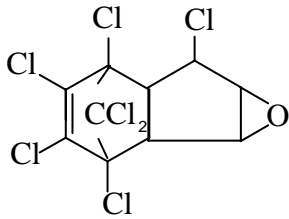
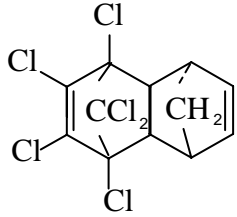
frecuentemente en productos alimenticios, acumulándose en los tejidos humanos después de su ingestión (Gómez-Catalán *et al.*, 1993).

Tabla 1.16. Plaguicidas OCs seleccionados.

Nombre	Fórmula	S (H ₂ O) (mg l ⁻¹)	Log Kow	LD-50 (mg Kg ⁻¹)	ADI (mg Kg ⁻¹)	p.v. (mPa)
<i>p,p'</i> -DDT		0.001- 0.004	6.38	113-118	0.02	0.025
<i>p,p'</i> -DDD		-	-	-	-	-
<i>p,p'</i> -DDE		-	-	-	-	-
HCHs		7 (γ) 10 (α) 0.2 (β) 10 (δ)	3.72 (γ) 3.81 (α) 3.80 (β) 4.14 (δ)	88-270 (γ) 1700 (α) 2000 (β) 1000 (δ)	0.008 (γ)	5.6 (γ)

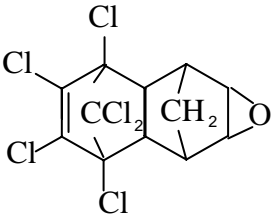
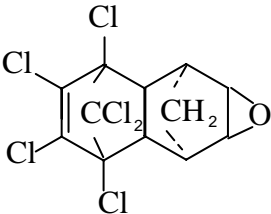
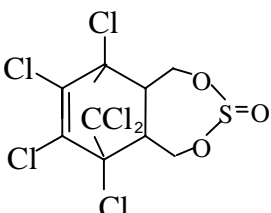
S: solubilidad; Kow: constante de distribución octanol-agua; LD-50: dosis letal media para ratas; ADI: dosis diaria aceptable; p.v.: presión vapor

Tabla 1.16 (cont). Plaguicidas OCs seleccionados.

Nombre	Fórmula	S (H ₂ O) (mg l ⁻¹)	Log Kow	LD-50 (mg Kg ⁻¹)	ADI (mg Kg ⁻¹)	p.v. (mPa)
Heptacloro		0.056	5.38	147-220	0.0001	53
Heptacloro epóxido		0.35	5.40	-	-	-
Aldrin		0.027	6.50	45-60	0.0001	0.7

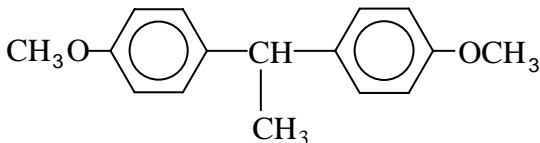
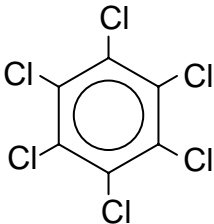
S: solubilidad; Kow: constante de distribución octanol-agua; LD-50: dosis letal media para ratas; ADI: dosis diaria aceptable; p.v.: presión vapor

Tabla 1.16 (cont). Plaguicidas OCs seleccionados.

Nombre	Fórmula	S (H ₂ O) (mg l ⁻¹)	Log Kow	LD-50 (mg Kg ⁻¹)	ADI (mg Kg ⁻¹)	p.v. (mPa)
Endrin		0.23	4.56	10-12	-	2E-5
Dieldrin		0.186	4.32	60-90	0.0001	0.4
Endosulfan (α o β)		0.33	4.74-4.79	70-240	0.006	0.83

S: solubilidad; Kow: constante de distribución octanol-agua; LD-50: dosis letal media para ratas; ADI: dosis diaria aceptable; p.v.: presión vapor

Tabla 1.16 (cont.). Plaguicidas OCs seleccionados.

Nombre	Fórmula	S (H ₂ O) (mg l ⁻¹)	Log Kow	LD-50 (mg Kg ⁻¹)	ADI (mg Kg ⁻¹)	p.v. (mPa)
Metoxicloro		0.1	3.31	6000	0.1	muy baja
HCB		insoluble	5.50	10000	-	1.45

S: solubilidad; Kow: constante de distribución octanol-agua; LD-50: dosis letal media para ratas; ADI: dosis diaria aceptable; p.v.: presión vapor

Bifenilos policlorados (PCBs)

Los PCBs son compuestos de síntesis que se introdujeron en el mercado por la industria química en 1929. Se utilizaron inicialmente en la fabricación de transformadores y otros equipamientos eléctricos aunque posteriormente ocuparon otras muchas aplicaciones como es el caso del plaguicida *aroclor*, que es una mezcla comercial de diferentes PCBs. Su producción fue prohibida en Estados Unidos en 1977 cuando se descubrió que estaban asociados al incremento de tumores hepáticos en animales de experimentación. Sin embargo, la prohibición no se aplicó a PCBs ya existentes cuyo uso ha continuado hasta nuestros días formando parte de sistemas cerrados como transformadores y aislamientos eléctricos.

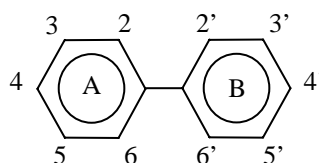
El uso de PCBs está restringido a algunos equipos, y se pretende que en 2025 se haya conseguido eliminar (UNEP, 2001). Según datos de la Conferencia de Plenipotenciarios para el Convenio de Estocolmo sobre POPs (UNEP/POPS/CONF/4, 5 Junio 2001) su producción está prohibida, aunque todavía siguen en uso con arreglo a las siguientes disposiciones:

- a) Utilización solamente en equipos intactos y estancos y en zonas en que el riesgo de liberación al medio ambiente pueda reducirse a un mínimo y la zona de liberación pueda descontaminarse rápidamente.
- b) Eliminación del uso en equipos situados en zonas donde se produzcan o elaboren alimentos para seres humanos o para animales
- c) Cuando se utilicen en zonas densamente pobladas, incluidas escuelas y hospitales, adopción de todas las medidas razonables de protección contra cortes de electricidad que pudiesen dar lugar a incendios, e inspección periódica de dichos equipos para detectar toda fuga
- d) Velar por que los equipos que contengan PCBs no se exporten ni importen salvo para fines de gestión ambientalmente racional de desechos
- e) Excepto para las operaciones de mantenimiento o reparación, no permitir la recuperación para su reutilización en otros equipos que contengan líquidos con una concentración de PCBs superior al 0.005%

Los PCBs constituyen una clase de hidrocarburos aromáticos clorados, con carácter no insecticida, que pueden acumularse en el medio ambiente y en la materia viva, y cuyas propiedades son muy semejantes a las de los plaguicidas OCs (estables, muy persistentes en el medio ambiente y solubles en la grasa). Una de las vías más importantes de exposición humana a PCBs es a través de la alimentación, especialmente en alimentos de origen marino.

Estos compuestos no se encuentran naturalmente en el medio ambiente y representan una mezcla de hidrocarburos bifenílicos con diferente estado de cloración, generalmente muy estables térmica y químicamente, pudiendo existir hasta 210 isómeros por la sustitución de hidrógeno por cloro en el anillo bifenílico. Las mezclas comerciales contienen diferentes isómeros y en cantidades distintas lo que va a determinar sus características específicas, que dependen del número de cloros y la posición relativa de los mismos, y de su persistencia o resistencia al metabolismo.

La nomenclatura de los PCBs se basa en la posición y grado de sustitución en la estructura bifenílica, como se muestra en la figura:



Las posiciones sustituibles son las 2, 3, 4, 5, 6 para el anillo A y 2', 3', 4', 5', 6' para el anillo B, pudiendo así llegar a tener hasta diez átomos de cloro, generándose en su fabricación diferentes mezclas de éstos.

Para este trabajo, se seleccionaron siete isómeros de PCBs los cuales son los más comúnmente determinados en alimentos grasos y en el Medio Ambiente: *PCB 28* (2,4,4'-trichlorobifenil), *PCB 52* (2,2',5,5'- tetraclorobifenil), *PCB 101* (2,2',4,5,5'- pentaclorobifenil), *PCB 118* (2,3',4,4',5- pentaclorobifenil), *PCB 138*

(2,2',3,4,4',5'- hexaclorobifenil), *PCB 153* (2,2',4,4',5,5'- hexaclorobifenil), *PCB 180* (2,2',3,4,4',5,5'- heptaclorobifenil).

1.7. Referencias

- A.O.A.C. (2000), Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (Dr. William Horwitz Ed.) 17th, Vol. I, Cap. 10, p1, Gaithersburg, Maryland, USA.
- ACGIH (1996), *TLVs Valores Límite para sustancias químicas y agentes físicos en el ambiente de trabajo. BEIs- Índices Biológicos de Exposición*, Edición en castellano a cargo de la Conselleria de Trabajo y Asuntos Sociales de la Generalitat Valenciana, Valencia.
- Aguilar, C., Peñalver, A., Pocurull, E., Ferré, J., Borrull, F., Marcé, R.M. (1999), *Optimization of solid phase microextraction to determine organochlorine pesticides in water by gas chromatography and electron capture detection*, J. Chromatogr. A, **844**, 425.
- Alder, L., Vieth, B. (1996), *A congener-specific method for the quantification of camphechlor (toxaphene) residues in fish and other foodstuffs*, Fresenius J. Anal. Chem, **354**, 81.
- Ameno, K., Fuke, C., Ameno, S., Kiri, T., Ijiri, I. (1989), *A rapid and sensitive quantitation of dipterex in serum by solid-phase extraction and gas chromatography with flame thermionic detection*, J. Anal. Toxicol., **13**, 150.
- Angerer, J., Ritter, A. (1997), *Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid phase extraction and gas chromatography mass spectrometry*, J. Chromatogr. B, **695**, 217.
- Ansari, G.A.S., James, G.P., Hu, L.A., Reynolds, E.S. (1986), *Organochlorines residues in adipose tissue of residents of the Texas Gulf Coast*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **36**, 311.

- Aprea, C., Sciarra, G., Sartorelli, P., Sartorelli, E., Strambi, F., Farina, G.A., Fattorini, A. (1997), *Biological monitoring of exposure to chlorpyrifos –methyl by assay of urinary alkylphosphates and 3,5,6- trichloro-2- pyridinol*, J. Toxicol. Environ. Health, **58**, 581.
- Aronson, K.J., Miller, A.B., Woolcott, C.G., Sterns, E.E., McCready, D.R., Lickley, L.A., Fish, E.B., Hiraki, G.Y., Holloway, C., Ross, T., Hanna, W.M., SenGupta, S.K., Weber, J-W. (2000), *Breast adipose tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and breast cancer risk*, Cancer Epidemiology, Biomarkers & prevention, **9**, 55.
- Arrebola, F.J., Martínez Vidal, J.L., Fernández Gutiérrez, A., Akhtar, M.H. (1999a), *Monitoring of pyrethroid metabolites in human urine using solid phase extraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry*, Anal. Chim Acta, **401**, 45.
- Arrebola, F.J., Martínez Vidal, J.L., Fernández Gutiérrez, A. (1999b), *Excretion study of endosulfan in urine of a pest control operator*, Toxicol. Letters, **107**, 15.
- Arthur, C.L., Pawliszyn, J. (1990), *Solid-phase micro-extraction with thermal desorption using fused-silica optical fibres*, Anal. Chem., **62**, 2145.
- Asakawa, F., Jitsunari, F., Miki, K., Choi, J-O., Takeda, N., Kitamado, T., Suna, S., Manabe, Y. (1996a), *Agricultural worker exposure to and absorption of permethrin applied to cabbage*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **56**, 42.
- Asakawa, F., Jitsunari, F., Shiraishi, H., Suna, S., Takeda, N., Kitamado, T. (1996b), *Accumulation of chlordanes in adipose tissues of mice caused by long-term exposure of low level technical chlordane*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **57**, 909.
- Atuma, S.S., Aune, M. (1999), *Method for the determination of PCB congeners and chlorinated pesticides in human blood serum*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **62**, 8.

- Barberá, C. (1989), *Pesticidas agrícolas*, Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- Barceló, D. (1993), *Environmental Protection Agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water*, J. Chromatogr, **643**, 117.
- Barr, D.A., Barr, J.R., Driskell, W.J., Hill, R.H., Ashley, D.L., Needham, L.L., Head, S.L., Sampson, E.J. (1999), *Strategies for biological monitoring of exposure for contemporary use pesticides*, Toxicol. Industrial Health, **15**, 168.
- Bartels, M.J., Kastl, P.E. (1992), *Analysis of 3,5,6-trichloropyridinol in human urine using negative ion chemical ionization gas chromatography mass spectrometry*, J. Chromatogr., **575**, 69.
- Beeson, M.D., Driskell, W.J., Barr, D.B. (1999), *Isotope dilution high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of atrazine, malathion and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid*, Anal. Chem., **71**, 3526.
- Belardi, R.P., Pawliszyn, J. (1989), *The application of chemically modified fused silica fibres in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns*, Water Pollut. Res. J. Canada, **24**, 179.
- Beltran, J., López, F.J., Cepriá, O., Hernández, F. (1998), *Solid-phase microextraction for quantitative analysis of organophosphorus pesticides in environmental water samples*, J. Chromatogr. A, **808**, 257.
- Beltran, J., López, F.J., Hernández, F. (2000), *Solid phase microextraction in pesticide residue analysis*, J. Chromatogr. A, **885**, 389.
- Beltran, J., Pitarch, E., Egea, S., López, F.J., Hernández, F. (2001), *Gas chromatographic determination of selected pesticides in human serum by head space solid phase microextraction*, Chromatographia, **54** (11/12).

- Bjerregaard, P., Dewailly, E., Ayotte, P., Pars, T., Ferron, L., Mulvad, G. (2001), *Exposure of Inuit in Greenland to organochlorines through the marine diet*, J. Toxicol Environ. Health, **62**, 69.
- Boyd-Boland, A.A., Pawliszyn, J. (1995), *Solid-phase microextraction of nitrogen-containing herbicides*, J. Chromatogr. A, **704**, 163.
- Boyd-Boland, A.A., Magdic, S., Pawliszyn, J. (1996), *Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid-chromatography for the determination of alkylphenol ethoxylate surfactants in water*, Analyst, **121**, 929.
- Brock, J.W., Burse, V.W., Ashley, D.L., Najam, A.R., Green, V.E., Korver, M.P., Powell, M.K., Hodge, C.C., Needham, L.L. (1996), *An improved analysis for chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human and bovine sera using solid phase extraction*, J. Anal. Toxicol., **20**, 528.
- Bucholski, K.A., Begerow, J., Winneke, G., Dunemann, L. (1996), *Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in human body fluids and tissues*, J. Chromatogr. A, **754**, 479.
- Byrne, S.L., Shurdut, B.A., Saunders, D.G. (1998), *Potential chlorpyrifos exposure to residents following standard crack and crevice treatment*, Environ. Health Perspectives, **106**, 725.
- Carson, L.J. (1981), *Modified shorter method for determination of organophosphorus pesticides in non fatty food total diet composites*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **64**, 714.
- Chaler, R., Vilanova, R., Santiago-Silva, M., Fernandez, P., Grimalt, J.O. (1998), *Enhanced sensitivity in the analysis of trace organochlorine compounds by negative ion mass spectrometry with ammonia as reagent gas*, J. Chromatogr. A, **823**, 73.

- Chambers, J.E., Ma, T., Chambers, H.W. (1995), *Insecticide metabolism in mammals. En: Progress in Pesticides, Biochemistry and Toxicology, vol. 8, The mammalian metabolism of agrochemicals*, D.H. Hutson and G.D. Paulson (eds.), John Wiley & Sons, Chichester.
- Chang, M.J.W., Lin, C.Y., Lo, L.W., Lin, R.S. (1996), *Biological monitoring of exposure to chlorpyrifos by high performance liquid chromatography*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **56**, 367.
- Chang, M.J.W., Lin, R.S. (1995), *Biological monitoring of exposure to fenitrothion by high performance liquid chromatography*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **55**, 29.
- Chang, R.R., Jarman, W.M., Hennings, J.A. (1993), *Sample cleanup by solid-phase extraction for the ultratrace determination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in biological samples*, Anal. Chem, **65**, 2420.
- Chiarotti, M., Strano-Rossi, S., Marsili, R. (1997), *Solid phase microextraction (SPME) and gas chromatographic analysis of anorectic compounds in human urine*, J. Microcolumn Separations, **9**, 249.
- Conselleria d'Agricultura i Pesca (1998), Generalitat Valenciana, *Productos y normas fitosanitarias*, Valencia.
- Conselleria de Sanitat i Consum (1993), Generalitat Valenciana, *Indicadores biológicos para la valoración de la exposición a los compuestos químicos industriales: plaguicidas organofosforados*. Traducido de la obra original de M. Maroni, Comunidades Europeas, Bruselas.
- De Boer, J., Wester, P. (1991), *Chlorobiphenyls and organochlorine pesticides in various sub-Antartic Organisms*, Mar. Pollut. Bull., **22**, 441
- De Boer, J., Stronck, C.J.N., Van-der-Valk, F., Wester, P.G., Daudt, M.J.M. (1992), *Method for the analysis of non-ortho substituted chlorobiphenyls in fish and marine mammals*, Chemosphere, **25**, 1277.

- De Bruin, L.S., Josephy, P.D., Pawliszyn, B. (1998), *Solid phase microextraction of monocyclic aromatic amines from biological fluids*, Anal. Chem., **70**, 1986.
- De la Iglesia, A. (1988), *Reconocimientos médicos de trabajadores expuestos a plaguicidas*, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Notas Técnicas de Prevención, NTP-199.
- Dehon, B., Humbert, L., Devisme, L., Stievenart, M., Mathieu, D., Houdret, N., Lhermitte, M. (2000), *Tetrachloroethylene and trichloroethylene fatality: case report and simple headspace determination in tissues*, J. Anal. Toxicol, **24**, 22.
- Dejonckheere, W., Steurbaut, W., Drieghe, S., Verstraeten, R., Braeckman, H. (1996), *Monitoring of pesticide residues in fresh vegetables, fruits, and other selected food items in Belgium, 1991-1993*, J. Assoc. Off. Anal. Chem, **79**, 97.
- Dewailly, E., Mulvad, G., Pedersen H.S., Ayotte, P., Demers, A., Weber, J-P., Hansen, J.C. (1999), *Concentration of organochlorines in human brain, liver and adipose tissue autopsy samples from Greenland*, Environ. Health Pers., **10**, 823.
- DFG (1987), *Manual of pesticide residues analysis*. Pesticide Commission of Germany. H.P. Thier and H. Zeumer (eds). Vol. 1, Weinheim, New York.
- Djien, A.K. (1999), *Important developments in methods and techniques for the determination of dioxins and PCBs in foodstuffs and human tissues*, Trends in Anal. Chem., **18**, 499.
- Dogheim, S., Mohamed, E-Z., Alla, S.A.G., El-Saied, S., Emel, S.Y., Mohsen, A.M., Fahmy, S.M. (1996), *Monitoring of pesticide residues in human milk, soil, water and food samples collected from Kafr El-Zayat Governorate*, J. AOAC Int., **79**, 99.
- Dorgan, J.F., Brock, J.W., Rothman, N., Needham, L.L., Miller, R., Stephenson, H.E., Schussler, N., Taylor, P.R. (1999), *Serum organochlorine pesticides and PCBs and breast cancer risk: results from a prospective analysis (USA)*, Cancer Causes and Control, **10**, 1.

- Dreisbach, R.H. y Robertson, W.O. (1987), *Handbook of poisoning*, 12th ed., Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut.
- Dua, V.K., Pant, C.S., Sharma, V.P., Pathak, G.K. (1996), *Determination of HCH and DDT in finger-prick whole blood dried on filter paper and its field application for monitoring concentrations in blood*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **56**, 50.
- Edwards, J.W., Priestly, B.G. (1994), *Effect of occupational exposure to aldrin on urinary D-glucaric acid, plasma dieldrin, and lymphocyte sister chromatid exchange*, Int. Arch. Occup. Environ. Health, **66**, 229.
- Ernst, W.R., Doe, K.G. (1986), *A comparison of the aquatic toxicity of fenitrothion flowable and fenitrothion liquid technical formulations*, Water Pollut. Res. J. Canada, **29**, 553.
- Futagami, K., Narazaki, C., kataoka, Y., Shuto, H., Oishi, R. (1997), *Application of high-performance thin-layer chromatography for the detection of organophosphorus insecticides in human serum after acute poisoning*, J. Chromatogr. B, **704**, 369.
- García, J.P. y Herranz, P. (1987), *Salud y medio ambiente. Estrategias para la planificación regional*, Informes técnicos, Consejería de Salud y Bienestar Social, Comunidad de Madrid.
- Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L., Moreno Frías, M., Olea-Serrano, F., Olea, N. (2000), *Quantitative determination of endocrine-disrupting polychlorinated biphenyls and organochlorinated pesticides in human serum using gas chromatography with electron-capture detection and tandem mass spectrometry*, J. Mass Spectrom., **35**, 967.
- Georgellis, A., Kolmodin-Hedman, B., Kouretas, D. (1999), *Can traditional epidemiology detect cancer risks caused by occupational exposure to pesticides?*, J. Exp. Clin. Cancer Res., **18**, 159.

- Gill, U.S., Schwartz, H.M., Wheatley, B. (1996), *Development of a method for the analysis of PCB congeners and organochlorine pesticides in blood/serum*, Chemosphere, **32**, 1055.
- Gillespie, A.M., Daly, S.L., Gilvydis, D.M., Schneider, F., Walters, S.M. (1995), *Multicolumn solid phase extraction clean up of organophosphorus and organochlorine pesticide residues in vegetable oils and butterfat*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **78**, 431.
- Gillespie, A.M., Walters, S.M. (1986), *HPLC silica column fractionation of pesticides and PCB from butterfat*, J. Liq. Chromatogr., **9**, 2111.
- Gillespie, A.M., Walters, S.M. (1989), *Semi-preparative reverse phase HPLC fractionation of pesticides from edible fats and oils*, J. Liq. Chromatogr., **12**, 1687.
- Gisbert, J.A. y Villanueva E. (1991), *Intoxicaciones por plaguicidas*. En: J.A. Gisbert, *Medicina Legal y Toxicología*, 4th ed., MASSON-SALVAT MEDICINA, S.A., Barcelona.
- Gladen, B.C., Monaghan, S.C., Lukyanova, E.M., Hulchiy, O.P., Shkyryak-Nyhyk, Z.A. (1999), *Organochlorines in breast milk from two cities in Ukraine*, Environ. Health Perspectives, **10**, 459.
- Gmeiner, G., Krassnig, C., Schmid, E., Tausch, H. (1998), *Fast screening method for the profile analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine using derivatisation solid phase microextraction*, J. Chromatogr. B, **705**, 132.
- Gómez-Catalán, J., Planas, J., To-Figueras, J., Camps, M., Corbella, J. (1993), *Organochlorine pesticide residues in the population of Catalonia (Spain)*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **51**, 160.

- Gort, S.M., van der Hoff, R., Baumann, R.A., van Zoonen, P., Martin-Moreno, J.M., van't Veer, P. (1997), *Determination of p,p'-DDE and PCBs in adipose tissues using high performance liquid chromatography coupled on line to capillary GC- The EURAMIC study*, J. High Resol. Chromatogr., **20**, 138.
- Grimalt, J.O., Sunyer, J., Moreno, V., Amaral, O.C., Sala, M., Rosell, A., Anto, J.M., Albaiges, J. (1994), *Risk excess of soft-tissue sarcoma and thyroid cancer in a community exposed to airborne organochlorinated compound mixtures with a high hexachlorobenzene content*, Int. J. Cancer, **56**, 200.
- Grimvall, E., Rylander, L., Nilsson-Ehle, P., Nilsson, U., Strömberg, U., Hagmar, L., Östman, C. (1997), *Monitoring of polychlorinated biphenyls in human blood plasma: methodological developments and influence of age, lactation, and fish consumption*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **32**, 329.
- Grob, K., Kalin, I. (1991), *Attempt for an on-line size exclusion chromatography-gas chromatography method for analyzing pesticide in foods*, J. Agric. Food Chem., **39**, 1950.
- Guan, F., Watanabe, K., Ishii, A., Seno, H., Kumazawa, T., Hattori, H., Suzuki, O. (1998), *Headspace solid phase microextraction and gas chromatographic determination of dinitroaniline herbicides in human blood, urine and environmental water*, J. Chromatogr. B, **714**, 205.
- Guardino, X., Serra, C., Obiols, J., Rosell, M.G., Berenguer, M.J., López, F., Brosa, J. (1996), *Determination of DDT and related compounds in blood samples from agricultural workers*, J. Chromatogr. A, **719**, 141.
- Haglund, P., Asplund, L., Jarnberg, U., Jansson, B. (1990), *Isolation of mono- and non-ortho polychlorinated biphenyls from biological samples by electron-donor acceptor high-performance liquid chromatography using a 2-(1-pyrenyl) ethyldimethylsilylated silica column*, Chemosphere, **20**, 887.

- Hernández, F., López, F.J., Medina, J., Barberá, J.C. (1987), *Sulfuric acid clean-up and KOH-ethanol treatment for confirmation of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls: application to wastewater samples*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **70**, 727.
- Hernández, F., Serrano, R., Beltran, J., López, F.J. (1996), *Comparison of cleanup techniques for simple method for analysis of selected organophosphorus pesticide residues in molluscs*, J. AOAC Int., **79**, 123.
- Hernández, F., Beltran, J., Lopez, J.F., Gaspar, J.V. (2000a), *Use of solid phase microextraction for the quantitative determination of herbicides in soil and water samples*, Anal. Chem., **72**, 2313.
- Hernández, F., Serrano, R., Roig-Navarro, A., Martínez-Bravo, Y., López, F.J. (2000b), *Persistent organochlorines and organophosphorus compounds and heavy elements in common whale (Balaenoptera physalus) from the Western Mediterranean Sea*, Mar. Poll. Bull., **40**, 426
- Hernández, F., Pitarch, E., Beltran, J., López, F.J. (en prensa 1), *Headspace solid phase microextraction in combination with gas chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in whole human blood*, J. Chromatogr. B.
- Hernández, F., Pitarch, E., Serrano, R., Gaspar, J.V., Olea, N. (en prensa 2), *Multiresidue determination of endosulfan and metabolic derivatives in human adipose tissue using automated liquid chromatography clean up and gas chromatography analysis*, J. Anal. Toxicol.
- Hernández, F., Pitarch, E., Serrano, R., Guerrero, C. (enviado), *Determination of organochlorine compounds in human adipose tissue using automated liquid chromatography clean up and gas chromatography analysis coupled to tandem mass spectrometry*, Chromatographia.

- Hill, R.H., Shealy, D.B., Head, S.L., Williams, C.C., Bailey, S.L., Gregg, M., Baker, S.E., Needham, L.L. (1995), *Determination of pesticide metabolites in human urine using an isotope dilution technique and tandem mass spectrometry*, J. Anal. Toxicol., **19**, 323.
- Hogendoorn, E.A., van der Hoff, G.R., van Zoonen, P. (1989), *Automated sample clean-up and fractionation of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human milk using NP-HPLC with column switching*, J. High Res. Chrom., **12**, 784.
- Hong, C.S., Bush, B., Xiao, J., Fitzgerald, E.F. (1992), *Isolation and determination of mono-ortho and non-ortho substituted PCB (coplanar PCB) in human milk by HPLC on porous graphitic carbon and GC-ECD*, Chemosphere, **24**, 465.
- Hopper, M.L., Griffitt, K.K. (1987), *Evaluation of an automated gel permeation clean up and evaporation systems for determining pesticide residues in fatty samples*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **70**, 724.
- Huckle, K.R. y Millburn, P. (1990), *Metabolism, bioconcentration and toxicity of pesticides in fish*. En: Progress in Pesticides, Biochemistry and Toxicology, vol. 7, *Environmental Fate of Pesticides*, D.H. Hutson and T.R. Roberts (eds.), John Wiley & Sons, Chichester.
- Hutson, D.H., Paulson, G.D. (1995), *The mammalian metabolism of agrochemicals*, Volumen 8, John Wiley & Sons, Chichester.
- Hyvönen, H., Auvinen, T., Riekkola, M-L., Himberg, K. (1992), *Determination of single PCB congeners in fish by on-line LC-GC*, J. Microcol. Sep., **4**, 123.
- Jaga, K. (2000), *What are the implications of the interaction between DDT and estrogen receptors in the body?*, Medical Hypotheses, **54**, 18.

- Janák, K., Jensen, E., Becher, G. (1999), *Determination of polychlorinated biphenyls in human blood by solid-phase extraction including on-column lipid decomposition*, J. Chromatogr., **734**, 219.
- Johnson-Thompson, M.C., Guthrie, J. (2000), *Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma*, Cancer Supplement, **88**, 1224.
- Johnston J.J., Petty, E.E., Volz, S.A.. (1997), *Solid phase extraction GC/ECD method for the analysis of organochlorine pesticides in wildlife plasma*, J. High Resol. Chromatogr., **20**, 405.
- Junting, L., Chuichang, F. (1991), *Solid phase extraction method for rapid isolation and clean up of some synthetic pyrethroid insecticides from human urine and plasma*, Forensic Sci. Int., **51**, 89.
- Klimmer, O.R. (1967), *Plaguicidas: toxicología, sintomatología y terapia*, Ediciones Oikos-Tau, S.A., Barcelona.
- Kocan, A., Petrík, J., Drobná, B., Chovancová, J. (1994), *Levels of PCBs and some organochlorine pesticides in the human population of selected areas of the Slovak Republic. I. Blood*, Chemosphere, **29**, 2315.
- Koster, E.H.M., Hofman, N.S.K., de Jong, G.J. (1998), *Direct solid phase microextraction combined with gas and liquid chromatography for the determination of lidocaine in human urine*, Chromatographia, **47**, 678.
- Krogh, M., Grefslie, H., Rasmussen, K.E. (1997), *Solvent modified solid phase microextraction for the determination of diazepam in human plasma samples by capillary gas chromatography*, J. Chromatogr. B, **689**, 357.
- Kühn, K.H., Leng, G., Bucholski, K.A., Dunemann, L., Idel, H. (1996), *Determination of pyrethroid metabolites in human urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry*, Chromatographia, **43**, 28.

- Kumazawa, T., Sato, K., Seno, H., Ishii, A., Suzuki, O. (1996), *Extraction of local anaesthetics from human blood by direct immersion solid phase microextraction (SPME)*, *Chromatographia*, **43**, 59.
- Laden, F., Hankinson, S.E., Wolff, M.S., Colditz, G.A., Willett, W.C., Speizer, F.E., Hunter, D.J. (2001), *Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer: and extended follow-up in the nurses' health study*, *Int. J. Cancer*, **91**, 568.
- Lee, X.-P., Kumazawa, T., Sato, K., Suzuki, O. (1996), *Detection of organophosphate pesticides in human body fluids by headspace solid-phase microextraction (SPME) and capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection.*, **42**, 135.
- Lee, J.S., Tanabe, S., Umnio, H., Tatsukawa, R., Loughlin, T.R., Calkins, D.C. (1997), *Organochlorine residues in deep-sea organisms from Suruga Bay, Japan*, *Mar. Pollut. Bull.*, **32**, 535.
- Lee, X-P., Kumazawa, T., Sato, K., Seno, H., Ishii, A., Suzuki, O. (1998), *Improved extraction of ethanol from human body fluids by headspace solid phase microextraction with a carboxen-polydimethylsiloxane coated fiber*, *Chromatographia*, **47**, 593.
- Leng, G., Kühn, K.H., Leng, A., Gries, W., Lewalter, J., Idel, H. (1997), *Determination of trace levels of pyrethroid metabolites in human urine by capillary gas chromatography high resolution mass spectrometry with negative chemical ionization*, *Chromatographia*, **46**, 265.
- Liu, J., Suzuki, O., Kumazawa, T., Seno, H. (1989), *Rapid isolation with Sep-Pak C₁₈ cartridges and wide bore capillary gas chromatography of organophosphates pesticides*, *Forensic Science International*, **41**, 67.
- López, F., Obiols, J., Subías, P.J. (1998), *Plaguicidas agrícolas y salud*. En: *Plaguicidas. Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos*, Morell, I. y Candela, L. (eds), Publicaciones de la Universitat Jaume I, Castelló de la Plana.

- López, F.J., Pitarch, E., Egea, S., Beltran, J., Hernández, F. (2001), *Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluids using solid phase microextraction*, Anal. Chim. Acta, **433**, 217.
- Luan, T., Li, G., Zhao, M., Zhang, Z. (2000), *Rapid detection of tetramethylenedisulfotetramine in human blood by solid phase microextraction/gas chromatography*, Anal. Chim. Acta, **404**, 329.
- Ludwicki, J.K., Góralczyk, K. (1994), *Organochlorine pesticides and PCBs in human adipose tissues in Poland*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **52**, 400.
- Luo, X.W., Foo, S.C., Ong, H.Y. (1997), *Serum DDT and DDE levels in Singapore general population*, Sci. Total Environ., **208**, 97.
- Macintosh, D.L., Needham, L.L., Hammerstrom, K.A., Ryan, P.B. (1999), *A longitudinal investigation of selected pesticide metabolites in urine*, J. Exposure Analysis Environ. Epidemiol., **9**, 494.
- Maddy, K.T., Knaak, J.B., Gibbons, D.B. (1986), *Monitoring the urine of pesticide applicators in California for residues of chlordimeform and its metabolites 1982-1985*, Toxicology Letters, **33**, 37.
- Maroni, M., Catenacci, G., Galli, D., Cavallo, D., Ravazzani, G. (1990), *Biological monitoring of human exposure to acephate*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **19**, 782.
- Marquis, P.J., Hanson, R.L., Larsen, M.L., DeVita, W.M., Butterworth, B.C., Kuehl, D.W. (1994), *Analytical methods for a national study of chemical residues in fish. II: Pesticides and Polychlorinated biphenyls*, Chemosphere, **29**, 509.
- Marrs, T.C. (1993), *Organophosphate poisoning*, Pharmacology and Therapeutics, **58**, 51.

- Martínez Vidal, J.L., Arrebola, F.J., Fernández Gutiérrez, A., Rams, M.A. (1998), *Determination of endosulfan and its metabolite in human urine using gas chromatography tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. B, **719**, 71
- Martínez Vidal, J.L., Moreno Frías, M., Garrido Frenich, A., Olea-Serrano, F., Olea, N. (2000), *Trace determination of α - and β -endosulfan and three metabolites in human serum by gas chromatography electron capture detection and gas chromatography tandem mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom., **14**, 939.
- Matos Lino, C., Ferreira Azzolini, C.B., Valente Nunes, D.S., Rocha Silva, J.M., Noronha da Silveira M.I. (1998), *Methods for the determination of organochlorine pesticide residues in human serum*, J. Chromatogr. B, **716**, 147.
- Millburn P. (1995), *The fate of xenobiotics in mammals: biochemical processes*. En: Progress in Pesticides, Biochemistry and Toxicology, vol. 8, *The mammalian metabolism of agrochemicals*, D.H. Hutson and G.D. Paulson (eds.), John Wiley & Sons, Chichester.
- Minelli, E.V., Ribeiro, M.L. (1996), *Quantitative method for the determination of organochlorine pesticides in serum*, J. Anal. Toxicol., **20**, 23.
- Miyahara, M., Okada, Y., Takeda, H., Aoki, G., Kobayashi, A., Saito, Y. (1994), *Multiresidue procedures for the determination of pesticides in food using capillary gas chromatographic, flame photometric and mass spectrometric techniques*, J. Agric. Food Chem., **42**, 2795.
- Moriya, F., Hashimoto, Y. (1999), *Comparative studies on tissue distributions of organophosphorus, carbamate and organochlorine pesticides in decedents intoxicated with these chemicals*, J. Forensic Sci., **44**, 1131.
- Mostert, I.A., Ramsteiner, K.A. (1989), *Coupled high-performance liquid chromatography-gas chromatography for the determination of pesticide residues in biological matrices*, J. Chromatogr., **477**, 359.

- Murphy, P.G. (1971), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **55**, 1360. En: Hernández, F., López, F.J., Medina, J., Barberá, J.C. (1987), *Sulfuric acid clean-up and KOH-ethanol treatment for confirmation of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls: application to wastewater samples*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 727.
- Musshoff, F., Junker, H., Madea, B. (1999), *Rapid analysis of parathion in biological samples using headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS)*, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **37**, 639.
- Nakagawa, R., Hirakawa, H., Hori, T. (1995), *Estimation of 1992-1993 dietary intake of organochlorine and organophosphorus pesticides in Fukuoka, Japan*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **78**, 921.
- Najam, A.R., Korver, M.P., Williams, C.C., Burse, V.W., Needham, L.L. (1999), *Analysis of a mixture of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in human serum by column fractionation and dual-column capillary gas chromatography with electron capture detection*, *J. AOAC Int.*, **82**, 177.
- Namera, A., Yashiki, M., Nagasawa, N., Iwasaki, Y., Kojima, T. (1997), *Rapid analysis of malathion in blood using head space solid phase microextraction and selected ion monitoring*, *Forensic Sci. Int.*, **88**, 125.
- Namera, A., Yashiki, M., Kojima, T., *Analysis of drugs in biological fluids using SPME*. EN: Pawliszyn, P. (1999), *Applications of solid phase microextraction*, RSC Chromatography Monographs, Canada.
- Namera, A., Yashiki, M., Liu, J., Okajima, K., Hara, K., Imamura, T., Kojima, T. (2000), *Simple and simultaneous analysis of fenfluramine, amphetamine and methamphetamine in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry after headspace-solid phase microextraction and derivatization*, *Forensic Sci. Int.*, **109**, 215.

- Natangelo, M., Tavazzi, S., Fanelli, R., Benfenati, E. (1999), *Analysis of some pesticides in water samples using solid phase microextraction gas chromatography with different mass spectrometric techniques*, J. Chromatogr. A, **859**, 193.
- Noble, A. (1993), *Partition coefficients (n-octanol-water) for pesticides*, J. Chromatogr., **642**, 3.
- Obiols, J. (1998), *Control biológico de los trabajadores expuestos a contaminantes químicos*, Edita Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Madrid.
- Okeyo, P., Rentz, S.M., Snow, N.H. (1997), *Analysis of steroids from human serum by SPME with headspace derivatization and GC/MS*, J. High Resol. Chromatogr., **20**, 171.
- Olea, N., Molina, M.J., García.Martin, M., Olea-Serrano, F. (1996), *Modern agricultural practices: the human price*, Comments Toxicology, **5**, 455.
- Olea, N., Olea-Serrano, F. (1996), *Oestrogens and the environment*, Eur. J. cancer Prevent., **5**, 491.
- Otero, R., Santiago-Silva, M., Grimalt J.O. (1997), *Hexachlorocyclohexanes in human blood serum*, J. Chromatogr. A, **778**, 87.
- Page, B.D., Lacroix, G. (1997), *Application of solid phase microextraction to the headspace gas chromatographic analysis of semi-volatile organochlorine contaminants in aqueous matrices*, J. Chromatogr. A, **757**, 173.
- Pauwels, A., Wells, D.A., Covaci, A., Schepens, P.J.C. (1999), *Improved sample preparation method for selected persistent organochlorine pollutants in human serum using solid phase disk extraction with gas chromatographic analysis*, J. Chromatogr. B, **723**, 117.
- Pawliszyn, J. (1997), *Solid phase microextraction. Theory and practice*, Wiley VCH, Inc., Canada.

- Pawliszyn, J. (1999), *Applications of solid phase microextraction*, RSC Chromatography Monographs, Canada.
- Petty, E.E., Johnston, J.J., Volz, S.A. (1997), *Solid phase extraction method for the quantitative analysis of organochlorine pesticides in wildlife urine*, J. Chromatogr. Sci., **35**, 430.
- Pitarch, E., López, F.J., Serrano, R., Hernández, F. (2001), *Multiresidue determination of organophosphorus and organochlorine in human biological fluids by capillary gas chromatography*, Fresenius J. Anal. Chem., **369**, 502.
- Porta, M., Malats, N., Jarrod, M., Grimalt, J.O., Rifà, J., Carrato, A., Guarner, L., Salas, A., Santiago-Silva, M., Corominas, J.M., Andreu, M., Real, F.X. (1999), *Serum concentrations of organochlorine compounds and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer*, The Lancet, **354**, 2125.
- Poustka, J., Hajslová, J., Holadová, K. (1994), *The comparison of elution profiles of polychlorinated biphenyls and fats in various gel permeation chromatographic systems*, Intern. J. Environ. Anal. Chem., **57**, 83.
- Primo, E. y Carrasco, J.M. (1986), *Química agrícola II. Plaguicidas y fitorreguladores*, Editorial Alhambra, S.A., Madrid.
- Quinsey, P.M., Donohue, D.C., Ahokas, J.T. (1995), *Persistence of organochlorines in breast milk of women in Victoria, Australia*, Fd. Chem. Toxic., **33**, 49.
- Real Decreto (3349) de 30 Noviembre 1983, publicado en el “Boletín Oficial del Estado” del 24 Enero 1984. En: Barberá, C. (1989), *Pesticidas agrícolas*, Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- Rivas, A., Olea, N., Olea-Serrano, F. (1997), *Human exposure to endocrine disrupting chemicals: assessing the total estrogenic xenobiotic burden*, Trends in Anal. Chem., **16**, 613.

- Rohrbaugh, D.K., Sarver, E.W. (1998), *Detection of alkyl methylphosphonic acids in complex matrices by gas chromatography tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **809**, 141.
- Röhrig, L., Püttmann, M., Meisch, H-U. (1998), *Determination of persistent organochlorine compounds in blood by solid phase micro extraction and GC-ECD*, Fresenius J. Anal. Chem., **361**, 192.
- Roma, F.J., Fernandes, I., Santos, E., Baptista, I., Barretto, H.H.C., Kussumi, T.A. (1998), *Levels of organochlorine pesticides in the blood serum of agricultural workers from Rio de Janeiro, Brazil*, Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, **14**, 33.
- Rosell, M.G., Obiols, J., Berenguer, M.J., Guardino, X. (1993), *Determination of chlorinated insecticides in blood samples of agricultural workers*, J. Chromatogr. A, **665**, 151.
- Sala, M., Sunyer, J., Otero, R., Santiago-Silva, M., Ozalla, D., Herrero, C., To-Figueras, J., Kogevinas, M., Anto, J.M., Camps, C., Grimalt; J. (1999), *Health effects of chronic high exposure to hexachlorobenzene in a general population sample*, Arch. Environ. Health, **54**, 102.
- Schecter, A., Toniolo, P., Dai, L.C., Thuy, L.T.B., Wolff, M.S. (1997), *Blood levels of DDT and breast cancer risk among women living in the north of Vietnam*, Arch. Environ. Contam. Toxicol, **33**, 453.
- Scheppers Wercinski, S.A. (1999), *Solid phase microextraction. A practical guide*, Marcel Dekker, Inc., California.
- Serrano, R., López, F.J., Hernández, F. (1999), *Multiresidue determination of persistent organochlorine and organophosphorus compounds in whale tissues using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatographic-mass spectrometric detection*, J. Chromatogr. A, **855**, 633.

- Singh, A.K., Spassova, D., White, T. (1998), *Quantitative analysis of polychlorinated biphenyls, organochlorine insecticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated hydrocarbons and polynitrohydrocarbons in spiked samples of soil, water and plasma by selected-ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry*, J, Chromatogr. B, **706**, 231.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernández, M.F., Olea, N., Olea-Serrano, F. (1995), *The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants*, Environ. Health Perspect., **103**, 113.
- Su, P-G., Huang, S-D. (1999), *Determination of organophosphorus pesticides in water by solid phase microextraction*, Talanta, **49**, 393.
- Suzuki, O., Hattori, H., Liu, J., Seno, H., Kumazawa, T. (1990), *Positive and negative ion mass spectrometry and rapid clean up of some carbamate pesticides*, Forensic Sci. International, **46**, 169.
- Takamiya, K. (1994), *Monitoring of urinary alkyl phosphates in pest control operators exposed to various organophosphorus insecticides*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **52**, 190.
- Takekawa, K., Oya, M., Kido, A., Suzuki, O. (1998), *Analysis of cyanide in blood by headspace solid phase microextraction (SPME) and capillary gas chromatography*, Chromatographia, **47**, 209.
- To-Figueras, J., Sala, M., Otero, R., Barrot, C., Santiago-Silva, M., Rodamilans, M., herrero, C., Grimalt, J., Sunyer, J. (1997), *Metabolism of hexachlorobenzene in humans: association between serum levels and urinary metabolites in a highly exposed population*, Environ. Health Perspectives, **105**, 78.
- Tomlin, C.D.S. (1997), *The Pesticide Manual*, 11th ed., British Crop Protection Council.

- Tuinstra, L.G.M.T., Van-Rhijn, J.A., Roos, A.H., Traag, W.A., Van-Mazijk, R.J., Kolkman, P.J.W. (1990), *Determination of planar chlorobiphenyls in animal fat*, J. High Resol. Chromatogr., **13**, 797.
- Ulrich, S., Martens, J. (1997), *Solid phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective detection for the assay of antidepressant in human plasma*, J. Chromatogr B, **696**, 217.
- UNEP (1991), *Assessment of the state of pollution of the Mediterranean sea by organophosphorus compounds*, M.A.P., Technical Reports Series, 58, UNEP, Athens.
- UNEP/POPS/CONF/4 (5 Junio, 2001), Conferencia de Plenipotenciarios para el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, Estocolmo.
- van der Hoff, G.R., Baumann, R.A., van Zoonen, P., Brinkman, A.A.T. (1997), *Determination of organochlorine compounds in fatty matrices: application of normal-phase LC clean-up coupled on-line to GC/ECD*, J. High Resol. Chromatogr., **20**, 222.
- Waliszewski, S.M., Szymczynski, G.A. (1991), *Persistent organochlorine pesticides in blood serum and whole blood*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **46**, 803.
- Walters, S.M. (1990), *Clean up techniques for pesticides in fatty foods*, Anal. Chim. Acta, **236**, 77.
- Wania, F., Mackay, D. (1993), *Global fractionation and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in polar regions*, Ambio, **22**, 10.
- Ware, G.W. (1983), *Pesticide theory and application*, W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Wells, D.E., Echarri, I. (1992), *Determination of individual chlorobiphenyls (CBs), including non-ortho and mono-ortho chloro substituted CBs in marine mammals from Scottish waters*, Int. J. Environ. Anal. Chem., **47**, 75.

CAPÍTULO 2

DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y
ORGANOCORADOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS HUMANOS MEDIANTE
EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES

2.1. Introducción

Esta primera parte experimental de la presente Memoria supuso el primer contacto de nuestro laboratorio con el análisis de muestras de fluidos biológicos. Por este motivo, se decidió utilizar, en primer lugar, técnicas convencionales de extracción en este tipo de matrices y, posteriormente, ir avanzando con técnicas más novedosas. Pero, tal y como se puede comprobar más adelante, no sólo se evolucionó en cuanto a la aplicación de la técnica de extracción, sino también en la introducción de sistemas de detección, cada vez más selectivos y sensibles (GC-MS y GC-MS/MS).

Típicamente, en extracciones multiresiduales, muchos autores tienden a aplicar un método “universal” o “general” con un simple paso de extracción con disolventes, o mediante SPE, debido a las diferentes propiedades físico-químicas de los analitos a determinar (Barr *et al.*, 1999). Este apartado va a tratar la LLE convencional, una de las técnicas más tradicionales para la extracción de plaguicidas en muestras de fluidos biológicos, y cuyos antecedentes ya han sido descritos en el capítulo anterior. Dados los bajos volúmenes de muestra y de disolventes empleados, en realidad se va a tratar de una **microextracción líquido-líquido (LLME)**, que permite reducir considerablemente el volumen de muestra y disolventes utilizados, lo cual supone una gran ventaja, teniendo en cuenta que la mayor limitación cuando se trabaja con muestras de fluidos biológicos es la poca cantidad disponible.

2.2. Experimental

En este apartado se pone a punto un procedimiento multiresidual sencillo para la determinación de plaguicidas OPs y OCs en muestras humanas de orina y suero mediante LLME.

En cuanto a los plaguicidas OPs seleccionados se incluyen un total de 10 compuestos, la mayoría de ellos ampliamente utilizados en las prácticas agrícolas de nuestra zona, sobre todo para combatir las plagas de los cítricos, tal y como se mostró en el capítulo anterior (apartado 1.6). Por otra parte, de entre los 16 plaguicidas OCs estudiados en este apartado, se encuentran los considerados prioritarios por la EPA (the Environmental Protection Agency). A esta lista de OCs, también se han añadido tres metabolitos de *endosulfan* (-éter, -lactona y -sulfato), que se excretan rápidamente en orina y heces, debido a la importancia actual de este compuesto puesto que todavía sigue estando en uso en la agricultura.

Una de las ventajas del procedimiento analítico desarrollado consiste en la instalación de un divisor de flujo en la columna analítica instalada en el GC, el cual dispone de dos detectores: ECD (más selectivo para compuestos OCs) y NPD (más selectivo para plaguicidas OPs). Esto permite obtener señales simultáneas en los dos detectores en una misma inyección de la muestra.

El presente apartado se ha estructurado del siguiente modo: en primer lugar, se describen detalladamente los reactivos, el material y el equipo instrumental utilizado; posteriormente, se resumen las principales experiencias realizadas para la aplicación de la técnica LLME, primero en muestras de orina y después en muestras de suero.

Las experiencias desarrolladas en este capítulo, junto a las efectuadas mediante SPE, se incluyen en el artículo científico correspondiente al apartado 3.2.6.

2.2.1. Reactivos, material y equipos instrumentales

Reactivos

- Patrones de plaguicidas OPs: *azinfos-metil, clorpirifos, diazinon, dimetoato, fenitrothion, fention, fosmet, malation, metidation* y *paration-metil* de 96.5-99.7% de pureza (Dr. Ehrenstorfer, Promochem, Wesel, Alemania).

Patrones de plaguicidas OCs: *aldrin, clorfenson, dieldrin, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, α - y β -endosulfan* y sus *metabolitos (-eter, -lactona y -sulfato)*, *endrin, α , β , γ y δ -HCH, HCB, heptaclor, heptacloro epóxido* y *metoxiclor* de 96.5-99.7% de pureza (Dr. Ehrenstorfer, Promochem, Wesel, Alemania).

Se prepararon por pesada disoluciones individuales stock de cada compuesto del orden de $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ en acetona, que se almacenaron en el congelador a -18°C . A partir de estas disoluciones individuales, se prepararon tres mezclas stock (aprox. $50 \mu\text{g ml}^{-1}$), una para OPs y otras dos para OCs, en acetona. Las disoluciones de trabajo se fueron preparando por dilución en acetona para fortificar las muestras de fluidos biológicos y en hexano para inyectar en el sistema cromatográfico.

- Disolventes orgánicos, calidad para análisis de residuos de plaguicidas (ARP): diclorometano, n-hexano y acetona (Scharlab, Barcelona, España).
- Agua calidad nanopure
- Sulfato sódico anhidro (ARP) (Scharlab, Barcelona, España), purificado en estufa a 300°C durante 18 h.

Material

- Material de vidrio: tubos, graduados de 15 ml y sin graduar, provistos de tapón de vidrio esmerilado, vasos de precipitados, pipetas Pasteur y tubos de rosca.

- Material volumétrico tipo A (pipetas, aforados, etc.).
- Bloque calefactor Multiblock, Selecta
- Agitador vibrador para tubos Reax 2000 (Vortex).
- Gases: Helio, nitrógeno e hidrógeno (99.9995% de calidad) y aire (99.995% de calidad), utilizados en el sistema cromatográfico fueron suministrados por Carburos Metálicos (Barcelona, España).

Muestras

- Las muestras de orina y suero usadas para la etapa de optimización fueron obtenidas de personas sanas, considerándolas población no-expuesta. Las muestras de sangre fueron recogidas por venipuncture haciendo uso de tubos separadores de sangre vacutainer (Brand). Se dejó que la sangre precipitara, y el suero fue extraído. Las muestras de suero fueron luego almacenadas a -18°C hasta su análisis.

Equipos instrumentales

- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 series II equipado con dos detectores (captura de electrones (ECD) y selectivo de nitrógeno-fósforo (NPD)), un autoinyector HP 7673 y una columna capilar de sílice fundida HP Ultra 2 (crosslinked 5% fenil-metil siloxano) 25 m x 0.25 mm d.i., 0.33 μm . Helio fue usado como gas portador a un flujo 1 ml min⁻¹. Temperatura del inyector, 270°C. Condiciones de ECD: temperatura 300°C, N₂ 60 ml min⁻¹. Condiciones de NPD: temperatura 270°C, He 30 ml min⁻¹, H₂ 3 ml min⁻¹, aire 100 ml min⁻¹. El programa de temperatura del horno fue programado de la siguiente manera: 90°C durante 1 min, a 30°C min⁻¹ hasta 150°C, a 3°C min⁻¹ hasta 270°C (0.5 min). Volumen de inyección, 2 μl usando autoinyector y modo *splitless*. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de patrón externo, y en el caso de plaguicidas OCs usando además patrón interno (*clorfenson*).

2.2.2. Análisis multiresidual en muestras de orina

Las etapas que se siguieron para la optimización de los procedimientos analíticos desarrollados en este capítulo se presentan a continuación.

Las primeras experiencias de aplicación de la técnica LLME se llevaron a cabo para **la determinación de los 10 plaguicidas OPs seleccionados** en muestras de orina humana, puesto que es una matriz que puede obtenerse con cierta facilidad y, normalmente, sin limitaciones en cuanto a la cantidad. Hay que destacar, que en el desarrollo del procedimiento LLME aplicado no se llevó a cabo ningún estudio comparativo de posibles disolventes orgánicos para la extracción, sino que se basó en un procedimiento previamente desarrollado en nuestro laboratorio, para la determinación de OPs en muestras de agua (López *et al.*, 1998) y en el cual se utilizó diclorometano (DCM) como mejor disolvente extractante de los compuestos estudiados. Además el utilizar una técnica de microextracción permitió trabajar con volúmenes adecuados para este tipo de muestras biológicas. De esta manera el procedimiento de extracción fue el siguiente: 5 ml de orina fueron extraídos dos veces con 5 ml de DCM mediante agitación en un Vortex durante 1 min. Para eliminar cualquier resto acuoso, la fase orgánica se pasó a través de una pipeta Pasteur rellena con aproximadamente 3 cm de sulfato sódico anhidro. Finalmente, el extracto fue concentrado mediante evaporación a aproximadamente 40°C bajo corriente de nitrógeno y redisolto en 1 ml de hexano.

A continuación, se procedió a la validación del método seleccionado evaluando los siguientes parámetros (los resultados se encuentran en el artículo científico de la sección 3.2.6):

Exactitud- fue estudiada mediante ensayos de recuperación analizando muestras de orina fortificadas a dos niveles de concentración (10 y 200 ng ml⁻¹).

Precisión- fue determinada como la repetibilidad en un mismo día (n=5) de las recuperaciones a cada nivel de fortificación ensayado.

Límites de detección (LD)- obtenidos cuando la señal fue 3 veces el ruido de fondo en el cromatograma correspondiente al nivel más bajo de concentración para el analito.

El siguiente paso fue aplicar el mismo procedimiento desarrollado a **la determinación de los compuestos OCs seleccionados** en muestras de orina. La validación del método también se llevó a cabo a los dos mismos niveles de concentración (200 ng ml⁻¹ y 10 ng ml⁻¹), pero sin embargo, la cuantificación fue ligeramente distinta: previamente al análisis por GC-ECD, se adicionó 200 µl de *clorfenson* a las muestras. Éste actuó como patrón interno para mejorar la precisión. En la **Tabla 2.1** se recogen las recuperaciones y los coeficientes de variación (CVs) de los OCs estudiados después de la aplicación de LLME a los dos niveles de concentración ensayados. Como puede observarse, aunque las recuperaciones fueron en la mayoría de los casos > 60%, se obtuvieron resultados aceptables para 10 compuestos, pero para el resto las recuperaciones, o bien fueron bajas, o los resultados no fueron consistentes.

Tabla 2.1. Recuperaciones y coeficientes de variación (%) (n =5) para plaguicidas OCs después de la aplicación del procedimiento LLME a muestras de orina.

Compuestos	200 ng ml ⁻¹	10 ng ml ⁻¹
α-HCH	65 (18)	105 (10)
HCB	<i>nr</i>	42 (24)
β-HCH	89 (1)	97 (15)
Lindano	<i>nr</i>	91 (12)
δ-HCH	107 (15)	119 (2)
Endosulfan-éter	59 (12)	73 (13)
Heptaclor	56 (13)	52 (9)
Aldrin	51 (11)	47 (8)
Endosulfan-lactona	86 (9)	94 (4)
Heptacloro epóxido	74 (3)	73 (13)
α-Endosulfan	76 (2)	72 (23)
Dieldrin	72 (1)	72 (12)
p,p'-DDE	52 (10)	43 (20)
Endrin	121 (2)	110 (4)
β-Endosulfan	83 (2)	77 (23)
p,p'-DDD	72 (4)	56 (9)
Endosulfan-sulfato	91 (3)	89 (4)
p,p'-DDT	67 (3)	41 (12)
Metoxiclor	89 (3)	77 (18)

nr no recuperado

A modo de ejemplo, la **Figura 2.1** muestra los cromatogramas correspondientes a una muestra de orina fortificada con OCs a un nivel de 10 ng ml⁻¹.

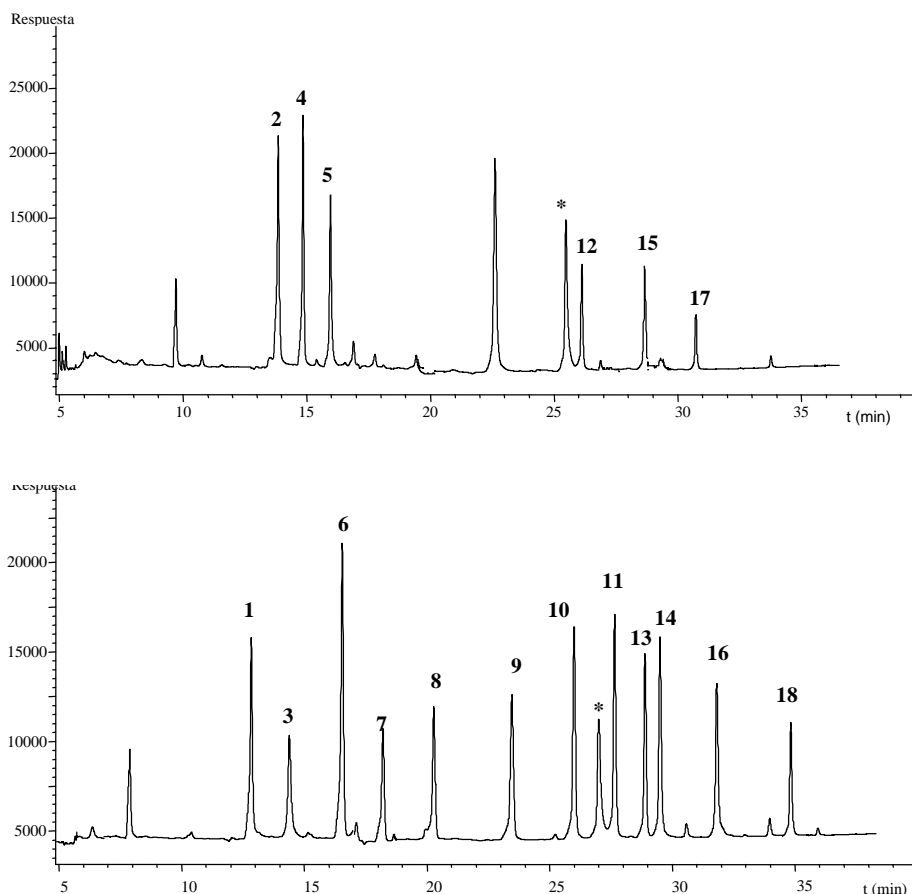


Figura 2.1. Cromatogramas GC-ECD obtenidos después de la aplicación del procedimiento de LLME a una muestra de orina fortificada a 10 ng ml^{-1} con las dos diferentes mezclas de plaguicidas OCs. (1) α -HCH, (2) HCB, (3) β -HCH, (4) lindano, (5) δ -HCH, (6) endosulfan-éter, (7) heptaclor, (8) aldrin, (9) heptacloro epóxido, (10) α -endosulfan, (11) dieldrin, (12) *p,p'*-DDE, (13) endrin, (14) β -endosulfan, (15) *p,p'*-DDD, (16) endosulfan-sulfato, (17) *p,p'*-DDT, (18) metoxiclor, (*) clorfenson, patrón interno

2.2.3. Análisis multiresidual en muestras de suero

Cuando se trabaja con muestras de suero, al igual que con muestras de plasma o sangre total, hay que considerar la limitación de la muestra disponible. Por este motivo, para desarrollar y optimizar el presente procedimiento multiresidual para analizar suero, el primer paso que se llevó a cabo fue el de obtener una mezcla

global y homogénea de varios sueros individuales para realizar las experiencias siempre con las mismas cualidades de matriz.

Los primeros ensayos para **la determinación de los plaguicidas OPs** en suero fueron aplicando las mismas condiciones que las utilizadas en orina. La experiencia resultó problemática por la formación de emulsiones debidas al alto contenido proteínico del suero y que impidieron llevar a cabo la extracción. Este problema también ha sido encontrado por muchos otros autores y así se refleja en la bibliografía (Waliszewski y Szymczynski, 1991; Chang *et al.*, 1993; Martínez Vidal *et al.*, 1998). Como consecuencia, fue necesario modificar el procedimiento de LLME: se diluyó la muestra (2 ml de suero + 3 ml de agua desionizada), con lo cual se disminuyó la complejidad de la matriz, y se adicionó un paso de centrifugación (durante 5 min) para romper las emulsiones.

A continuación, se procedió a la validación del método seleccionado evaluando los siguientes parámetros (resultados en el artículo científico de la sección 3.2.6):

Exactitud- fue estudiada mediante ensayos de recuperación analizando muestras de suero a dos niveles de concentración (25 y 500 ng ml⁻¹).

Precisión- fue determinada como la repetibilidad en un mismo día (n=5) de las recuperaciones a cada nivel de fortificación ensayado.

Límites de detección (LD)- obtenidos cuando la señal fue 3 veces el ruido de fondo en el cromatograma correspondiente al nivel más bajo de concentración para el analito.

Por último, el procedimiento desarrollado anteriormente se aplicó a **la determinación de los plaguicidas OCs** seleccionados. Pero los resultados obtenidos no fueron satisfactorios debido a las bajas recuperaciones obtenidas para algunos de los compuestos al nivel más alto estudiado de 500 ng ml⁻¹ (*heptaclor* (47%), *aldrin* (29%), *heptacloro epóxido* (61%), *α-endosulfan* (60%), *dieldrin* (54%), *p,p'-DDE* (18%), *p,p'-DDD* (34%), *p,p'-DDT* (25%), *metoxiclor* (36%)).

A la vista de los resultados obtenidos, puede concluirse que los procedimientos mediante LLME desarrollados en este apartado (a excepción del caso de plaguicidas OCs en suero) pueden resultar útiles como método de *screening* (con fines semicuantitativos), si bien puede que no sean tan apropiados para fines cuantitativos, posiblemente por su sencillez. Para mejorar las características analíticas sería necesario introducir etapas adicionales de tratamiento de muestra, lo cual alargaría el procedimiento y lo haría más tedioso y estaría expuesto a mayores posibilidades de error. Ante esta situación, otras alternativas más modernas, como SPE o SPME, podrían resultar más ventajosas, como se verá más adelante.

2.3. Referencias

- Barr, D.A., Barr, J.R., Driskell, W.J., Hill, R.H., Ashley, D.L., Needham, L.L., Head, S.L., Sampson, E.J. (1999), *Strategies for biological monitoring of exposure for contemporary use pesticides*, Toxicol. Industrial Health, **15**, 168.
- Chang, R.R., Jarman, W.M., Hennings, J.A. (1993), *Sample cleanup by solid-phase extraction for the ultratrace determination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in biological samples*, Anal. Chem., **65**, 2420.
- López, F.J., Beltran, J., Forcada, M., Hernández, F. (1998), *Comparison of simplified methods for pesticide residue analysis. Use of large-volume injection in capillary gas chromatography*, J. Chromatogr A, **823**, 25.
- Martínez Vidal, J.L., Arrebola, F.J., Fernández-Gutiérrez, A., Rams, M.A. (1998), *Determination of endosulfan and its metabolites in human urine using gas chromatography-tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. B, **719**, 71.
- Waliszewski, S.M., Szymczynski, G.A. (1991), *Persistent organochlorine pesticides in blood serum and whole blood*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **46**, 803.

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y
ORGANOCORADOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS HUMANOS MEDIANTE
EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

3.1. Introducción

El siguiente paso, después de la aplicación de la LLME, consistió en el desarrollo de un método multiresidual basado en la **extracción en fase sólida (SPE)** para la determinación de plaguicidas en muestras de fluidos biológicos.

Debido a su fácil automatización, la SPE ha crecido rápidamente, particularmente en el análisis de alimentos y de muestras de interés medioambiental, en donde bajas concentraciones de analito pueden ser concentradas a partir de grandes volúmenes de muestra. Aunque estas ventajas no sean del todo aplicables para el caso de muestras de fluidos biológicos, la SPE resulta adecuada para estas matrices principalmente por su selectividad y la obtención de extractos limpios, el ahorro de disolventes y, especialmente, la ausencia de emulsiones.

En esta técnica, los plaguicidas son retenidos en una fase adsorbente adecuada que se encuentra empaquetada en columnas o cartuchos de extracción, a través de los cuales se hace pasar la muestra. Aunque comercialmente existe una gran diversidad de materiales que pueden utilizarse como adsorbentes, las sílices enlazadas, sobre todo C₁₈, son las fases que más se utilizan en el análisis de residuos de plaguicidas en muestras biológicas.

La calidad de la extracción en SPE depende del disolvente utilizado en la elución, el volumen de muestra usado, el flujo y el pH. Evidentemente, no existe un sistema único que pueda ser aplicado para un gran número de compuestos. Recientemente, se han ensayado columnas conteniendo diferentes adsorbentes para aumentar el rango de aplicación de la SPE en el análisis de plaguicidas.

3.2. Experimental

En este apartado se pone a punto un procedimiento multiresidual para la determinación de plaguicidas OPs y OCs en muestras humanas de orina y suero mediante SPE.

Se han investigado los mismos plaguicidas OPs (10 compuestos) y OCs (19 compuestos) estudiados en el capítulo anterior siguiendo los mismos criterios de selección.

La determinación de los plaguicidas se lleva a cabo mediante GC, y en nuestro caso concreto con la instalación de un divisor de flujos que permite la obtención de señales simultáneas en el cromatógrafo provisto de dos detectores: ECD y NPD, tal y como ya se comentó en el apartado anterior. Por lo que respecta a las experiencias de optimización del método se ha hecho uso de estos detectores, pero cuando se aplica a muestras reales, la confirmación y cuantificación de los analitos detectados en ECD o NPD se ha llevado a cabo con un detector más selectivo de masas (GC-MS) para evitar falsos positivos.

El presente apartado se ha estructurado del siguiente modo: en primer lugar, se describen detalladamente los reactivos, el material y el equipo instrumental utilizado; en segundo lugar, se incluye un estudio de la estabilidad de los plaguicidas OPs y OCs en este tipo de muestras; y finalmente, se resumen las principales experiencias realizadas para la aplicación de la técnica SPE, primero a muestras de orina y después a muestras de suero.

Los resultados obtenidos se resumen en el artículo científico:

- “Multiresidue determination of organophosphorus and organochlorine pesticides in human biological fluids by capillary gas chromatography”

Fresenius J. Anal. Chem. , 369, 502-509 (2001)

3.2.1. Reactivos, material y equipos instrumentales

Reactivos

- Patrones de plaguicidas OPs: *azinfos-metil, clorpirifos, diazinon, dimetoato, fenitroton, fention, fosmet, malation, metidation y paration-metil* de 96.5-99.7% de pureza (Dr. Ehrenstorfer, Promochem, Wesel, Alemania).

Patrones de plaguicidas OCs: *aldrin, clorfenson, dieldrin, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, α - y β -endosulfan* y sus *metabolitos (-eter, -lactona y -sulfato), endrin, α , β , γ y δ -HCH, HCB, heptaclor, heptacloro epóxido y metoxiclor* de 96.5-99.7% de pureza (Dr. Ehrenstorfer, Promochem, Wesel, Alemania).

Se prepararon por pesada disoluciones individuales stock de cada compuesto del orden de $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ en acetona, que se almacenaron en el congelador a -18°C . A partir de estas disoluciones individuales, se prepararon tres mezclas stocks (aprox. $50 \mu\text{g ml}^{-1}$), una para OPs y otras dos para OCs, en acetona. Las disoluciones de trabajo se fueron preparando por dilución en acetona para fortificar las muestras de fluidos biológicos y en hexano para inyectar en el sistema cromatográfico.

- Disolventes orgánicos, calidad para análisis de residuos de plaguicidas (ARP): acetonitrilo, acetona, acetato de etilo, diclorometano, metanol, n-hexano y metil tert-butil éter (Scharlab, Barcelona, España).
- Agua calidad nanopure

Material

- Material de vidrio: tubos graduados de 15 ml y sin graduar, provistos de tapón de vidrio esmerilado, vasos de precipitados, pipetas Pasteur y tubos de rosca.
- Material volumétrico tipo A (pipetas, aforados, etc.)
- Bloque calefactor Multiblock, Selecta

- Agitador vibrador para tubos Reax 2000 (Vortex).
- Cartuchos para Extracción en Fase Sólida de 6 ml con relleno de 500 mg de C₁₈ (Varian, Harbor City, CA, USA).
- Sistema de preparación de muestras por SPE (Varian, Harbor City, California, USA), equipado con bomba de vacío.
- Gases: Helio, nitrógeno e hidrógeno (99.9995% de calidad) y aire (99.995% de calidad), utilizados en el sistema cromatográfico fueron suministrados por Carburos Metálicos (Barcelona, España).

Muestras

- Las muestras de orina y suero utilizadas para la etapa de optimización, fueron obtenidas de personas sanas, considerándolas población no-expuesta. Las muestras de sangre fueron recogidas por venipuncture haciendo uso de tubos separadores de sangre vacutainer (Brand). Se dejó que la sangre precipitara, y el suero fue extraído. Las muestras de suero fueron luego almacenadas a -18°C hasta su análisis.

Equipos instrumentales

- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 series II equipado con dos detectores (ECD y NPD), un autoinyector HP 7673 y una columna capilar de sílice fundida HP Ultra 2 (crosslinked 5% fenil-metil siloxano) 25 m x 0.25 mm d.i., 0.33 μm. Helio fue usado como gas portador a un flujo 1 ml min⁻¹. Temperatura del inyector, 270°C. Condiciones de ECD: temperatura 300°C, N₂ 60 ml min⁻¹. Condiciones de NPD: temperatura 270°C, He 30 ml min⁻¹, H₂ 3 ml min⁻¹, aire 100 ml min⁻¹. El programa de temperatura del horno fue programado de la siguiente manera: 90°C durante 1 min, a 30°C min⁻¹ hasta 150°C, a 3°C min⁻¹ hasta 270°C (0.5 min). Volumen de inyección, 2 μl usando autoinyector y modo *splitless*. La cuantificación se llevó a cabo

mediante el método de patrón externo, y en el caso de OCs utilizando además patrón interno (*clorfenson*).

- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 series II equipado con detector selectivo de masas MSD 5971, *splitless* autoinyector HP 7673 y columna capilar HP Ultra 2 similar a la anterior. Se usaron las mismas condiciones que para GC-ECD/NPD, excepto que el flujo del gas portador fue de 0.5 ml min^{-1} . Las características del detector de masas fueron: modo de impacto (70 eV) con un multiplicador de voltaje de 1659; temperatura de la línea de transferencia 280°C ; rango de masas para las experiencias en *full scan* 50-500 m/z . El análisis se llevó a cabo mediante el modo de detección selectiva de iones (SIM).

3.2.2. Estabilidad de los plaguicidas organofosforados en orina y suero

Por el interés en conocer el tiempo de almacenamiento de las muestras de orina y suero en nevera (4 °C) antes de su análisis, se procedió a estudiar la estabilidad de los plaguicidas OPs seleccionados en muestras fortificadas a un nivel de concentración de 200 ng ml⁻¹. En el caso de *fention* y *clorpirifos*, el estudio sólo se realizó para uno puesto que su resolución en los cromatogramas no fue satisfactoria, y por este motivo se eligió *clorpirifos* por su mayor interés en la agricultura de la zona Mediterránea. El tiempo de estudio fue de un mes, durante el cual se hicieron análisis por triplicado mediante el procedimiento optimizado de SPE en el primer día, considerado como día 0, y posteriormente al cabo de 3, 7, 14, 22 y 30 días. Las **Figuras 3.1** y **3.2** muestran los resultados obtenidos en las muestras fortificadas de orina y suero, respectivamente.

Como se observa en la **Figura 3.1**, todos los compuestos OPs presentaron el mismo comportamiento en orina puesto que el perfil de la curva fue semejante para todos ellos. Sólo fueron estables durante los 3 primeros días presentando una fuerte reducción de la concentración entre los días 3 y 7. Sin embargo, en el suero el comportamiento resultó más variado: la concentración de *diazinon* se mantuvo prácticamente constante durante el período de estudio de 30 días; *malation* y *fosmet* tuvieron pérdidas considerables incluso después del tercer día de almacenamiento; y el resto de OPs permanecieron estables en suero durante 7 días, aunque se observaron disminuciones en las recuperaciones. Como se puede observar, a excepción de *malation* y *fosmet*, los plaguicidas OPs resultaron, en general, algo más estables que en orina, posiblemente debido al mayor contenido lipídico en suero, que puede contribuir a aumentar su estabilidad.

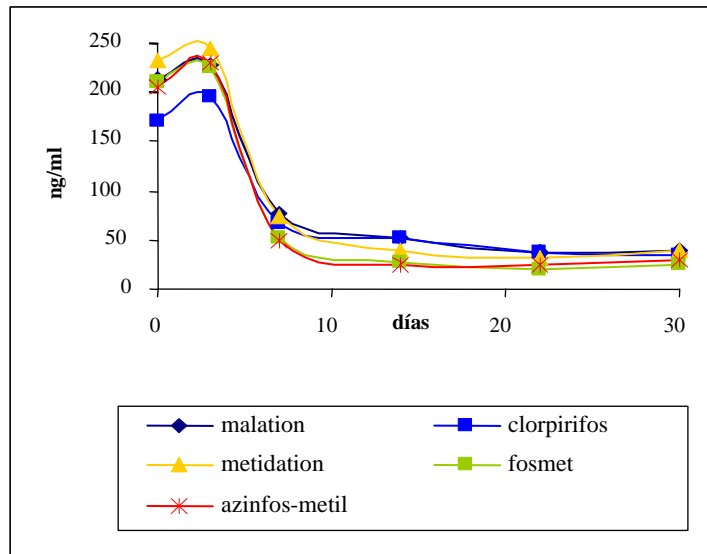
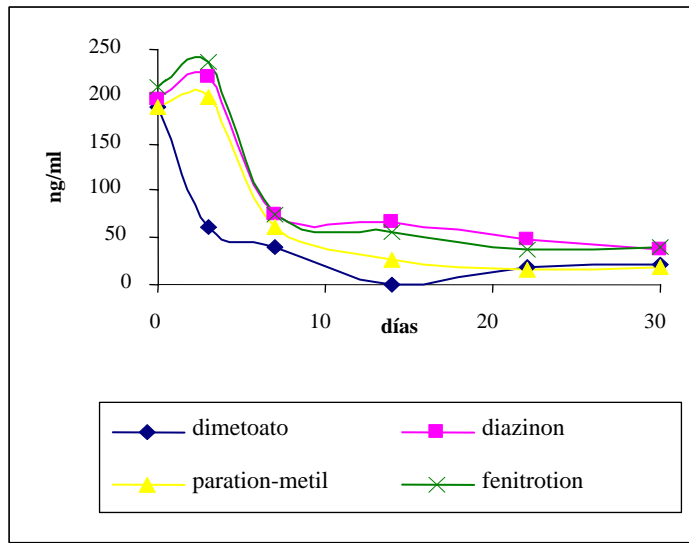


Figura 3.1. Estabilidad de los plaguicidas OPs seleccionados en orina humana almacenada a 4°C.

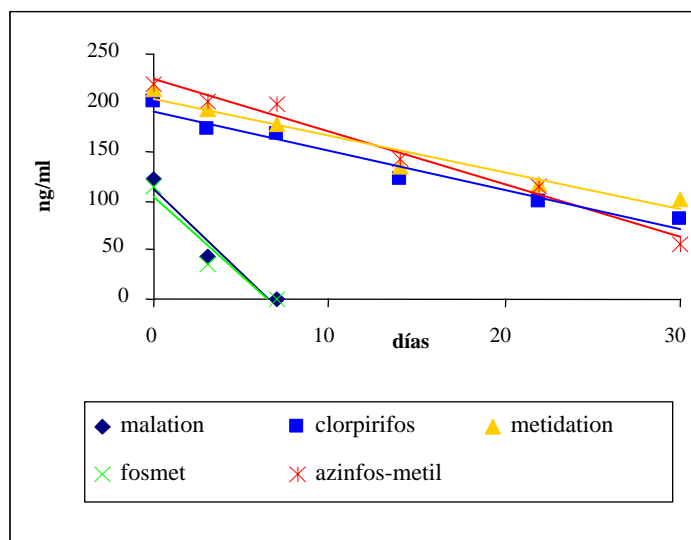
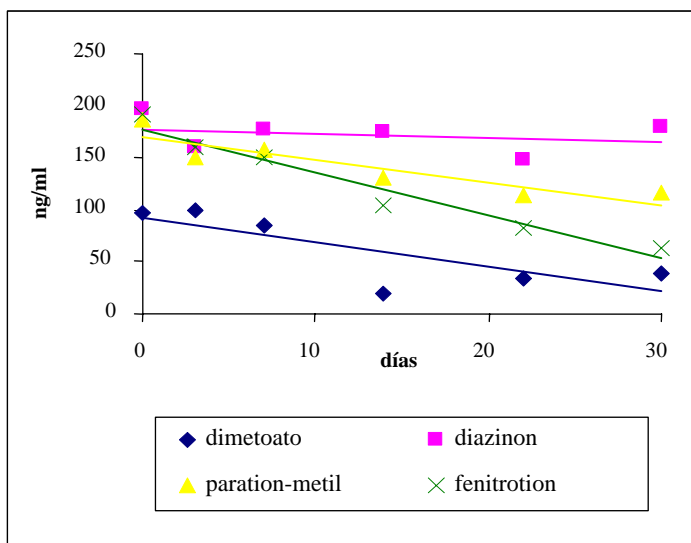


Figura 3.2. Estabilidad de los plaguicidas OPs seleccionados en suero humano almacenado a 4°C.

3.2.3. Estabilidad de los plaguicidas organoclorados en suero

El estudio de la estabilidad de los 19 plaguicidas OCs seleccionados en una muestra de suero (mezcla de varios sueros individuales) se llevó a cabo usando una muestra fortificada a 100 ng ml^{-1} y almacenada en nevera (4°C) durante un mes. El planteamiento de trabajo fue idéntico al apartado anterior. La **Figura 3.3** muestra la variación de las recuperaciones con el tiempo de almacenamiento para los plaguicidas OCs investigados.

A la vista de los resultados obtenidos, la mayoría de los compuestos OCs estudiados en suero resultaron relativamente estables durante el mes de almacenamiento, aunque hubo algunos casos, tales como δ -HCH, α - y β -endosulfan, en los que el tiempo de vida media fue un poco menor que el resto. El compuesto que se comportó de una más anómala fue *p,p'*-DDT, cuya cantidad se redujo a la mitad en sólo 3 días y después permaneció estable a ese nivel. Posiblemente, ese comportamiento pueda explicarse su rápida degradación metabólica a otros derivados o por procesos de adsorción.

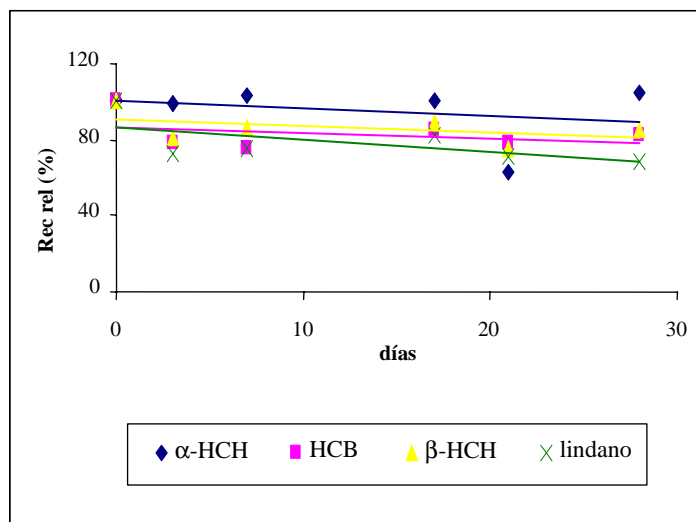


Figura 3.3. Estabilidad de los plaguicidas OCs seleccionados en suero humano almacenado a 4°C .

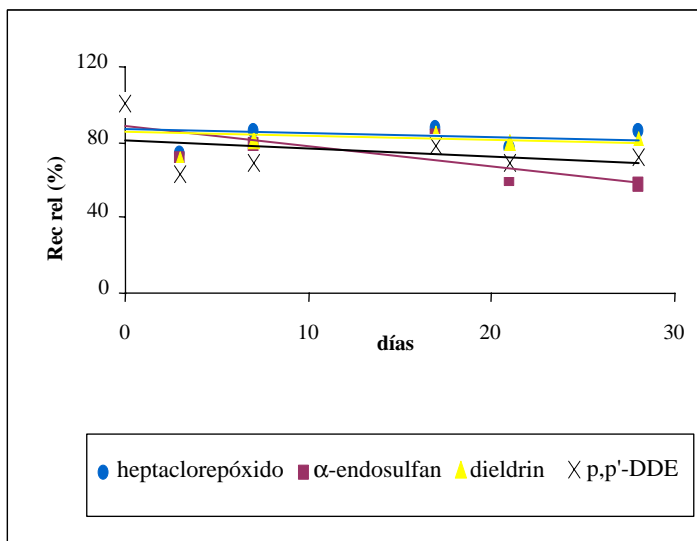
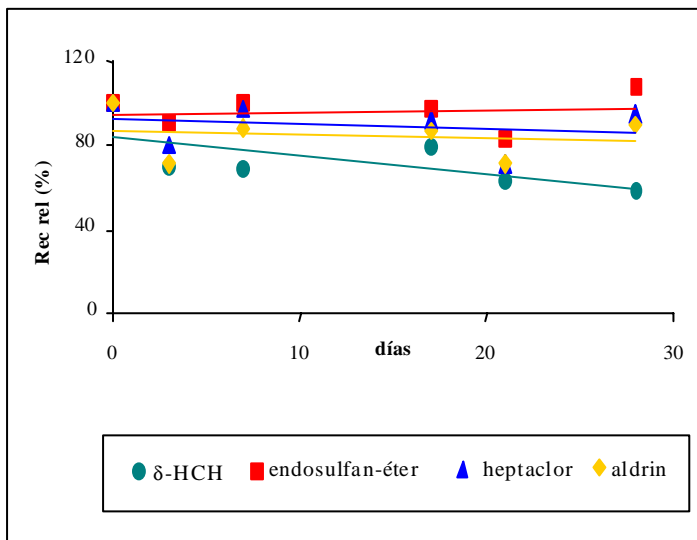


Figura 3.3 (cont.). Estabilidad de los plaguicidas OCs seleccionados en suero humano almacenado a 4°C.

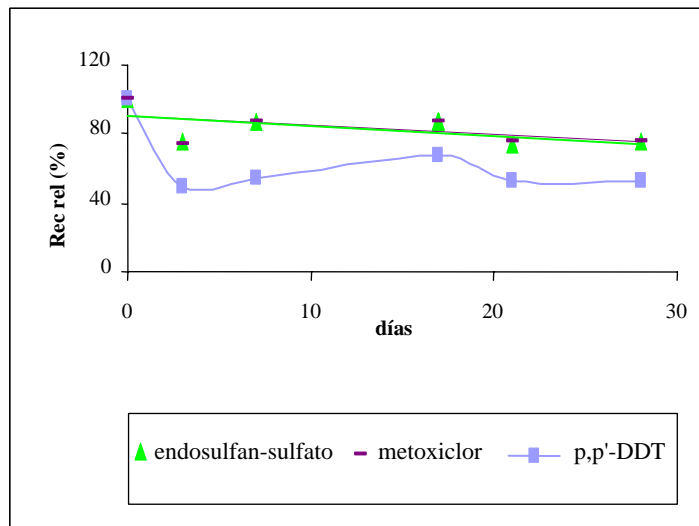
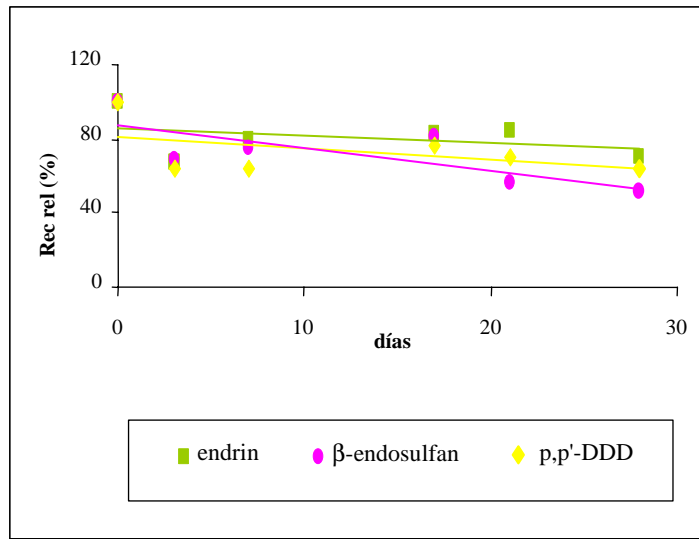


Figura 3.3 (cont.). Estabilidad de los plaguicidas OCs seleccionados en suero humano almacenado a 4°C.

3.2.4. Análisis multiresidual en muestras de orina

Las primeras aplicaciones de la técnica SPE se llevaron a cabo con **la determinación de los plaguicidas OPs seleccionados** en muestras de orina humana. El procedimiento SPE estuvo basado en la experiencia obtenida durante una estancia de un mes de la autora de esta Memoria en el Departamento de Hidrogeología y Química Analítica de la Universidad de Almería, en Abril-Mayo de 1998, y cuyo procedimiento queda descrito en la bibliografía por Martínez Vidal y colaboradores (1998).

El primer paso de la optimización fue el de la elección del disolvente orgánico para eluir la muestra de los cartuchos SPE utilizados (C₁₈, 500 mg). Un total de 5 disolventes con diferentes polaridades fueron investigados: metanol, DCM, acetonitrilo, acetato de etilo y MTBE. De todos ellos, el MTBE fue el que dio mejores resultados en cuanto a valores de recuperación, puesto que con el resto las recuperaciones fueron bajas e incluso, algunos plaguicidas no se recuperaron. A modo de ejemplo, en las **Figura 3.4 A** y **3.4 B** se muestran dos cromatogramas correspondientes a una muestra de orina fortificada a 200 ng ml⁻¹ con los plaguicidas OPs después de aplicar el procedimiento de SPE eluyendo en un caso con MTBE y en el otro con acetato de etilo. A la vista de estas figuras, se observa que la respuesta cromatográfica de los analitos fue mucho mayor en el caso de la elución con MTBE.

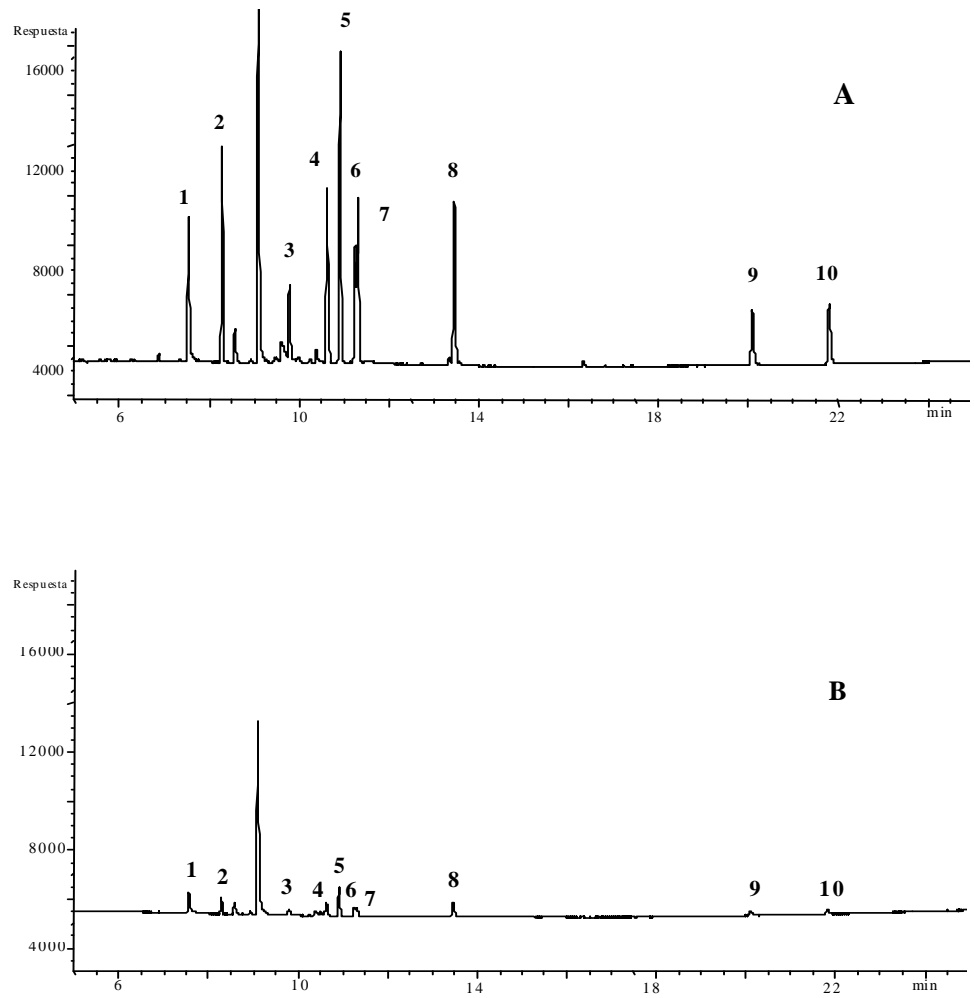


Figura 3.4. Cromatogramas GC-NPD correspondientes a una muestra de orina fortificada a 200 ng ml^{-1} después de la elución SPE con 5 ml de MTBE (A) y 5 ml de acetato de etilo (B). (1) dimetoato, (2) diazinon, (3) paration-metil, (4) fenitrothion, (5) malation, (6) fention, (7) clorpirifos, (8) metidation, (9) fosmet, (10) azinfos-metil.

La **Figura 3.5** muestra el esquema del procedimiento SPE aplicado a la determinación de plaguicidas OPs en muestras de orina y de suero, como se verá posteriormente.

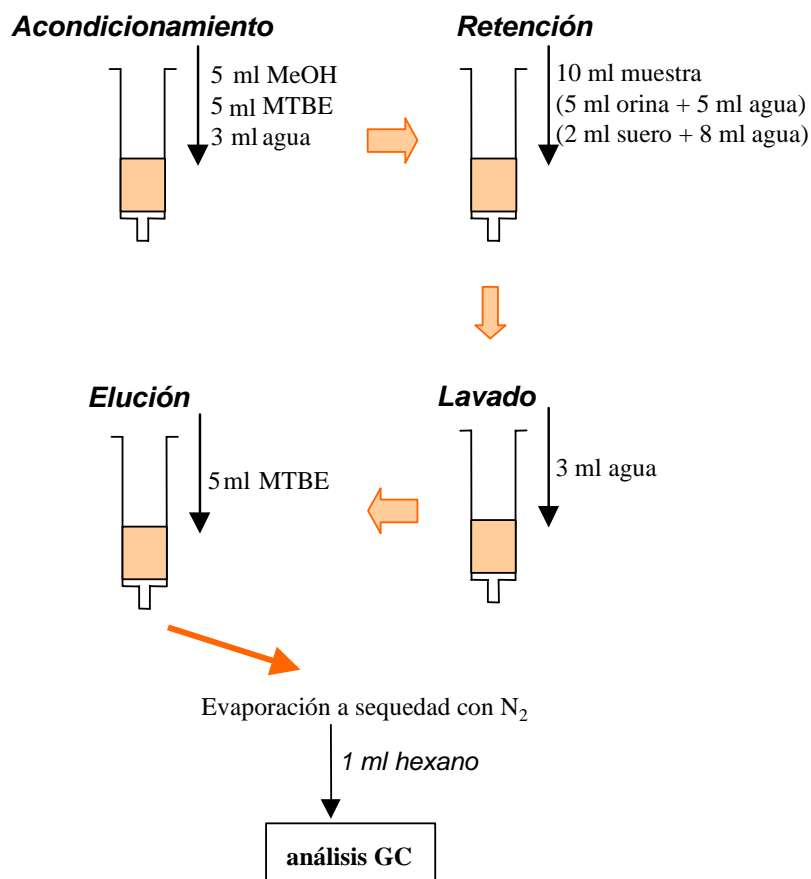


Figura 3.5. Esquema del procedimiento SPE desarrollado para la determinación de plaguicidas en fluidos biológicos.

Una vez seleccionado el disolvente orgánico para la elución, se llevó a cabo la validación del método evaluando los siguientes parámetros:

Exactitud- fue estudiada mediante ensayos de recuperación analizando muestras de orina fortificada a dos niveles de concentración (10 y 200 ng ml⁻¹).

Precisión- fue determinada como la repetibilidad en un mismo día (n=5) de las recuperaciones a cada nivel de fortificación ensayado.

Límites de detección (LD)- obtenidos cuando la señal fue 3 veces el ruido de fondo en el cromatograma correspondiente al nivel más bajo de concentración para el analito.

Los resultados fueron, en general, satisfactorios y se encuentran reflejados en el artículo científico del apartado 3.2.6.

A continuación, el procedimiento desarrollado se aplicó a **la determinación de los 19 compuestos OCs seleccionados** en muestras de orina. La validación del método también se llevó a cabo a dos niveles de concentración 200 ng ml⁻¹ y 10 ng ml⁻¹ (n = 5). La **Tabla 3.1** muestra las recuperaciones y CVs de los OCs investigados después de la aplicación del procedimiento de SPE, y utilizando *clorfenson* como patrón interno.

Tabla 3.1. Recuperaciones y coeficientes de variación (%) (n =5) correspondientes a los plaguicidas OCs estudiados después de la aplicación del procedimiento SPE a muestras de orina.

Compuestos	200 ng ml ⁻¹	10 ng ml ⁻¹
α-HCH	69 (10)	<i>nr</i>
HCB	49 (4)	<i>nr</i>
β-HCH	64 (11)	41 (3)
Lindano	69 (4)	31 (13)
δ-HCH	84 (4)	66 (18)
Endosulfan-éter	59 (8)	<i>nr</i>
Heptaclor	64 (9)	<i>nr</i>
Aldrin	55 (8)	<i>nr</i>
Endosulfan-lactona	37 (7)	56 (19)
Heptacloro epóxido	70 (5)	32 (3)
α-Endosulfan	75 (3)	37 (3)
Dieldrin	72 (2)	38 (1)
p,p'-DDE	66 (3)	58 (23)
Endrin	145 (3)	61 (1)
β-Endosulfan	72 (5)	42 (1)
p,p'-DDD	80 (2)	75 (14)
Endosulfan-sulfato	71 (9)	45 (1)
p,p'-DDT	92 (3)	61 (25)
Metoxiclor	106 (2)	64 (1)

nr no recuperado

Como puede observarse, los resultados no son del todo satisfactorios. Al nivel alto de concentración, aunque algunas recuperaciones se encontraron en el rango 37-66% (HCB, β-HCH, endosulfan-éter, heptaclor, aldrin, endosulfan-lactona y p,p'-DDE), la precisión fue altamente aceptable (<10%). En el nivel más bajo, la situación resultó bastante desfavorable puesto que se obtuvieron elevados CVs (es el caso de 23% para p,p'-DDE o de 25% en el caso de p,p'-DDT) y muy bajas

recuperaciones (32–75%). La asignación de nr en la tabla anterior correspondió a plaguicidas con valores de recuperaciones < 20%.

3.2.5. *Análisis multiresidual en muestras de suero*

Una vez aplicado el procedimiento de SPE a muestras de orina, se procedió a estudiarlo para **la determinación de plaguicidas OPs** en muestras de suero con una ligera modificación en cuanto al volumen de muestra acuosa que se pasaba a través del cartucho de SPE: 2 ml de suero y 8 ml de agua. La reducción en el volumen utilizado de la muestra de suero fundamentalmente se hizo basándose en la poca cantidad disponible en este tipo de muestra.

Posteriormente, también se aplicó a **la determinación de los plaguicidas OCs** en suero humano. En ambos casos, la validación del método se llevó a cabo estudiando las *recuperaciones* y las *precisiones* a dos niveles de concentración. Los resultados fueron, en general, satisfactorios y se encuentran reflejados en el artículo del apartado 3.2.6.

La conclusión final de las experiencias realizadas es que la técnica SPE resultó adecuada para la determinación de los plaguicidas OPs, tanto en muestras de orina como de suero; sin embargo, en el caso de los OCs sólo se encontró aplicación aceptable en el análisis de suero. Estos compuestos presentaron un comportamiento poco consistente en las muestras de orina cuando fueron extraídos mediante el procedimiento de SPE, tal como se ha podido observar en la **Tabla 3.1**.

El procedimiento optimizado de SPE se ha aplicado al análisis de muestras reales de suero, habiéndose detectado en todas ellas *HCB* y *p,p'-DDE* en un rango de concentración 0.8-38 ng ml⁻¹. También se analizaron muestras reales de orina, encontrándose *endosulfan sulfato* (55 ng ml⁻¹) en una de ellas, y *fosalone*, en tres muestras correspondientes a trabajadores agrícolas. Estos resultados se pueden encontrar en el artículo científico correspondiente (apartado 3.2.6).

3.2.6. Artículo científico 1: Fresenius J Anal Chem (2001), **369**, 502.**MULTIRESIDUE DETERMINATION OF ORGANOPHOSPHORUS AND ORGANOCHLORINE PESTICIDES IN HUMAN BIOLOGICAL FLUIDS BY CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY**

E. Pitarch F.J. López R. Serrano F. Hernández

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Dept., University Jaume I, P.O. Box 224, 12080, Castellón, Spain; E-mail: hernandf@exp.uji.es

Received: 8 September 2000 / Revised: 18 December 2000 / Accepted: 12 December 2000**Abstract**

Two multiresidual analytical methods for the simultaneous determination of organophosphorus and organochlorine pesticides in human urine and serum samples are described. The first approach is based on liquid-liquid microextraction with dichlorometane, and the second uses solid-phase extraction with C₁₈. In both methods, the extracts are analyzed by capillary gas chromatography using nitrogen-phosphorus detection (NPD) and electron-capture detection (ECD). Limits of detection of the overall procedure of analysis are at the low ng mL⁻¹. Stability experiments have been performed in spiked urine and serum samples stored at 4°C during 1 month. Finally, the solid-phase extraction procedure was applied to real-world samples. Quantification was performed by NPD or ECD, and confirmation of peaks was carried out by using mass-selective detection (MSD).

Introduction

Exposure to hazardous pesticides is a concern of the general population, especially residents living near industrial or contaminated places and, obviously, in the agricultural population. The best way to measure the exposure to these

contaminants is to determine those chemicals or their metabolites directly in biological fluids, a technique sometimes called biological monitoring [1]. Consequently, fast, accurate and sensitive analytical methods are necessary for the estimation of human exposure.

Inhibition of blood cholinesterase activity can be a valuable indicator of exposure to organophosphorus pesticides (OPPs) [2], but this inhibition is not specific for acute OPPs intoxication, because carbamate pesticides also cause it. OPPs are usually rapidly metabolised and excreted, and so, individual daily exposure to these insecticides is often measured by determination of alkyl phosphate in urine or blood [3-5], or by determination of specific metabolites in urine samples [6-8].

In cases of acute intoxication the analysis of pesticide residues in biological fluids would be of extreme interest. Although most pesticides used nowadays are rapidly metabolised and consequently many phenols and other polar compounds are found as conjugates in liver and urine [9], the presence of the parent compound can also be expected in some cases. Thus, parent pesticides have been reported in patients with acute drug toxicity as a result of accidental or suicide-intended consumption [10-15].

Regarding lipophilic organochlorine pesticides (OCPs), residues of the parent compound or metabolites are assimilated and stored in the lipid portion of adipose tissues. Residues of these chemicals may also be detected in the lipid portion of fluids as milk and blood serum. Other chemicals such as some OCPs and chlorophenoxy herbicides are capable of passing directly through the human body virtually intact and are then excreted.

The determination of pesticide residues in blood and serum samples usually requires the application of clean-up steps to remove interferences and reduce the detection limits of the procedures. Different clean-up techniques of different complexity have been reported, especially for the determination of organochlorine compounds, by the most studied chemicals in this type of matrix. Treatment with

sulfuric acid has been widely used in combination with solvent extraction using hexane [16] or petroleum ether-acetone [17]. In some cases, sulfuric acid has been also applied together with solid-phase extraction (SPE) using adsorbents such as Florisil [18] or C₁₈ [19]. Atuma and Aune [20] proposed a laborious procedure for OCPs and PCBs in serum where, after extraction with hexane-ether, two sulfuric acid treatments and purification by HPLC on a silica gel column were applied. In this way, very good LODs were obtained (2-7 pg g⁻¹ for PCBs and 1-7 pg g⁻¹ for OCPs), enabling determination of low organochlorine levels in both exposed and non-exposed population. SPE has been widely used for clean-up purposes for the determination of different organochlorine compounds in serum and urine samples, using Florisil [21-23] or a two-steps clean-up with Florisil and silicagel [24]. Usually, the application of procedures with laborious clean up steps leads to cleaner extracts and, consequently, to lower detection limits, although risks of analytical errors in sample treatment also increase.

SPE has been also applied, mostly using C₁₈ cartridges, for the isolation of OCPs from samples such as wildlife plasma [25], whole blood samples from agricultural workers [26], human and bovine sera [23], and for the extraction of other type of pesticides such as carbamates [27], triazines [28], 2,4-D [29], and pyrethroids metabolites [30].

Several OPPs have also been isolated by use of SPE for the sample treatment before GC analysis. Thus, Ameno et al. [11] reported the extraction of dipterex from serum samples, on C₁₈ cartridges, before its determination by GC-NPD, and Liu et al. [12] also used C₁₈ SPE for isolation of eleven OPPs from human urine and plasma.

In this paper, ten OPPs widely used in the agricultural practices of our area have been selected in order to investigate their behaviour. Two multi-residue methods applied to human serum and urine were applied: one is based on the use of solid-phase extraction (SPE) and the other on liquid-liquid microextraction (LLME). Development and optimization have been carried out by use of GC-NPD. The

procedures optimized for OPPs have been also tested for sixteen OCPs currently investigated by the Environmental Protection Agency (EPA), and also for three endosulfan metabolites which are rapidly excreted in the urine and feces (endosulfan-ether, -lactone and -sulfate). In this case, GC-ECD was used for their determination. Finally, the recommended procedures have been applied to real-world samples from exposed and non-exposed persons, using GC-MSD for the confirmation of the identities of the compounds detected.

Experimental

Chemicals

Pesticide standards (azinphos-methyl, chlorpyrifos, diazinon, dimethoate, fenithrothion, fenthion, malathion, methidathion, parathion-methyl, phosmet, aldrin, dieldrin, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDT, α - and β - endosulfan and their metabolites [-ether, -lactone and -sulfate], endrin, α -, β -, γ - and δ -HCH, hexachlorobenzene, heptachlor, heptachlorepoxyde and methoxichlor) were purchased from Dr. Ehrenstofer (Promochem, Wesel, Germany) and used without further purification. Three stock standard solution mixtures (ca. 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), one for OPs pesticides and two for OC insecticides, were prepared in acetone from stock individual standards. Working solutions of pesticides for sample spiking were prepared by dilution with acetone. Standard solutions for injection in the GC systems were prepared by dilution with *n*-hexane. Organic solvents (dichlorometane, *n*-hexane, methanol, acetone and methyl *tert*-butyl ether) were used for pesticide residue analysis (Scharlau, Barcelona, Spain). Anhydrous sodium sulfate (Scharlau) was of pesticide-residue grade and was purified by heating at 300°C overnight. 500 mg C₁₈ cartridges (Varian, Harbor City, CA, USA) were used for solid-phase extraction. Urine samples were obtained from healthy subjects, assumed to be non-exposed. Blood samples were collected by venipuncture by use of serum separator

vacutainer (Brand) blood tubes. The blood was left to clot, and the serum was extracted. Serum samples were then stored at -18°C until analysis.

Helium, nitrogen and hydrogen gas of quality 99.9995% and air of quality 99.995% were supplied by Carbueros Metálicos (Barcelona, Spain).

Equipment

GC analysis was performed on a Hewlett-Packard 5890 series II chromatograph with electron-capture (ECD) and nitrogen-phosphorus detectors (NPD), equipped with an HP 7673 autosampler. Splitless injections of 2 µl (purge off time: 1 min) were performed on a 25 m length x 0.25 mm I.D. fused-silica HP Ultra 2 capillary column coated with a 0.33 µm film of crosslinked 5% phenyl-methylsiloxane. Helium was used as carrier gas at a flow-rate of 1 mL min⁻¹. Injector temperature was 270°C. ECD conditions: temperature 300°C, N₂ 60 mL min⁻¹. NPD conditions: temperature 270°C, He 30 mL min⁻¹, H₂ 3 mL min⁻¹, air 100 mL min⁻¹. The oven temperature was programmed as follows: 90°C for 1 min, at 30°C min⁻¹ to 150°C, at 3°C min⁻¹ to 270°C with a final hold for 0.5 min.

GC-MS was performed on a Hewlett-Packard 5890 series II equipped with an HP 7673 autosampler and an MSD 5971 mass-selective detector, using the same conditions as for GC-ECD/NPD, except that the carrier gas flow rate was 0.5 mL min⁻¹. Mass detector characteristics were: electron impact (70 eV) mode with electron multiplier voltage of 1659; temperature of transfer line was 280 °C.

Extraction procedures

Solid-phase extraction (SPE). A 10-mL sample (5 mL of urine diluted with 5 mL water, or 2 mL serum diluted with 8 mL water) was passed through a 500 mg C₁₈ cartridge previously conditioned by passage of 5 mL methanol, 5 mL methyl *tert*-butyl ether (MTBE), and 3 mL deionized water, avoiding dryness. After loading the sample, cartridges were washed with 3 mL deionized water. Sample flow-rate was adjusted to approximately 6-8 mL.min⁻¹. The cartridges were dried by passage

of air by use of a vacuum for 10-15 min and compounds were then eluted with 5 mL MTBE. The extract was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream at 40 °C and the residue was dissolved in 1 mL of *n*-hexane for GC analysis.

Liquid-liquid microextraction (LLME). A 5-mL urine sample was shaken mechanically (Vortex) twice with 5 mL dichlorometane (DCM) in a glass tube for 1 min. The organic layer was then separated and dried by passage through a glass pipette packed with a 3 cm layer of anhydrous sodium sulfate. The extract was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream at 40 °C and the residue was dissolved in 1 mL *n*-hexane for injection into the gas chromatograph.

In the case of human serum, the sample was diluted with deionized water (2 mL sample and 3 mL water), the extraction time was 5 min, and the extract was centrifuged to remove the emulsion obtained, because solvent extraction of this matrix was more difficult.

Results and discussion

Firstly, the stability of the OPPs in urine and serum samples spiked at 200 ng mL⁻¹ and stored in a glass container for 1 month at 4°C was studied. Aliquots of stored samples were analyzed by triplicate after 0, 3, 7, 14, 21 and 28 days by applying the optimized SPE procedure. Results obtained revealed that OPPs were stable in urine samples for 3 days only; a substantial decrease in concentration was observed between day 3 and day 7. However, most of the compounds remained stable in serum samples for up to 7 days although a small decrease in recoveries was observed, except for malathion and fosmet, for which losses were substantial even after storage for three days. This higher stability in serum samples could be explained by the presence of lipids in this matrix, which probably has a positive influence on pesticides solubility and stability. As an example, **Fig. 1** shows the variation of concentration with time for four OPPs in urine, serum and water matrices; this figure is representative of the general pattern for all OPPs in different matrices.

The stability of OCPs in serum samples spiked at 100 ng mL^{-1} was also investigated similarly. Results obtained showed that all these compounds were stable in this matrix over the entire period studied (30 days).

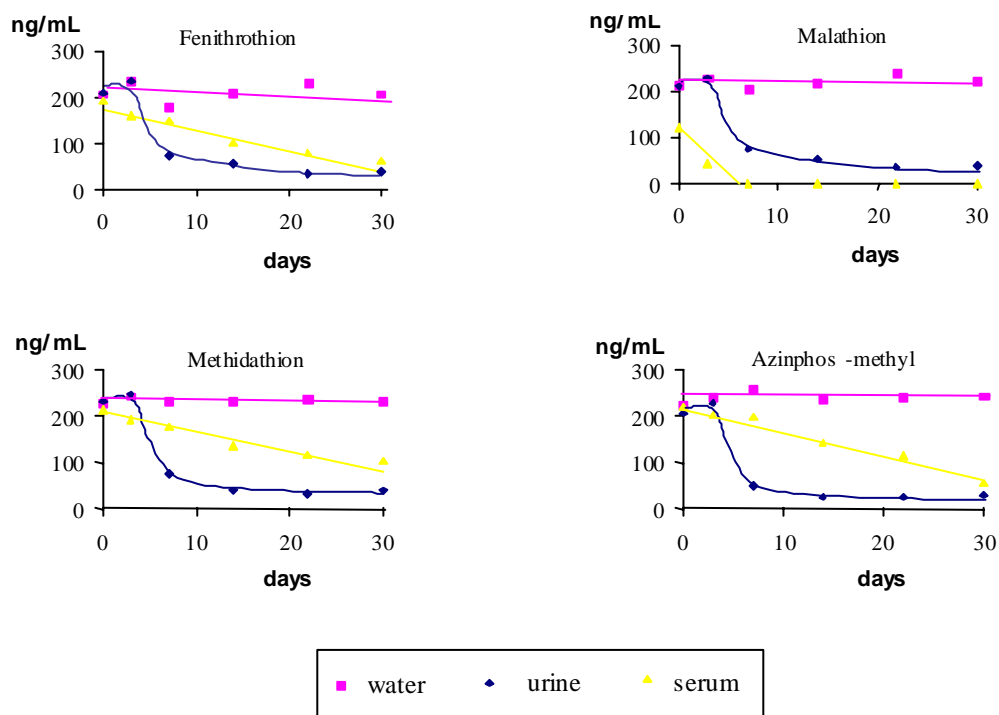


Fig.1 Stability of several OPPs in urine and serum matrices stored at 4°C

Urine

Firstly, SPE and LLME were used to determine the OPPs in urine. The SPE procedure was based on that previously described by Martínez Vidal et al. [31] for the determination of endosulfan in human urine. 500 mg C_{18} cartridges and different elution solvents (acetonitrile, dichlorometane, ethyl acetate, methanol and methyl

tert-butyl ether) were initially tested. The last (MTBE) was chosen for subsequent experiments because of the higher recoveries obtained. Moreover, the LLME procedure applied was based on a procedure previously developed in our laboratory for the determination of OPPs in water samples [32], but using dichlorometane as extractant, because it has been widely used for extraction of OPPs from aqueous samples [33, 34].

Both extraction procedures were applied (five replicates) to human urine spiked at two levels (10 and 200 ng mL⁻¹). Results obtained are summarized in Table 1, showing that SPE led to satisfactory recoveries (higher than 80%) with coefficients of variation below 10% for both spiking levels. The only exception was dimethoate, one of the most widely used OPPs, at the 10 ng mL⁻¹ level; this was frequently poorly recovered in C₁₈ SPE procedures. However, recoveries were less satisfactory when LLME was applied, especially at the lowest spiking level. Poor results were obtained for chlorpyrifos, probably because of its lower polarity and also overlapping with the peak corresponding to fenthion in the chromatograms, which made quantification difficult. The precision of the LLME procedure was also significantly worse than for SPE.

Table 1 also shows detection limits calculated as three times the background noise from the chromatograms corresponding to urine samples spiked at 10 ng mL⁻¹. They were found to be quite similar for both procedures, and mostly ranging from 0.5 to 2 ng mL⁻¹.

Figure 2A shows a GC-NPD chromatogram corresponding to an urine sample spiked at 10 ng mL⁻¹, after application of the SPE procedure.

These extraction procedures were also tested for OCPs in human urine samples spiked at 200 and 10 ng mL⁻¹, to evaluate their feasibility as wide-scope methods for multiresidue analysis. The results obtained were less satisfactory than for OPPs and the use of a surrogate standard (chlorfenson) was necessary for quantification. In general, recoveries were higher than 60% for most of the compounds, but most of the data were inconsistent. Recoveries were poor (ca. 40%)

for some of the compounds of interest, e.g. HCB, heptachlor, aldrin and *p,p'*-DDE. These results for OCPs could be explained by the fact that the procedures were optimized for OPPs. However, even if organochlorine compounds were sometimes not completely recovered, both procedures could be useful for the determination of OPPs and for detection of the presence of OCPs in screening studies performed in urine samples. More accurate results for OCPs would require the optimization of a specific analytical procedure.

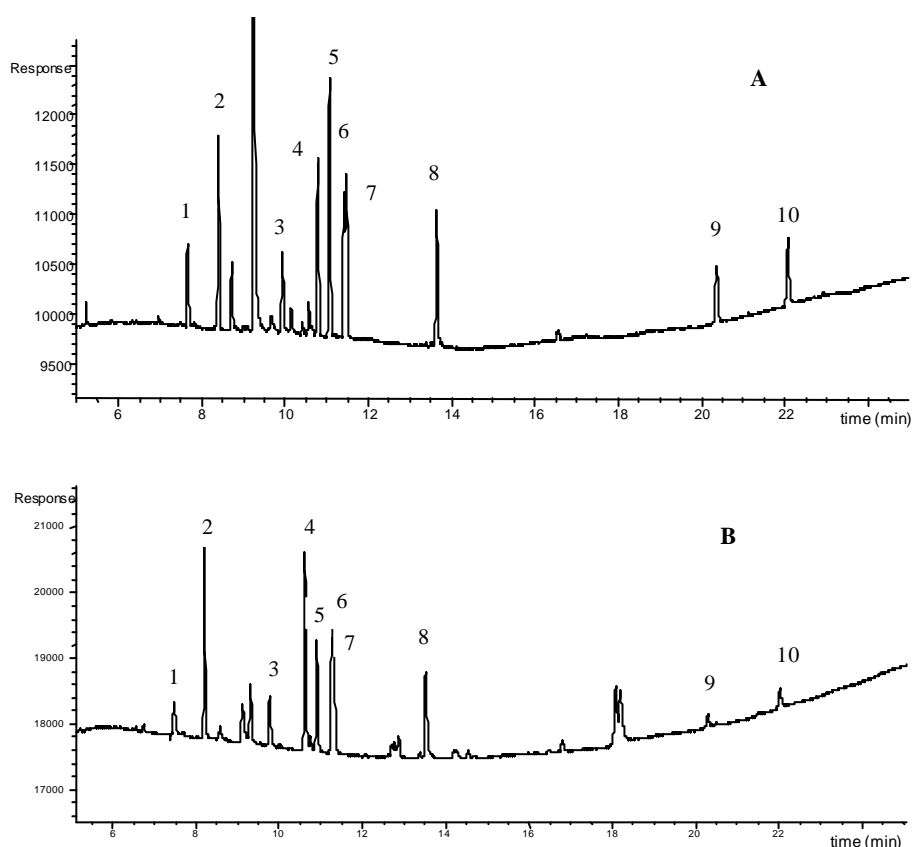


Fig. 2 GC-NPD chromatograms obtained after SPE of a urine sample fortified at 10 ng mL^{-1} (A) and a serum sample fortified at 25 ng mL^{-1} (B) with OPPs. (1) dimethoate, (2) diazinon, (3) parathion-methyl, (4) fenitrothion, (5) malathion, (6) fenthion, (7) chlorpyrifos, (8) methidathion, (9) phosmet, (10) azinphos methyl

Table 1. Mean recoveries, coefficients of variation, and limits of detection (LOD) for OPPs after application of SPE and LLME to samples of human urine samples fortified at 200 and 10 ng mL⁻¹ (n = 5).

	SPE			LLME		
	200 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	LOD (ng mL ⁻¹)	200 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	LOD (ng mL ⁻¹)
1 Dimethoate	102 (8)	68 (20)	1.4	93 (12)	72 (23)	2.0
2 Diazinon	96 (2)	96 (7)	0.6	77 (11)	61 (18)	3.0
3 Methyl-parathion	96 (4)	103 (10)	1.5	84 (16)	84 (2)	2.0
4 Fenitrothion	95 (3)	103 (3)	0.6	87 (10)	86 (9)	0.7
5 Malathion	90 (5)	99 (4)	0.5	94 (15)	93 (2)	2.0
6 Fenthion	96 (2)	99 (1)	0.8	91 (12) ^a	85 (13) ^a	0.7
7 Chlorpyrifos	97 (3)	97 (1)	0.7	64 (20) ^a	50 (21) ^a	-
8 Methidathion	94 (6)	108 (3)	0.9	99 (11)	107 (3)	2.0
9 Phosmet	83 (9)	109 (5)	2.0	93 (11)	114 (9)	2.0
10 Azinphos-methyl	96 (8)	107 (1)	1.7	109 (15)	98 (17)	6.0

^a Peaks 6 and 7 were not well resolved

Serum

The application of LLME and SPE to serum samples required a prior dilution with deionized water to simplify the matrix, and also because of the limited volume of sample available. The extraction time was also increased to 5 min in LLME, and the extract was centrifuged to break the emulsions obtained. This problem when extracting serum samples has also been reported by other authors [17, 31, 35].

Data for serum samples spiked with OPPs at 500 and 25 ng mL⁻¹ are shown in **Table 2** (n=5). It is apparent that SPE was more satisfactory than LLME regarding both recoveries and coefficients of variation. The low recoveries for dimethoate (lower than 50%) and phosmet, and especially the poor repeatability for these compounds, made solvent extraction inadequate for their determination.

In general, the poor results obtained by LLME could be explained by problems in the handling of these samples, especially the formation of emulsions. Thus, it can be concluded that SPE procedure was more suitable for this kind of matrix.

Detection limits for the SPE procedure (**Table 2**), calculated from chromatograms obtained from serum samples spiked at 25 ng mL⁻¹, were between 1 and 5 ng mL⁻¹, except for azinphos-methyl (10 ng mL⁻¹). **Figure 2B** shows the chromatogram obtained after SPE of a serum sample spiked with 25 ng mL⁻¹ OPPs.

SPE was also applied to serum samples spiked with selected OCPs at two levels, 200 and 10 ng mL⁻¹ (n = 5), using chlorfenson as internal standard for quantification (**Table 3**). Recoveries obtained were higher than 70% for most compounds at the two levels tested. Endosulfan-lactone was not recovered. Coefficients of variation at the high level were found to be lower than 12%, whereas at the 10 ng mL⁻¹ level they were ca. 20%, which could be acceptable in trace analysis. Detection limits calculated from the chromatograms corresponding to 10 ng mL⁻¹ varied between 0.7 (HCB) and 3.6 (*p,p'*-DDT) ng mL⁻¹. LODs obtained for organochlorine compounds such as *p,p'*-DDE and HCB were sufficiently low for

their determination in both the non-exposed and exposed population, according to the levels reported in different monitoring surveys. However, for other compounds as β -HCH and p,p' -DDT the procedure would only be suitable for the exposed population [16, 22, 24, 26].

Figure 3 shows the chromatograms obtained after SPE of a serum sample spiked at 10 ng mL^{-1} with two mixtures of OCPs.

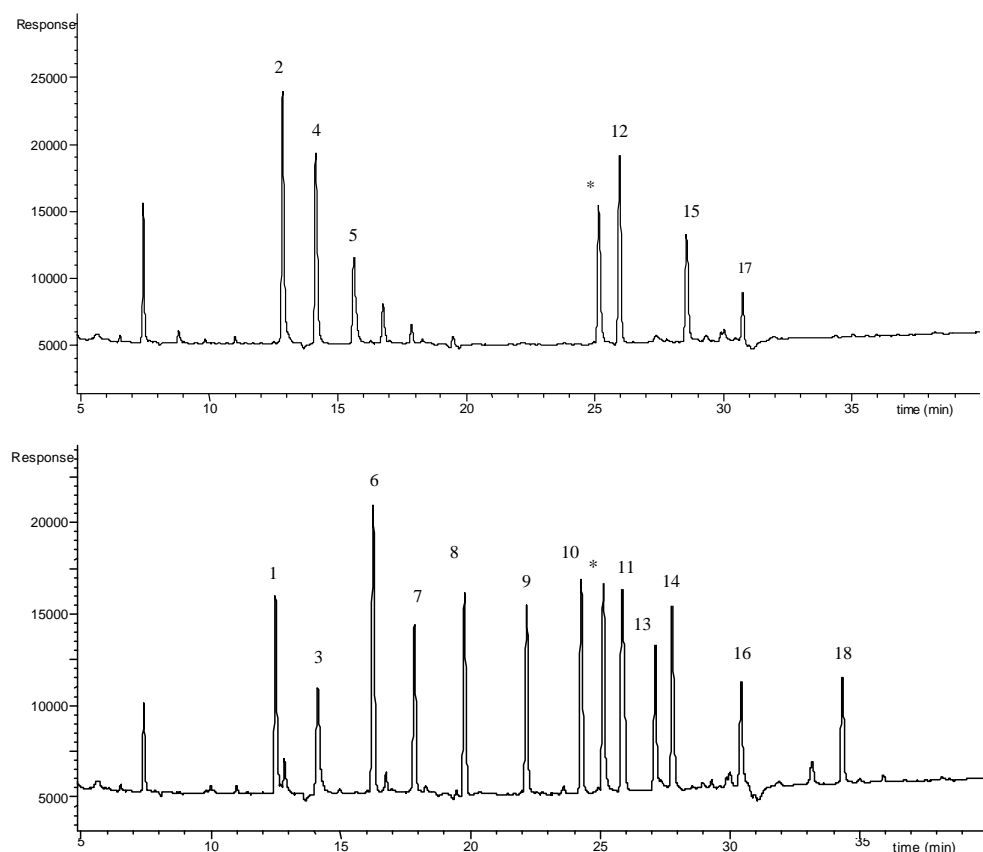


Fig. 3 GC-ECD chromatograms obtained after SPE of a serum sample fortified at 10 ng mL^{-1} with two different mixtures of OCPs. (1) α -HCH, (2) Hexachlorobenzene, (3) β -HCH, (4) γ -HCH, (5) δ -HCH, (6) endosulfan ether, (7) heptachlor, (8) aldrin, (9) heptachlor epoxide, (10) α -endosulfan, (11) dieldrin, (12) p,p' -DDE, (13) endrin, (14) β -endosulfan, (15) p,p' -DDD, (16) endosulfan sulfate, (17) p,p' -DDT, (18) methoxichlor, (*) chlorfenson, internal standard

Table 2-. Mean recoveries, coefficients of variation, and limits of detection (LOD) for OPPs after application of SPE and LLME to samples of human serum samples fortified at 500 and 25 ng mL⁻¹ (n =5).

	SPE			LLME	
	500 ng mL ⁻¹	25 ng mL ⁻¹	LOD (ng mL ⁻¹)	500 ng mL ⁻¹	25 ng mL ⁻¹
2 Diazinon	88 (7)	86 (6)	1	71 (21)	98 (26)
3 Methyl-parathion	91 (11)	93 (5)	5	92 (16)	59 (4)
4 Fenitrothion	95 (10)	92 (5)	1	78 (19)	45 (14)
5 Malathion	75 (10)	69 (10)	2	75 (18)	53 (1)
6 Fenthion	86 (8)	88 (11)	2	98 (16)	^a
7 Chlorpyrifos	87 (15)	87 (13)	2	26 (41)	^a
8 Methidathion	100 (11)	105 (6)	3	104 (7)	93 (27)
9 Phosmet	70 (22)	57 (20)	-	96 (9)	46 (9)
10 Azinphos-methyl	119 (8)	121 (7)	10	112 (15)	53 (13)

^a Peaks not resolved

Table 3. Mean recoveries, coefficients of variation and limits of detection (LOD) for OCPs after application of SPE procedure to human serum fortified at 200 and 10 ng mL⁻¹ (n=5).

	200 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	LOD (ng mL ⁻¹)
1 α -HCH	68 (6)	106 (12)	1.2
2 Hexachlorobenzene	75 (9)	77 (18)	0.7
3 β -HCH	79 (5)	109 (15)	2.3
4 γ -HCH	87 (12)	104 (20)	0.9
5 δ -HCH	87 (9)	114 (20)	1.9
6 Endosulfan-ether	69 (5)	83 (23)	0.8
7 Heptachlor	67 (8)	102 (23)	1.4
8 Aldrin	63 (5)	78 (23)	1.2
9 Heptachlorepoide	72 (6)	83 (19)	1.2
10 α -Endosulfan	71 (5)	86 (21)	1.0
11 Dieldrin	72 (4)	96 (16)	1.0
12 <i>p,p'</i> -DDE	73 (9)	108 (18)	0.9
13 Endrin	90 (6)	109 (21)	1.6
14 β -Endosulfan	74 (4)	83 (18)	1.2
15 <i>p,p'</i> -DDD	84 (10)	89 (21)	1.7
16 Endosulfan-sulfate	75 (5)	88 (19)	2.3
17 <i>p,p'</i> -DDT	90 (8)	114 (18)	3.6
18 Methoxichlor	83 (5)	132 (19)	2.3

Finally, the overall SPE procedure was applied to human urine and serum samples spiked with a mixture of all the 29 compounds studied. The high resolution of the GC capillary column enabled the satisfactory separation of most of the analytes and impurities in such a way that no co-elution was observed in the NPD chromatogram. However, the several pesticides (β -HCH/ γ -HCH, malathion/aldrin, fenthion/chlorpyrifos, endosulfan-lactone/heptachlorepoide, and dieldrin/*p,p'*-DDE) co-eluted when GC-ECD was used. Nevertheless, the use of GC-MSD for

confirmation of peak identity in real-world samples enabled the selective identification and quantification of co-eluted compounds.

Application to real samples

The application of the SPE procedure to ten serum samples revealed the presence of HCB and *p,p'*-DDE in all the samples at concentration levels between 0.8 and 1.2 ng mL⁻¹ (HCB) and between 5 and 38 ng mL⁻¹ (*p,p'*-DDE). **Figure 4** shows the ECD chromatogram obtained from a sample containing 0.8 ng mL⁻¹ HCB and 16.2 ng mL⁻¹ *p,p'*-DDE. The identity of these compounds was confirmed by analysis of the hexane extracts by GC-MS in selected ion monitoring mode (SIM), using the single ions 249, 284, and 286 for HCB, and 246 and 318 for *p,p'*-DDE. Determination of these compounds by GC-MS in full-scan mode was not feasible, because of the low sensitivity of our chromatographic equipment. Three of these serum samples were also analyzed by an alternative method developed in our laboratory based on headspace Solid Phase Microextraction (SPME) then GC-MS analysis, using isotopically labelled HCB as surrogate standard for quantification. Results obtained by SPME confirmed the concentrations found for *p,p'*-DDE (SPME and SPE results in ng mL⁻¹: sample 1 6.4/6.4; sample 2 6.7/6.7; sample 3 5.9/7.9), although they were a little higher for HCB (SPME and SPE results in ng mL⁻¹: sample 1 2.1/0.8; sample 2 1.8/0.9; sample 3 1.9/1.1).

The SPE procedure was also applied to ten urine samples from non-agricultural and agricultural workers. Pesticides were detected in four samples and endosulfan sulfate was the only OCP detected (in one sample only). On the other hand, the organophosphorus pesticide phosalone was detected in three urine samples collected from agricultural workers, although this compound was not included in our method development. The identity of these two pesticides was always confirmed by GC-MS in full scan mode. As an example, **Fig. 5** shows the GC-MS chromatogram obtained for the sample containing endosulfan sulfate. Quantification was achieved by use of GC-MS in SIM mode using the single ions 386, 272, and 229 for endosulfan sulfate, and 367, 182, and 221 for phosalone. The concentration of

endosulfan sulfate was found to be 55 ng mL^{-1} . The urine sample containing endosulfan sulfate was also analyzed by a method that we have developed based on SPME by direct immersion of the fiber in the ten fold-diluted urine sample and subsequent analysis by GC-MS. The concentration of the compound was 33 ng mL^{-1} .

Concentration levels of phosalone ranged between 18 and 66 ng mL^{-1} in three urine samples. This finding was not expected, because phosalone should be excreted in urine mainly as glucuronide; its presence as free pesticide, therefore, be indicative of exposure to extremely high levels, which evidently did not happen. We do not have enough data on the agricultural workers investigated to obtain a clear conclusion. In future studies we will consider this problem carefully.

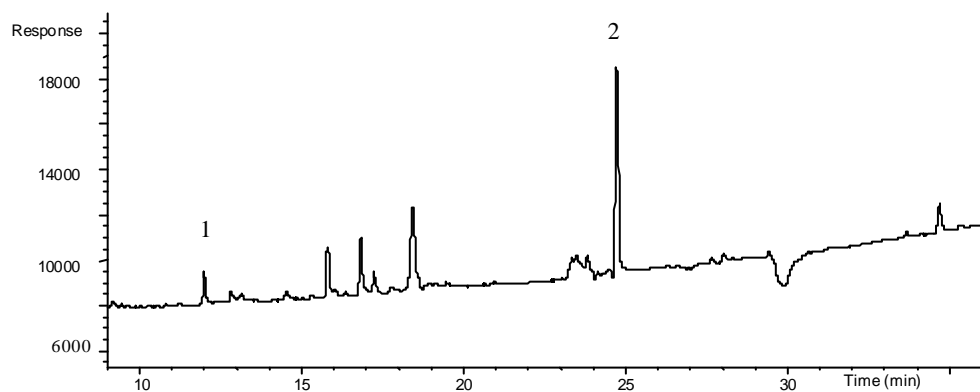


Fig. 4 GC-ECD chromatogram obtained from a sample of human serum containing (1) hexachlorobenzene and (2) *p,p'*DDE, analyzed by the SPE procedure.

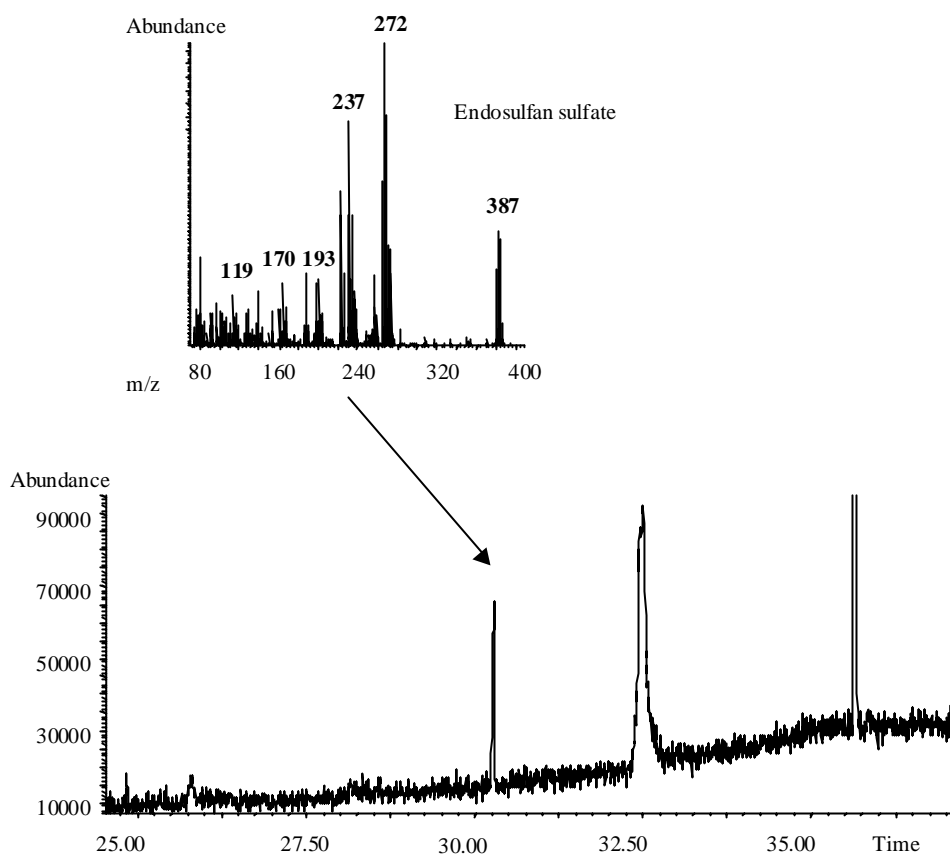


Fig.5 GC-MSD chromatogram (full scan mode) obtained from a sample of human urine containing endosulfan sulfate, analyzed by the SPE procedure.

Conclusions

Two wide-scope multiresidue procedures have been evaluated for analysis of 10 OPPs and 18 OCPs in human urine and serum. One procedure was based on LLME with DCM, the other on C₁₈ SPE. The results obtained by use of spiked samples indicated that both procedures could be used for the rapid multiresidue analysis of pesticides in human urine, but in serum samples the SPE procedure was far more adequate. In summary, SPE was faster, less tedious, and also avoided the formation of emulsions often encountered in LLME. SPE also led to extracts cleaner

than those of LLME, which usually required an additional clean-up step. Limits of detection were occasionally insufficient for monitoring pesticide residues in the non-exposed population, although they were appropriate for the analysis of the higher levels encountered in the exposed population.

At present, our group is investigating the application of other extraction methods, e.g. the direct immersion and headspace solid phase microextraction, for the isolation of pesticides from biological fluids. The use of mass spectrometry for detection (GC-MS and, preferably, GS-MS-MS), the use of labelled surrogate standards, and calibration by use of standards in sample matrices is also a subject of interest under investigation.

Acknowledgements This work forms a part of the project entitled "Nuevas estrategias en la determinación de residuos de plaguicidas y de metabolitos en fluidos biológicos. Simplificación de la etapa de preparación de muestra", carried out with the financial support of Fundación Caixa Castelló.

The authors thank J.L. Villamarin of Conselleria de Sanitat (Castelló) for providing human serum samples.

References

1. Aprea C, Sciarra G, Sartorelli P, Desideri E, Amati R, Sartorelli E (1994) *Int Arch Occup Environ Health* 66:333-338
2. Peyster A, Willis WO, Molgaard CA, McKendrick TM, Walker C (1993) *Arch Environ Health* 48:348-352
3. Takamiya K (1994) *Bull Environ Contam Toxicol* 52:190-195
4. Miki A, Tsuchilashi H, Ueda K, Yamashita M (1995) *J Chromatogr A* 718:383-359
5. Drevenkar V, Stengl B, Fröbe Z (1994) *Anal Chim Acta* 290:277-286

6. Hill RH, Shealy DB, Head SL, Williams CC, Bailey SL, Gregg M, Baker SE, Needham LL (1995) *J Anal Toxicol* 19:323-329
7. Chang MJW, Lin CY, Lo LW, Lin RS (1996) *Bull Environ Contam Toxicol* 56:367-374
8. Chang MJW, Liu RS (1995) *Bull Environ Contam Toxicol* 55:29-35
9. Hutson DH, Paulson GD (1995) (eds) *The mammalian metabolism of agrochemicals*. John Wiley & Sons, Chichester
10. Namera A, Yashiki M, Nagasawa N, Iwasaki Y, Kojima T (1997) *Forensic Sci Int* 88:125-131
11. Ameno K, Fuke C, Ameno S, Kiriu T, Ijiri Y (1989) *J Anal Toxicol* 13:150-151
12. Liu J, Suzuki O, Kumazaya T, Seno H (1989) *Forensic Sci Int* 41:67-72
13. Futagami K, Nazaraki C, Kataoka Y, Shuto H, Oishi R (1997) *J Chromatogr B* 704:369-373
14. Maroni M, Catenacci G, Galli D, Cavallo D, Ravazzani G (1990) *Arch Environ Contam Toxicol* 19:782-788
15. Maddy KT, Knaak JB, Gibbons DB (1986) *Toxicol Letters* 33:37-44
16. Otero R, Santiago Silva M, Grimalt JO (1997) *J Chromatogr A* 778:87-94
17. Waliszewski SM, Szymczynski GA (1991) *Bull Environ Contam Toxicol* 46:803-809
18. Gill US, Schwartz HM, Wheatley B (1996) *Chemosphere* 32:1055-1061
19. Pauwels A, Wells DA, Covaci A, Schepens PJC (1999) *J Chromatogr B* 723:117-125
20. Atuma SS, Aune M (1999) *Bull Environ Contam Toxicol* 62:8-15
21. Matos C, Ferreira CB, Valente DS, Rocha JM, Noronha MI (1998) *J Chromatogr B* 716:147-152

22. Bucholski KA, Begerow J, Winneke G, Dunemann L (1996) *J Chromatogr A* 754:479-485
23. Brock JW, Burse VW, Ashley DL, Najam AR, Green VE, Korver MP, Powell MK, Hodge CC, Needham LL (1996) *J Anal Toxicol* 20:528-536
24. Najam AR, Korver MP, Williams CC, Burse VW, Needham LL (1999) *J AOAC Int* 82:177-185
25. Johnston JJ, Petty EE, Volz SA (1997) *High Resol Chromatogr* 20:405-409
26. Guardino X, Serra C, Obiols J, Rosell MG, Berenguer MJ, López F, Brose J (1996) *J Chromatogr A* 719:141-147
27. Suzuki O, Hattori H, Liu J, Seno H, Kumazawa T (1990) *Forensic Sci Int* 46:169-180
28. Kumazawa T, Sato K, Seno H, Suzuki O (1992) *Forensic Sci Int* 54:159-166
29. Thompson TS, Treble RG (1996) *Chemosphere* 33:1515-1522
30. Angerer J, Ritter A (1997) *J Chromatogr B* 695:217-226
31. Martínez Vidal JL, Arrebola FJ, Fernández-Gutiérrez A, Rams MA (1998) *Chromatogr B* 719:71-78
32. López FJ, Beltrán J, Forcada M, Hernández F (1998) *J Chromatogr A* 823:25-33
33. Hernández F, Morell I, Beltran J, López FJ (1993) *Chromatographia* 37:303-312
34. Hernández F, Serrano R, Miralles MC, Font N (1996) *Chromatographia* 42:151-158
35. Chang RR, Jarman WM, Hennings JA (1993) *Anal Chem* 65:2420-2427

3.3. Referencias

- Martínez Vidal, J.L., Arrebola, F.J., Fernández Gutiérrez, A., Rams, M.A. (1998), *Determination of endosulfan and its metabolite in human urine using gas chromatography tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. B, **719**, 71

CAPÍTULO 4

DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y
ORGANOCORADOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS HUMANOS MEDIANTE
SPME

4.1. Introducción

En los capítulos anteriores se ha estudiado la aplicación de técnicas convencionales para la determinación de plaguicidas en fluidos biológicos, tales como la extracción con disolventes (LLME) y la SPE. En este capítulo se va a estudiar la aplicación de una técnica más novedosa, como es la **microextracción en fase sólida (SPME)**, libre de disolventes y más rápida y simple que los métodos tradicionales.

La microextracción en fase sólida es una técnica de preparación de muestra revolucionaria, que fue introducida por Pawliszyn y colaboradores a principios de 1990 para el análisis de compuestos orgánicos (Belardi y Pawliszyn, 1989; Arthur y Pawliszyn, 1990). En esta técnica, los pasos de extracción y concentración en la fase de preparación de la muestra se simplifican en una sola etapa, lo cual supone una reducción del tiempo de análisis y de la manipulación de la muestra, así como una disminución de los errores generados por la introducción de pasos adicionales.

Algunas de las aplicaciones de la técnica SPME en análisis biomédicos, incluyendo determinaciones de drogas, metabolitos, sustancias endógenas, tóxicos y contaminantes medioambientales por medio de técnicas cromatográficas (GC y LC), han sido revisadas por Ulrich en 2000 (Ulrich, 2000). También en el mismo año, Mills y Walker (2000) publicaron un trabajo de revisión de las aplicaciones de la técnica SPME en modo espacio de cabeza para el análisis de fluidos biológicos y otros materiales por medio de técnicas cromatográficas de gases. En este trabajo quedó reflejado el futuro potencial de la técnica SPME en métodos de rutina de muchos laboratorios, que implican análisis de muestras biológicas.

Beltran y colaboradores (2000) también han estudiado las aplicaciones de esta técnica, concretamente en el campo del análisis de residuos de plaguicidas. Han realizado una completa revisión de la literatura existente considerando las diferentes aplicaciones, divididas de acuerdo a las familias de los plaguicidas (OCs, OPS, triazinas, tiocarbamatos, uracilos sustituidos, derivados de la urea y dinitoanilinas) en diferentes tipos de matrices incluyendo muestras medioambientales (agua y

suelo), alimentos (vino, frutas y zumos) y fluidos biológicos (orina, suero y sangre). En relación con el tipo de fibras utilizadas, han destacado mayoritariamente las fibras de PDMS y PA, debido principalmente al hecho de que fueran las primeras disponibles comercialmente. Sin embargo, hoy en día se están realizando muchas investigaciones en base a la aplicación de fibras con fases poliméricas más polares y que están siendo recientemente comercializadas, como son CW-DVB, CW-TPR o CX-PDMS.

Cuando se trata de analizar muestras con matrices complejas, como es el caso de orina, suero y sangre, muchos autores recomiendan utilizar patrones internos o calibraciones con adiciones estándar, para llevar a cabo la cuantificación de los compuestos y obtener respuestas lineales adecuadas (Hill *et al.*, 1995; Beeson *et al.*, 1999; Beltran *et al.*, 2000; Mills y Walker, 2000). La utilización de técnicas cromatográficas con detectores de espectrometría de masas permite conseguir una cuantificación más adecuada, puesto que pueden utilizarse patrones isotópicamente marcados (deuterio o ^{13}C), cuyas propiedades físico-químicas resultan análogas al correspondiente compuesto objeto de estudio.

El desarrollo de métodos de análisis altamente sensibles se ha convertido actualmente en casi una exigencia. Una posible alternativa para conseguir aumentar la sensibilidad de los métodos analíticos, consiste en el empleo de técnicas de análisis más selectivas que proporcionen mayores relaciones señal/ruido para los picos cromatográficos correspondientes a los compuestos de interés. La selectividad en los análisis por GC-MS se puede aumentar mediante el empleo de técnicas como la ionización química, la espectrometría de masas en tándem o la combinación de ambas. En la mayoría de los casos, la eliminación o reducción del ruido químico, originado por la presencia de matrices complejas o de picos que co-eluyen con los analitos de interés, proporciona límites de detección más bajos.

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) generalmente requiere el uso de más de un analizador, como es el caso del triple cuadrupolo o el triple sector, que desempeñan las tareas de aislamiento de iones, fragmentación por colisión inducida y análisis de los iones para obtener finalmente el espectro de iones producto, libre de

interferencias química. Este tipo de configuraciones se denomina tándem en el espacio. El coste de los equipos y la dificultad de operación ha limitado su aplicación al análisis de residuos de plaguicidas en rutina.

La reciente aplicación de la función MS/MS en instrumentos de trampa de iones supone, en cambio, un impulso a la aplicación de esta técnica por su facilidad de uso, menor coste y posibilidad de realizar funciones MSⁿ sin modificaciones en la configuración del instrumento.

4.2. Experimental

En este apartado se ponen a punto procedimientos para la determinación de plaguicidas OPs y OCs en muestras humanas de orina, suero y sangre total mediante SPME. Por lo que respecta a la selección de los plaguicidas, al principio de cada subapartado se indica el grupo de compuestos OPs y OCs estudiados.

El desarrollo de los procedimientos sigue una línea progresiva en cuanto al sistema de detección utilizado en el GC. Al principio, y para realizar muchas de las experiencias de optimización de la técnica SPME, la determinación de los plaguicidas se lleva a cabo mediante GC-ECD o GC-FPD. La introducción de GC-MS o en tándem, permitió un aumento de la sensibilidad, así como de la selectividad, características altamente necesarias para el análisis de muestras reales.

Los procedimientos desarrollados se han aplicado a muestras reales de orina, suero y sangre. Muchos plaguicidas OCs, principalmente HCB y p,p'-DDE, han sido encontrados en muestras de población expuesta y no-expuesta. Por lo que respecta a los plaguicidas OPS, sólo *clorpirifos* se ha detectado en algunas muestras de sangre y suero pero en concentraciones muy bajas.

El presente apartado se ha estructurado del siguiente modo: en primer lugar, se describen detalladamente los reactivos, el material y el equipo instrumental utilizado para todas las experiencias; en segundo lugar, se estudia la técnica SPME en modo inmersión directa, primero en medio acuoso y después en muestras de orina y suero diluidas; en tercer lugar, se resumen las principales experiencias de optimización de la técnica SPME en modo espacio de cabeza (HS) en muestras acuosas; en cuarto lugar, se incluye el análisis de muestras de sangre total por HS-SPME y con detección GC-MS/MS; y finalmente, se estudia la aplicación de la técnica HS-SPME a muestras de suero mediante determinación por GC-MS.

Los artículos científicos presentados en este capítulo son tres:

- “Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluid using solid phase microextraction”

Anal. Chim Acta, 433, 217-226 (2001)

- “Headspace solid phase microextraction in combination with gas chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human blood”

J. Chromatogr B, (en prensa)

- “Gas chromatographic determination of selected pesticides in human serum by head-space solid phase microextraction”

Chromatographia, 54(11/12), (Diciembre 2001).

4.2.1. Reactivos, material y equipos instrumentales

Reactivos

- Patrones de plaguicidas OPs: *clorpirifos, diazinon, etion, fonofos, forate, fenitroton, fention, malation, metidation y paration-metil* de 96.5-99.7% de pureza (Dr. Ehrenstorfer, Promochem, Wesel, Alemania).

Patrones de plaguicidas OCs: *aldrin, clorfenson, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, α - y β -endosulfan* y sus *metabolitos (-éter, -lactona y -sulfato), endrin, α -, β -, γ y δ -HCH, HCB, heptaclor, heptacloro epóxido y metoxiclor* de 96.5-99.7% de pureza (Dr. Ehrenstorfer, Promochem, Wesel, Alemania).

Patrones de plaguicidas deuterados: *p,p'-DDE D₈* (Dr. Ehrenstorfer), *HCB ¹³C₆* y *fenitroton- O,O-dimetil D₆* (Cambridge Isotope Labs, Inc. Andover, MA).

Se prepararon por pesada disoluciones individuales stock de cada compuesto del orden de 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en el caso de los patrones deuterados) en acetona, que se almacenaron en el congelador a -18°C. A partir de estas disoluciones individuales, se prepararon tres mezclas stock (aprox. 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) también en acetona. Las disoluciones de trabajo se fueron preparando por dilución en metanol para fortificar las muestras de fluidos biológicos y de agua, y en hexano para inyectar en el sistema cromatográfico. La fortificación de las muestras biológicas se llevó a cabo añadiendo el volumen adecuado de las disoluciones standard en metanol (manteniendo un contenido final de metanol menor de 1-2.5 %). Después de agitarlas, se dejaron toda la noche a 4°C para que alcanzasen el equilibrio.

- Disolventes orgánicos, calidad para análisis de residuos de plaguicidas (ARP): acetona, metanol y n-hexano (Scharlab, Barcelona, España).
- Agua calidad nanopure.
- Cloruro sódico, calidad analítica (Scharlab).

- Ácido sulfúrico (Scharlab) y clorhídrico (J.T. Baker, Deventer, The Netherlands), de calidad analítica, y ácido tricloroacético (American Chemical Society, Panreac), calidad para análisis-ACS.

Material

- Material de vidrio: viales para SPME (36 mm x 12 mm d.i.) y 7 ml (52 mm x 14 mm d.i.) con tapones y septum de silicona, pipetas Pasteur, tubos, etc.
- Material volumétrico tipo A (pipetas, aforados, etc.).
- Agitador magnético Selecta (Agimatic Rev-E) provisto de sonda y controlador de temperatura.
- Agitador vibrador para tubos Reax 2000 (Vortex).
- Soporte para SPME (Supelco).
- Fibras de SPME (Supelco). Las fases estacionarias utilizadas, así como el grosor, la T^a máxima y recomendada, y las condiciones de acondicionamiento en el puerto de inyección del GC, antes del primer uso, se presentan en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Fibras utilizadas para la optimización de SPME.

Fase estacionaria	Grosor	T ^a máxima	T ^a recomendada	T ^a acond.	t acond.
PDMS	100 μm	280°C	200-270°C	250°C	1 h
PA	85 μm	320°C	220-310°C	280°C	0.5 h
CX/PDMS	75 μm	320°C	240-300°C	280°C	0.5 h
CW/DVB	65 μm	265°C	200-260°C	250°C	0.5 h

- Gases: Helio, nitrógeno e hidrógeno (99.9995% de calidad) y aire (99.995% de calidad) utilizados en el sistema cromatográfico fueron suministrados por Carburos Metálicos (Barcelona, España).

Muestras

- Las muestras de orina, suero y sangre usadas para la etapa de optimización fueron obtenidas de personas sanas, considerándolas población no-expuesta. Para la obtención del suero, primeramente las muestras de sangre fueron recogidas por venipuncture haciendo uso de tubos separadores de sangre vacutainer (Brand o TAPVAL); se dejó que la sangre precipitara, y el suero fue extraído. Las muestras de sangre completa fueron recogidas en tubos vacutainer (Brand) que contenían EDTA en su interior para evitar la coagulación. Todas estas muestras fueron luego almacenadas a -18°C hasta su análisis.

Equipos instrumentales

- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 series II con detector ECD, un *splitless* autoinyector HP 7673 (2 mm d.i. inserto) y una columna capilar de sílice fundida HP Ultra 2 (crosslinked 5% fenil-metil siloxano, 25 m x 0.25 mm d.i., 0.33 μm de espesor de fase). Helio fue usado como gas portador a un flujo 1 ml min^{-1} . Condiciones de ECD: temperatura 300°C , N_2 60 ml min^{-1} .
- Cromatógrafo de gases Ultra-Trace GC (Fisons Instruments) basado en el GC 8000 Series 2, y equipado con un detector fotométrico de llama (FPD-80) y un PC como sistema de datos (Chrom Card) para controlar la adquisición de datos y las condiciones del equipo. La presión de los gases auxiliares, hidrógeno y aire, fue de 140 y 60 kPa, respectivamente. Helio fue utilizado como gas portador, 1 ml min^{-1} . La columna analítica utilizada fue de 30 m x 0.32 mm d.i., con 0.5 μm 5% fenil metil siloxano. La temperatura del detector fue de 280°C .
- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 series II equipado con detector selectivo de masas MSD 5971, un *splitless* autoinyector HP 7673 (2 mm d.i. inserto) y columna capilar HP Ultra 2 (5% fenil metil siloxano) 25 m x 0.25 mm d.i., 0.33 μm . Helio fue usado como gas portador a 0.5 ml min^{-1} . Las

características del detector de masas fueron: modo de impacto (70 eV) con un multiplicador de voltaje de 1800V; temperatura de la línea de transferencia 280°C; rango de masas para las experiencias en *full scan* 50-500 *m/z*.

- Cromatógrafo de gases GC 8000 Top (CE Instruments, Milan, Italy) equipado con un espectrómetro de masas de trampa de iones (Finnigan GCQ, Austin, Texas, USA) operando en modo de ionización de impacto electrónico (EI) y con un *splitless* autoinyector AS 800. Las características de la columna capilar fueron: sílice fundida DB-5MS (5% fenil metil siloxano) 30 m x 0.25 mm d.i., 0.25 μm . Se usó Helio como gas portador a 1 ml min⁻¹. Las condiciones experimentales del espectrómetro de masas se verán en apartados posteriores.

En los procedimientos por SPME en el modo de inmersión directa, la cuantificación se llevó a cabo utilizando patrones externos acuosos y patrón de control (*surrogate*)/patrón interno. Sin embargo, en los procedimientos de HS-SPME la cuantificación de las muestras se realizó usando una curva de calibración preparada con muestras de fluidos biológicos “blancos” fortificadas a varios niveles de concentración y usando *surrogate*/patrón interno deuterado, siempre y cuando se hiciera uso de GC-MS o GC-MS/MS.

La temperatura de los inyectores, el tiempo de desorción, así como el programa de temperatura del horno, para cada uno de los cromatógrafos, fueron variables objeto de la optimización de la desorción de los analitos, y por tanto se harán referencia a ellas en los apartados posteriores.

4.2.2. Optimización de la técnica SPME en medio acuoso por inmersión directa

En primer lugar, y antes de la aplicación de la técnica SPME al análisis de fluidos biológicos, se llevó a cabo la optimización de los parámetros experimentales en muestras de agua fortificada para la determinación de plaguicidas OPs y OCs seleccionados. Para cada una de las dos familias de insecticidas, el proceso de optimización se realizó por separado y utilizando detectores distintos: GC-FPD para los OPs y GC-ECD para los compuestos OCs.

En cuanto a los plaguicidas OPs estudiados en este apartado se incluyeron un total de 7 compuestos: *diazinon*, *paration-metil*, *fenitrotion*, *malation*, *fention*, *clorpirifos* y *metidation*. Como patrones internos se utilizaron dos: *forate* o *fonofos*.

Por otra parte, en cuanto a los plaguicidas OCs fue seleccionado un grupo de 16 compuestos: *HCB*, β -, γ y δ -*HCH*, *p,p'*-*DDE*, *p,p'*-*DDT*, *p,p'*-*DDD*, α - y β -*endosulfan* y *metabolitos* (-éter y -sulfato), *heptaclor*, *heptacloro epóxido*, *aldrin*, *endrin* y *metoxiclor*. Como patrones internos, se utilizaron *clorfenson* y α -*HCH*.

4.2.2.1. Plaguicidas organofosforados

En cuanto a la determinación de plaguicidas OPs en medio acuoso mediante SPME, un trabajo reciente publicado por Beltran *et al.* (1998) estudió la optimización con dos fibras, PDMS y PA, encontrando que el tiempo de desorción óptimo para las dos fibras era de 4 min y la temperatura del inyector de 270°C y 250°C, respectivamente. Las condiciones de la absorción fueron las siguientes: 3 ml de muestra conteniendo un 15% de NaCl fueron extraídos con agitación y a temperatura ambiente durante un tiempo de 30 min.

A partir de estas experiencias, se llevó a cabo la *selección de la fibra* más idónea para la determinación de los compuestos OPs investigados. Para ello se compararon cuatro fibras diferentes, las cuales cubren un amplio rango de polaridades: *polidimetilsiloxano* (PDMS) (100 μ m), *poliacrilato* (PA) (85 μ m),

carboxen/polidimetilsiloxano (CX/PDMS) (75 μm) y carbowax/divinilbenceno (CW/DVB) (65 μm). En la desorción, se utilizó un tiempo de 4 min y una temperatura de 270°C (PDMS), 250°C (PA), 280°C (CX/PDMS) y 240°C (CW/DVB). La **Figura 4.1** muestra los resultados obtenidos para los OPs estudiados después de la extracción por SPME con las diferentes fibras seleccionadas. A la vista de la figura, se seleccionó la fibra de PDMS puesto que aumentaba la eficacia de la extracción para todos los compuestos OPs estudiados, y consecuentemente se adoptaron las condiciones descritas (270°C y 4 min) para la desorción.

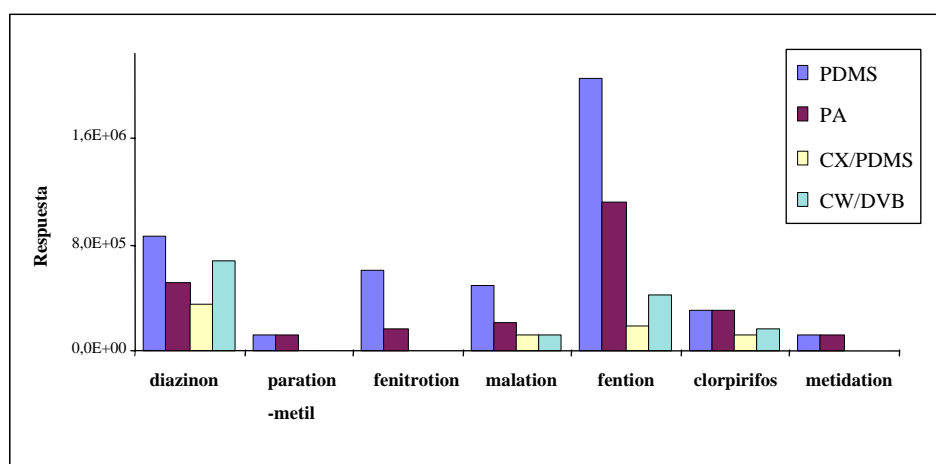


Figura 4.1. Respuestas cromatográficas de los plaguicidas OPs obtenidas tras la extracción por SPME de una muestra de agua fortificada a 10 ng ml⁻¹ usando distintos tipos de fibras.

4.2.2.2. Plaguicidas organoclorados

La optimización del procedimiento de SPME para los OCs, en modo inmersión directa y en medio acuoso, se llevó a cabo en dos etapas separadas: en primer lugar, se estudió la etapa de desorción, y a continuación, se optimizaron las condiciones de la absorción.

Optimización de la etapa de desorción

En primer lugar, y para realizar las experiencias posteriores, fue necesario fijar unas condiciones de absorción. De este modo, las condiciones iniciales de la extracción fueron: 3 ml de agua fortificada a 10 ng ml^{-1} con agitación magnética y un tiempo de extracción de 30 min.

Las primeras experiencias consistieron en el estudio de *selección de la fibra*, probándose las mismas que las estudiadas para los OPs: PDMS (100 μm), PA (85 μm), CX/PDMS (75 μm) y CW/DVB (65 μm). En la desorción, se utilizó un tiempo de 5 min y una temperatura de 270°C , excepto para la fibra CW/DVB, para la cual se tomó 240°C ya que, aunque la máxima temperatura recomendada para esta fibra es de 265°C , trabajar a temperaturas superiores a 240°C supone una rápida degradación de la misma (Hernández *et al.*, 2000).

La **Figura 4.2** muestra la cantidad recuperada de los plaguicidas OCs tras la extracción por SPME para cada una de las fibras estudiadas. Aunque puede observarse que la fibra CW/DVB dio muy buenos resultados en algunos casos (α -HCH, HCB, lindano, δ -HCH), se decidió seleccionar sólo las fibras de PDMS y PA para los estudios de las experiencias posteriores, puesto que la fibra CW/DVB opera a temperaturas de desorción más bajas que las otras dos, y en principio parece ser una fibra menos estable y puede degradarse con mayor facilidad.

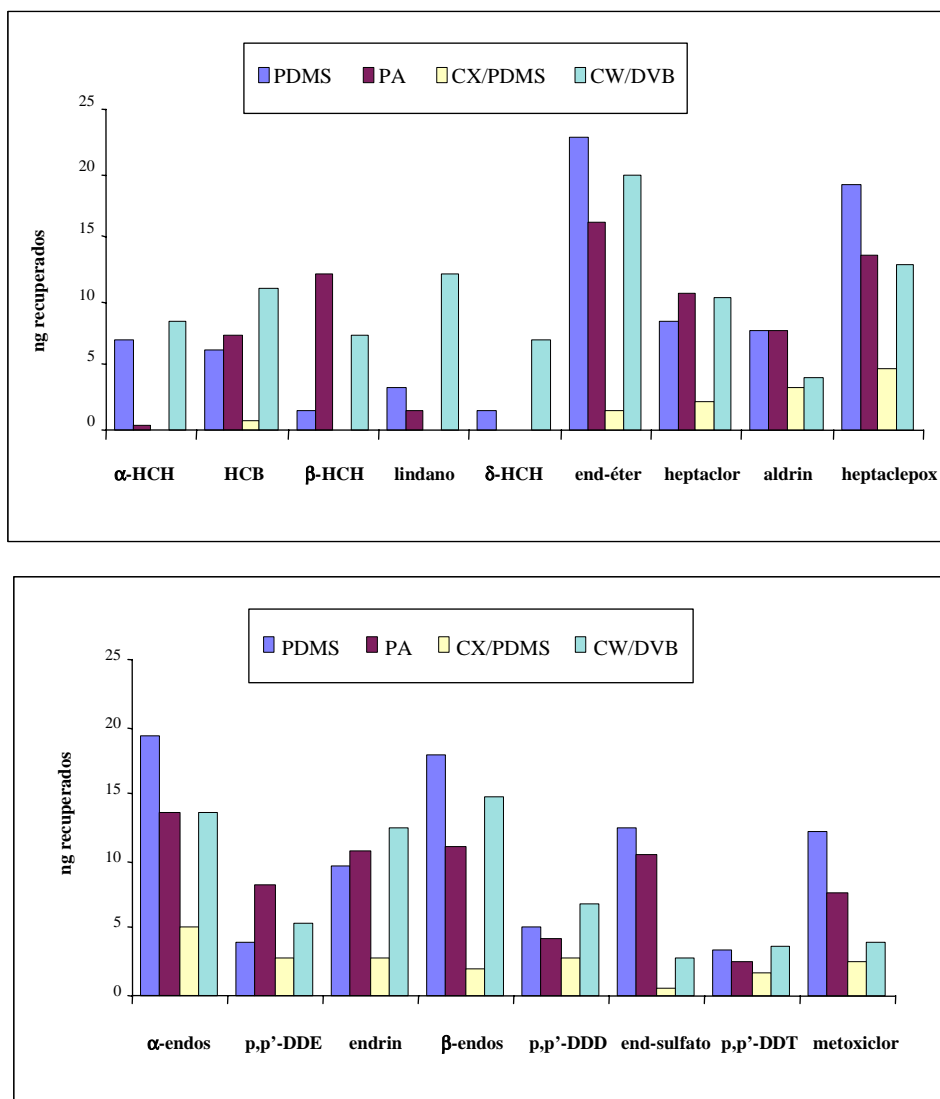


Figura 4.2. Recuperaciones de los plaguicidas OCs obtenidas tras la extracción por SPME de una muestra de agua fortificada a 10 ng ml^{-1} usando distintos tipos de fibras.

A continuación, se estudiaron las dos variables de desorción más importantes: la temperatura del inyector y el tiempo de desorción.

- **Temperatura de desorción**

La **Figura 4.3** muestra los resultados de la optimización de la temperatura de desorción en el inyector del GC para la fibras PDMS y PA. Las temperaturas seleccionadas fueron 250°C (para la fibra PDMS) y 260°C (para la fibra de PDMS), puesto que las mejores respuestas cromatográficas para la mayoría de los compuestos OCs se obtuvieron a esos valores.

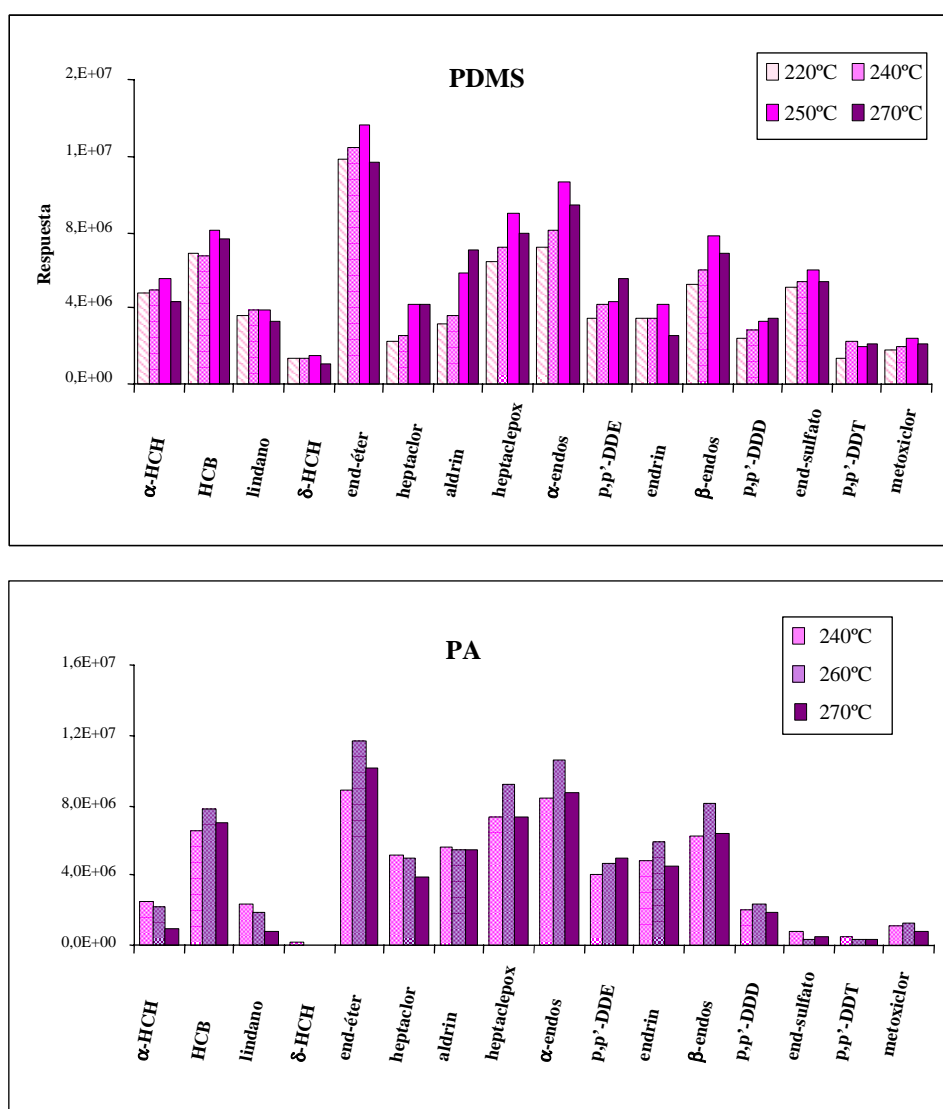


Figura 4.3. Respuestas obtenidas para los compuestos OCs en función de la temperatura de desorción para las fibras PDMS y PA.

- **Tiempo de desorción**

A las temperaturas de desorción óptimas, y con el fin de obtener la máxima respuesta por parte del detector, se estudiaron diferentes tiempos de desorción entre 1-5 min. La **Figura 4.4** muestra los resultados obtenidos para las fibras PDMS y PA. En el caso de la fibra PDMS, se observó en general un incremento de las recuperaciones al aumentar el tiempo de desorción, presentando los mejores resultados a un tiempo de 5 min. Sin embargo, para la fibra PA el comportamiento fue distinto observándose un máximo de recuperación para un tiempo de 2 min. De este modo, esos fueron los valores seleccionados para continuar el trabajo experimental.

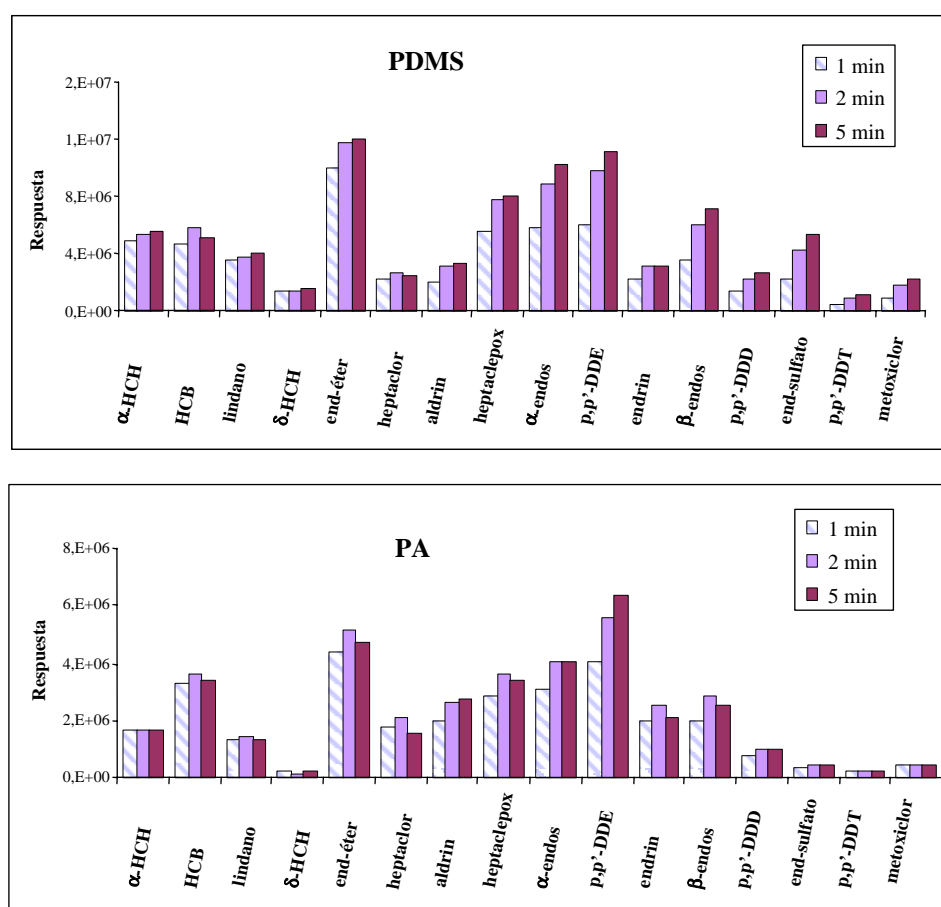


Figura 4.4. Respuestas obtenidas para los compuestos OCs en función del tiempo de desorción para las fibras PDMS y PA.

Optimización de la etapa de absorción

Una vez optimizadas las variables de desorción para la fibra PDMS (250°C, 5 min) y PA (260°C, 2 min), el siguiente paso fue la selección de las condiciones óptimas para la absorción de los plaguicidas OCs en medio acuoso. Las dos variables que se optimizaron fueron el contenido de sal y el tiempo de extracción. Todas las experiencias se realizaron a temperatura ambiente, con agitación magnética y utilizando un volumen de muestra de 3 ml, cantidad suficiente para sumergir la fibra durante el proceso de extracción. En relación con este último parámetro, algunos autores indican que en condiciones de equilibrio se debería utilizar el mayor volumen de muestra disponible para obtener buenas recuperaciones (Gorecki y Pawliszyn, 1997). Sin embargo, el método que se propondrá no trabaja en condiciones de equilibrio, y por tanto no se consideró necesario aumentar el volumen de muestra.

- **Fuerza iónica**

El efecto del contenido de sal (0 – 15% de NaCl) en la muestra fue el primer parámetro de absorción que se estudió, puesto que es bien conocida la eficacia del efecto salino (*salting out*) en la extracción de plaguicidas polares en agua, al menos mediante LLE o SPE (Lopez Avila y Edgell, 1990; Hernández *et al.*, 1993; Beltran *et al.*, 1993). La **Figura 4.5** muestra las recuperaciones de los plaguicidas OCs después de la extracción de una muestra de agua, con y sin NaCl. A la vista de los resultados obtenidos, para la mayoría de los compuestos, la adición de sal no mejoró la eficacia de la extracción, ni utilizando PDMS ni PA, posiblemente debido a la baja polaridad de los analitos. Como consecuencia, se decidió trabajar sin adición de NaCl.

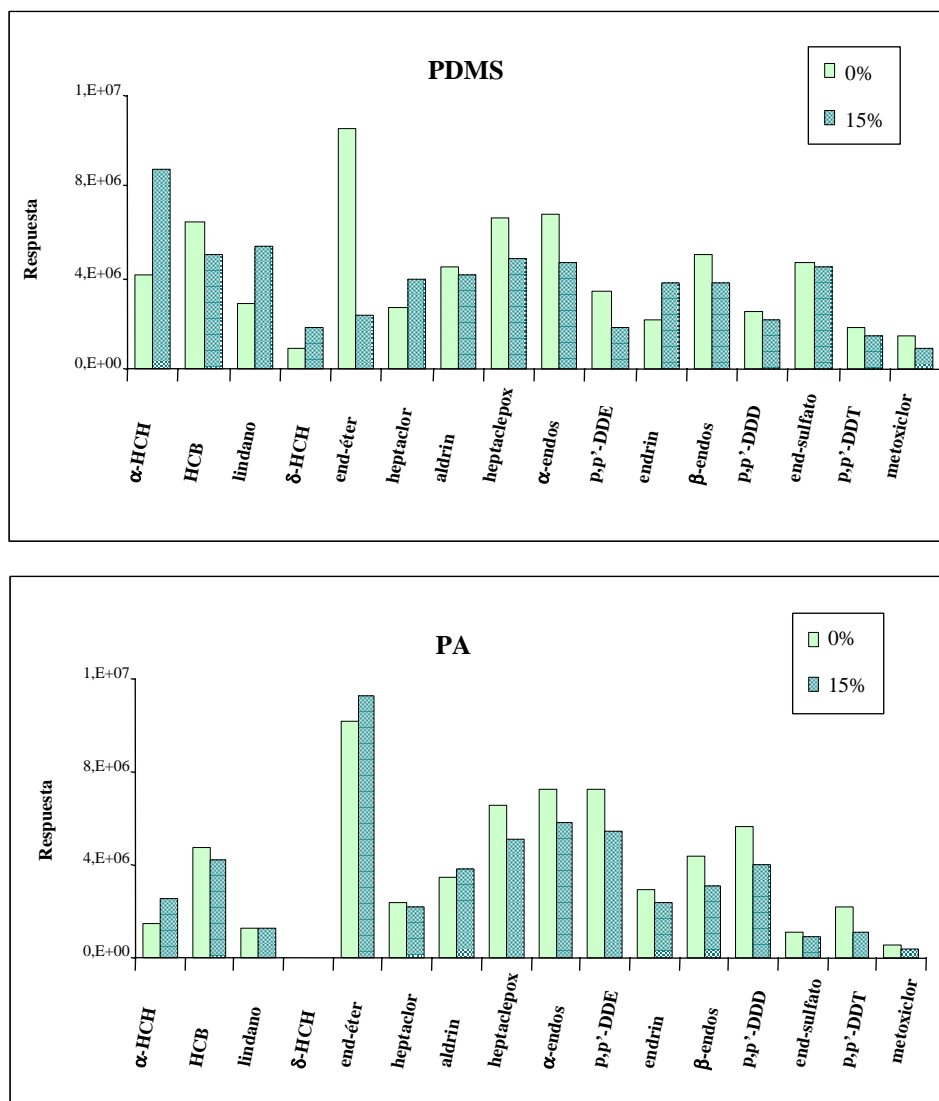


Figura 4.5. Efecto de la adición de NaCl en la eficacia de la extracción de plaguicidas OCs en agua por SPME utilizando las fibras PDMS y PA.

- **Tiempo de extracción**

El siguiente paso en el desarrollo del método fue el estudio del efecto del tiempo de absorción en la eficacia de la extracción para los diferentes plaguicidas OCs estudiados. Este apartado es de gran importancia práctica ya que determina la obtención del tiempo necesario para llegar al equilibrio.

En este sentido, se realizaron extracciones de una muestra de agua fortificada a un nivel de 10 ng ml^{-1} con tiempos desde 1 min hasta 24 horas, para las dos fibras estudiadas. Los resultados obtenidos para algunos de los compuestos seleccionados, representando la cantidad extraída (ng) en función del tiempo de extracción, se muestran en la **Figura 4.6**.

Para determinar, tanto el tiempo de equilibrio como la masa extraída en condiciones de equilibrio, los valores experimentales se ajustaron a la ecuación deducida por Ai (1997), mediante el programa Origin (Microcal):

$$n = n_0 [1 - e^{(-at)}] \quad (1)$$

Donde n y n_0 son las cantidades de analito absorbidas en el tiempo t y en el equilibrio respectivamente y a es un parámetro que indica la rapidez con que se alcanza el equilibrio de absorción en SPME.

Los resultados obtenidos en cuanto a valores de n_0 , parámetro a y tiempo de equilibrio se presentan en la **Tabla 4.2**. Como puede observarse, la cantidad de analito extraída en el equilibrio para la mayoría de los compuestos fue mayor para la fibra de PDMS. Los tiempos de equilibrio, calculados como el tiempo necesario para extraer el 95 % de la máxima cantidad extraída (n_0), variaron entre 30 minutos y 9 horas en el caso de la fibra apolar (PDMS), mientras que para la fibra polar (PA) los tiempos de equilibrio fueron mayores, oscilando entre 6 y 24 horas.

Por otro lado, se calcularon las constantes de extracción (K_{SPME}), utilizando tiempos de extracción de 24 horas, a partir de la ecuación siguiente (Magdic y Pawliszyn, 1996).

$$K = \frac{nV_s}{V_f(C_0V_s - n)} \quad (2)$$

Donde n es la cantidad de analito absorbida en 24 horas, V_s es el volumen de muestra (3 ml), V_f es el volumen de la fibra y C_0 es la concentración de la muestra ($10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Las constantes obtenidas de este modo también se muestran en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4.2. Parámetros obtenidos por ajuste matemático (ecuación (1)) de la cantidad absorbida frente al tiempo de extracción (3 ml muestra de agua fortificada a un nivel de 10 ng mL^{-1}) para las dos fibras estudiadas. Constantes de extracción para SPME obtenidas a 24 horas (ecuación (2)).

	Log K_{OW} ⁽¹⁾	Fibra PDMS				Fibra PA			
		n_0 (ng) ⁽²⁾	a	teq (min) ⁽³⁾	K_{SPME}	n_0 (ng) ⁽²⁾	a	teq (min) ⁽³⁾	K_{SPME}
α -HCH	3.81	3.4	0.0818	56	562	3.6	0.0099	304	792
HCB	5.50	9.5	0.0100	301	562	8.9	0.0034	889	2434
Lindano	3.72	2.3	0.0703	43	2061	3.3	0.0084	359	713
δ -HCH	4.14	1.1	0.1186	25	381186	–	–	–	–
Edosulfan-éter	–	11.1	0.0320	102	2084	11.2	0.0069	434	3437
Heptaclor	5.38	11.7	0.0057	526	2922	8.0	0.0031	970	2098
Aldrin	6.50	8.1	0.0066	454	1710	4.1	0.0042	713	924
Heptaclorepóxido	5.40	17.8	0.0155	193	6364	13.8	0.0050	600	4915
α -Endosulfan	4.75	17.6	0.0192	156	6320	13.4	0.0050	596	4657
p,p'-DDE	–	13.5	0.0120	251	3790	9.0	0.0047	636	2473
Endrin	4.56	17	0.0136	220	6158	10.4	0.0052	576	3061
β -Endosulfan	4.75	13.7	0.0241	124	3620	11.8	0.0053	564	3741
p,p'-DDD	–	16.3	0.0067	449	5556	6.7	0.0023	1320	1646
Endosulfan-sulfato	–	7.2	0.0450	67	1470	1.9	0.0021	1440	390
p,p'-DDT	6.38	17.8	0.0096	312	6541	2.4	0.0060	497	502
Metoxiclor	3.31	21.8	0.0083	363	12084	8.5	0.0021	1413	2281

(1) coeficiente de partición octanol-agua (Noble, 1993; Tomlin, 1997)

(2) cantidad máxima que puede extraerse en el equilibrio

(3) calculado como el tiempo necesario para la extracción del 95% de la cantidad extraída en el equilibrio

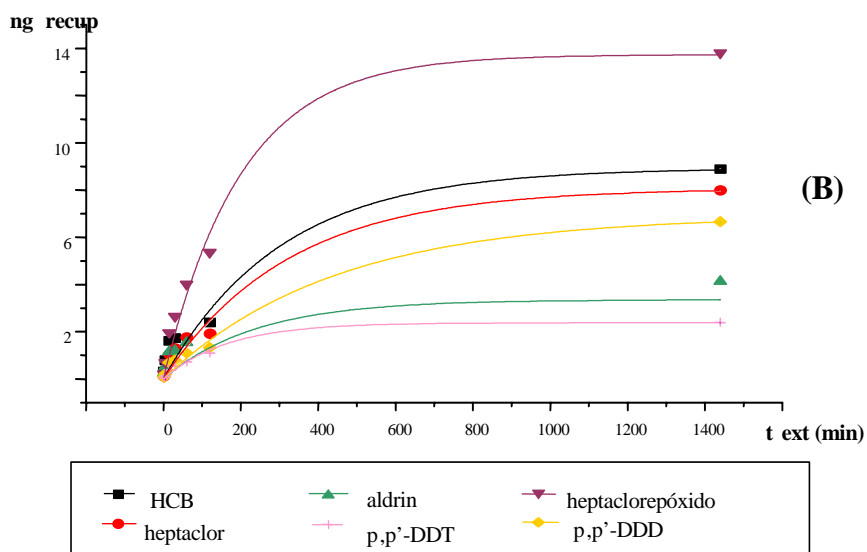
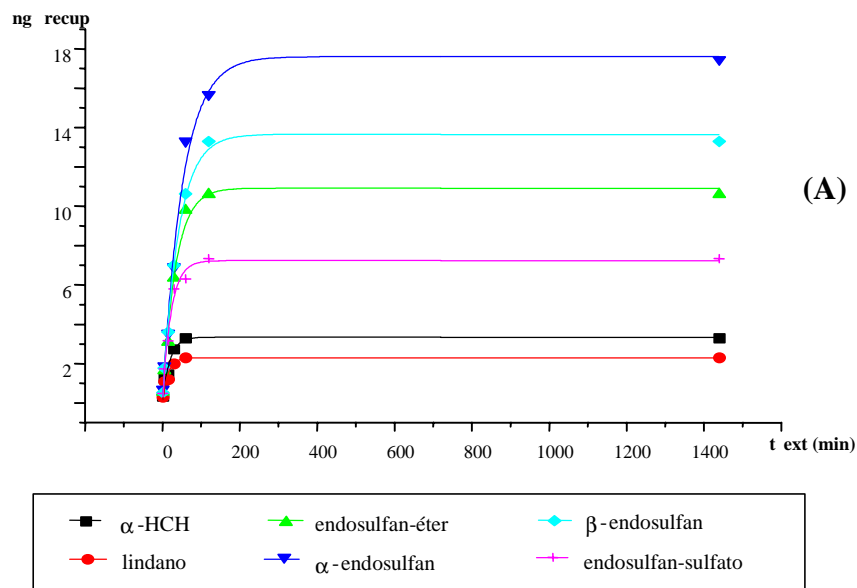


Figura 4.6. Curvas del tiempo de extracción para plaguicidas OCs obtenidas a partir de la ecuación (1) mediante SPME con inmersión directa. (A) fibra PDMS; (B) fibra PA.

A la vista de los resultados y teniendo en cuenta que los tiempos de equilibrio eran demasiado altos desde el punto de vista práctico, se decidió trabajar en condiciones de no equilibrio, y se seleccionó un tiempo medio de extracción de 45 min, tiempo comparable a la duración del programa cromatográfico. Utilizando este tiempo de extracción con la fibra PDMS se conseguía extraer más del 50% de la cantidad extraída en el equilibrio (n_0) para muchos de los OCs, mientras que con la fibra PA no se consiguieron buenos resultados, por lo que fue la fibra PDMS la seleccionada para el desarrollo y validación posterior del método.

Tras establecer las condiciones óptimas de extracción (*absorción*: 3 ml de muestra y 45 min de extracción mediante fibra PDMS, con agitación; *desorción*: 5 min a 250°C), se llevó a cabo la validación del procedimiento, para lo cual se estudió la precisión, los rangos de linealidad y los límites de detección (los resultados se muestran en el artículo que se presenta en la sección 4.2.3.5). A modo de ejemplo, la **Figura 4.7** muestra un cromatograma correspondiente a la extracción mediante SPME de una muestra de agua fortificada a 0.5 ng ml⁻¹ con los OCs seleccionados.

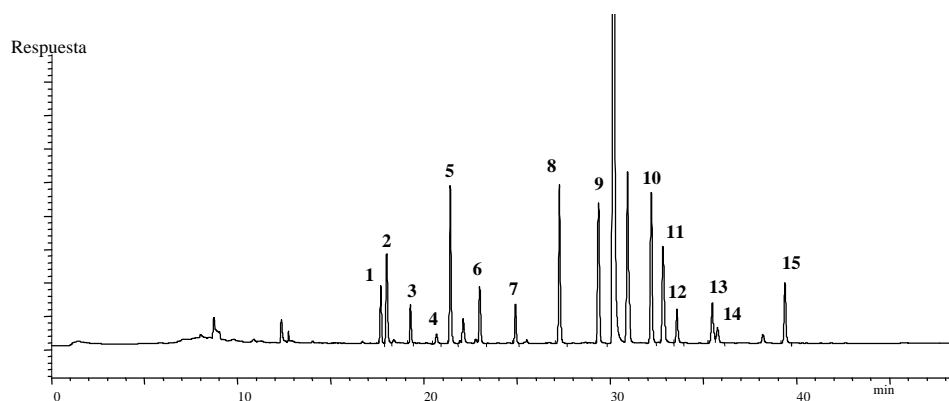


Figura 4.7. Cromatograma (GC-ECD) correspondiente a una muestra de agua fortificada a 0.5 ng ml⁻¹ con los plaguicidas OCs estudiados extraída mediante SPME con fibra de PDMS. (1) α -HCH, (2) HCB, (3) lindano, (4) δ -HCH, (5) endosulfan-éter, (6) heptaclor, (7) aldrin, (8) heptacloro epóxido,

(9) α -endosulfan, (10) endrin, (11) β -endosulfan, (12) *p,p'*-DDD, (13) endosulfan-sulfato, (14) *p,p'*-DDT, (15) metoxiclor.

4.2.3. Análisis de suero y orina mediante SPME con inmersión directa

Una vez establecidas las condiciones de absorción y desorción para la extracción de plaguicidas OPs y OCs en muestras de agua mediante SPME en modo inmersión directa, el siguiente paso fue la aplicación de estas condiciones a muestras de fluidos biológicos. En cuanto a los plaguicidas seleccionados, fueron los mismos que los del apartado anterior.

4.2.3.1. Determinación de plaguicidas organofosforados en suero

La primera experiencia que se realizó fue comprobar la eficacia de la extracción optimizada en muestras de agua aplicada ahora, a muestras de suero. Para ello, y bajo las mismas condiciones de absorción (fibra PDMS/ agitación/ 15% NaCl/ 30 min de extracción) y desorción (270°C/ 4 min) se extrajeron 3 ml de agua y 3 ml de suero diluido (1/10) fortificados ambos a una concentración final de 10 ng ml⁻¹. Comparando las áreas de los picos, se observó que la eficacia de la extracción en las muestras de suero era casi diez veces menor que en las muestras de agua (**Figura 4.8**).

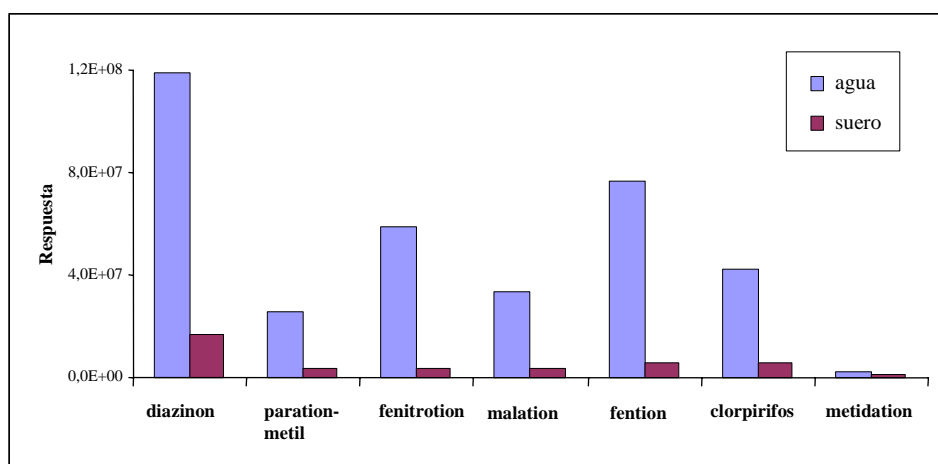


Figura 4.8. Comparación de áreas de picos de los plaguicidas OPs en agua y suero diluido (manteniendo una concentración final en la muestra extraída de 10 ng mL^{-1}) tras la extracción por SPME.

Al principio y tratando de encontrar alguna explicación al diferente comportamiento, se pensó que algunos de los parámetros optimizados para las muestras de agua no eran los más óptimos para las muestras de suero. Por este motivo, se llevó a cabo una experiencia en cuanto al *contenido de NaCl*: el resultado de la extracción del suero con 15% y 0% de NaCl no mostró ninguna diferencia, puesto que las áreas de los picos fueron prácticamente las mismas. También se estudió *el tiempo de absorción* en las muestras de suero desde 30 min hasta 20 horas. Los resultados de esta última experiencia resultaron sorprendentes, puesto que a medida que el tiempo aumentaba no se observó un aumento importante de la respuesta de los plaguicidas, sino que el área de los picos permanecía más o menos constante. Una posible explicación a este hecho podría atribuirse a la matriz de la muestra, puesto que existen muchos interferentes (como las proteínas) que podrían saturar la fibra e impedir que los compuestos sigan absorbiéndose a ella al aumentar el tiempo.

Como paso siguiente, y con el fin de disminuir la complejidad de la matriz y aumentar la eficacia de la extracción, se comprobó el efecto de *la dilución del suero* con agua previamente a la extracción por SPME, estudiando diluciones de 10 a 100 veces, manteniendo siempre una concentración final de muestra extraída de 5 ng mL^{-1} (**Figura 4.9**).

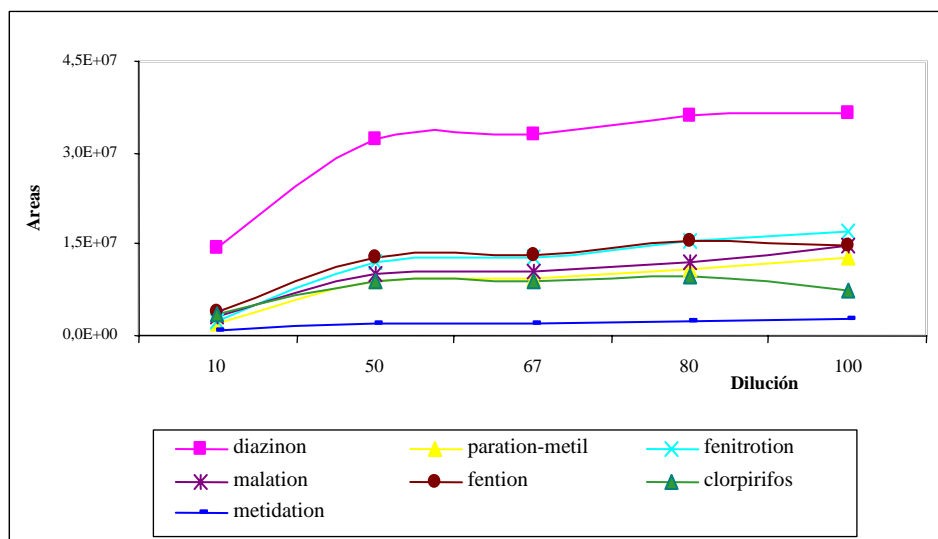


Figura 4.9. Efecto de la dilución del suero sobre la respuesta en la SPME de plaguicidas OPs (concentración final en el suero diluido, 5 ng ml^{-1}).

Como puede observarse, la eficacia de la extracción en general aumentó a medida que el suero estaba más diluido, y como consecuencia se decidió seleccionar una dilución 1/50, ya que para mayores diluciones el aumento de la respuesta cromatográfica no resultaba tan sustancial.

Una vez optimizadas las variables de la extracción por SPME, se buscó el método de cuantificación más apropiado para la determinación de los plaguicidas OPs en las muestras de suero. Para poder cuantificar mediante curvas de calibración preparadas con patrones acuosos, fue necesario trabajar con patrón interno, añadido tanto a las muestras de suero como a los patrones acuosos externos. El compuesto seleccionado como patrón interno debía poseer unas propiedades físico-químicas semejantes a los plaguicidas investigados, así que se decidió elegir otro insecticida OP que no fuese muy utilizado en los cultivos de la zona Mediterránea. De este modo, *forate* fue el mejor candidato presentando además gran eficacia de extracción cuando se aplicó el procedimiento desarrollado de SPME.

Por último, la validación del método desarrollado se llevó a cabo evaluando los siguientes parámetros:

Linealidad- la curva de calibración fue obtenida en el intervalo de concentración 10-50 ng ml⁻¹.

Exactitud- fue estudiada mediante ensayos de recuperación analizando muestras de suero a dos niveles de concentración (10 y 50 ng ml⁻¹).

Precisión- fue determinada como la repetibilidad en un mismo día (n=6) de las recuperaciones a cada nivel de fortificación ensayado.

Límites de detección (LD)- obtenidos cuando la señal fue 3 veces el ruido de fondo en el cromatograma correspondiente al nivel más bajo de concentración para el analito.

Los resultados correspondientes a la validación del método se presentan en el artículo científico adjunto en la sección 4.2.3.5.

4.2.3.2. Determinación de plaguicidas organoclorados en suero

El esquema de trabajo seguido en esta fase de la investigación fue el análogo al del apartado anterior relativo a la determinación de OPs.

Al comparar los resultados obtenidos en la extracción de 3 ml de agua nanopure con la extracción de 3 ml de suero diluido (1/10) fortificados ambos a una concentración final de 10 ng ml⁻¹, y bajo las mismas condiciones de absorción (fibra PDMS/ agitación/ 45 min de extracción) y desorción (250°C/ 5 min), se comprobó también que la eficacia de la extracción de los plaguicidas OCs en suero era mucho menor que en agua. Por consiguiente, el siguiente paso fue el estudiar el efecto de la dilución del suero con agua nanopure sobre la extracción por SPME. La **Figura 4.10** muestra los resultados obtenidos, observándose que la mayor eficacia corresponde al menos a un factor de dilución de 50, a partir del cual las respuestas cromatográficas de los plaguicidas se mantienen más o menos constantes, o en algunos casos

(*endosulfan-éter*) aumentan ligeramente. Por tanto, y al igual que en los compuestos OPs, se decidió aplicar un factor de dilución de 50 al suero.

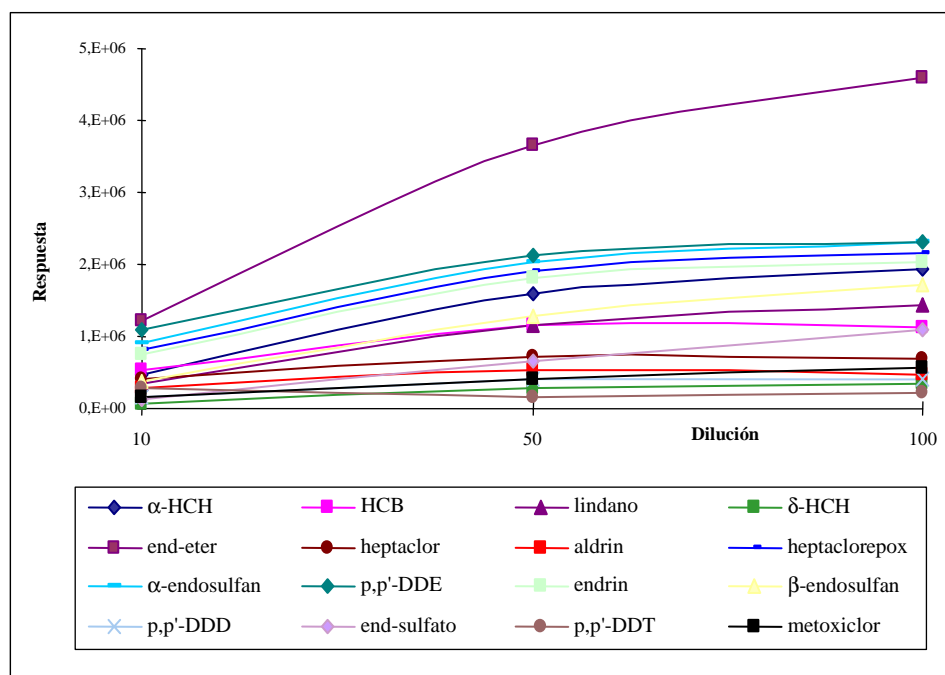


Figura 4.10. Efecto de la dilución del suero con agua nanopure sobre la respuesta en la SPME de plaguicidas OCs (concentración final en el suero diluido 5 ng ml^{-1}).

La cuantificación, en este caso, también se llevó a cabo con curvas de calibración de patrones acuosos externos, y utilizando patrón interno. Al principio, como patrón interno se seleccionó *clorfensón*, un plaguicida OC cuyo tiempo de retención se encontraba en una situación intermedia respecto a los demás compuestos estudiados. Pero se observó que tanto la reproducibilidad como la precisión no eran satisfactorias para los OCs que eluían antes que él. Por este motivo, se adicionó otro compuesto más (α -HCH) como patrón interno para corregir la variabilidad de los primeros analitos (*HCB*, *lindano*, δ -HCH, *endosulfan-éter*, *heptaclor* y *aldrin*).

La validación del método desarrollado se llevó a cabo evaluando los siguientes parámetros (resultados en el artículo adjunto, sección 4.2.3.5):

Linealidad- la curva de calibración fue obtenida en el intervalo de concentración 5-500 ng ml⁻¹.

Exactitud- fue estudiada mediante ensayos de recuperación analizando muestras de suero fortificados a tres niveles de concentración (5, 50 y 500 ng ml⁻¹).

Precisión- fue determinada como la repetibilidad en un mismo día (n=6) de las recuperaciones a cada nivel de fortificación ensayado.

Límites de detección (LD)- obtenidos cuando la señal fue 3 veces el ruido de fondo en el cromatograma correspondiente al nivel más bajo de concentración para el analito.

4.2.3.3. Determinación de plaguicidas organofosforados en orina

Con el fin de completar el estudio de la determinación de plaguicidas en fluidos biológicos mediante SPME en modo inmersión directa, el procedimiento optimizado en el apartado correspondiente a muestras de agua (4.2.2.1) se aplicó al análisis de muestras de orina humana. El primer paso, y en base a los conocimientos obtenidos en los ensayos previos con muestras de suero, fue comparar la eficacia del procedimiento de extracción en muestras de agua y de orina. Para ello, y bajo las mismas condiciones de absorción (fibra PDMS/ agitación/ 15% NaCl/ 30 min de extracción) y desorción (270°C/ 4 min) se extrajeron 3 ml de agua, por un lado, y 3 ml de orina sin diluir, por otro, fortificadas ambas a 10 ng ml⁻¹. La **Figura 4.11** muestra la comparación de las áreas de picos obtenidas para los plaguicidas OPs en ambos casos. Como puede observarse, para cuatro de los compuestos no existió apenas diferencia de respuesta entre las matrices (*diazinon*, *paration-metil*, *fenitroton* y *malation*). Para los tres restantes, la eficacia fue mayor en agua (entre 1.5 - 4.5 veces mayor), aunque la diferencia entre agua y orina, fue mucho menor que entre agua y suero.

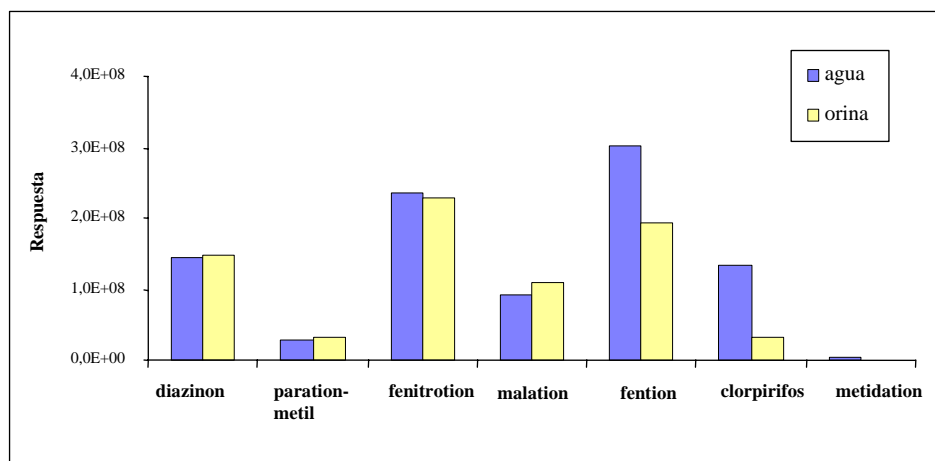


Figura 4.11. Comparación de áreas de picos de los plaguicidas OPs en agua y orina tras la extracción por SPME (nivel de fortificación 10 ng ml^{-1}).

Asimismo, y observando que el comportamiento de los plaguicidas estudiados era bastante diferente en orina que en suero, se decidió comprobar también en qué medida afectaba la dilución en las respuestas de los compuestos. En este caso, se estudiaron factores de dilución menores que en suero, debido a que la matriz parecía no presentar tanta complejidad. De entre todos los valores estudiados (factores de dilución 0-10) prácticamente no existieron grandes diferencias en la eficacia de la extracción, así que se seleccionó un factor de dilución de 10 para evitar un desgaste excesivo de la fibra por contacto directo con la matriz.

La validación del método desarrollado se llevó a cabo evaluando los siguientes parámetros ((resultados en el artículo adjunto, sección 4.2.3.5):

Linealidad- la curva de calibración fue obtenida en el intervalo de concentración $1-100 \text{ ng ml}^{-1}$.

Exactitud- fue estudiada mediante ensayos de recuperación analizando muestras de orina fortificada a cuatro niveles de concentración ($1, 10, 50$ y 100 ng ml^{-1}).

Precisión- fue determinada como la repetibilidad en un mismo día ($n=6$) de las recuperaciones a cada nivel de fortificación ensayado.

Límites de detección (LD)- obtenidos cuando la señal fue 3 veces el ruido de fondo en el cromatograma correspondiente al nivel más bajo de concentración para el analito.

4.2.3.4. Determinación de plaguicidas organoclorados en orina.

Este apartado no se va a desarrollar de una manera extensa, puesto que no se llegó a obtener ningún procedimiento por SPME lo suficientemente robusto como para la determinación de los plaguicidas OCs en orina.

Después de realizar algunas experiencias sobre el efecto de la dilución de la orina y obtener mejores resultados para los plaguicidas OCs cuando la orina era diluida 50 veces, se llevaron a cabo distintas experiencias con el objeto de mejorar la extracción de estos compuestos. Aunque se logró que al nivel de 5 ng ml⁻¹ la precisión fuese satisfactoria (1-13%) utilizando el mismo criterio de cuantificación que en suero, no se obtuvieron valores de recuperación aceptables para la mayoría de los compuestos estudiados (20-170%).

Finalmente, los resultados no fueron suficientemente satisfactorios, por lo que se descartó la posibilidad de utilizar SPME para la determinación de plaguicidas OCs en orina.

4.2.3.5. *Artículo científico 2*: Anal Chim Acta (2001), **433**, 217

GAS CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF ORGANOCHLORINE AND ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES IN HUMAN FLUIDS USING SOLID PHASE MICROEXTRACTION

F.J. López, E. Pitarch, S. Egea, J. Beltrán, F. Hernández*

Analytical Chemistry Division, Experimental Sciences Department, University Jaume I, P.O. Box 224, E-12080, Castellón, Spain

Received 14 September 2000; received in revised form 11 December 2000; accepted 5 January 2001

Abstract

This paper explores the feasibility of developing procedures based on solid phase microextraction (SPME) for the determination of pesticides in human body fluids, including serum and urine samples. The advantages of SPME procedures could greatly help in sample treatment reduction that is highly recommendable in biological monitoring for pesticides.

Two procedures based on direct immersion SPME and GC/ECD/FPD analysis were investigated for organochlorine (hexachlorobenzene, β -HCH, lindane, δ -HCH, endosulfan ether, heptachlor, aldrin, heptachlor epoxide, α -endosulfan, *p,p'*-DDE, endrin, β -endosulfan, *p,p'*-DDD, endosulfan sulphate, *p,p'*-DDT, methoxychlor) and organophosphorus pesticides (diazinon, parathion methyl, fenitrothion, malathion, fenthion, chlorpyrifos, methidathion) in serum and urine samples. Quantitative application of SPME for the determination of selected pesticides in biological fluids required dilution of samples prior to SPME, in order to reduce matrix influence on the extraction of pesticides, and the use of surrogate standards for accurate quantitation. In this way, quantitation can be carried out by means of external standards prepared in ultra-pure water. Optimised procedures were applied to spiked

samples in order to obtain analytical characteristics. Recoveries obtained were generally satisfactory and over 70% in most cases, with relative standard deviations in the range of 1-20% at all concentration levels tested. Limits of detection, calculated as the signal equal to three times background noise using chromatograms of samples spiked at the lowest level, were in the range of 1-10 ng ml⁻¹ for serum samples (δ -HCH, 20 ng ml⁻¹ and methidathion, 15 ng ml⁻¹), and in the range of 0.1-0.4 ng ml⁻¹ for organophosphorus pesticides in urine samples (methidathion, 20 ng ml⁻¹). Finally, developed procedures were applied to real-world samples obtained from exposed and non-exposed subjects, several organochlorine pesticides being detected in some of the samples.

Keywords: Serum analysis; Urine analysis; Solid phase microextraction; Pesticides; Organochlorine compounds; Organophosphorus compounds

1. Introduction

Solid phase microextraction (SPME) is a sample preparation technique that, since its development by Pawliszyn and co-workers in the early 1990s [1-3], has received increasing attention. Advantages of this new solvent-free extraction technique, as simplicity or capability of injecting the whole extracted sample, have been discussed in several papers [4-7], and they can be summarised as an important reduction of sample treatment/manipulation. Several hundreds of papers are found in the literature on the application of SPME to the determination of both volatile and semi- or non-volatile analytes. Volatile compounds are usually extracted by using the headspace technique [8,9], while for less volatile compounds the direct immersion approach (by directly dipping the fiber into the liquid sample) is preferred [10,11]. Among the number of references published on SPME, around 60 papers are devoted to pesticide determination, as it has been recently reviewed by Beltran et al [12].

Pesticides used in agricultural as well as industrial or home pest control should be considered as hazardous chemicals with great concern for the general population. As a way for assessing the risk of population to the exposure to pesticides, measurements of contaminant levels in body tissues and fluids (sometimes called biological monitoring) is a well-accepted approach. Thus, the analysis of urine, serum or whole blood samples allow us to determine pesticide exposure levels and to predict possible risks for individual as well as for community health.

Determination of pesticides in human body fluids has been generally carried out by applying solvent extraction procedures and subsequent clean-up steps using either sulphuric acid treatment (for organochlorine pesticides) [13,14] or solid phase extraction/column chromatography [14-17]. This situation derives from the extremely high complexity of the sample matrices involved, containing both polar and non-polar components, being especially problematic the presence of fat and the protein fraction of these matrices.

Development of an adequate SPME procedure for pesticide determination should allow us to achieve a reduction in sample manipulation, even eliminating the need for clean-up steps. Several applications of SPME to pesticide determination in biological samples can be found for organochlorine [18] and organophosphorus pesticides [19,20], as well as for dinitroaniline herbicides [21]. Headspace approach has been preferred in order to avoid interferences from the sample matrix [18-21]. However, when the headspace approach is applied, most of non-volatile pesticides are excluded from the determination, and consequently the scope of the developed procedures is more limited than those based on direct immersion of the SPME fiber.

This article deals with the development of SPME multiresidual procedures for the determination of several organochlorine (OC) and organophosphorus (OP) pesticides in urine and serum samples by direct immersion. Gas chromatographic determination is carried out by using specific detection systems ECD and FPD after thermal desorption of the fiber in the split-splitless injector. Quantitative determination of selected pesticides is achieved by using external standard

calibration curves prepared with ultra-pure water and by using surrogate standards to correct matrix effects.

2. Experimental

2.1. Reagents

Pesticide standards of 96.5-99.7% purity were purchased from Dr. Erhenstorfer (Promochem, Wesel, Germany) and used without further purification. Three stock standard solution mixtures (concentration ca. 50 $\mu\text{g l}^{-1}$), one for OP pesticides and two for OC pesticides, were prepared in acetone from stock individual standards and stored at -18°C . Working solutions were prepared by dilution with methanol and stored at 4°C . Fortified water and biological samples were prepared by adding the appropriate volume of the methanol standard solution, maintaining a final concentration lower than 1% methanol in the samples.

Organic solvents (methanol and acetone) were for pesticide residue analysis (Scharlau, Barcelona, Spain). Sodium chloride (Scharlau) of analytical grade was used after purification by heating at 300°C overnight.

2.2. Samples

Urine and serum samples used for optimisation studies were obtained from healthy supposed non-exposed subjects. Blood samples were collected by venipuncture using serum separator vacutainer (Brand) blood tubes. The blood was allowed to clot, and the serum was extracted. Serum samples were then stored at -18°C until analysis.

2.3. Instrumentation

The SPME device for manual extraction used, consisting in a holder assembly and several replaceable fibers, was purchased from Supelco (Spain). Four different

fiber types were compared, from non polar polydimethylsiloxane (PDMS, 100 μm) to more polar polyacrylate (PA, 85 μm), Carboxen/PDMS (CX/PDMS, 75 μm) and Carbowax/divinylbenzene (CW/DVB, 65 μm). Before the first use, fibers were conditioned as recommended by the manufacturer by heating them in the injection port of the chromatographic system for 0.5-2 h, at 250-300°C depending on the fiber coating. No additional conditioning between sampling was considered, as the results obtained with several desorption blanks did not show carry over in any case.

Analysis of OC pesticides were performed using a Hewlett-Packard 5890 Series II gas chromatograph (Avondale, USA) equipped with a splitless injector (2 mm i.d. glass liner; 5 min splitless time) and electron capture detection (ECD) system. The GC system was fitted with a 25 m x 0.2 mm I.D., 0.33 μm HP Ultra 2 (5% phenyl methyl siloxane) column. Injector temperature was investigated under the study, while the temperature program used was: 60°C (5.5 min), 30°C min^{-1} to 150°C, 3°C min^{-1} to 270°C with a final hold for 0.5 min. Helium was used as carrier gas at a flow-rate of 1 ml min^{-1} . ECD conditions: temperature 300°C; nitrogen 60 ml min^{-1} .

Analysis of OP pesticides were performed using an Ultra-Trace GC gas chromatograph (Fisons Instruments) based on the GC 8000 Series 2, equipped with and FPD-80 flame photometric detector and PC-based data system (Chrom Card) to control data acquisition and instrument conditions. The pressure of the fuel and auxiliary gases, hydrogen and air, were set at 140 and 60 kPa, respectively. Helium was used as carrier gas at a flow-rate of 1 ml min^{-1} and it was controlled using flow programming. The analytical column was a 30 m x 0.32 mm I.D., with 0.50 μm 5% phenyl methyl siloxane. Detector and injector temperatures were 280 and 270°C, respectively. The oven temperature was programmed as follows: 60°C (5.5 min), 30°C min^{-1} to 200°C, 3°C min^{-1} to 270°C with a final hold for 5 min.

2.4. Analytical recommended procedures

Before extraction, sample dilution was performed by placing 0.5 ml of serum and 125 μl of surrogate standard ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$ α -HCH and chlorfenson in methanol) in a 25 ml volumetric flask adjusting the volume with ultra-pure water. Extraction of OC pesticides in serum samples was carried out by direct dipping the PDMS fiber into 3 ml of diluted sample contained in a 4 ml clear glass vial (36 mm x 12 mm i.d.) under magnetic stirring (200 rpm) for 45 min at ambient temperature. The fiber was situated off-center in the vial so the sample flows perpendicular to the fiber axis. After extraction, the fiber was thermally desorbed for 5 min into the glass liner of the GC injection port at 250°C, maintaining initial oven temperature at 60°C.

Extraction of OP pesticides in serum and urine samples was made by direct immersion of the PDMS fiber into 3 ml of sample (human serum diluted 50-fold and urine diluted 10-fold with ultra-pure water) containing 15% NaCl for 30 min under stirring at ambient temperature. Desorption was carried out during 4 min at 270°C in the hot GC injector, maintaining initial oven temperature at 60°C.

Quantitation of samples was made using calibration curves obtained by plotting relative peak areas (α -HCH, chlorfenson and phorate or fonofos as internal/surrogate standards) versus pesticide concentration. Each calibration level was prepared by spiking ultra-pure water.

3. Results and discussion

3.1. SPME optimisation

As indicated in many papers, prior to the development of SPME procedures for the determination of pesticide residues in real-world samples, as human biological fluids, it is necessary to optimise the SPME experimental parameters, which is usually accomplished using fortified water samples. Thus, a step-by-step optimisation scheme has been applied for OC pesticides determination including

fiber type, desorption time and temperature, salting out effect and extraction time. For OP pesticides recent information published in our previous paper [10] has been used, and only the performance of new fibers commercially available has been checked.

Different fibers were assayed (see Section 2) for both OC and OP pesticides. The highest efficiencies corresponded to the PDMS and PA fibers for OC pesticides and to PDMS for OP compounds. Additionally, our data showed that using PDMS fiber higher extracted amounts and lower equilibrium times were achieved for OC pesticides in comparison to the PA fiber (equilibrium times between 6 and 24 hours). PDMS fiber was chosen for optimisation of the procedure for both OP and OC pesticides.

Extraction times required to reach equilibrium were estimated to be in the range of 30 min (δ -HCH) to 9 h (heptachlor), corresponding the lower values to the HCH isomers. These equilibrium times were considered too high from a practical point of view and, thus, working in non-equilibrium conditions was considered a feasible approach. In this way, for OC extraction a time of 45 min was selected in order to keep the total extraction time comparable to the chromatographic run time (maximum sample throughput).

Once established the optimum extraction conditions (listed in previous section), validation of the procedure was carried out as regards linearity range, precision and estimated limit of determination for ultra-pure water samples. The procedure showed a linear behaviour between 0.1 and 10 ng ml⁻¹ leading to regression coefficients (r^2) higher than 0.99 (0.1, 0.5, 1 and 10 ng ml⁻¹ calibration levels were analysed in duplicate). **Table 1** gives precision (calculated as percent relative standard deviation) at three concentration levels (0.1, 1 and 10 ng ml⁻¹) for seven replicate spiked ultra-pure water samples. The values obtained were lower than 20 % in all cases (in the range of 10% for the higher concentration levels), allowing us to estimate limits of determination for the studied OC pesticides around or lower than 0.1 ng ml⁻¹ (except for δ -HCH).

Table 1. Precision of the SPME procedure for determination of organochlorine pesticides in spiked ultra-pure water samples (n=7).

	R.S.D. (%)		
	10 ng ml ⁻¹	1 ng ml ⁻¹	0.1 ng ml ⁻¹
α -HCH	12	11	11
Hexachlorobenzene	13	13	19
Lindane	12	11	12
δ -HCH	14	13	-
Endosulfan ether	5	6	9
Heptachlor	9	13	23
Aldrin	10	11	11
Heptachlor epoxide	7	9	7
α -Endosulfan	13	14	14
Endrin	10	10	16
β -Endosulfan	10	12	18
<i>p,p'</i> -DDD	6	8	15
Endosulfan sulphate	6	7	12
<i>p,p'</i> -DDT	6	13	13
Methoxychlor	8	11	12

3.2. Development of SPME procedure for serum samples

Once demonstrated the feasibility of extracting the selected OP and OC pesticides from aqueous samples, and following the aim of the present paper, the application of SPME for extraction of these pesticides in human serum was studied.

In a first approach, spiked serum samples were extracted using PDMS fibers and the previously optimised SPME procedures (for OP and OC pesticides separately). Quantitation of samples was carried out by using external standards (spiked ultra-pure water), comparing peak areas for both serum and water samples. Results showed an important decrease in peak area for serum samples in most cases,

for both OC and OP pesticides. Low extraction efficiencies achieved when extracting complex matrices have also been reported by several authors when extracting pesticides in a variety of sample matrices as food samples (honey, fruits and fruit juices) [22-24] or biological fluids (blood, serum and urine) [19,21].

The first approach assayed to improve recoveries was the reduction in matrix complexity by diluting samples with ultra-pure water prior to SPME determination. In this way, spiked serum samples were diluted covering a range of 10-100 times, maintaining a final concentration in the extracted sample of 5 ng ml^{-1} , and then submitted to SPME procedures. **Fig. 1** shows the behaviour of some selected OC and OP pesticides under SPME after sample dilution. Results obtained indicated that a dilution of at least 50-fold was required in human serum to achieve a pesticide response independent of matrix composition.

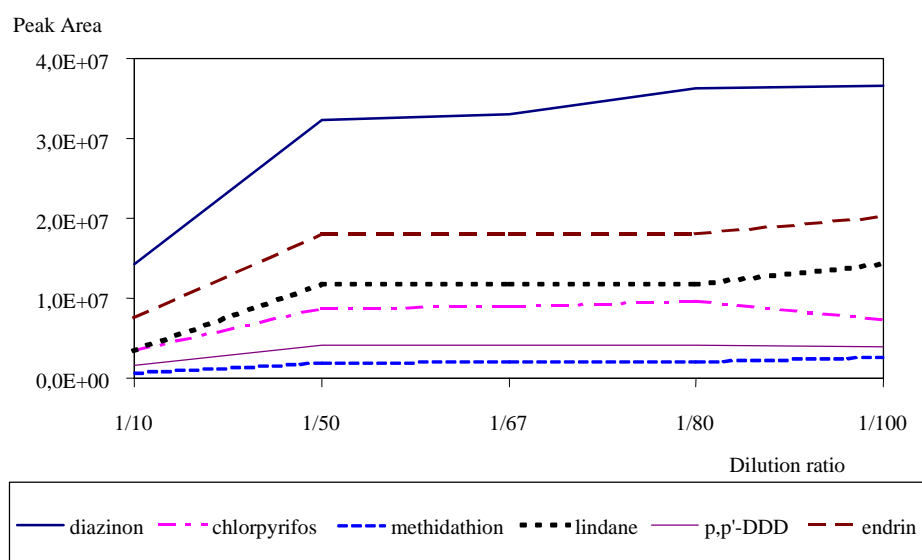


Fig. 1. Effect of reduction in matrix complexity of human serum by sample dilution with ultra-pure water over peak response. Final concentration of extracted diluted samples is 5 ng ml^{-1} in all cases.

But even after sample dilution, accuracy of quantitation was not satisfactory for most compounds, as the concentration in spiked serum samples calculated using external calibration with aqueous standards (mainly at the lower levels) were lower than those corresponding to the spiking level. Further experiments demonstrated that the use of the surrogate/internal standards corrected the observed deviations. Due to the wide range of physico-chemical properties of the OC pesticides studied, it was not feasible to obtain satisfactory results for all compounds when only one internal standard (chlorfenson) was used. For the first eluting compounds (from HCB to aldrin) the deviations from the expected values were higher than 50%. The use of α -HCH as internal standard for quantitation of these compounds solved the problem. In this way, using phorate as internal standard of OP pesticides and α -HCH and chlorfenson for OC pesticides, it was feasible to obtain accurate quantitation of the studied pesticides in spiked serum samples using calibration curves prepared with ultra-pure water.

At this point, analytical characteristics of the SPME procedures were obtained accounting for recoveries (analyte concentration calculated for a spiked serum sample using pure water standards compared to that of spiking values), precision and limits of detection. Results obtained for OC and OP pesticides are given in **Tables 2** and **3**, respectively.

Results obtained for OC pesticides indicated that at the higher concentration levels (50 and 500 ng ml⁻¹) recoveries and relative standard deviations were satisfactory with values over 80% for most of recoveries and precision better than 15%. At the lowest level assayed (5 ng ml⁻¹), recoveries -calculated only for those compounds with lower detection limits- were over 70% with relative standard deviations lower than 17% (hexachlorobenzene, 22%). At this concentration level, a significant decrease in recovery was observed for hexachlorobenzene, lindane and α -endosulfan in comparison to those obtained at 50 and 500 ng ml⁻¹ spiking levels. An exception to this general behaviour was observed for *p,p'*-DDE which showed low recovery at the three concentration levels assayed (30-50%) but good precision (below 10% in all cases), thus allowing the quantitative determination of this

compound by applying an adequate recovery factor. **Table 2** also shows detection limits for the studied OC compounds that are in the low parts per billion in the serum (1-10 ng ml⁻¹).

When the SPME procedure was applied to determination of OP pesticides in spiked serum samples (10 and 50 ng ml⁻¹), recoveries were satisfactory for most of compounds but showing some deviations in behaviour. Thus, recoveries for methidathion were always above 140%, probably due to a poor correction of matrix effects using the surrogate standard (phorate) (**Table 3**). As indicated for OC pesticides, precision of the procedure was in the usual range for this type of samples and analytes, with values below 20%, allowing the determination of studied OP compounds, even those showing relatively low recoveries, as fenthion or chlorpyrifos. Detection limits for OP pesticides in serum samples were below 5 ng ml⁻¹, except for methidathion because of its low detector response.

As an example, **Fig. 2** shows the chromatograms obtained when applying the recommended SPME procedures to serum samples spiked at 50 and 10 ng ml⁻¹ for OC and OP pesticides, respectively.

Table 2. Mean recoveries and relative standard deviations ($n = 6$) obtained after application of SPME to the determination of organochlorine pesticides in spiked serum samples after 50-fold dilution with ultra-pure water.

	500 ng ml ⁻¹		50 ng ml ⁻¹		5 ng ml ⁻¹		LOD (ng ml ⁻¹) ^a
	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)	
Hexachlorobenzene	114	6	127	4	80	22	2
β-HCH	86	2	128	6	-	-	10
Lindane	104	1	100	2	69	17	3
δ-HCH	74	6	70	7	-	-	20
Endosulfan ether	112	5	128	4	90	7	1
Heptachlor	118	8	103	7	-	-	10
Aldrin	121	7	104	9	-	-	10
Heptachlor epoxide	109	13	93	8	94	11	2
α-Endosulfan	110	13	93	9	70	15	2
<i>p,p'</i> -DDE	34	7	41	8	-	-	10
Endrin	105	13	86	11	94	13	2
β-Endosulfan	89	11	84	11	106	16	3
<i>p,p'</i> -DDD	100	5	95	20	-	-	10
Endosulfan sulphate	88	11	77	4	74	12	5
<i>p,p'</i> -DDT	70	6	71	9	-	-	10
Methoxychlor	71	6	62	10	69	2	2

^a Limits of detection referred to serum (non-diluted real sample).

Table 3. Mean recoveries and relative standard deviation ($n = 6$) obtained after application of SPME to the determination of organophosphorus pesticides in spiked serum samples after 50-fold dilution with ultra-pure water.

	50 ng ml ⁻¹		10 ng ml ⁻¹		LOD (ng ml ⁻¹) ^a
	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)	
Diazinon ^b	104	5	115	5	1
Parathion methyl	111	10	92	13	3
Fenitrothion	83	7	79	14	4
Malathion	92	12	108	17	4
Fenthion	65	13	60	15	4
Chlorpyrifos	69	4	50	8	5
Methidathion ^c	145	8	165	5	15

^a Limits of detection referred to serum (non-diluted real sample).

^b Concentrations for this compound is half of the nominal concentrations.

^c Concentrations for this compound is double of the nominal concentrations.

3.3. Development of SPME procedure for urine samples

In order to complete the study on applicability of SPME-based procedures to human body fluids, the above optimised procedure for OP pesticides in serum samples was applied to the analysis of urine samples. Firstly, the effect of sample matrix dilution was investigated due to the expected differences between serum and urine matrices. Results obtained at different urine dilution values were compared to those obtained for aqueous standards by using a paired *t*-test proving that a 10-fold dilution led to adequate quantification when using aqueous external standards (fonofos was used as surrogate standard in both cases). **Table 4** shows recoveries obtained in urine at four spiking levels (1-100 ng ml⁻¹) and precision expressed as relative standard deviation (%) for seven replicates. The procedure showed a linear behaviour over the whole concentration range tested. Limits of detection for the studied OP pesticides are also given in **Table 4** and they were found to be below 0.5 ng ml⁻¹, except for methidathion (20 ng ml⁻¹).

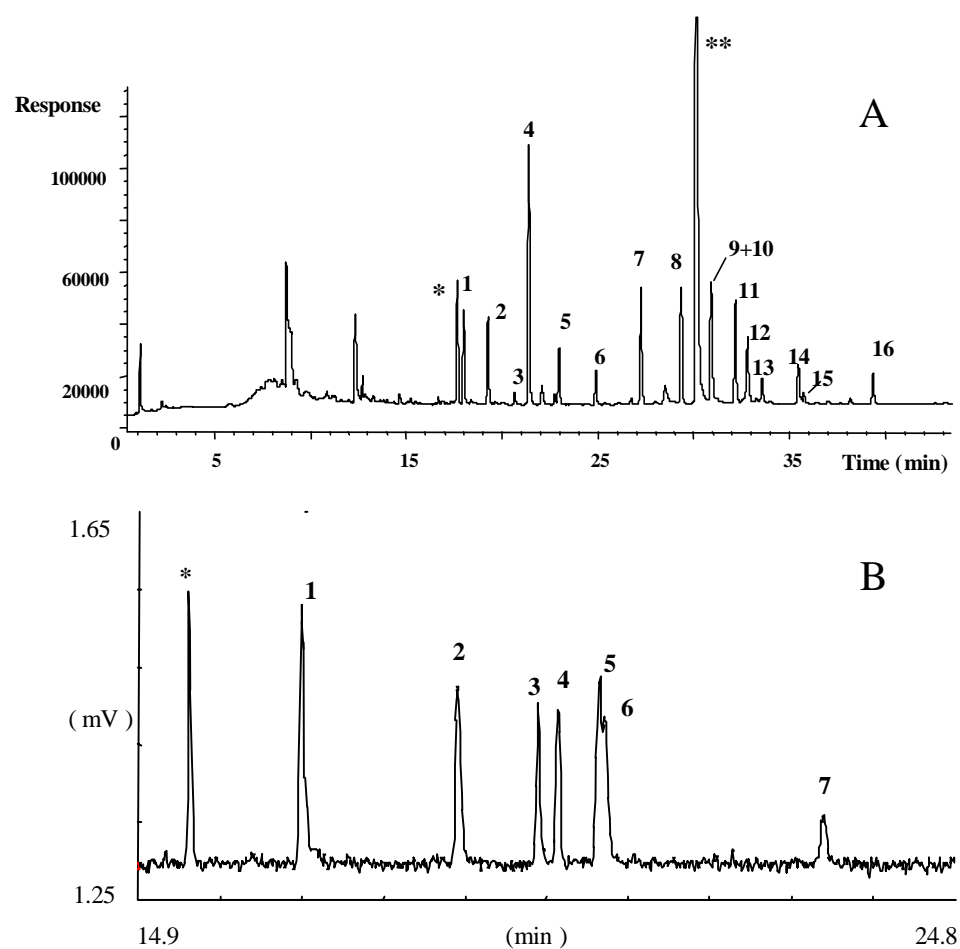


Fig. 2. Chromatograms obtained by GC/ECD or GC/FPD after SPME over spiked serum samples. (A) 50 ng mL⁻¹ OC pesticides (ECD): 1, hexachlorobenzene; 2, lindane; 3, δ -HCH; 4, endosulfan-ether; 5, heptachlor; 6, aldrin; 7, heptachlor epoxide; 8, α -endosulfan; 9, *p,p'*-DDE+dieldrin; 10, endrin; 11, β -endosulfan; 12, *p,p'*-DDD; 13, endosulfan sulphate; 14, *p,p'*-DDT; 15, methoxychlor; internal standards: *, α -HCH; **, chlorfenson. (B) 10 ng mL⁻¹ OPs pesticides (FPD): 1, diazinon; 2, parathion methyl; 3, fenitrothion; 4, malathion; 5, fenthion; 6, chlorpyrifos; 7, methidathion; internal standard: *, phorate.

Table 4. Mean recoveries and relative standard deviations ($n = 7$) for selected organophosphorus pesticides after application of SPME to spiked urine samples^a.

	100 ng ml ⁻¹		50 ng ml ⁻¹		10 ng ml ⁻¹		1 ng ml ⁻¹		LOD (ng ml ⁻¹) ^b
	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)	
Diazinon ^c	82	6	88	7	99	2	110	7	0.1
Parathion methyl	127	11	127	11	116	5	140	9	0.3
Fenitrothion	126	11	111	8	108	4	122	13	0.3
Malathion	124	13	127	8	127	10	141	11	0.4
Fenthion	84	10	90	4	95	7	95	8	0.2
Chlorpyrifos	84	13	76	14	76	12	92	10	0.3
Methidathion ^d	145	14	141	12	136	8	-	-	20

^a Urine samples were diluted 10 times with ultra-pure water prior to SPME application.

^b Limits of detection referred to serum (non-diluted real sample).

^c Concentrations for this compound is half of the nominal concentrations.

^d Concentrations for this compound is double of the nominal concentrations.

Inter-day precision was calculated over nine replicates (100 ng ml^{-1}) analysed in three different days in order to demonstrate procedure robustness. Relative standard deviations (%) calculated ranged between 5 and 10% for all compounds.

Fig. 3 shows a typical chromatogram obtained after SPME applied over a human urine sample spiked with the selected OP pesticides (1 ng ml^{-1}).

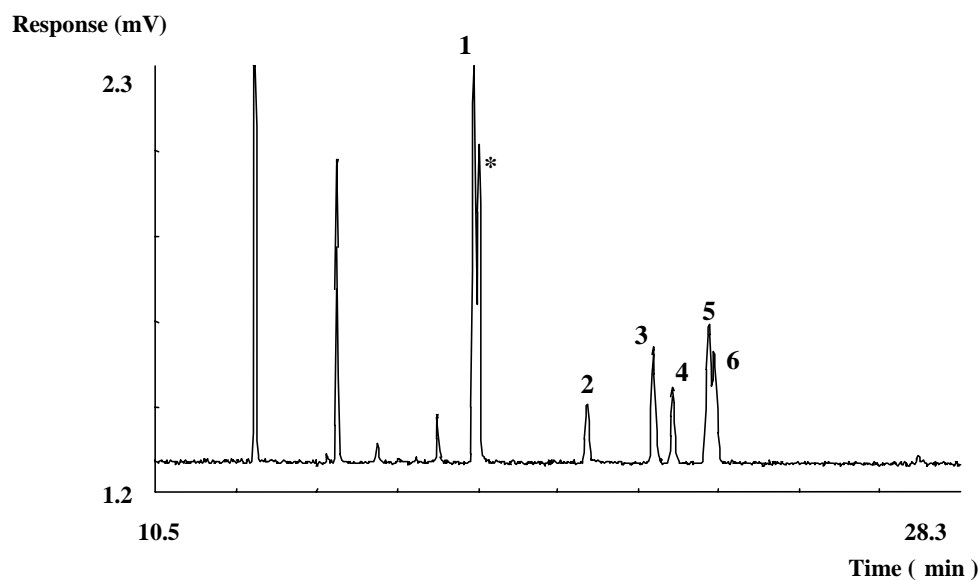


Fig. 3. Chromatogram obtained by GC/FPD after SPME over a urine sample spiked with OP pesticides (1 ng ml^{-1}): 1, diazinon; 2, parathion methyl; 3, fenitrothion; 4, malathion; 5, fenthion; 6, chlorpyrifos; internal standard: *, fonofos.

3.4. Application of SPME to serum and urine samples

The SPME procedures developed in the present paper were applied to several serum samples (in a number of 16) obtained from agricultural practice exposed as well as non-exposed subjects. Samples that were suspected to contain any of the studied pesticides were analysed again by using GC/MS in order to confirm the identity of the compounds. Only a few serum samples were confirmed to contain pesticides. As an example, **Fig. 4** shows the chromatogram corresponding to a serum

sample where three OC pesticides were detected. This chromatogram was obtained by SPME following the recommended procedure and using a GC/MSD (Hewlett-Packard 5890 with 5971 mass selective detector) operated in full scan mode (m/z range 50-450; 70 eV electron impact ionisation). This sample was found to contain *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD and α -endosulfan in concentrations around 100 ng ml⁻¹. **Fig. 4** also shows the spectra of the pesticides identified in the sample by library search (HPPEST, Hewlett-Packard).

Moreover, several urine samples from a biological monitoring performed in our laboratory in exposed and non-exposed population (to agricultural activities) were analysed following a multiresidual method based on SPE on C₁₈ cartridges and GC/MS analysis [25]. One of these samples contained endosulfan sulphate at 55 ng ml⁻¹. Although SPME was not optimised in the present paper for determining OC pesticides in urine samples, we applied the procedure optimised for OC pesticides in serum to this urine sample after a 10-times dilution with distilled water. The analysis performed by GC/MS confirmed the presence of endosulfan sulphate at concentration level of 35 ng ml⁻¹ and, additionally, α - and β -endosulfan were also detected, all of them identified by GC/MS using full scan mode and library search (HPPEST, Hewlett-Packard). Others authors [26, 27] have also detected residues of α - and β -endosulfan and some of their metabolites in urine samples of pest control operators.

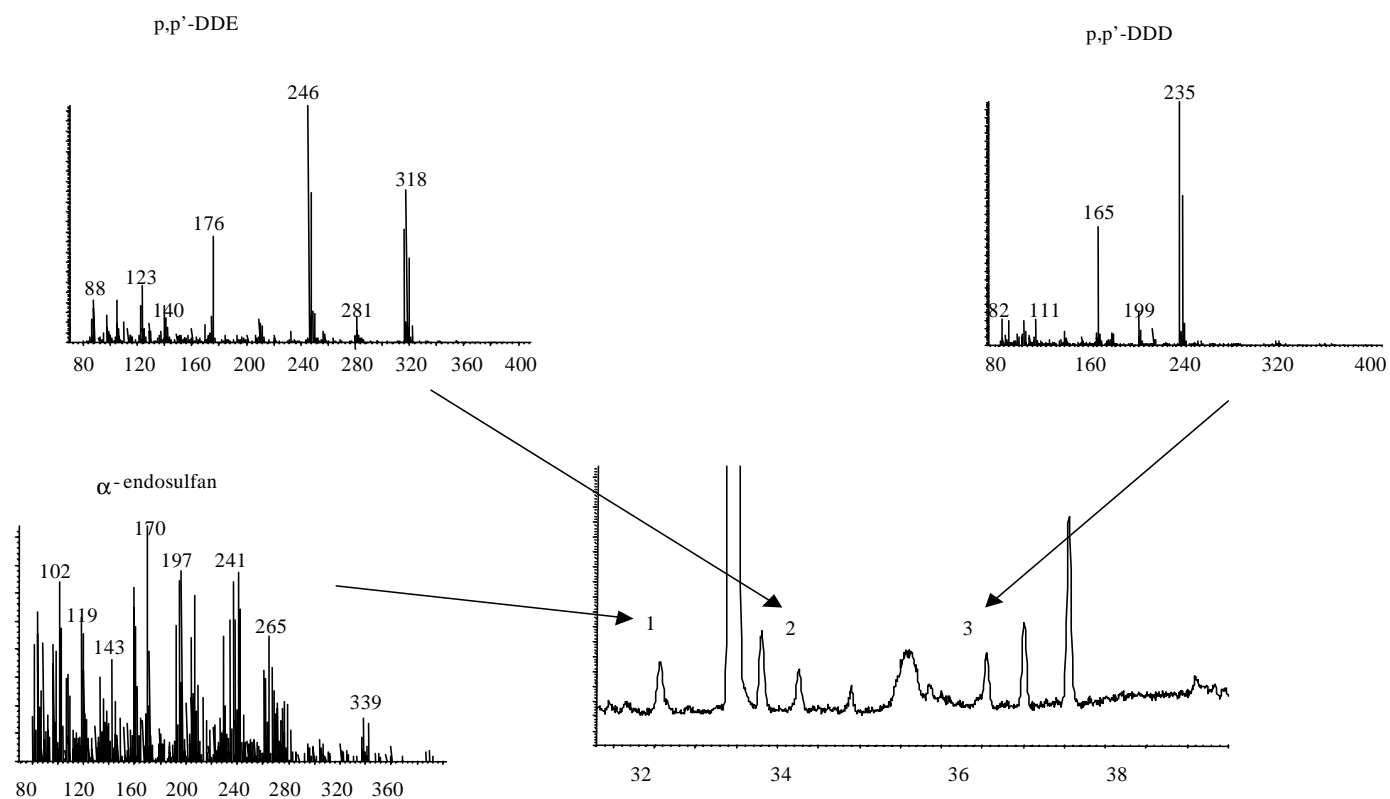


Fig. 4. Chromatogram obtained by GC/MSD (full scan mode) after SPME over a real-world serum sample. Mass spectra of identified organochlorine pesticides detected in the sample. Calculated concentrations: 1, α -endosulfan (86 ng ml^{-1}); 2, p,p' -DDE (102 ng ml^{-1}); 3, p,p' -DDD (115 ng ml^{-1}).

4. Conclusions

The applicability of SPME for the determination of OC and OP pesticides in urine and serum has been explored, using GC/ECD and GC/FPD for their analysis. Direct immersion of the fiber can be used, but a preliminary dilution of the sample with water is necessary in order to improve the extraction efficiency and to protect the fiber from the matrix components. A dilution of 50-times for serum and of 10-times for urine samples is recommended in the paper. Quantitation can be performed by external standards prepared in distilled water, but the use of surrogate/internal standard is required. Sample dilution makes that LOD of the overall procedure are relatively high, especially in serum samples (between 3-10 and 1-5 ng ml⁻¹ for OC and OP pesticides, respectively) and a little lower in urine (0.1-0.5 ng ml⁻¹). This makes that this technique, as described in this paper, finds its major application in samples from exposed population.

This paper shows that SPME can be a valuable tool in pesticide residue analysis of OC and OP pesticides in samples as human fluids. The SPME optimisation performed proves that selected compounds can be efficiently extracted under the experimental conditions described in the paper. In this way, sample manipulation could be substantially reduced and the errors associated to this step minimised. However, other techniques for the measurement of extracted analytes would be assayed, mainly GC/MS (GC/MS/MS), in order to improve the sensitivity of the procedure as well as to confirm the identity of compounds detected in the samples.

Other approaches as the use of headspace SPME or the above-mentioned application of SPME followed by GC/MS/MS analysis are being investigated in our group at present. The use of labelled surrogate standards and the calibration by using standards in sample matrices is also a subject of interest that is being investigated as well.

Acknowledgements

This work forms a part of the project entitled "Nuevas estrategias en la determinación de residuos de plaguicidas y de metabolitos en fluidos biológicos. Simplificación de la etapa de preparación de muestra", developed with the financial support of Fundación Caixa Castelló.

The authors thank J.L. Villamarin of Conselleria de Sanitat (Castelló) for providing human serum samples.

References

- [1] R.P. Belardi and J. Pawliszyn, *Water Poll. Res. J. Canada*, 24 (1989) 179.
- [2] C.L. Arthur and J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2145.
- [3] C.L. Arthur, K.Pratt, S. Motlagh, J. Pawliszyn and R.P. Belardi, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 15 (1992) 741.
- [4] A. Balinova, *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 125.
- [5] H.G.J. Mol, H.G.M. Janssen, C.A. Cramers, J.J. Vreuls and U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 703 (1995) 277.
- [6] J.R. Dean, G. Wade and I.J. Barnabas, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 295.
- [7] A. Martin Esteban, P. Fernandez, A. Fernandez Alba and C. Camara, *Quim. Anal.*, 17 (1998) 51.
- [8] J.J. Langenfeld, S.B. Hawthorne and D.J. Miller, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 144.
- [9] R.J. Bartelt, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 364.
- [10] J. Beltran, F.J. López, O. Cepriá and F. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 808 (1998) 257.
- [11] F. Hernandez, J. Beltran, F. J. Lopez and J. V. Gaspar, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 2313.
- [12] J. Beltran, F.J. López and F. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 389.

- [13] R. Otero, M. Santiago Silva and J.O. Grimalt, *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 87.
- [14] V.W. Burse, S.L. Head, M.P. Korver, P. C. McClure, J.F. Donahue and L.L. Needham, *J. Anal. Toxicol.*, 14 (1990) 137.
- [15] R.H. Hill, D.B. Shealy, S.L. Susan, C.C. Williams, S.L. Bailey, M. Gregg, S.E. Baker and L.L. Needham, *J. Anal. Toxicol.*, 19 (1995) 323.
- [16] S.J. Reid and R.R. Watts, *J. Anal. Toxicol.*, 5 (1981) 126.
- [17] J.W. Brock, V.W. Burse, D.L. Ashley, A.R. Najam, V.E. Green, M.P. Korver, M.K. Powell, C.C. Hodge and L.L. Neddham, *J. Anal. Toxicol.*, 20 (1996) 528.
- [18] L. Rohrig, M. Puttmann and H.U. Meisch, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 361 (1998) 192.
- [19] X.P. Lee, T. Kumazawa, K. Sato and O. Suzuki, *Chromatographia*, 42 (1996) 135.
- [20] A. Namera, M. Yashiki, N. Nagasawa, Y. Iwasaki and T. Kojima, *Forensic Sci. Int.* 88 (1997) 125.
- [21] F. Guan, K. Watanabe, A. Ishii, H. Seno, T. Kumazawa, H. Hattori and O. Suzuki, *J. Chromatogr. B*, 714 (1998) 205.
- [22] A.L. Simplicio and L.V. Boas, *J. Chromatogr. A*, 833 (1999) 35.
- [23] J.J. Jimenez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.T. Martin and A.L. Mayorga, *J. Chromatogr. A*, 829 (1998) 269.
- [24] R. Batlle, C. Sanchez and C. Nerin, *Anal. Chem.*, 71 (1999), 2417.
- [25] E. Pitarch, F.J. Lopez, R. Serrano and F. Hernández, submitted for publication.
- [26] J.L. Martínez Vidal, F.J. Arrebola, A. Fernández Gutiérrez and M.A. Rams, *J. Chromatogr. B*, 719 (1998) 71.

- [27] F.J. Arrebola, J.L. Martínez Vidal and A. Fernández Gutiérrez, *Toxicol. Lett.*, 107 (1999) 15.

4.2.4. Optimización de la técnica SPME en medio acuoso por espacio de cabeza

El objetivo de esta parte de la investigación fue optimizar un procedimiento para la determinación de plaguicidas OCs y OPs en medio acuoso mediante SPME en modo espacio de cabeza. La aplicación de esta técnica a los analitos objeto de estudio en matrices acuosas sirvió de experiencia preliminar, para posteriormente estudiar la propia matriz biológica (suero o sangre total). Mientras que esta etapa de optimización se realizó utilizando GC-ECD y GC-FPD, los procedimientos finales recomendados para sangre y suero se realizaron con detectores más selectivos: GC-MS y GC-MS/MS.

En cuanto a los plaguicidas OPs estudiados en este apartado se incluyeron un total de 7 compuestos: *diazinon*, *fonofos*, *paration-metil*, *fenitrotion*, *malation*, *fention* y *clorpirifos*. Por otra parte, en cuanto a los plaguicidas OCs fue seleccionado un grupo de 17 compuestos: α -HCH, HCB, β , γ y δ -HCH, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, α - y β -endosulfan y metabolitos (-éter y -sulfato), *heptaclor*, *heptacloro epóxido*, *aldrin*, *endrin* y *metoxiclor*.

Para la realización de la técnica HS-SPME, el vial conteniendo la muestra fue sumergido en una bañera de silicona calentada a través de un agitador térmico-magnético provisto de controlador de sonda de temperatura.

4.2.4.1. Plaguicidas organoclorados

La etapa de optimización de la extracción HS-SPME en agua se inició con el estudio de los plaguicidas OCs.

Con el fin de seleccionar la fibra y la temperatura de extracción adecuada para los compuestos estudiados, se fijaron las condiciones de absorción (3 ml de muestra durante 30 min de extracción) y de desorción. Se comprobaron tres fibras diferentes: PDMS (100 μ m), PA (85 μ m) y CW/DVB (65 μ m), a dos temperaturas distintas de extracción 44 y 90°C. Como tiempo y temperatura de desorción se tomaron 5 min y

270°C (240°C para CW/DVB), respectivamente. La eficacia de la extracción mejoró al aumentar la temperatura, seleccionando finalmente 90°C para el procedimiento. La **Figura 4.12** muestra la respuesta de los plaguicidas utilizando tres fibras distintas a una temperatura de extracción de 90°C. Se puede observar que ninguna de las tres fibras fue claramente superior a las demás, siendo las fibras de PA y CW/DVB las que dieron resultados algo mejores (mayores respuestas para 6 compuestos cada una). Finalmente, se seleccionó la fibra PA para posteriores experiencias.

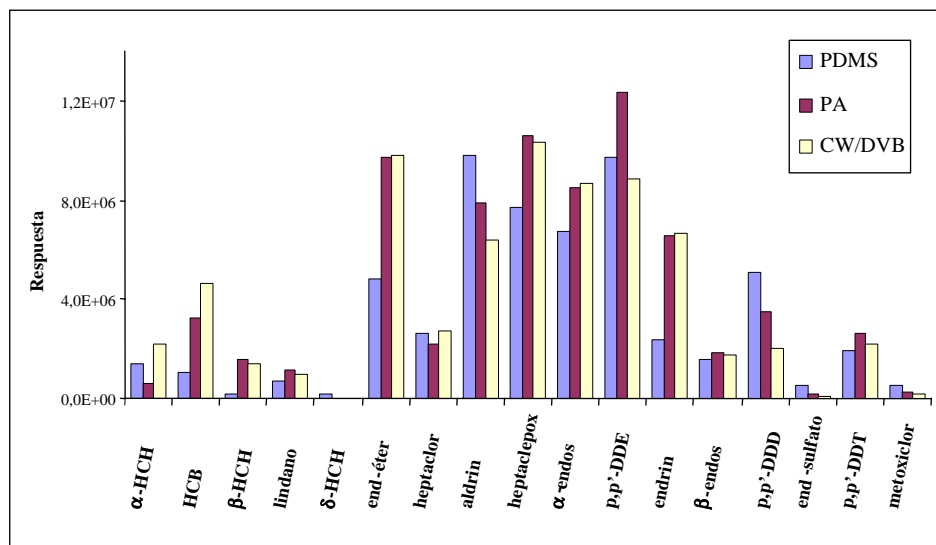


Figura 4.12. Respuestas de plaguicidas OCs obtenidas tras la extracción por HS-SPME (90°C) de una muestra de agua fortificada a 10 ng ml^{-1} para distintos tipos de fibra.

Debido a que para esta fibra ya habían sido optimizadas las condiciones de desorción (260°C, 2 min) en el apartado 4.2.2.2, únicamente se estudiaron las condiciones de absorción.

Optimización de la etapa de absorción

Los parámetros que se optimizaron dentro de la etapa de absorción fueron: el contenido de sal, el volumen de muestra y el tiempo de extracción.

- **Contenido salino**

Para estudiar el efecto de la fuerza iónica, se llevó a cabo la extracción de 3 ml de agua fortificada a 10 ng ml^{-1} a dos niveles de concentración de sal distintos (0 y 15% de NaCl). Como puede observarse en la **Figura 4.13**, la eficacia de la extracción aumentó con la adición de sal para todos los plaguicidas, a excepción de *p,p'*-DDE. Por consiguiente, se decidió añadir un 15% de NaCl para las posteriores experiencias.

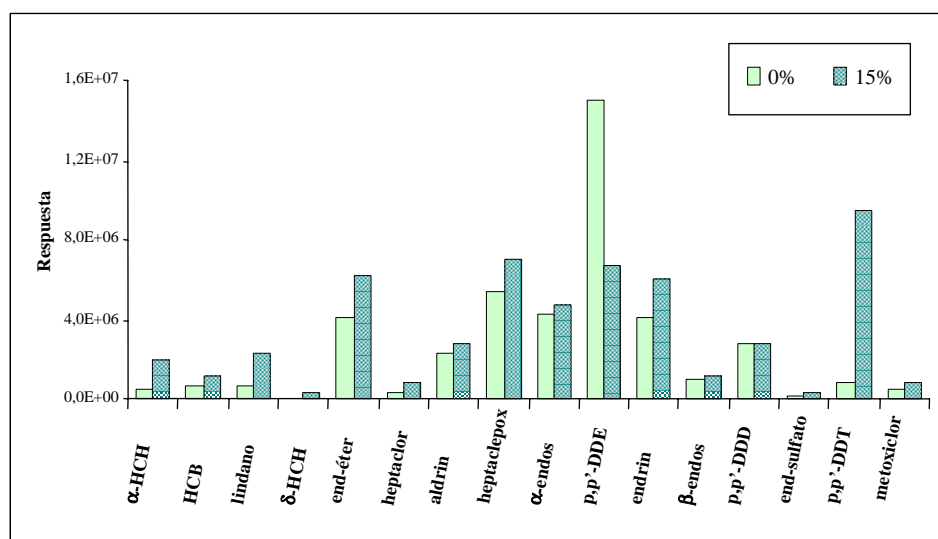


Figura 4.13. Efecto de la adición de NaCl en la eficacia de la extracción de plaguicidas OCs en agua por HS-SPME utilizando la fibra de PA.

- **Volumen de muestra**

Se estudió la eficacia de la extracción para cinco volúmenes (3-30 ml) de agua fortificada a un nivel de 10 ng ml^{-1} con un 15% de NaCl. Siguiendo el comportamiento esperado, se observó que las respuestas de los plaguicidas eran mayores a medida que aumentaba el volumen de extracción, con lo que se decidió trabajar con el mayor volumen de muestra estudiado, 30 ml para posteriores experiencias (**Figura 4.14**).

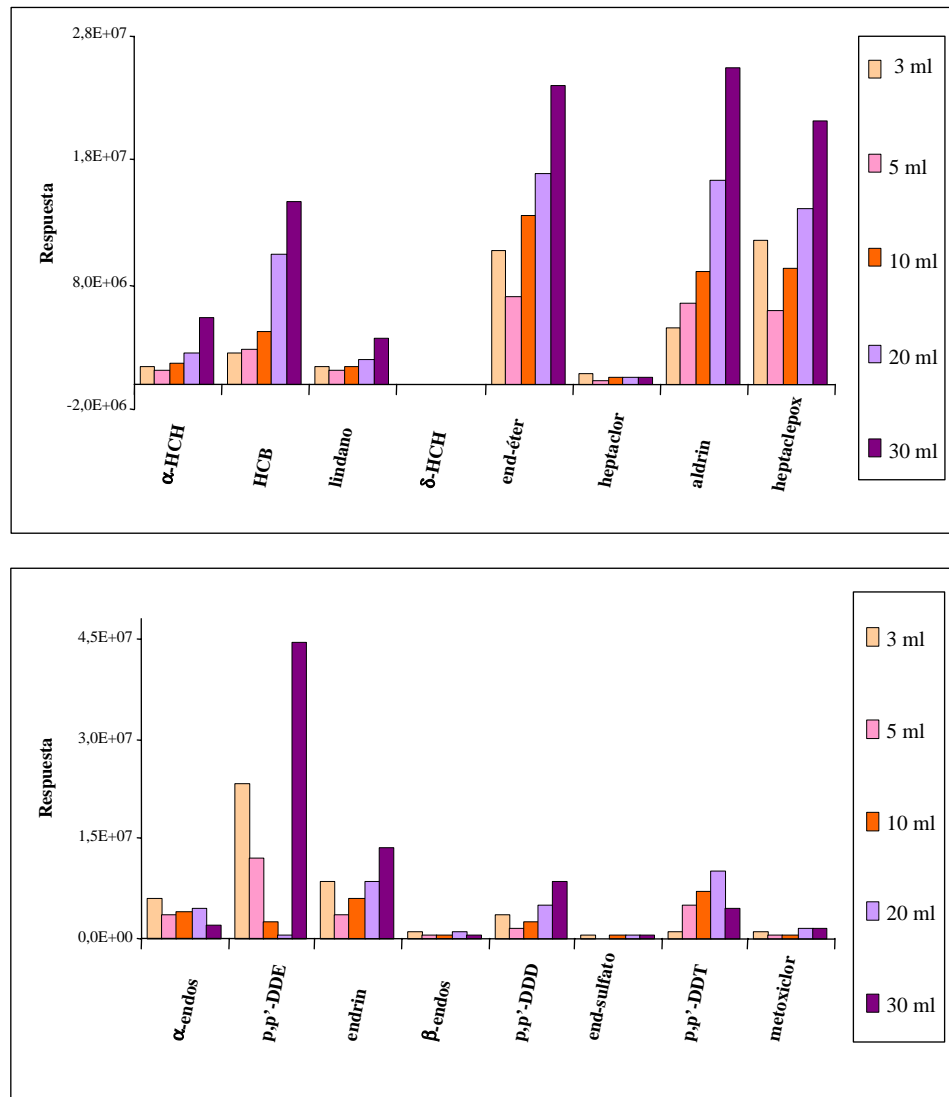


Figura 4.14. Eficacia de la extracción de los plaguicidas OCs en función del volumen de muestra utilizado en la extracción HS-SPME con la fibra de PA.

- **Tiempo de extracción**

Finalmente, se estudió el efecto del tiempo de absorción sobre la eficacia de la extracción, para lo cual se realizaron extracciones de diferentes alícuotas de agua fortificada a 10 ng ml^{-1} en tiempos que iban desde 1 min a 18 h para la fibra de PA.

La **Figura 4.15** muestra los resultados obtenidos para algunos de los compuestos estudiados, representando la cantidad extraída (ng) en función del tiempo de extracción, según la ecuación deducida por Ai, mostrada en la sección 4.2.2.2 (ecuación (1)).

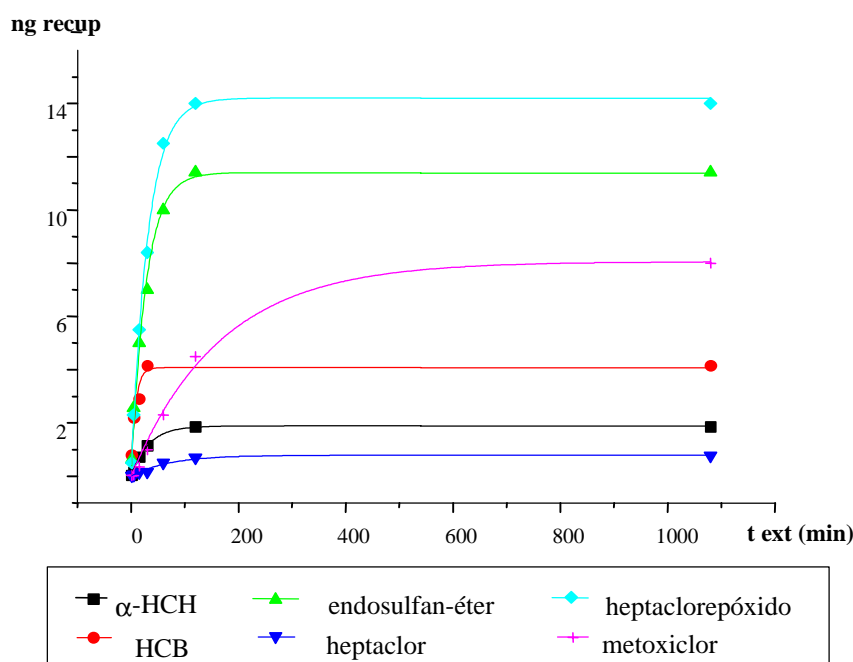


Figura 4.15. Curvas del tiempo de extracción para plaguicidas OCs obtenidas a partir de la ecuación (1) mediante SPME con inmersión directa y fibra PA.

La **Tabla 4.3** muestra los valores obtenidos para los parámetros n_0 , a y tiempo de equilibrio (obtenidos según ecuación (1)) y K_{SPME} (obtenida según ecuación (2)). Como puede observarse, los tiempos de equilibrio variaron entre 25 min y 10 h. Al igual que ocurría con el modo de inmersión directa, los tiempos obtenidos fueron demasiado altos, por lo que se decidió trabajar en condiciones de no equilibrio, seleccionando un tiempo de extracción de 30 min. Además, y para conseguir

aumentar la cantidad de analito en la fase vapor, se decidió incluir un tiempo fijo de pre-extracción de 30 min a la misma temperatura que la de la extracción.

Tabla 4.3. Parámetros obtenidos por ajuste matemático (ecuación (1)) de la cantidad absorbida frente al tiempo de extracción (30 ml muestra de agua fortificada a 10 ng ml⁻¹) para el procedimiento HS-SPME con la fibra de PA. Constantes de extracción para SPME obtenidas a 24 horas (ecuación (2)).

	Log K _{OW} ⁽¹⁾	n ₀ (ng) ⁽²⁾	a	teq (min) ⁽³⁾	K _{SPME}
α-HCH	3.81	1.9	0.0311	96	360
HCB	5.50	4.1	0.1222	25	811
Lidano	3.72	1.5	0.1000	30	296
δ-HCH	4.14	0.03	0.0106	283	5
Edosulfan-éter	–	11.4	0.0358	36	2279
Heptaclor	5.38	0.8	0.0142	212	147
Aldrin	6.50	10.0	0.0396	76	1939
Heptacloro epóxido	5.40	14.2	0.0323	93	2824
α-Endosulfan	4.75	0.9	0.0146	206	174
p,p'-DDE	–	10.2	0.0407	74	2016
Endrin	4.56	14.6	0.0201	149	2824
β-Endosulfan	4.75	0.24	0.0212	141	44
p,p'-DDD	–	18.0	0.1000	644	3682
Endosulfan-sulfato	–	4.8	0.0029	1026	898
p,p'-DDT	6.38	10.8	0.0083	359	2196
Metoxiclor	3.31	8.0	0.0060	497	1580

(4) coeficiente de partición octanol-agua (Noble, 1993; Tomlin, 1997)

(5) cantidad máxima que puede extraerse en el equilibrio

(6) calculado como el tiempo necesario para la extracción del 95% de la cantidad extraída en el equilibrio

Se estudiaron las características analíticas del método HS-SPME desarrollado para la determinación de plaguicidas OCs en agua, obteniendo los siguientes resultados:

Rango de linealidad- se obtuvo la curva de calibración analizando disoluciones acuosas de patrones entre 0.1-10 ng ml⁻¹ (0.1, 0.5, 1 y 10 ng ml⁻¹) por triplicado, obteniéndose para todos los compuestos estudiados valores de r superiores a 0.98.

Precisión- se realizaron extracciones repetidas ($n = 7$) de disoluciones de agua fortificadas a tres niveles de concentración (0.1, 1 y 10 ng ml^{-1}). Los coeficientes de variación obtenidos fueron inferiores al 30% en todos los casos, e inferiores al 20% para niveles de concentración más altos.

Límites de detección- Fueron calculados como la concentración correspondiente a un pico tres veces mayor al ruido de fondo a partir de los cromatogramas correspondientes a los niveles más bajos de fortificación. Se obtuvieron valores de LD satisfactorios en un rango de 60-0.4 pg ml^{-1} , excepto para β -endosulfan (0.6 ng ml^{-1}) y para α -HCH (0.1 ng ml^{-1}).

A modo de ejemplo la **Figura 4.16** muestra un cromatograma GC-ECD correspondiente a una muestra de agua fortificada a 0.1 ng ml^{-1} .

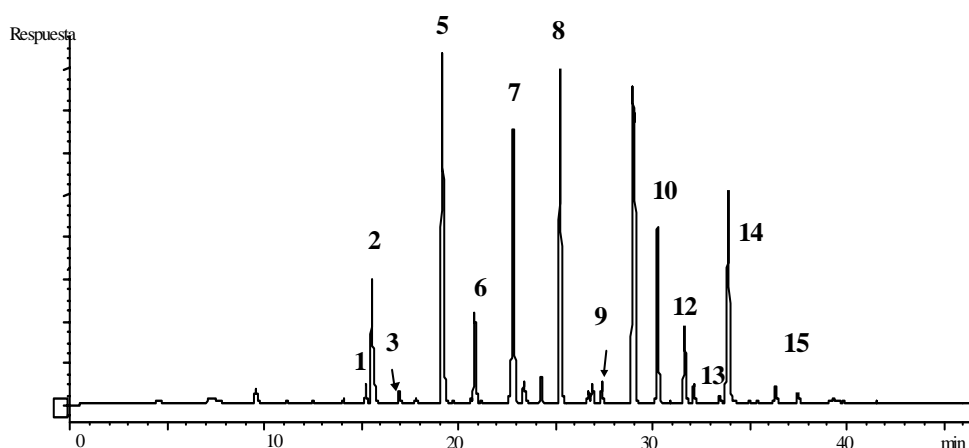


Figura 4.16. Cromatograma GC-ECD correspondiente a una disolución de agua fortificada a 0.1 ng ml^{-1} con los OCs estudiados y tras la extracción mediante HS-SPME. (1) α -HCH, (2) HCB, (3) lindano, (5) endosulfan-éter, (6) heptaclor, (7) aldrin, (8) heptacloro epoxido, (9) α -endosulfan, (10) endrin, (12) p,p' -DDD, (13) endosulfan-sulfato, (14) p,p' -DDT, (15) metoxiclor.

4.2.4.2. Plaguicidas organofosforados

En cuanto a la determinación de plaguicidas OPs en aguas mediante el modo de extracción HS-SPME, sólo se optimizó el tipo de fibra y el contenido de sal. Por lo que respecta a las condiciones de desorción se utilizaron las optimizadas para OPs en el artículo publicado por Beltran *et al.* (1998). En cuanto a la absorción se seleccionó la temperatura de extracción (90°C) y el tiempo de extracción (30 min pre-calentamiento + 30 min de extracción). El volumen de extracción, y puesto que el objetivo de la técnica era la aplicación a suero y sangre, cuya cantidad de muestra disponible está bastante limitada, se redujo a 1 ml.

Con el fin de seleccionar la fibra se procedió a la extracción de 1 ml de agua fortificada a 10 ng ml⁻¹ con los plaguicidas OPs. Se comprobaron tres fibras diferentes: PDMS (100 µm), PA (85 µm) y CW/DVB (65 µm), tomándose como tiempo de desorción 4 min y como temperatura de desorción 270°C (PDMS), 250°C (PA) y 240°C (CW/DVB). La **Figura 4.17** muestra la eficacia de la extracción HS-SPME para cada una de las fibras. Como puede observarse no se han dado valores para *malation* puesto que a ese nivel de concentración no fue extraído por HS-SPME.

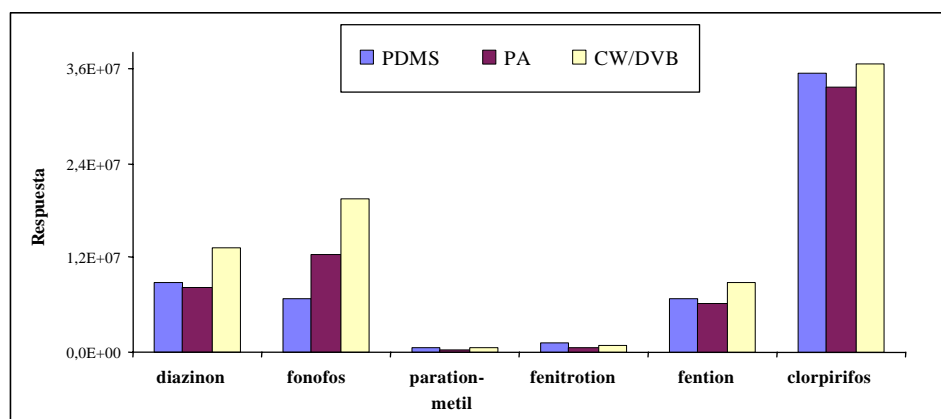


Figura 4.17. Áreas de picos de los plaguicidas OPs obtenidas tras la extracción por HS-SPME (90°C) de una muestra de agua fortificada a 10 ng ml⁻¹ para distintos tipos de fibra.

Aunque los mejores resultados se obtuvieron para la fibra CW/DVB, ésta no fue la seleccionada puesto que resultó ser más inestable que las otras. Con respecto a las otras dos, no se encontraron grandes diferencias de respuesta (sólo en el caso de *fonofos* el área mejoró con la aplicación de PA). Finalmente, para realizar las experiencias posteriores se decidió seleccionar la fibra de PA, por ser la misma que se utilizó en la determinación de los OCs.

En cuanto a la optimización del contenido de sal, se realizaron sucesivas extracciones de una muestra de agua fortificada a 10 ng ml^{-1} con tres diferentes proporciones de NaCl (0%, 15% y 30%). El aumento del contenido de sal mejoró ligeramente la señal de alguno de ellos (*diazinon* y *fention*), sin embargo en el caso de *paration-metil* el área disminuyó hasta cinco veces cuando se añadía 15 o 30% de NaCl. Por este motivo, se decidió trabajar en pruebas posteriores sin adición de sal.

4.2.5. Análisis de sangre total mediante SPME en modo espacio de cabeza

Con el fin de completar la aplicación de la técnica de SPME a muestras de fluidos biológicos, se llevó a cabo el análisis de sangre total. La sangre es una matriz bastante compleja, por lo que no es recomendable la aplicación de la técnica más simple de inmersión directa, que como vimos con anterioridad sí resultó apropiada para el análisis de orina y suero diluidos con los correspondientes factores de dilución. En el caso de la sangre, una gran cantidad de compuestos, especialmente proteínas, pueden ser absorbidos por la fibra, además de los analitos objeto de estudio, con lo que la calidad de los análisis decrece y el tiempo de vida media de la fibra disminuye drásticamente.

El uso de GC-ECD y GC-FPD supone una limitación para seleccionar otros compuestos, normalmente de la misma familia, como patrones internos. En este apartado se introduce la espectrometría de masas en tándem como sistema de detección, lo cual permite trabajar con compuestos deuterados como patrones internos para los procedimientos finales recomendados.

4.2.5.1 Etapa preliminar de optimización para plaguicidas organoclorados

Algunas de las variables optimizadas para la determinación de plaguicidas OCs en muestras acuosas fueron aplicadas al análisis de sangre total (absorción: fibra PA, 30 min de pre-extracción + 30 min de extracción, T^a de extracción 90°C; desorción: 260°C, 2 min). Por lo que respecta al volumen, se fijó una cantidad de 0.5 ml de muestra a la cual se adicionó 0.5 ml de agua nanopure.

Los parámetros más importantes de la absorción, que pueden influir significativamente en la eficacia de la extracción de analitos en sangre por SPME, son la desproteínización, que se estudió mediante la adición de ácidos, y la fuerza iónica, que se evaluó añadiendo diferentes sales.

Este estudio se llevó a cabo usando un GC-ECD debido a su mayor disponibilidad frente al GC-MS/MS. Los parámetros seleccionados se comprobaron

finalmente en el equipo GC-MS/MS, que fue el usado para el análisis de muestras reales.

- **Efecto de la adición de ácido**

Con el fin de estudiar la influencia de la adición de distintos ácidos en sangre total, se extrajo una muestra fortificada a 10 ng ml^{-1} en presencia de $50 \text{ }\mu\text{l}$ de HCl 4.5M y 9M, o de H_2SO_4 4.5M y 9M. La **Figura 4.18** muestra los cromatogramas ECD obtenidos para algunos OCs.

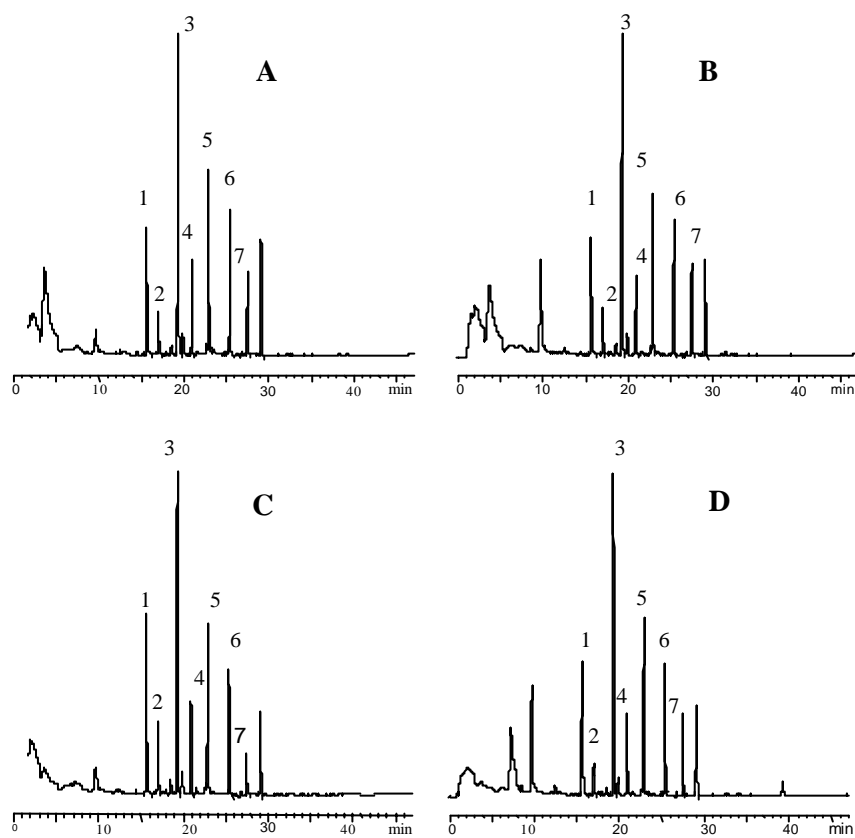


Figura 4.18. Cromatogramas GC-ECD correspondientes a la extracción de algunos plaguicidas OCs en sangre por HS-SPME en distintas condiciones de acidez. A: H_2SO_4 9M; B: H_2SO_4 4.5M; C: HCl 9M; D: HCl 4.5M. (1) HCB, (2) lindano, (3) endosulfan-éter, (4) heptaclor, (5) aldrin, (6) heptacloro éoxido, (7) α -endosulfan.

Como puede observarse, no existieron grandes diferencias en las respuestas de los plaguicidas OCs en función del tipo de ácido y de las diferentes concentraciones.

- **Efecto de la adición de sal**

Esta experiencia se llevó a cabo en sangre fortificada a un nivel de 10 ng ml^{-1} , adicionando dos tipos de sales: mono- y di-valente (NaCl y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). La **Figura 4.19** muestra los cromatogramas correspondientes a la extracción de los plaguicidas OCs en sangre en distintas condiciones salinas y de acidez.

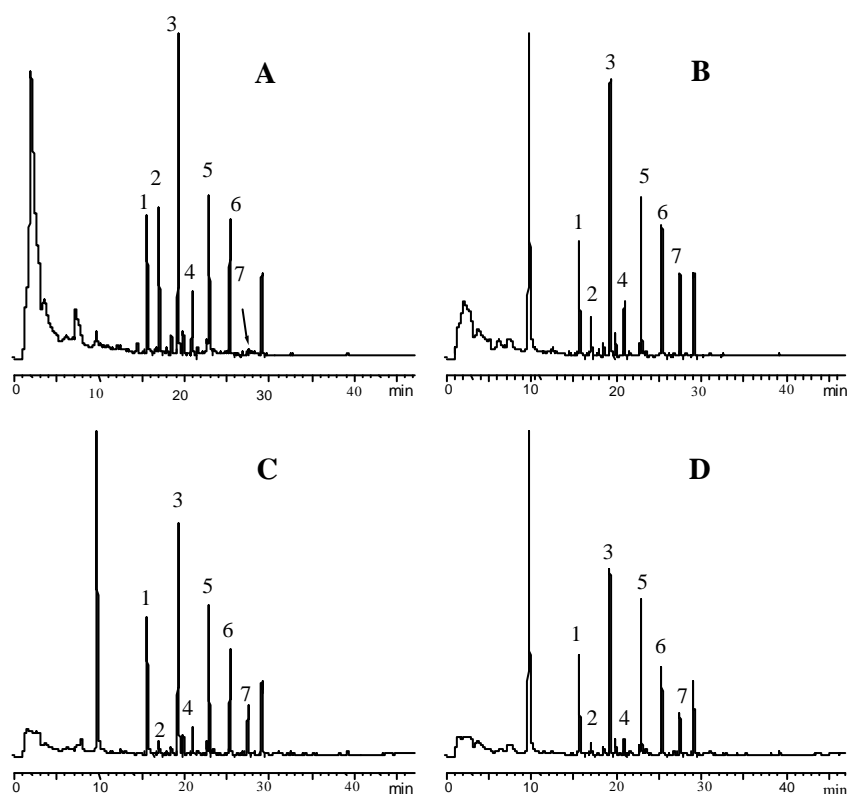


Figura 4.19. Cromatogramas GC-ECD correspondientes a la extracción de algunos plaguicidas OCs en sangre por HS-SPME. A: H_2SO_4 9M/0.15 g NaCl; B: disolución H_2SO_4 9M/0.15 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; C: 0.15 g NaCl; D: 0.15 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (1) HCB, (2) lindano, (3) endosulfan-éter, (4) heptaclor, (5) aldrin, (6) heptacloro éoxido, (7) α -endosulfan.

A la vista de la **Figura 4.19**, puede observarse que para la mayoría de los compuestos estudiados la eficacia de la extracción aumentó con las experiencias realizadas en sangre con ácido y sal (**Figuras A y B**). Sin embargo, cuando éstas se compararon con las recuperaciones obtenidas en la extracción de sangre conteniendo solamente ácido, resultaron mucho menores. Este hecho está de acuerdo con la explicación que aportan Lee *et al.* (1996) sobre la posible estabilización de las membranas de los eritrocitos en presencia de sales, lo que provocaría que los plaguicidas quedasen atrapados en las vesículas de las membranas dificultándose su extracción. Como consecuencia, se consideró necesaria la adición de ácido (H_2SO_4 o HCl) a las muestras de sangre, pero no así la de al, cuyo uso se descartó en experiencias posteriores.

4.2.5.2. Etapa preliminar de optimización para plaguicidas organofosforados

Del mismo modo que en el apartado anterior, para la determinación de plaguicidas OPs en sangre total se realizaron también algunas pruebas preliminares de optimización, en este caso mediante GC-FPD.

Se descartó la adición de sal y se estudió únicamente el efecto de la adición de ácido. Para llevar a cabo esta experiencia, se extrajeron 0.5 ml de sangre + 0.5 ml de agua nanopure con la fibra PA adicionando en cada caso 50 μ l HCl 4.5M y 9 M, o 50 μ l de H_2SO_4 4.5M y 9M. La **Figura 4.20** muestra los resultados obtenidos (nivel de fortificación en sangre 40 ng ml⁻¹ (*fonofos*, *clorpirifos* y *etion*), 160 ng ml⁻¹ (*paration-metil* y *fentrotion*) y 320 ng ml⁻¹ (*malation*)). El *fention* fue eliminado de la lista de OPs debido a que su resolución con *clorpirifos* no era del todo satisfactoria, seleccionando entonces *clorpirifos* por su mayor interés en los cultivos de la zona Mediterránea. Por otro lado, se incluyó un nuevo insecticida OP, *etion* (ver **Tabla 1.13** de la sección 1.6), con la previsión de que su eficacia de extracción por HS-SPME era satisfactoria (Lee *et al.*, 1996).

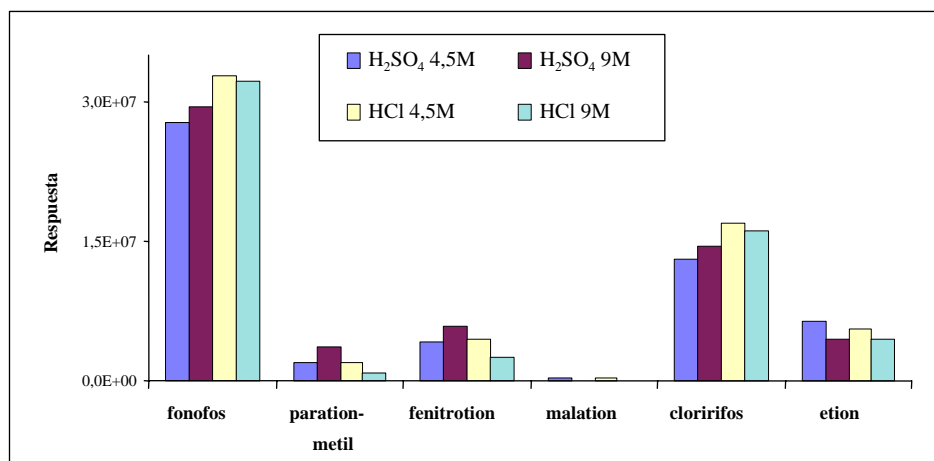


Figura 4.20. Áreas de picos de los plaguicidas OPs obtenidas tras la extracción por HS-SPME de una muestra de sangre para la optimización de la adición de ácido y su concentración.

La Figura 4.20 muestra que no existen grandes diferencias en el comportamiento de los compuestos estudiados en las distintas condiciones de acidez. Conociendo la facilidad de algunos plaguicidas OPs de hidrolizarse en condiciones ácidas fuertes, se decidió seleccionar un menor contenido de ácido (adición de 50 μ l de HCl 4.5M) para los ensayos posteriores.

4.2.5.3. Optimización del método cromatográfico GC-MS/MS

Para el desarrollo de un método multiresidual para la determinación simultánea de plaguicidas OPs y OCs mediante GC-MS/MS, se estudiaron, en primer lugar, los espectros de masas de cada uno de los compuestos seleccionados, preparados en n-hexano. Aunque lo más recomendable hubiese sido optimizar el método cromatográfico en muestras de sangre fortificadas con los compuestos investigados, debido a la técnica de extracción utilizada (SPME) y a la imposibilidad de obtener un extracto común, se optó por la utilización de patrones en hexano, extrapolando las condiciones óptimas obtenidas con patrones a las muestras reales finalmente analizadas.

Todas las experiencias MS/MS se realizaron en modo de ionización por impacto electrónico (EI). La detección MS/MS consistió en el aislamiento del ión precursor seleccionado para cada compuesto dentro de la trampa y seguidamente la aplicación de un voltaje de excitación adecuado para su subsecuente fragmentación.

En cuanto a las condiciones de ionización por EI, la temperatura de la fuente se fijó en 220°C y la presión en 30 mTorr. Por lo que respecta a las condiciones de fragmentación, los parámetros estudiados para la optimización del método fueron: selección del ión precursor, ventana de aislamiento, rango de masas, voltaje de excitación y valor del parámetro q . El tiempo de aislamiento del ión/iones precursores seleccionados se fijó en 8 ms y el tiempo de aplicación del voltaje de radiofrecuencia (RF) de excitación fue de 15 ms.

El primer paso en el proceso de optimización de las condiciones cromatográficas fue la selección del ión precursor para cada analito a partir de su espectro de masas y del margen de unidades masa carga (m/z) incluido en la ventana de aislamiento. En algunos casos, aunque muy pocos, como iones precursores se pudieron seleccionar los iones moleculares puesto que aparecían como picos base (fue el caso de *HCB* con (m/z 284) y *fonofos* (m/z 246)).

Una vez seleccionados los iones precursores, se eligió el margen de unidades masa carga definiendo la ventana de aislamiento. En el caso de compuestos OPs el margen de unidades m/z fue de ± 0.5 unidades sobre el valor de la m/z del ión precursor (excepto para *clorpirifos* ± 2.5 unidades). Por lo que respecta a las ventanas de los plaguicidas OCs, fueron superiores, con valores de ± 2.5 y ± 4 unidades, excepto para *HCB* y *p,p'-DDE* que fueron de mayor amplitud (± 5 unidades) debido a que se precisó la selección del ión precursor y una ventana adecuada para poder identificar al analito y a su isótopo marcado. La definición de la ventana de aislamiento correspondiente al ión precursor, y su posterior fragmentación mediante espectrometría de masas en tándem, permite una mayor información cualitativa del analito y por tanto una identificación más segura. Los resultados de las ventanas de aislamiento, así como de los iones precursores seleccionados, se muestran en el artículo adjunto (sección 4.2.5.5).

Después de seleccionar el ión precursor para cada compuesto y de establecer su ventana de aislamiento, se optimizaron los parámetros relacionados con el proceso de fragmentación. Este proceso implica colisión y posterior disociación de los iones precursores para generar los iones fragmento. El software del equipo permite programar diferentes segmentos de tiempo para cada *scan* de análisis, y aplicar diferentes voltajes de RF durante un mismo análisis. La optimización de las condiciones de fragmentación para cada plaguicida se efectuó mediante la aplicación de diferentes voltajes. La selección de las condiciones de fragmentación óptimas se hicieron en base a la obtención de un espectro de masas donde aparecieran, en la medida de lo posible, los iones fragmento y el ión precursor en una abundancia relativa entre 15 y 30%, lo cual está asociado con una mayor respuesta en la relación señal ruido y en el área del pico cromatográfico. Además, la presencia del ión precursor en el espectro de MS/MS con esta abundancia relativa, junto con los iones fragmento hace posible la correcta identificación del analito.

Como ejemplo de la optimización en el proceso de fragmentación mediante la aplicación de distintos voltajes, se muestran las **Figuras 4.21** y **4.22**, correspondientes a los espectros MS/MS de *HCB* y *p,p'*-*DDT*, respectivamente, obtenidos con la aplicación de distintos voltajes (1, 1.5 y 5 para *HCB*; 1.2, 1.3 y 1.4 V para *p,p'*-*DDT*). Como puede observarse, la fragmentación va aumentando al hacerlo el voltaje (en el caso de *HCB* se generaron hasta tres fragmentos de iones importantes, y *p,p'*-*DDT* generó dos fragmentos de iones con alta abundancia relativa). También puede observarse que en el caso de *HCB*, con la aplicación de un elevado voltaje (5 V) no se obtuvo una situación apropiada puesto que hizo desaparecer por completo el ión precursor, y esto generaría dudas en la identificación del compuesto.

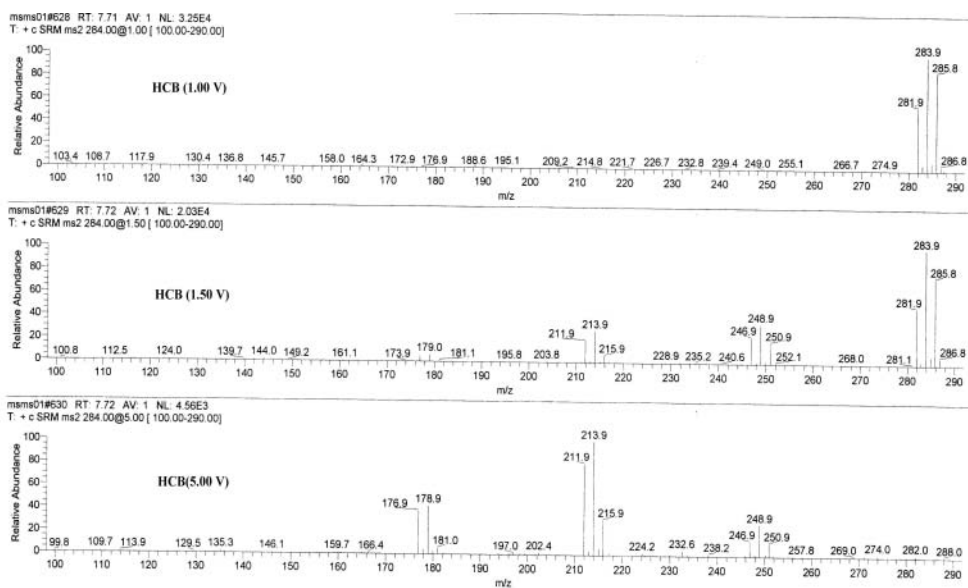


Figura 4.21. Espectros MS/MS obtenidos para diferentes voltajes de fragmentación de HCB (ión precursor seleccionado m/z 284).

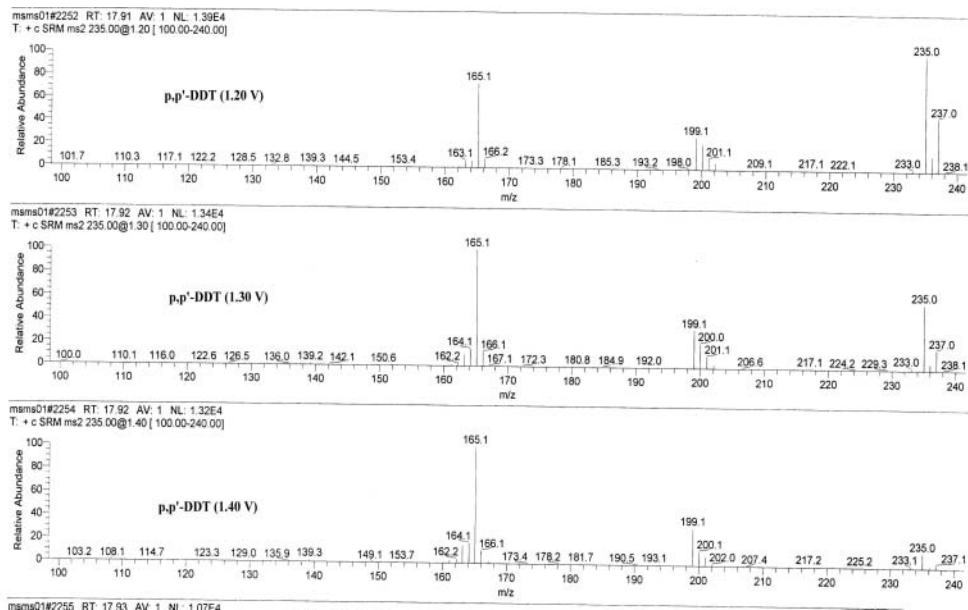


Figura 4.22. Espectros MS/MS obtenidos para diferentes voltajes de fragmentación de p,p'-DDT (ión precursor seleccionado m/z 235).

La **Figura 4.23** muestra un cromatograma MS/MS para una mezcla de patrones OCs y OPs de 50 ng ml^{-1} , aplicando el método creado para esta experiencia. La **Figura 4.24** muestra los espectros de fragmentación MS/MS obtenidos para los plaguicidas estudiados tras su inyección con el método optimizado.

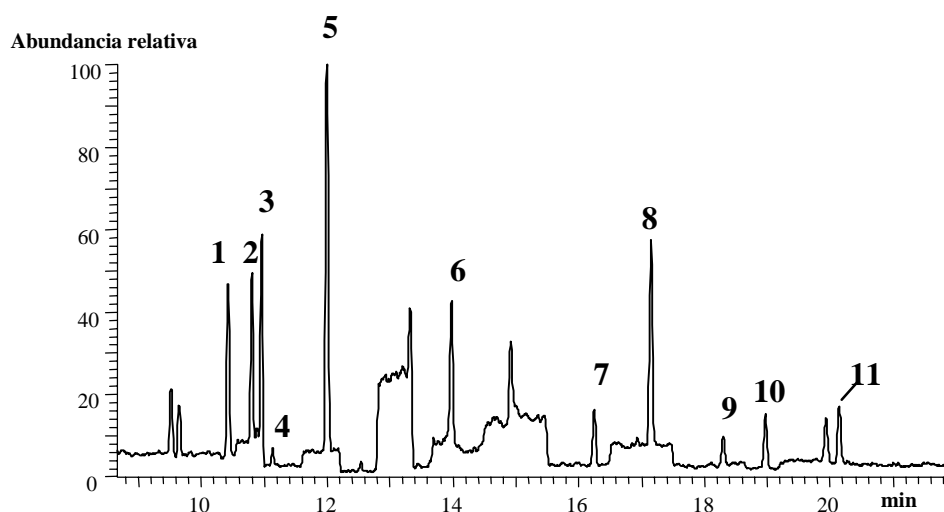


Figura 4.23. Cromatograma GC-MS/MS correspondiente a una mezcla de patrones de OCs y OPs a 50 ng ml^{-1} . (1) HCB, (2) β -HCH, (3) lindano, (4) fonofos, (5) endosulfan-éter, (6) clorpirifos, (7) α -endosulfan, (8) *p,p'*-DDE, (9) *p,p'*-DDD, (10) etion, (11) *p,p'*-DDT.

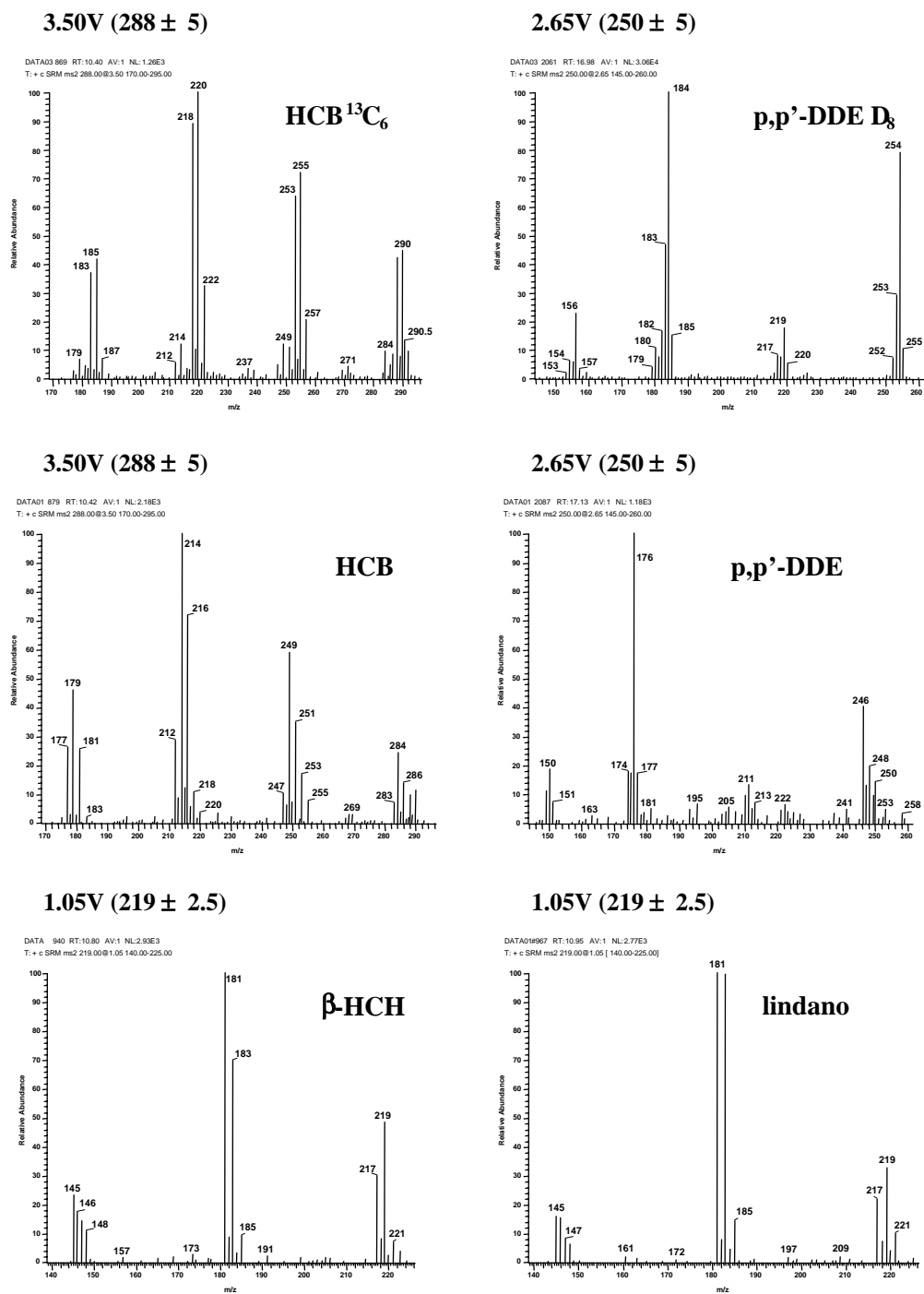


Figura 4.24. Espectros MS/MS correspondientes a los plaguicidas OCs y OPs estudiados.

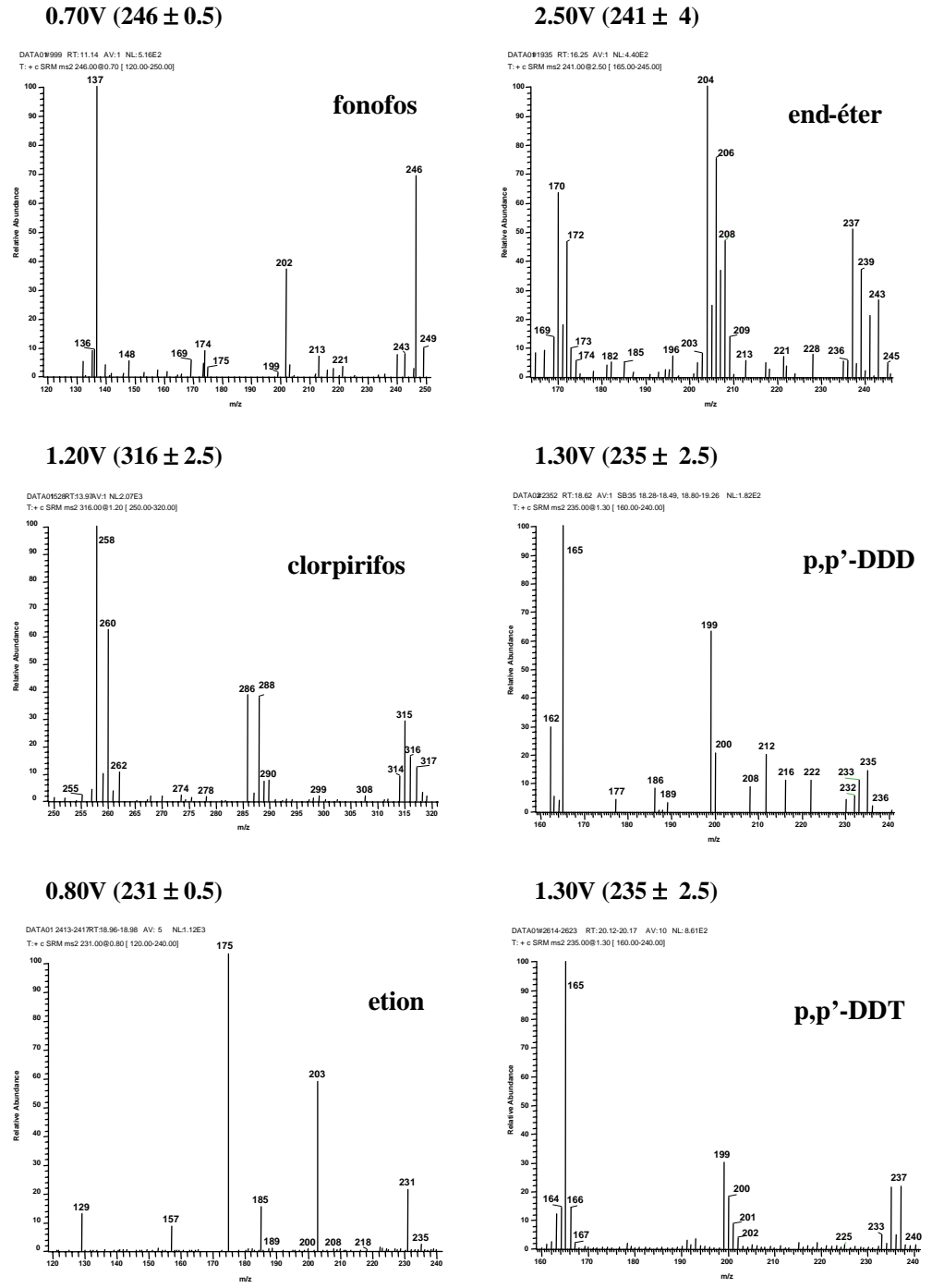


Figura 4.24 (cont.). Espectros MS/MS correspondientes a los plaguicidas OCs y OPs estudiados

4.2.5.4. *Determinación de plaguicidas organoclorados y organofosforados en muestras de sangre*

La aplicación de la técnica HS-SPME a muestras de sangre se realizó conjuntamente para los plaguicidas OPs y OCs mediante GC-MS/MS. En el caso de los plaguicidas OCs, se decidió reducir la lista de compuestos estudiados seleccionando solamente aquellos detectados con mayor frecuencia en fluidos biológicos de acuerdo con la literatura (*HCb*, β -*HCH*, *lindano* y *DDTs*), así como α -*endosulfan* y su metabolito -éter, porque su uso en cultivos todavía está autorizado en España (ver **Tabla 1.12** de la sección 1.6). Por lo que respecta a los plaguicidas OPs la lista se redujo a *fonofos*, *clorpirifos* y *etion*. El *diazinon* fue eliminado de la lista porque se hidrolizaba en medios ácidos y por tanto no se recuperaba adecuadamente.

Como podrá observarse, el método desarrollado no se pudo aplicar a la determinación de β -*endosulfan* y *endosulfan-sulfato*, pues no se extrajeron adecuadamente mediante HS-SPME en muestras de sangre.

Basándonos en todas las variables optimizadas para la extracción de plaguicidas OPs y OCs mediante HS-SPME, tanto en muestras de agua (apartado 4.2.4) como en pruebas preliminares con sangre (apartados 4.2.5.1 y 4.2.5.2), se seleccionó un procedimiento común de extracción para muestras de sangre mediante HS-SPME y detección GC-MS/MS. A 0.5 ml de sangre se le añadió 50 μ l de HCl 4.5 M, y después de 1 min de agitación se adicionó 0.5 ml de agua nanopure. El vial conteniendo la muestra fue pre-calentado a 90°C durante 30 min, y seguidamente extraído durante 30 min más con la fibra de PA. Finalmente, la desorción de la fibra tuvo lugar en el puerto de inyección del GC a una temperatura de 240°C durante un tiempo de 4 min.

La validación del método desarrollado se llevó a cabo evaluando los siguientes parámetros (ver resultados en el artículo adjunto, sección 4.2.5.5):

Linealidad- las curvas de calibración fueron obtenidas a partir 5 niveles de concentración con tres réplicas. Los patrones se prepararon en matriz y se usaron

áreas relativas a patrones internos marcados isotópicamente HCB $^{13}\text{C}_6$ (para HCB) y p,p'-DDE D_8 (para el resto de compuestos). El rango de concentración estudiado fue entre 1-50 ng ml $^{-1}$ (excepto para HCB 0.5-25 ng ml $^{-1}$ y 5-50 ng ml $^{-1}$ para p,p'-DDT). Como puede observarse en la **Figura 4.25**, se usaron curvas de calibración de segundo orden ya que permitieron un mejor ajuste de los puntos y la obtención de valores de r^2 superiores a 0.99.

Exactitud- estudiada mediante ensayos de recuperación (n=6) analizando muestras de sangre fortificada a tres niveles de concentración 1, 5 y 25 ng ml $^{-1}$ (0.5, 2.5 y 12.5 ng ml $^{-1}$ para HCB).

Precisión intra-día- determinada como la repetibilidad en un mismo día (n=6) de las recuperaciones a los tres niveles de fortificación ensayados 1, 5 y 25 ng ml $^{-1}$ (0.5, 2.5 y 12.5 ng ml $^{-1}$ para HCB).

Precisión inter-día- determinada como la reproducibilidad en tres días diferentes (n=9) de las recuperaciones a dos niveles de fortificación 1 y 25 ng ml $^{-1}$ (0.5 y 12.5 ng ml $^{-1}$ para HCB).

Límites de detección (LD)- obtenidos cuando la señal fue 3 veces el ruido de fondo en el cromatograma correspondiente al nivel más bajo de concentración para el analito.

El procedimiento optimizado se aplicó a muestras reales de sangre correspondientes a cultivadores, y a aplicadores de plaguicidas en cítricos de la Comunidad Valenciana. HCB (0.8-4.8 ng ml $^{-1}$), β -HCH (1.1-1.8 ng ml $^{-1}$) y p,p'-DDE (2.2-74 ng ml $^{-1}$) fueron los plaguicidas OCs detectados con mayor frecuencia. El insecticida OP *clorpirifos* fue detectado en 4 muestras a bajos niveles de concentración próximos a su límite de detección (0.2 ng ml $^{-1}$). El procedimiento también se aplicó a 5 muestras reales de suero, que además coincidieron con los aplicadores de plaguicidas, cuyas sangres también se habían analizado. Los resultados obtenidos estuvieron de acuerdo con los detectados en las sangres. Para más detalles se puede consultar el artículo científico del apartado 4.2.5.5.

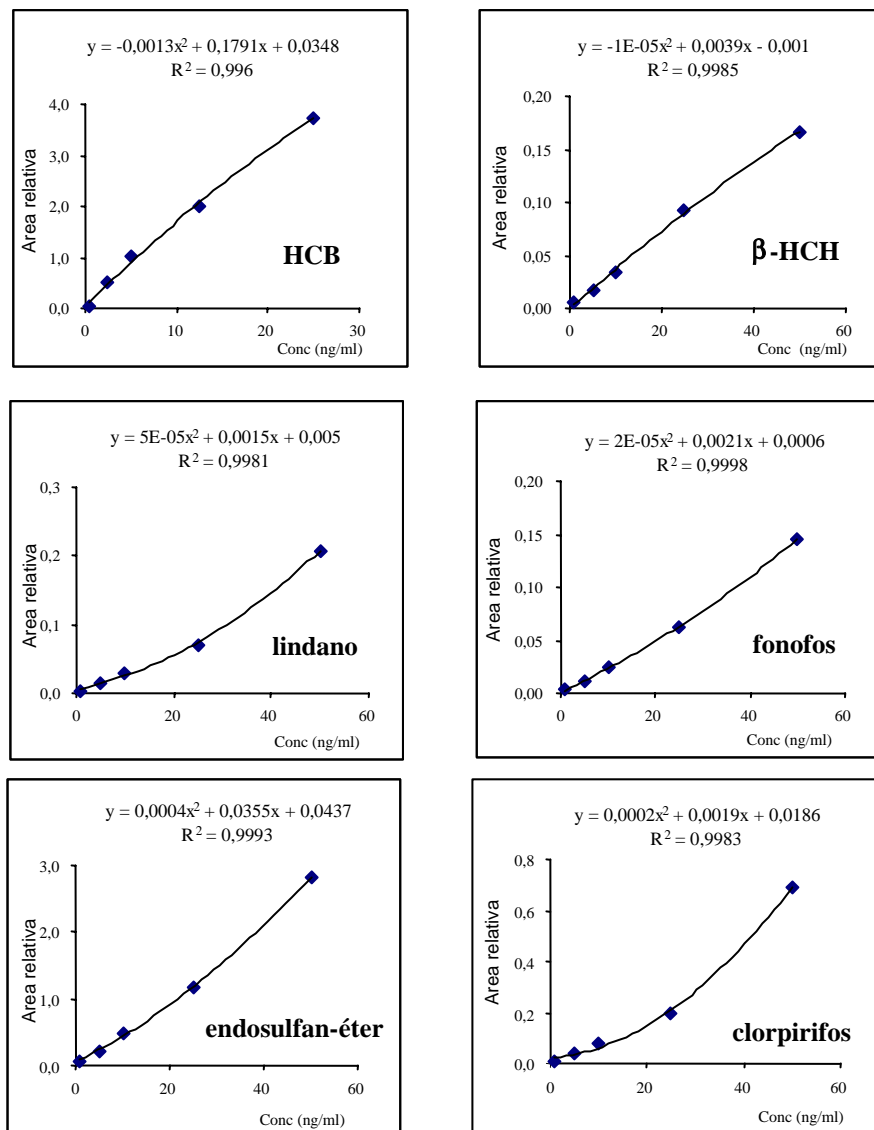


Figura 4.25. Curvas de calibrado correspondientes a la extracción por HS-SPME de disoluciones patrón de plaguicidas OCs y OPs preparadas en sangre y usando patrones internos HCB ¹³C₆ (para HCB) y p,p'-DDE D₈ (para el resto de compuestos).

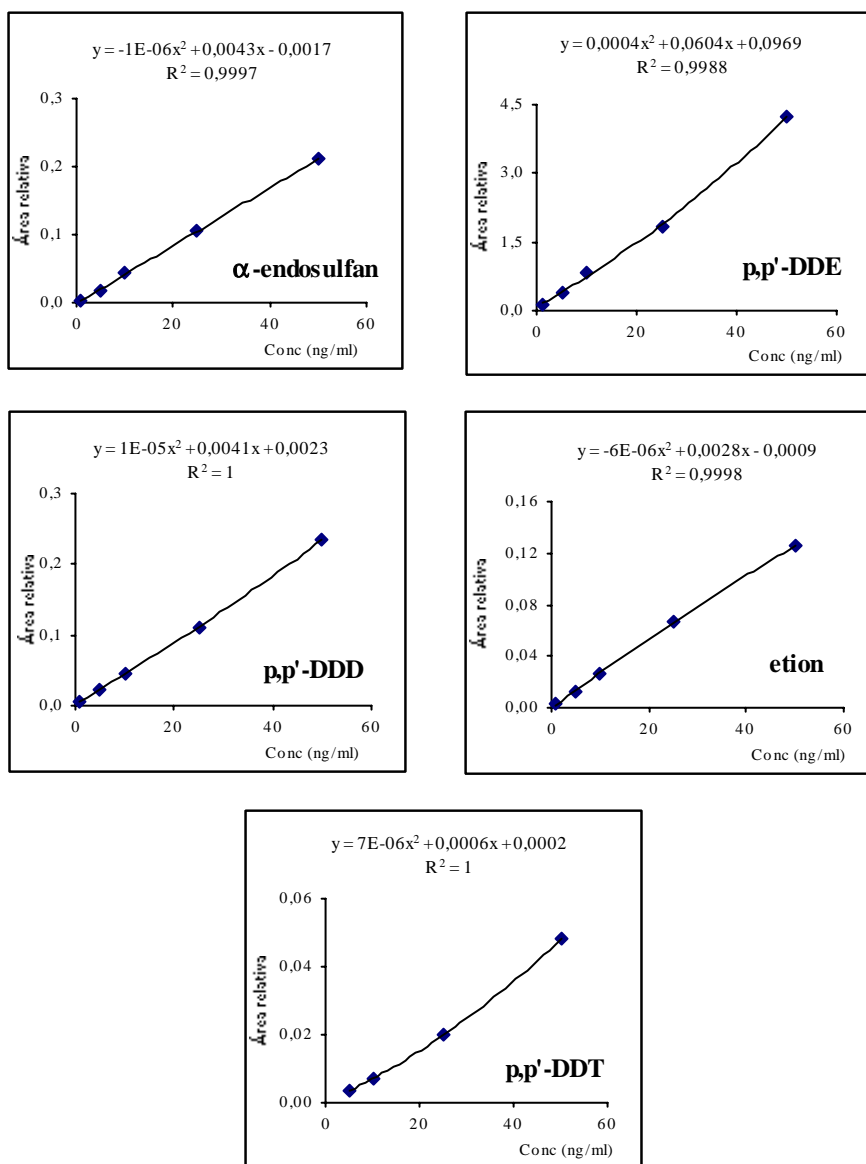


Figura 4.25 (cont.). Curvas de calibrado correspondientes a la extracción por HS-SPME de disoluciones patrón de plaguicidas OCs y OPs preparadas en sangre y usando patrones internos $HCB^{13}C_6$ (para HCB) y p,p'-DDE D_8 (para el resto de compuestos).

4.2.5.5. Artículo científico 3: J. Chromatogr. B (en prensa)**HEADSPACE SOLID PHASE MICROEXTRACTION IN COMBINATION WITH GAS CHROMATOGRAPHY AND TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF ORGANOCHLORINE AND ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES IN WHOLE HUMAN BLOOD**

F. Hernández, E. Pitarch, J. Beltran, F.J. López*

Analytical Chemistry, Dept. Experimental Sciences, University Jaume I, P.O. Box 8029, E-12080 Castellon, Spain

Abstract

A method for the determination of several organochlorine and organophosphorus pesticides in human whole blood samples was developed. The combination of solid phase microextraction in headspace mode with gas chromatography with tandem mass spectrometry allowed the determination of eleven selected pesticides at ppb levels, minimizing the sample treatment. Quantitation was carried out by means of calibration curves prepared in blood using labelled surrogate/internal standards. The method showed good linearity between 1 and 50 ng ml⁻¹ (0.5-25 ng ml⁻¹ for HCB) using second-order calibration curves. Precision was found to be better than 20% at the three concentration levels assayed in the range of ng ml⁻¹. The detection limits obtained were in the range 0.02-0.7 ng ml⁻¹, except for p,p'-DDT (3 ng ml⁻¹). The developed procedure was applied to blood and serum samples obtained from agricultural workers. HCB, β-HCH and p,p'-DDE were the most frequently detected in the samples analyzed.

Keywords: gas chromatography, tandem mass spectrometry, solid phase microextraction, blood analysis, pesticides

1. Introduction

The widespread use of pesticides has posed problems for both our environment and health, being the exposure to these hazardous compounds of great concern for the general population. Biological monitoring is a useful tool for assessing exposure to pesticides and involves the measurement of a biomarker of exposure (usually the pesticide or their metabolites) in human blood, urine or tissues, determining in this way the internal dose of the toxicant [1]. Measure of toxic compounds in biological samples face to several inconvenient being the most important the low concentration levels involved and the complexity of samples matrices (urine, serum or whole blood). So, biological monitoring requires reliable analytical methods for the accurate determination of pesticides and/or metabolites at the low levels found in this type of samples.

Measuring the internal dose of toxicants in blood has several advantages over measuring it in urine. Generally, the parent compound, instead of a metabolite, can be directly monitored in blood products such as whole blood, plasma, or serum; therefore, the development of a blood measurement technique usually does not require detailed information on the metabolism. The major disadvantages of blood measurements are the venipuncture required to obtain the sample and the low concentration levels. In addition, when samples can be obtained, the amount of blood available to perform the analysis is often limited. These facts stress the need for developing specially sensitive analytical procedures.

For the determination of pesticides in blood products, serum is usually preferred over whole blood due to the major complexity of the matrix in whole blood and because serum is a more homogeneous material [2]. However, the analysis of blood can provide interesting information on the total levels of some contaminants before their distribution in the different blood compartments. The analysis of whole blood samples usually requires tedious procedures including one or more clean up steps in order to remove interferences. In this way, treatment with sulfuric acid after liquid-liquid [2,3] or solid phase extraction (SPE) [4] has been used for the determination of organochlorine pesticides and PCBs in whole blood

samples, sometimes combined with an additional SPE [2]. SPE clean up has been also applied after hexane extraction for the determination of HCH isomers, aldrin and DDT metabolites in human blood [5]. Chlordane compounds and metabolite residues have been determined in whole blood using and extraction with extrelute columns and a SPE clean up with florisil [6].

When the analytes have suitable volatility, an alternative for the analysis in these complex matrices is the extraction in headspace (HS) mode in order to avoid most interferences. The use of solid phase microextraction (SPME), quite a recent extraction technique developed by Pawliszyn and co-workers [7-9], in the head space approach appears as a feasible technique favored by reduction in sample handling, even eliminating the need for clean up steps. HS-SPME procedures have been proposed for the determination of different compounds as cyanide [10], ethanol [11] and fenfluramine and amphetamines [12] in whole blood samples. With regards to pesticides, some applications for organochlorine [13] and organophosphorus pesticides [14-16], as well as for dinitroaniline herbicides [17] have been reported in whole blood samples by means of HS-SPME.

Detection of extracted pesticides can be carried out by using different gas chromatography (GC) detectors, but it is preferable to use mass spectrometry detection in order to further assess peak identity. The use of MS detection clearly increases detection capabilities giving spectral identification of separated compounds. In spite of this, in most occasions the use of typical EI-MS detection suffers from peak detection problems even when using a selected ion for quantitation, especially with very complex matrices as biological fluids [18,19]. This situation can be overcome by using mass spectrometry in tandem detection with an adequate selection of precursor and daughters ions as referenced in literature [20,21]. Thus, procedures based on a final determination by GC-MS/MS usually give good results both on identification and quantitation of pesticides in biological samples at low concentration levels.

In this paper, a study on the applicability of the HS-SPME combined with GC-MS/MS for the pesticide determination on human blood stabilized with K₃

EDTA has been done. Development and optimization of SPME procedures were carried out separately for several OC and OP pesticides by using GC-ECD and GC-FPD, respectively. Later, a method has been developed for both types of compounds using tandem mass spectrometry detection. Quantitation has been performed using calibration curves prepared by spiking blank EDTA-blood samples, and using labelled surrogate standards. The developed multiresidue procedure has been applied to blood and serum samples from agricultural workers.

2. Experimental

2.1 Reagents

96.5-99.7% purity pesticide standards were purchased from Dr. Erhenstorfer (Pomochem, Wesel, Germany) and used without further purification. Stock standard solution mixtures (ca. 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for OP and for OC pesticides (except 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for HCB) were prepared in acetone from stock individual standards and stored at -18°C . Working solutions were prepared by dilution with methanol and stored at 4°C . Spiked water and blood samples were prepared by adding the appropriate volume of the methanol standard solution, maintaining a final constant concentration of 2.5% methanol, thoroughly shaking and allowing to equilibrate overnight at 4°C .

4,4'-DDE D_8 (Dr Ehrenstorfer) and HCB- $^{13}\text{C}_6$ (Cambridge Isotope Labs, Inc. Andover, MA) were used as surrogate/internal standards. Stock solutions of labelled standard (ca 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) were prepared in acetone and stored at -18°C . Working solutions were prepared by dilution with methanol.

Organic solvents (methanol and acetone) were for pesticide residue analysis (Scharlau, Barcelona, Spain). Sulfuric acid (Scharlau) and hydrochloric acid (J.T. Baker, Deventer, The Netherlands) were of analytical grade. Sodium chloride (Scharlau) of analytical grade was used after purification by heating at 300°C overnight.

2.2. Samples

Blood samples used for optimization studies were obtained from non-exposed healthy subjects and samples for analysis were collected from citrus growers. All of them were supplied by *Gabinete de Seguridad e Higiene en el Trabajo de la Conselleria de Trabajo de la Generalitat Valenciana*. The samples were collected into Vacutainer tubes (Brand. Sterile Interior) containing K_3 EDTA for avoiding coagulation and stored at -18°C .

2.3. Instrumentation

The SPME device used for manual extraction, consisting in a holder assembly and several replaceable fibers, was purchased from Supelco (Spain). Three different fiber types were compared, from non polar polydimethylsiloxane (PDMS, $100\ \mu\text{m}$) to more polar polyacrilate (PA, $85\ \mu\text{m}$) and Carbowax/divinylbenzene (CW/DVB, $65\ \mu\text{m}$). The fibers were conditioned as recommended by the manufacturer by heating them in the injection port of the chromatographic system during 0.5-2 h at $250\text{-}300^{\circ}\text{C}$ depending on the fiber type.

Analysis of OC pesticides were performed using a Hewlett-Packard 5890 Series II gas chromatograph (Avondale, USA) equipped with a splitless injector ($2\ \text{mm}$ i.d. glass liner) and electron capture detection (ECD) system. The GC system was fitted with a $25\ \text{m} \times 0.2\ \text{mm}$ i.d., $0.33\ \mu\text{m}$ HP Ultra 2 (5% phenyl methyl siloxane) column. Injector temperature was 260°C , while the oven temperature program used was: 120°C (5.5 min), $30^{\circ}\text{C}\ \text{min}^{-1}$ to 150°C , $3^{\circ}\text{C}\ \text{min}^{-1}$ to 270°C with a final hold for 0.5 min. Helium was used as carrier gas at a flow-rate of $1\ \text{ml}\ \text{min}^{-1}$. ECD conditions: temperature 300°C , nitrogen (make-up) $60\ \text{ml}\ \text{min}^{-1}$.

Analysis of OP pesticides were performed using an Ultra-Trace GC gas chromatograph (Fisons Instruments, Milan, Italy) based on the GC 8000 Series 2, equipped with an FPD-80 flame photometric detector and PC-based data system (Chrom Card) to control data acquisition and instrument conditions. The pressure of detector gases, hydrogen and air, were set at $140\ \text{kPa}$ and $60\ \text{kPa}$, respectively.

Helium was used as carrier gas at a constant flow-rate of 1 ml min⁻¹. The analytical column was a 30 m x 0.32 mm i.d., with 0.50 µm 5% phenyl methyl siloxane (Hewlett-Packard). Detector and injector temperatures were 280 and 250°C, respectively. The oven temperature was programmed as follows: 60°C (5.5 min), 30°C min⁻¹ to 200°C, 3°C min⁻¹ to 270°C with a final hold time for 5 min.

GC-MS/MS was performed using an ion trap mass spectrometer (Finnigan GCQ, Austin, Texas, USA) operating in electron impact (EI) ionization mode. The GC 8000 Top (CE Instruments, Milan, Italy) was equipped with a AS 800 autosampler. The oven temperature was programmed as follows: 90°C (4 min), 30°C min⁻¹ to 180°C, 4°C min⁻¹ to 270°C, 30°C min⁻¹ to 300°C with a final hold for 3.5 min. Splitless injections (3 mm i.d. glass liner) of 2 µl were performed using a 30 m x 0.25 mm fused silica DB-5MS capillary column with a film thickness of 0.25 µm (cross-linked 5% phenyl methyl siloxane). Helium was used as carrier gas at a flow of 1 ml min⁻¹. The injector temperature was 240°C. Experimental mass spectrometer conditions are summarised in **Tables I** and **II**. Extracted ions selected from EI-MS/MS spectra for quantitation are indicated in **Table III**.

Table I. Mass spectrometer conditions.

Ionisation mode	EI (70 eV)
Multiplier voltage	1550 V
Multiplier gain	3.2E5
Source temperature	220°C
Transfer line temperature	275°C
Emission current	250 µA
AGC target	50
Trap offset	10

Table II. Programme for MS/MS detection of selected compounds.

Compound	parent ion	time	window	mass range	voltage (V)
HCB	288	3.50	10	170-295	3.50
β and γ -HCH	219	10.60	5	140-225	1.05
fonofos	246	11.00	1	120-250	0.70
endosulfan-ether	241	11.60	8	165-245	1.56
chlorpyrifos	316	13.67	5	250-320	1.20
α -endosulfan	241	15.50	8	165-245	2.50
p,p'-DDE	250	16.50	10	145-260	2.65
p,p'-DDD	235	18.30	5	160-240	1.30
ethion	231	18.70	1	120-240	0.80
p,p'-DDT	235	19.90	5	160-240	1.30

Table III. List of ions (m/z) extracted in MS/MS chromatograms for quantitation (relative abundances %).

Compound	m/z
1. HCB	212-216 (214, 100%), 249-253 (249, 55%), 284 (30%), 286(25%)
2. β -HCH	181 (100%), 183 (85%)
3. γ -HCH	181 (84%), 183 (100%)
4. fonofos	137 (100%), 174 (12%), 202 (23%)
5. endosulfan-ether	204-208 (206,100%), 237-241 (239, 54%)
6. chlorpyrifos	258 (100%), 260 (92%), 286 (85%), 288 (48%)
7. α -endosulfan	170 (73%), 172 (45%), 204-208 (204, 100%)
8. p,p'-DDE	175 (16%), 176 (98%), 177 (16%), 246 (100%), 248 (46%)
9. p,p'-DDD	165 (100%), 199 (36%)
10. ethion	175 (100%), 203 (68%)
11. p,p'-DDT	165 (100%), 199 (6%)
<i>Labelled surrogate/internal standard</i>	
$^{13}\text{C}_6$ HCB	18-222 (220, 100%), 253-257 (255, 72%), 288 (70%)
D_8 p,p'-DDE	33 (80%), 184 (100%), 185 (15%), 254 (72%)

2.4. Analytical recommended procedure

For the extraction of pesticides, 0.5 ml human EDTA-blood, 25 μl of 400 ng ml^{-1} surrogate/internal standards mixture and 50 μl 4.5 M HCl solution were placed into a 4 ml clear glass vial (36 mm x 12 mm i.d.), and sealed with a silicon-lined septum screw cap. After shaking the vial for 1 min in a vortex, 0.5 ml ultrapure water were added. Before the extraction, the sealed vial was preheated at 90°C with stirring in a silicone bath for 30 min. Then, the needle of the SPME device was passed through the septum and the PA fiber was pushed out from the needle and exposed to the HS of the vial for 30 min. After absorption, the fiber was allowed to dry for around 10 minutes. Then, it was thermally desorbed during 4 min into the glass liner of the GC injection port at 240°C, maintaining initial oven temperature at 90°C. Quantitation of samples was made using a calibration curve prepared by spiking blank blood samples and using isotopically labelled pesticides as surrogate/internal standards (HCB- $^{13}\text{C}_6$ for quantitation of HCB and p,p'-DDE-D₈ for the rest of pesticides).

3. Results and discussion

3.1. HS-SPME optimization

Before the application of HS-SPME to blood samples, several experiences with spiked water samples were carried out in order to select the optimum conditions for the extraction process. Determination of OC and OP pesticides in this first step was performed separately by GC-ECD and GC-FPD, respectively.

For the selected OC pesticides (HCB, lindane, endosulfan ether, α -endosulfan and p,p'-DDE) an optimization study on the desorption step was initially was carried out. The best results were established as follows: desorption time 2 min at 260°C with a initial oven temperature of 120°C. PDMS, PA and CB/DVB fibers were compared for the extraction of selected OC pesticides from spiked water samples

(10 ng ml⁻¹ level) at two extraction temperatures: 45 and 90°C (extraction time 30 min). Although some compounds as HCB showed lower affinity for the fiber coating at higher temperature, in general extraction efficiency was better at 90°C. With regard to the type of coating, the higher efficiencies corresponded to PA fiber.

Extraction times were studied using spiked water samples and the equilibrium was estimated to take up to several hours (ranging between 0.5-11 hours). In this situation a fixed extraction time of 30 min was selected, being similar to pre-heating time, thus simplifying the procedure and giving a total time of sample treatment comparable to the chromatographic run time. In this way a maximum sample throughput with manual extraction was obtained.

Once established the conditions for fiber type, heating temperature and extraction time using spiked water samples, the HS- SPME procedure was applied to blood samples. The sample volume available when dealing with this type of samples is often limited, being usually lower than 1 ml. Moreover, it is advisable to dilute blood samples with distilled water previously to the extraction in order to reduce their complexity and to avoid coagulation processes when the sample is heated. So, in further experiments, a volume of 0.5 ml of whole blood diluted with 0.5 ml of ultrapure water was selected for developing the HS-SPME procedure for the determination of OC pesticides.

According to the available literature, analytical procedures for determination of pesticides in serum and blood samples usually include an acidification of the sample previous to the extraction step, even when using SPME procedures [12-14]. So, the effect of adding acid to the blood sample together with the effect of the ionic strength over the extraction efficiency was studied. 50 µl of sulfuric or hydrochloric acids at two concentration levels (9 and 4.5 M) and uni and divalent (sodium chloride and ammonium sulfate) salts (between 0 and 15%, w/v) were added to diluted blood samples. As an example, **Figure 1** shows the ECD response of some OC analytes after SPME of blood samples spiked at 10 ng ml⁻¹ level in different conditions of salt and acid concentration. As it can be seen, the addition of H₂SO₄ 9 M to the sample generally improved the response for pesticides studied, allowing the

determination of lindane which was not recovered without acid. Only HCB showed a notable decrease in its response when adding acid or salt. On the other hand, addition of sodium chloride and ammonium sulfate decreased extraction efficiency for all pesticides, as it has also been reported by several authors [13,16]. This lower extraction efficiency when using salt addition has been justified by the stabilization of the erythrocyte membranes by the salts, which causes trapping the pesticides into membranous vesicles and thus their low recovery [13]. In spite of this, the addition of low concentrations (<10%) has been recommended in the literature in order to homogenize salt content of samples better than to improve pesticides extraction [22]. In our work, the use of hydrochloric acid instead of sulfuric acid or lowering acid concentration did not improve the results (**Figure 1**) and we selected the addition of only 50 μl of 9 M H_2SO_4 , that allowed us to achieve the better response for most compounds.

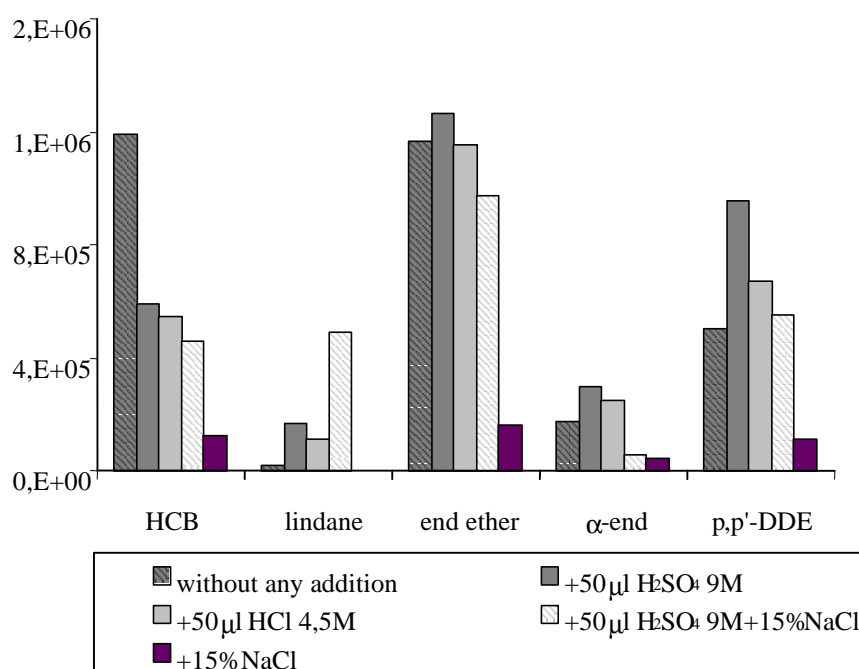


Figure 1. Influence of the addition of acid and salt in blood samples fortified at 10 ng ml^{-1} on HS-SPME efficiency.

In relation to OP pesticides, preliminary experiments with spiked water samples using different fiber coatings showed that the highest extraction efficiencies were also obtained with PA fiber. Desorption conditions were established according to our previous data for the determination of OP pesticides in water samples by direct immersion SPME [23] (4 min desorption time at 250°C in the injector and initial oven temperature 60°C). Initially, the experiments were carried out including a number of eight OP pesticides, but soon it was evident that some of them as dichlorvos, phorate, methidation, azinphos methyl and metamidofos did not show an adequate behaviour for HS extraction, probably due to their low volatility. So, only fonofos, chlorpyrifos and ethion were eventually selected for carrying out the study.

The effect of the ionic strength and of the acid addition over the OP pesticides extraction efficiencies were studied using blood samples spiked at 40 ng ml⁻¹ level. Addition of salt also led to lower extraction efficiencies. When studying the addition of different acids and concentrations, the best results were obtained when 50 µl of HCl 4.5 M were added to the sample, probably due to the low stability of OP pesticides in more strong acid conditions (as an example, fonofos and ethion are hydrolyzed in acid conditions [24]).

It is interesting to note that during some of the experiments, we found quantitation problems at the lower spiking levels which were attributed to contamination due to the absorption and reload of some of the studied compounds from the Teflon stirring bars. Some cleaning procedures were assayed to avoid memory effects between consecutive experiments, as cleaning the bars with a saturated solution of potassium dichromate in sulfuric acid for 15 min, into n-hexane for 1 hour or baking them at 200°C for 1.5 hours, but none of them solved the problem. At last, the pesticides were satisfactorily removed from stirring bars at 300°C for at least 1 hour.

3.2. GC-MS/MS optimization

After optimization of the HS-SPME for selected OC and OP pesticides, the following step was to develop a multiresidual procedure for the simultaneous determination of both OC and OP pesticides in whole blood samples carrying out subsequent analysis by GC-MS/MS. Besides the five OC and the three OP pesticides selected, β -HCH, p,p'-DDD and p,p'-DDT were also added to the standard mixtures in order to check their behavior. The use of MS/MS allowed us to increase the number of compounds to be studied due to its improved sensitivity and, mainly, selectivity. For acidification of the sample previous to the extraction step, HCl was chosen for the multiresidue determination of OC and OP pesticides, as a compromise for both families of compounds. Therefore, the HS-SPME procedure was applied as indicated in section 2.4.

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

In this paper, the MS/MS method was divided into ten acquisition segments (one for each pesticide, except for the isomers β -HCH and lindane). Three values of the trapping parameter q (0.45, 0.35 and 0.25) were investigated. The higher response for most compounds were obtained with $q = 0.45$, so this value was selected for our method. Then, isolation and excitation conditions were optimized and selected in order to obtain characteristic MS/MS spectra with fragmentation patterns rich enough to allow the accurate identification of analytes detected.

Table II shows the conditions corresponding of the optimized MS/MS method. The highest isolation windows used corresponded to HCB and p,p'-DDE as the labelled HCB- $^{13}\text{C}_6$ and 4,4'-DDE D_8 were also included in these segments. In addition, the selected precursor ion in these isolation windows did not correspond to any base peak in their EI spectrum (284 for HCB and 246 for p,p'-DDE), but the selection of precursor ion and window was made in order to keep isolation mass range as short as possible and including the pesticide as well as the isotopically labelled compound. In general, OP compounds required lower values of fragmentation voltages (0.70 V for fonofos, 1.20 V for chlorpyrifos and 0.80 V for ethion) than OC pesticides, corresponding the highest voltages to HCB, α -endosulfan and p,p'-DDE (3.5, 2.5 and 2.65, respectively).

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

3.3. Analytical characteristics and validation

Once the experimental conditions were optimized, validation of the overall analytical procedure, including HS-SPME (PA) and the subsequent determination of selected OC and OP pesticides by GC/MS-MS was carried out as regards as linearity range, precision, accuracy and limits of detection.

Quantitation was performed using calibration curves prepared by spiking "blank" blood samples with selected pesticides and using labelled surrogate/internal standards. The "blank" blood sample consisted in a pool obtained by mixing around 20 individual EDTA blood samples. This pool was previously analyzed and it was found to contain HCB and p,p'-DDE (mean concentrations of 2.7 and 3.7 ng ml $^{-1}$; relative standard deviations 20 and 12%, respectively), and thus it was necessary to correct the quantitative results in the samples by subtracting blank values for these two pesticides. **Figure 2** shows a typical chromatogram of a "blank" of blood sample.

Initially, some quantitation problems were observed, that were attributed to the fact that $^{13}\text{C}_6$ HCB was used as surrogate/internal standard for quantitation of the early eluting peaks (HCB, β -HCH, lindane, fonofos and endosulfan ether) and D_8 p,p'-DDE for the late eluting peaks (chlorpyrifos, α -endosulfan, p,p'-DDE, p,p'-DDD, ethion and p,p'-DDT). Coefficients of variation obtained in this way were too high (>20% in most cases at all fortification levels assayed) as matrix effect correction was inadequate. After several experiments, we proved that the best option was the use of $^{13}\text{C}_6$ HCB for only HCB and D_8 p,p'-DDE for the rest of pesticides.

Linearity of the method was tested on blood samples spiked at a range of 1-50 ng ml^{-1} using five concentration levels (1, 5, 10, 25 and 50 ng ml^{-1} , except for HCB, 0.5, 2.5, 5, 12.5 and 25 ng ml^{-1}) and analyzing each level by triplicate. A best fit of the experimental points was obtained when using second-order calibration curves with r^2 higher than 0.99 for all compounds in the whole range tested.

The precision and accuracy of the procedure were obtained by analysis of six spiked blood replicate samples at three concentration levels (1, 5 and 25 ng ml^{-1}) (**Table IV**). Most of calculated concentrations fell in the range of 90 to 120% of the spiking concentrations, with a few exceptions. In the case of fonofos values obtained were above 120% at the three spiking levels assayed; chlorpyrifos also showed high values, especially at 5 ng ml^{-1} (143%). This problem could have possibly been corrected using more adequate labelled internal standards (ideally fonofos and chlorpyrifos labelled standard). Ethion showed the worse accuracy when quantitation was carried out using calibration curves, being the calculated concentrations lower than the spiking values (74%) at 5 ng ml^{-1} spiking level. Precision, expressed as coefficients of variation, was in general better than 20% and near this value for most of the compounds at the lowest concentration level assayed (1 ng ml^{-1}). The worst values were obtained for lindane and p,p'-DDT, in the last compound probably due to that fortification level was close to the LOD. These coefficients of variation are quite similar to those reported for determining dinitroaniline herbicides (0.1-10 ng ml^{-1}) in blood and urine samples by SPME

(around 14%) [17], and are in the usual range of precision for SPME procedures when applied to the determination of pesticides in complex matrix samples [22, 25].

Between-day precision (n=9) was also studied by analyzing three replicates of blood samples spiked at two concentration levels (1 and 25 ng ml⁻¹) on three different days covering a total period of 5 days. Coefficients of variation were below 30% at both levels.

The limits of detection (LOD) were estimated from chromatograms (using extracted ion chromatogram) corresponding to blood samples spiked at the lowest level and calculated as the peaks having a signal-to-noise ratio of 3 (**Figure 3**). As it can be seen in **Table IV**, experimental LOD were in the range of 0.02-0.7 ng ml⁻¹, except for p,p'-DDT (3 ng ml⁻¹). Due to the presence of HCB and p,p'-DDE in all samples analysed, the "blank" included, LOD for these compounds were estimated from the chromatograms corresponding to the measured sample with the lowest concentration (sample 15: HCB 0.7 ng ml⁻¹ and p,p'-DDE 0.4 ng ml⁻¹). LOD for HCB and p,p'-DDE were found to be 0.1 ng ml⁻¹ and 0.02 ng ml⁻¹, respectively.

These LOD were similar or better than other found in the literature. Thus, Röhrig et al. [13] also used HS-SPME for the determination of OC pesticides in human blood reaching LOD of 0.15 ng ml⁻¹ for lindane, 0.25 ng ml⁻¹ for p,p'-DDD and 1.59 ng ml⁻¹ for p,p'-DDT; for β-HCH, HCB and p,p'-DDE their LOD were lightly higher than those obtained in this paper (0.9, 0.76 and 0.08 ng ml⁻¹, respectively, compared to 0.1, 0.1 and 0.02 ng ml⁻¹). In the same way, using the same chromatographic detection technique (GC-MSMS) and solvent extraction (with 2 cleanup steps) for the determination of endosulfan in serum, LOD were very similar (endosulfan-ether 0.05 ng ml⁻¹ and α-endosulfan 0.3 ng ml⁻¹) [26]. Other authors found much higher LOD (25-30 ng ml⁻¹) for the determination of OC pesticides in human plasma by means of LLE with a Florisil cleanup step [27].

Table IV. Accuracy and precision ($n=6$) for the overall HS-SPME and GC-MS/MS procedure for the determination of pesticides in spiked blood samples. Limits of detection (ng ml^{-1}).

	Spiking level ^a 25 ng ml^{-1}		Spiking level ^b 5 ng ml^{-1}		Spiking level ^c 1 ng ml^{-1}		L.O.D. (ng ml^{-1})
	Mean concentration (ng ml^{-1})	C.V. (%)	Mean concentration (ng ml^{-1})	C.V. (%)	Mean concentration (ng ml^{-1})	C.V. (%)	
HCB	13.4	11	2.4	10	2.4	21	0.1
β -HCH	25.0	17	5.4	13	5.4	20	0.1
lindane	23.5	20	6.1	22	6.1	35	0.2
fonofos	30.8	10	6.5	14	6.5	16	0.4
endosulfan ether	27.0	8	5.3	5	5.3	8	0.1
chlorpyrifos	28.0	18	7.2	17	7.2	14	0.2
α -endosulfan	28.8	8	5.2	13	5.2	9	0.5
p,p'-DDE	29.8	7	5.7	20	5.7	18	0.02
p,p'-DDD	28.8	11	5.4	19	5.4	22	0.4
ethion	25.5	8	3.7	15	3.7	22	0.7
p,p'-DDT	31.3	20	5.2	41	5.2	–	3

^a 12.5 ng ml^{-1} for HCB

^b 2.5 ng ml^{-1} for HCB

^c 0.5 ng ml^{-1} for HCB

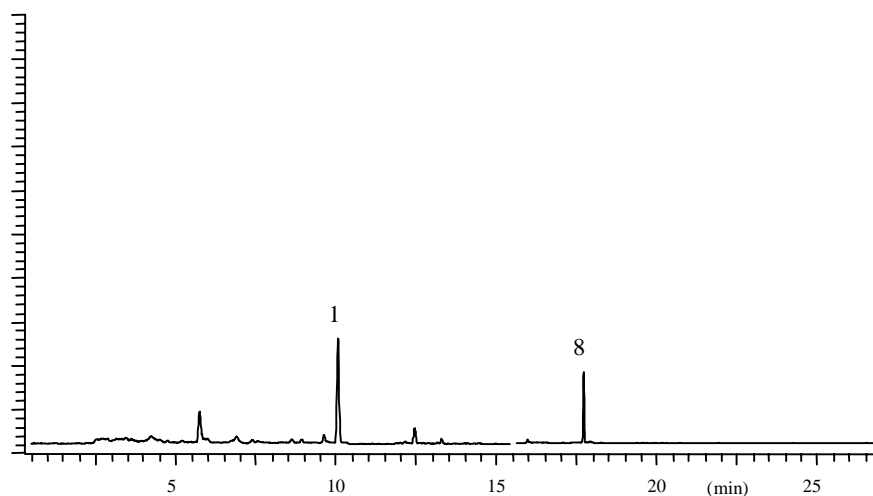


Figure 2. Extracted ion GC-MS/MS chromatogram obtained after HS-SPME of a “blank” of blood sample. 1- HCB, 8- *p,p'*-DDE. (See Table III for *m/z* used).

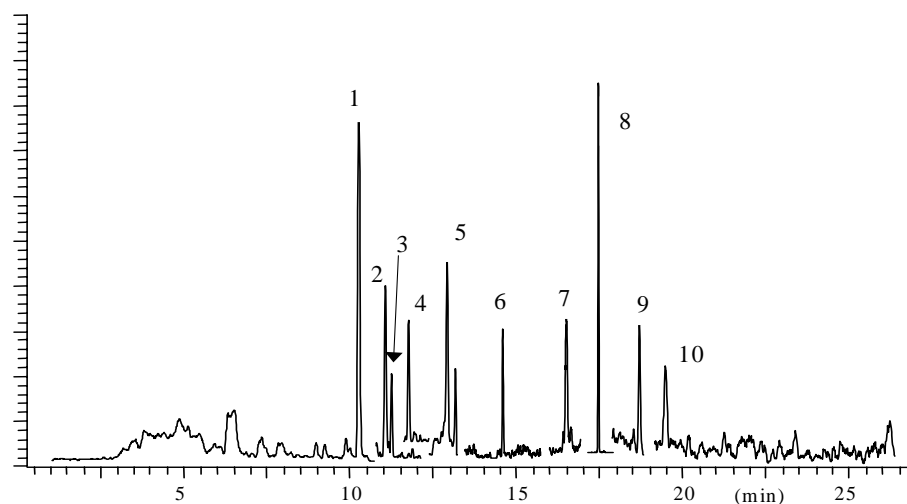


Figure 3. Extracted ion GC-MS/MS chromatogram obtained after HS-SPME of a blood sample spiked with OC and OP pesticides at 1 ng mL^{-1} . 1- HCB, 2- β -HCH, 3- lindane, 4- endosulfan ether, 5- fonofos, 6- chlorpyrifos, 7- α -endosulfan, 8-*p,p'*-DDE, 9- *p,p'*-DDD, 10- ethion. (See Table III for *m/z* used).

3.4. Application to real blood and serum samples

The multiresidual procedure developed in this paper was applied to two groups of samples: 17 samples collected from growers of the Valencia province (Spain) and 5 samples from pesticide applicators from the Castellon province (Spain) engaged in citric production. Due to the limited volume of sample available, only one replicate of each sample could be analyzed. **Tables V** and **VI** show the results obtained.

HCB (ranging between 0.7-4.3 ng ml⁻¹) and p,p'-DDE (0.4-74 ng ml⁻¹) were detected in all the blood samples, showing a parallel behaviour because higher concentration of HCB corresponded usually to samples containing also high levels of p,p'-DDE. Significant are the samples numbered as 11, 12 and 14 which contained the highest concentrations of HCB (around 4 ng ml⁻¹) and also of p,p'-DDE (48, 74 and 66 ng ml⁻¹). Among all the 22 samples analyzed, it can be emphasized the number 12, which was by far the most contaminated, with the highest concentration of p,p'-DDE, HCB and β-HCH. Additionally, it was the only blood sample where we detected p,p'-DDT and p,p'-DDD. β-HCH was detected in seven samples at concentrations always around 1 ng ml⁻¹.

As depicted in Table V two samples contained p,p'-DDE at concentrations above of the method (50 ng ml⁻¹). In these cases, we estimated their concentrations in around 66 and 74 ng ml⁻¹, as the calibration curve was tested up to 100 ng ml⁻¹ actually, although linearity was only established up to 50 ng ml⁻¹.

These findings are in agreement with different monitoring surveys performed in human population, where OC pesticides as HCB, p,p'-DDT and metabolites and HCHs are frequently detected in blood (serum) or adipose tissues. In a previous work [28], we also detected HCB, p,p'-DDT, and p,p'-DDE in human serum samples.

The organophosphorus insecticide chlorpyrifos (widely used nowadays in citric crops of the Mediterranean region) was detected in 4 samples, in all cases at concentration levels below or around the limit of detection of the procedure (0.2 ng ml⁻¹). The presence of chlorpyrifos in blood should be due to a recent exposition of

growers to this compound because it is rapidly metabolized in humans being excreted mainly as the metabolite 3,5,7-trichloro-6-pyridinol in urine.

As an example, **Figure 4** shows the extracted ion GC-MS/MS chromatogram corresponding to the blood sample 12.

In a previous paper [28], we developed a procedure for the determination of OC and OP pesticides in human serum using HS-SPME followed by GC-MS. In the present work, we have used the optimized GC-MS/MS detection but maintaining the same extraction conditions originally established [28] (1 ml serum + 50 μ l 9 M H₂SO₄ + 2 ml distilled water; HS extraction for 30 min at 90°C of stirred samples with PDMS fiber). This new procedure was checked for linearity range, which was tested over a range of 1-25 ng ml⁻¹ in serum sample (0.2-12.5 ng ml⁻¹ for HCB). The best fitting of the experimental points corresponded to second-order calibration curves with r² higher than 0.99 for all compounds in the whole range tested. Limits of detection were also calculated from the GC-MS/MS (extracted ion) chromatograms of serum samples spiked at the lowest level (1 ng ml⁻¹). Experimental LOD were in the range of 0.03-0.3 ng ml⁻¹ (1 ng ml⁻¹ for β -HCH and 1.6 ng ml⁻¹ for α -endosulfan). In this way, LOD obtained with MS/MS detection were more satisfactory than those of MS for most of compounds. For example, the LOD for lindane and p,p'-DDT using MS detection were found to be 1 and 5 ng ml⁻¹, respectively, while for MS/MS detection the LOD was 0.2 ng ml⁻¹ for both compounds.

This multiresidual procedure was applied to serum samples from the five pesticide applicators whose whole blood had been analysed before. Results obtained are in agreement with those of whole blood (Table VI), although concentration levels in serum were always higher than in blood by a factor ranging from 1.3 to 2.1. This increase in the values could be due to the volume concentration that takes place to separate serum from whole blood or to the different distribution of organic compounds in blood compartments.

Figure 5 shows the extracted ion GC-MS/MS chromatogram corresponding to the serum sample 18.

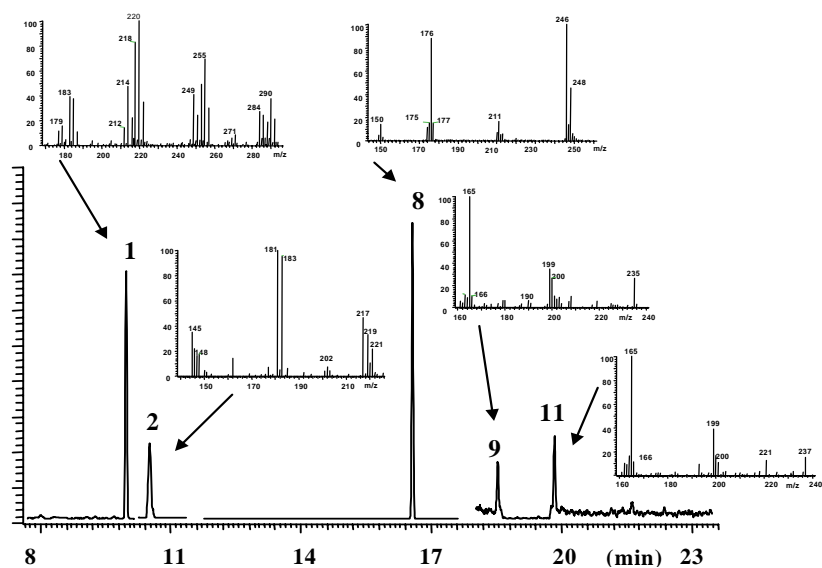


Figure 4. Extracted ion GC-MS/MS chromatogram of the blood sample 12. 1- HCB, 2- β -HCH, 8- p,p' -DDE, 9- p,p' -DDD, 11- p,p' -DDT. (See Table III for m/z used).

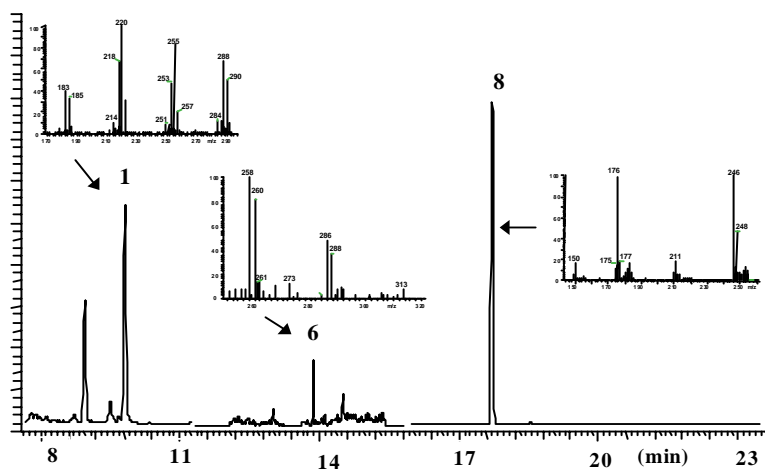


Figure 5. Extracted ion GC-MS/MS chromatogram of the serum sample 18. 1- HCB, 6- chlorpyrifos, 8- p,p' -DDE. (See Table III for m/z used).

Table V. Concentrations (ng mL^{-1}) of pesticides detected in human blood from a group of 17 growers from Valencia.

	Sample number																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
HCB	2.2	1.2	2.1	2.4	1.9	2.8	1.7	1.1	1.1	1.0	3.8	4.3	1.7	4.1	0.7	2.0	0.8
β -HCH	1.4	–	–	–	–	1.5	–	–	–	–	1.7	1.8	1.1	1.2	–	–	1.4
chlorpyrifos	–	–	–	–	d ^a	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	d
p,p'-DDE	12	3.0	6.2	9.3	2.2	2.8	5.3	27	14	21	48	74*	22	66*	0.4	8.1	8.8
p,p'-DDD	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.8	–	–	–	–	–
p,p'-DDT	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5.0	–	–	–	–	–

^a d: detected

* estimated value

Table VI. Concentrations (ng mL^{-1}) of pesticides detected in human blood and serum from a group of five pesticide applicators (citric crops) from Castellon

	Sample number									
	18		19		20		21		22	
	blood	serum	blood	serum	blood	serum	blood	serum	blood	serum
HCB	2.5	3.4	2.8	4.8	2.2	3.5	1.8	2.5	1.8	2.6
chlorpyrifos	d ^a	0.7	0.4	0.6	–	–	–	–	–	–
p,p'-DDE	8.7	13	13	27	3.1	4.8	8.1	16	5.6	7.0

^a

d:

detected

4. Conclusions

The SPME multiresidue procedure developed in this paper allows an important reduction in sample treatment compared with other conventional techniques as liquid-liquid and solid-phase extraction. Although SPME is usually applied in the direct immersion mode, the complexity of blood sample matrix forced us to carry out extraction in the HS mode. Thus, the use of calibration curves prepared with spiked blank blood provides accurate results for quantitation, also being required to use isotopically labelled surrogate/internal standards to correct the matrix effect. Moreover, the application of GC-MS/MS provides a satisfactory sensitivity and selectivity avoiding most of the interferences from this type of complex biological matrix.

The overall SPME-GC-MS/MS procedure allowed us to determine several OC and OP pesticides simultaneously in whole blood leading to low detection limits for most of the pesticides studied (0.02-0.7 ng ml⁻¹). The method can be suitable for detecting pesticides of different physico-chemical characteristics in exposed and non-exposed population and can be widened to the analysis of serum samples.

The developed procedure has been applied to a number of blood and serum samples where several OC pesticides were detected.

Acknowledgements

This work forms a part of the projects entitled “*Nuevas estrategias en la determinación de residuos de plaguicidas y de metabolitos en fluidos biológicos. Simplificación de la etapa de preparación de muestra*” and “*Simplificación de la etapa de preparación de muestra en la determinación de residuos de pesticidas mediante SPME*” developed with the financial support of Fundació Caixa Castelló.

The authors thank to María José Saez and Carmen Armelles from the *Gabinete de Seguridad e Higiene en el Trabajo de la Conselleria de Trabajo de la Generalitat Valenciana* for providing human blood samples.

References

- [1] D.B. Barr, J.R. Barr, W.J. Driskell, R.H. Hill, D.L. Ashley, L.L. Needham, S.L. Head and E.J. Sampson, *Toxicology and Industrial Health*, 15 (1999) 168.
- [2] U.D. Gill, H.M. Schwartz and B. Wheatley, *Chemosphere*, 32 (1996) 1055.
- [3] S.M. Waliszewski and G.A. Szymcaynski, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 46 (1991) 803.
- [4] K. Janak, E. Jensen and G. Becher, *J. Chromatogr. B*, 734 (1999) 219.
- [5] V.K.Dua, C.S. Pant, V.P. Sharma and G.K. Pathak, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56 (1996) 50.
- [6] F. Jitunari, F. Asakawa, N. Takeda, S. Suna and Y. Manabe, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 54 (1995) 855.
- [7] R.P. Belardi and J. Pawliszyn, *Water Pollut. Res. J. Canada*, 24 (1989)179.
- [8] C.L. Arthur and J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2145.
- [9] C.L. Arthur, L.M. Killam, K.D. Buchholz, J. Pawliszyn and J.R. Berg, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1960.
- [10] K. Takekawa, M. Oya, A. Kido and O. Suzuki, *Chromatographia*, 47 (1998) 209.
- [11] X.P. Lee, T. Kumazawa, K. Sato, H. Seno, A. Ishii and O. Suzuki, *Chromatographia*, 47 (1998) 593.
- [12] A. Namera, M. Yashiki, J. Liu, K. Okajima, K. Hara, T. Imamura and T. Kojima, *Forensic Sci. Int.*, 109 (2000) 215.
- [13] L. Röhrig, M. Püttmann and H.U. Meisch, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 361 (1998) 192.
- [14] X.P. Lee, T. Kumazawa, K. Sato and O. Suzuki, *Chromatographia*, 42 (1996) 135.

- [15] A. Namera, M. Yashiki, N. Nagasawa, Y. Iwasaki and T. Kojima, *Forensic Sci. Int.*, 88 (1997) 125.
- [16] F. Musshoff, H. Junker and B. Madea, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37 (1999) 639.
- [17] F. Guan, K. Watanabe, A. Ishii, H. Seno, T. Kumazawa, H. Hattori and O. Suzuki, *J. Chromatogr. B*, 714 (1998) 205.
- [18] F.J. Arrebola, J.L. Martínez Vidal, A. Fernández Gutiérrez and M.H. Akhtar, *Anal. Chim. Acta.*, 401 (1999) 45.
- [19] D.K. Rohrbaugh and E.W. Sarver, *J. Chromatogr. A*, 809 (1998) 141.
- [20] R.H. Hill, D.S. Shealy, S.L. Head, C.C. Williams, S.L. Bailey, M. Gregg, S.E. Baker and L.L. Needham, *J. Anal. Toxicol.*, 19 (1995) 323.
- [21] M.D. Beeson, W.J. Driskell and D.B. Barr, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 3526.
- [22] S. Ulrich, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 167.
- [23] J. Beltran, F.J. López, O. Cepriá and F. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 808 (1998) 257.
- [24] C.D.S. Tomlin, *The Pesticide Manual*, 11th Ed., British Crop Protection Council, 1997.
- [25] J. Beltran, F.J. López and F. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 389.
- [26] J.L. Martínez Vidal, M. Moreno Frías, A. Garrido Frenich, F. Olea Serrano and N. Olea, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14 (2000) 939.
- [27] A.K. Singh and D. Spassova, T. White, *J. Chromatogr. B*, 706 (1998) 231.
- [28] J. Beltran, E. Pitarch, S. Egea, F.J. Lopez and F. Hernández, *Cromatographia*, (in press).

4.2.6. Análisis de suero mediante SPME en modo de espacio de cabeza

La aplicación de la técnica HS-SPME a muestras de suero se realizó separadamente para los plaguicidas OC y OPs mediante GC con detector de espectrometría de masas. Los plaguicidas seleccionados fueron los mismos investigados en el apartado 4.2.5.4, aunque se adicionó el OC, α -HCH, y los OPs, *paration-metil* y *fenitrothion*.

4.2.6.1. Optimización del método cromatográfico GC-MS

De modo análogo a la optimización de GC-MS/MS, el estudio cromatográfico por GC-MS se llevó a cabo con patrones de plaguicidas en n-hexano, utilizando la detección en modo *selected ion monitoring* (SIM). El primer paso para la creación del método fue la obtención de los espectros de masas para cada compuesto mediante experiencias de inyección en modo *full scan*, y seguidamente seleccionando aquel o aquellos iones, incluyendo el pico base, más característicos de cada analito. Las **Figuras 4.26 y 4.27** muestran los espectros de masas para cada plaguicida estudiado.

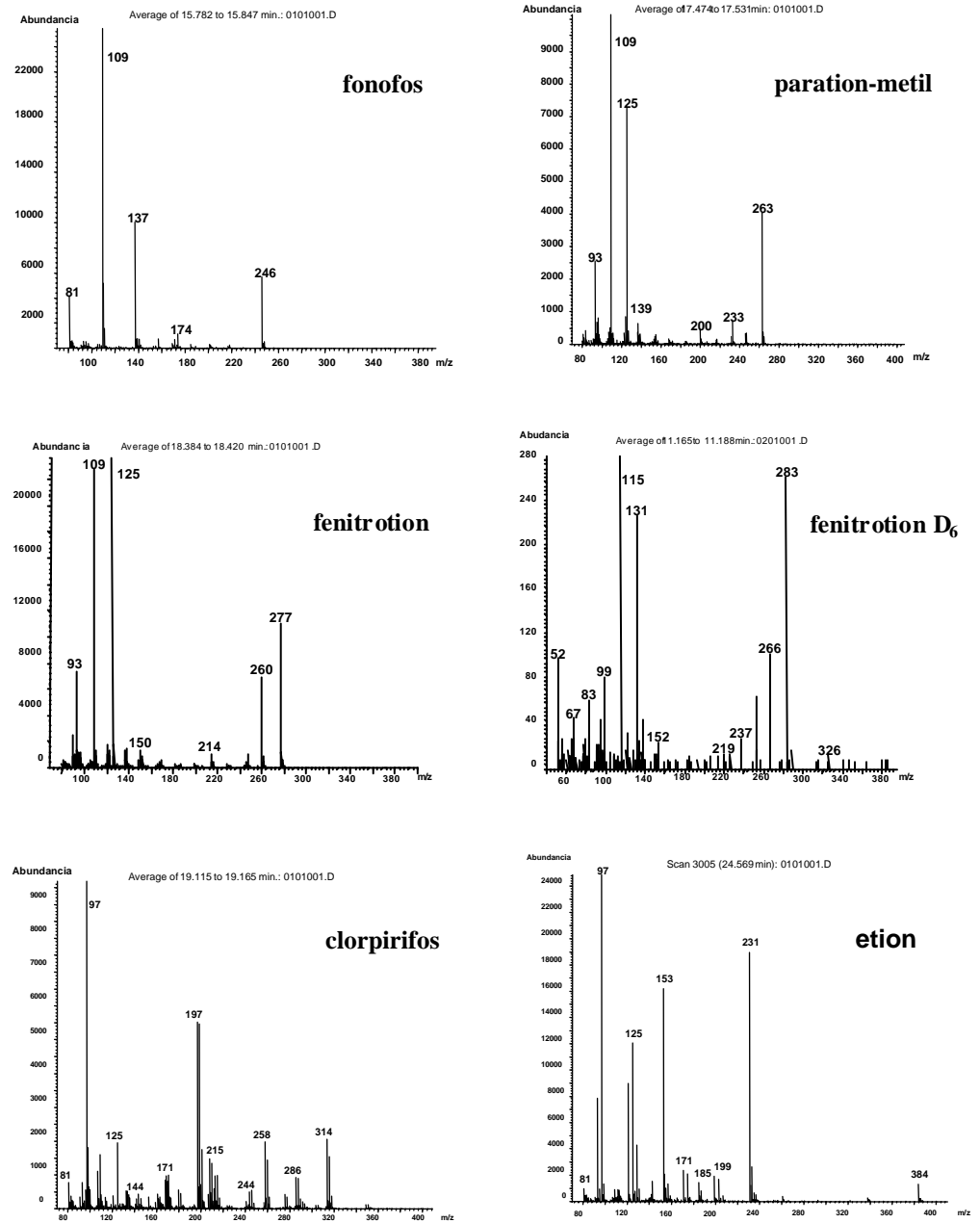


Figura 4.26. Espectros de masas correspondientes a los plaguicidas OPs estudiados.

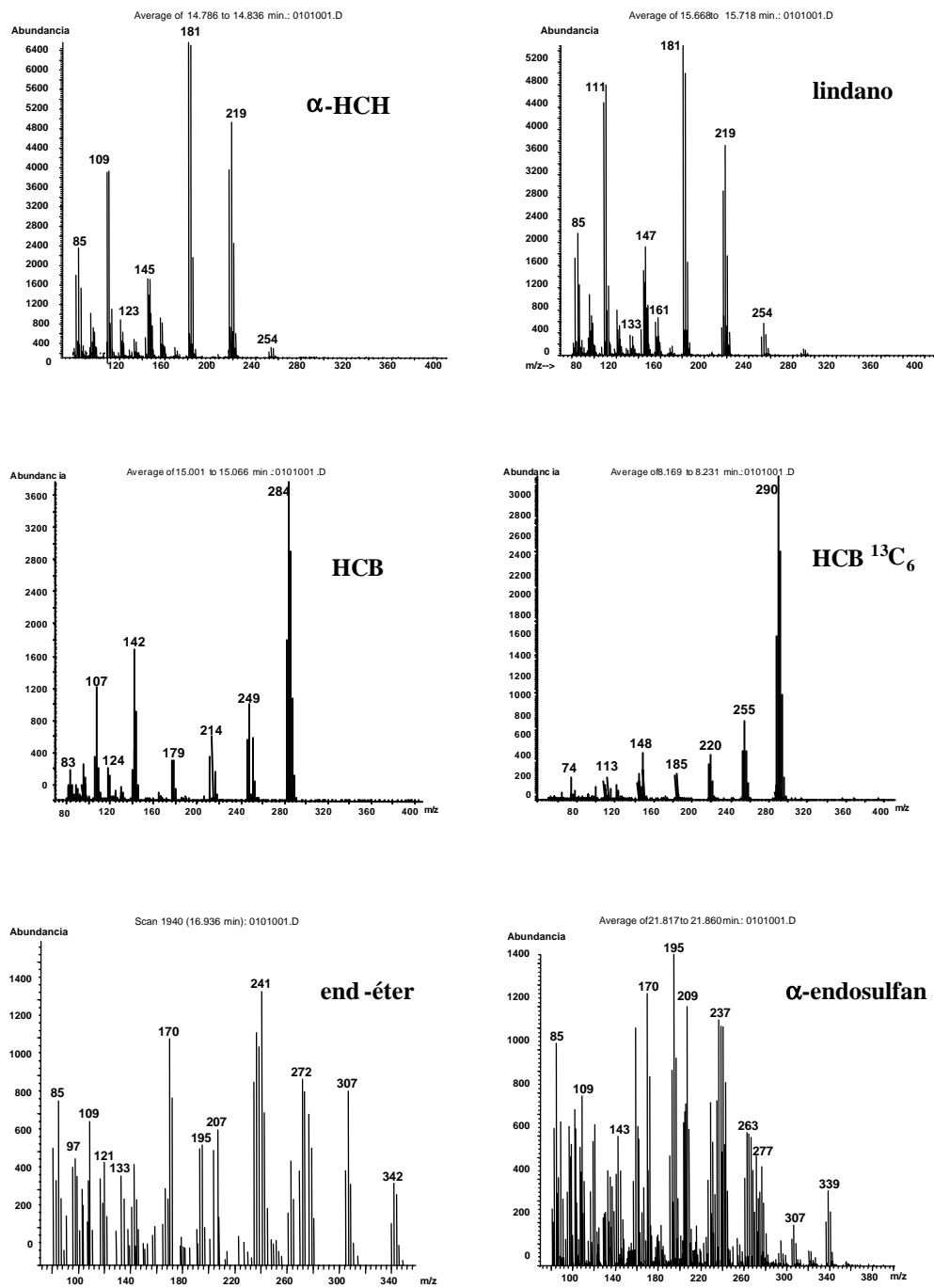


Figura 4.27. Espectros de masas correspondientes a los plaguicidas OCs estudiados.

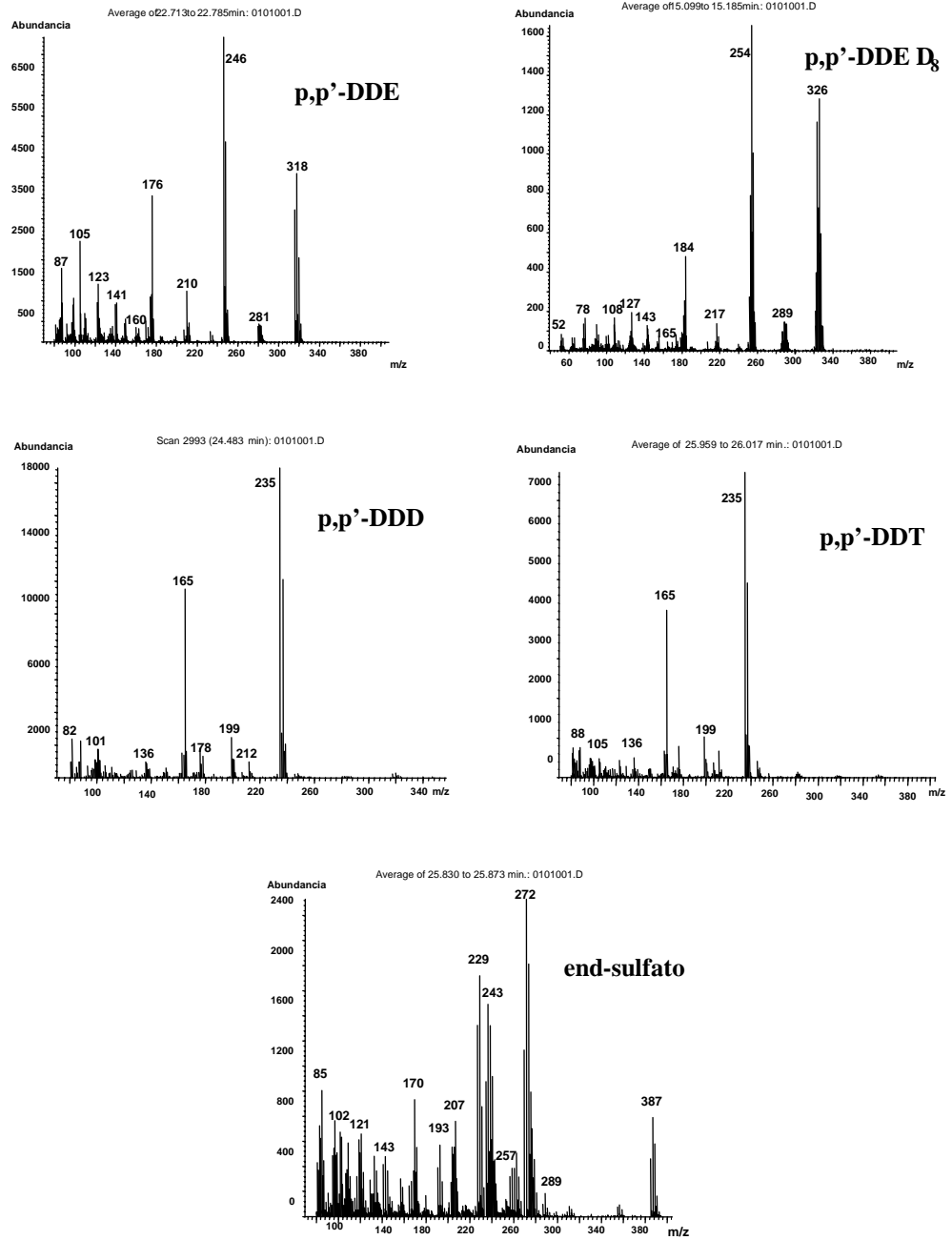


Figura 4.27 (cont.). Espectros de masas correspondientes a los plaguicidas OCs estudiados.

4.2.6.2. *Determinación de plaguicidas organoclorados y organofosforados en muestras de suero*

El objetivo de investigar esta última etapa de análisis de muestras de suero fue principalmente, la mejora en cuanto a sensibilidad y selectividad con respecto al procedimiento optimizado en el apartado 4.2.3 en el que se usaba SPME por inmersión directa.

Después de varias experiencias insatisfactorias por inmersión directa con la fibra PDMS, en las que se intentó mejorar la sensibilidad del método usando menores factores de dilución (entre 1/12 y 1/3) o añadiendo agentes desproteinizantes (H_2SO_4 , TCA, metanol), se optó por aplicar la técnica de espacio de cabeza (HS-SPME). Como condiciones iniciales, se seleccionaron la fibra PDMS (ya usada con éxito en el método de inmersión directa), una temperatura de 90°C y una dilución del suero 1/3. Con esta dilución, menor a la usada en inmersión directa (1/50), se pretendía mejorar la sensibilidad del método, pues en este caso la fibra debía presentar a priori menos problemas al no introducirse directamente en una muestra compleja como el suero.

Se estudió el efecto del agente desproteinizante para la determinación de OCs en muestras de suero mediante HS-SPME. La **Figura 4.28** muestra el efecto de la adición de $50\ \mu\text{l}$ H_2SO_4 9M, $50\ \mu\text{l}$ TCA o $500\ \mu\text{l}$ metanol a 1 ml de suero fortificado a $50\ \text{ng ml}^{-1}$ y posteriormente diluido con 2 ml de agua nanopure. Como puede observarse, el metanol no generó ningún incremento de las respuestas de los analitos. Los mejores resultados se obtuvieron con la adición de $50\ \mu\text{l}$ H_2SO_4 9M a la muestra, y por consiguiente éste fue seleccionado como agente desproteinizante del suero para el método HS-SPME.

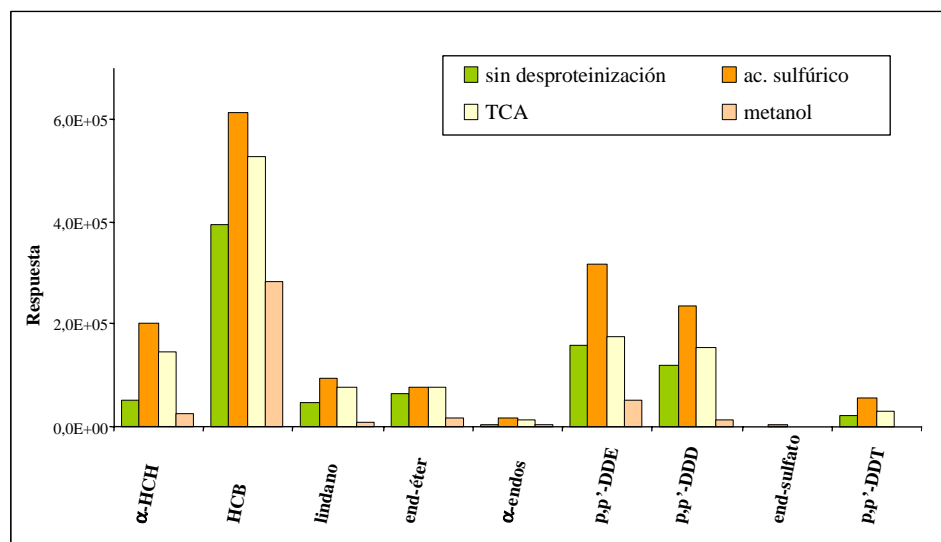


Figura 4.28. Áreas correspondientes a los plaguicidas OCs en suero tras la extracción por HS-SPME, en función del agente desproteínizante.

Finalmente, se seleccionó un procedimiento común de extracción de plaguicidas OCs y OPs en muestras de suero mediante HS-SPME y detección GC-MS. A 1 ml de suero se le añadió 50 µl H₂SO₄ 9M, y después de 1 min de agitación se adicionó 2 ml de agua nanopure. El vial conteniendo la muestra fue pre-calentado a 90°C durante 30 min, y seguidamente extraído durante 30 min con la fibra de PDMS. Finalmente, la desorción de la fibra se llevó a cabo en el puerto de inyección del GC a una temperatura de 250°C durante 5 min.

La validación del método desarrollado se llevó a cabo evaluando los siguientes parámetros (ver resultados en el artículo adjunto, sección 4.2.6.3):

Linealidad- las curvas de calibración fueron obtenidas a partir 6 niveles de concentración con tres réplicas, usando patrones en matriz y áreas relativas a patrones internos marcados isotópicamente HCB ¹³C₆ (para α-HCH, HCB, lindano y endosulfan éter) p,p'-DDE D₈ (α-endosulfan, p,p'-DDE, p,p'-DDD, endosulfan

sulfato y *p,p'*-DDT) y fenitrotion D₆ (para los OPs). En el caso de los plaguicidas OCs, el rango de concentración estudiado fue entre 1-100 ng ml⁻¹ (excepto para HCB 0.5-50 ng ml⁻¹), y para los plaguicidas OPs, 2.5-250 ng ml⁻¹ para *paration-metil* y *fenitrotion*, y 0.5-50 ng ml⁻¹ para el resto. Como puede observarse en las **Figuras 4.29** y **4.30**, se usaron curvas de calibración de segundo orden, ya que permitieron un mejor ajuste de los puntos y la obtención de valores de r² superiores a 0.99.

Exactitud- estudiada mediante ensayos de recuperación (n=6) analizando muestras de suero fortificado a tres niveles de concentración (0.5, 5 y 25 ng ml⁻¹ para HCB; 1, 10 y 50 ng ml⁻¹ para el resto de OCs; 5, 25 y 125 ng ml⁻¹ para *paration-metil* y *fenitrotion*; 1, 5 y 25 ng ml⁻¹ para el resto de OPs).

Precisión intra-día- determinada como la repetibilidad en un mismo día (n=6) de las recuperaciones a los tres niveles de fortificación ensayados.

Precisión inter-día- determinada como la reproducibilidad en tres días diferentes (n=9) de las recuperaciones a los tres niveles de fortificación ensayados.

Límites de detección (LD)- obtenidos cuando la señal fue 3 veces el ruido de fondo en el cromatograma correspondiente al nivel más bajo de concentración para el analito.

El procedimiento optimizado se aplicó a muestras reales de sueros de trabajadores agrícolas de la producción de cítricos en la provincia de Castellón, siendo HCB (0.4-6.5 ng ml⁻¹), *p,p'*-DDE (1.6-29 ng ml⁻¹) y *clorpirifos* (0.6-2.8 ng ml⁻¹) los compuestos detectados con mayor frecuencia. Para más detalles se puede consultar el artículo científico del apartado 4.2.6.3.

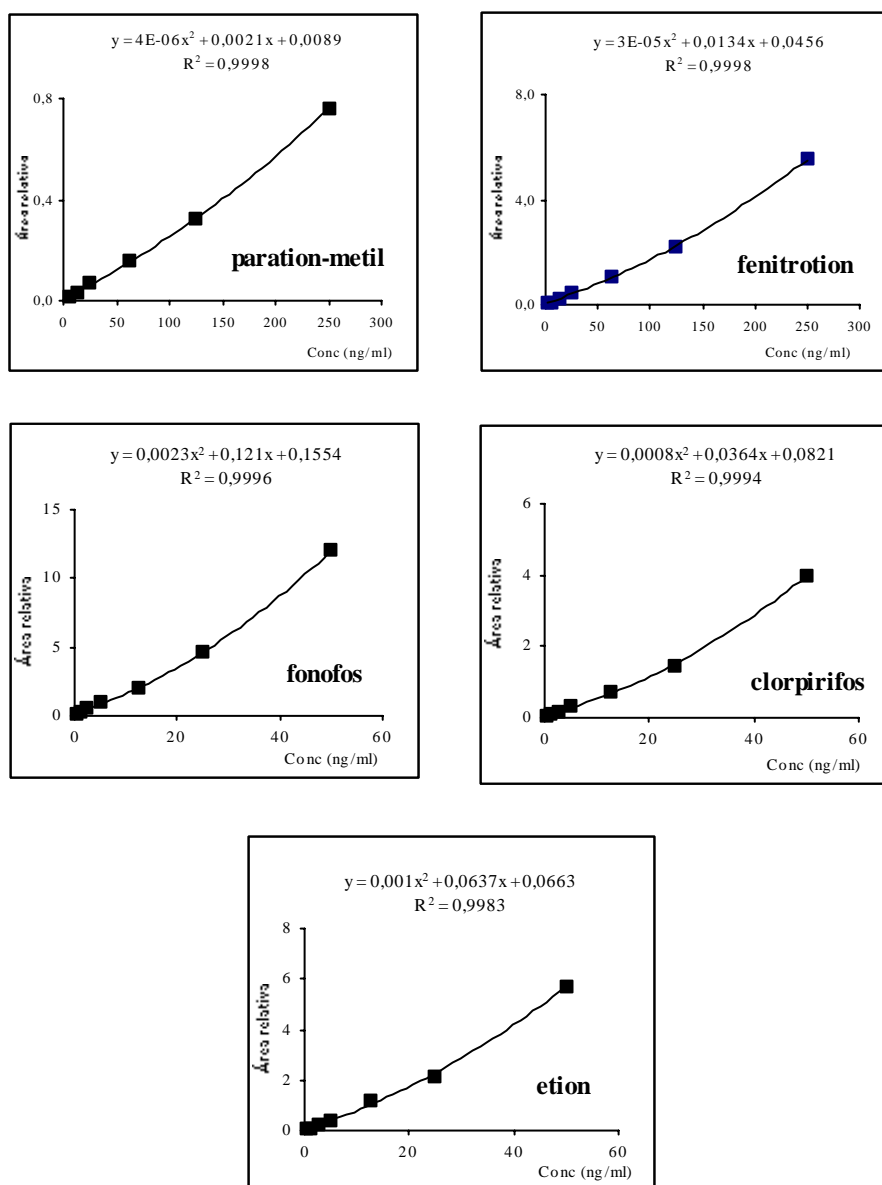


Figura 4.29. Curvas de calibrado correspondientes a la extracción por HS-SPME de disoluciones patrón de plaguicidas OPs preparadas en suero y usando patrón interno (fenitroton D₆).

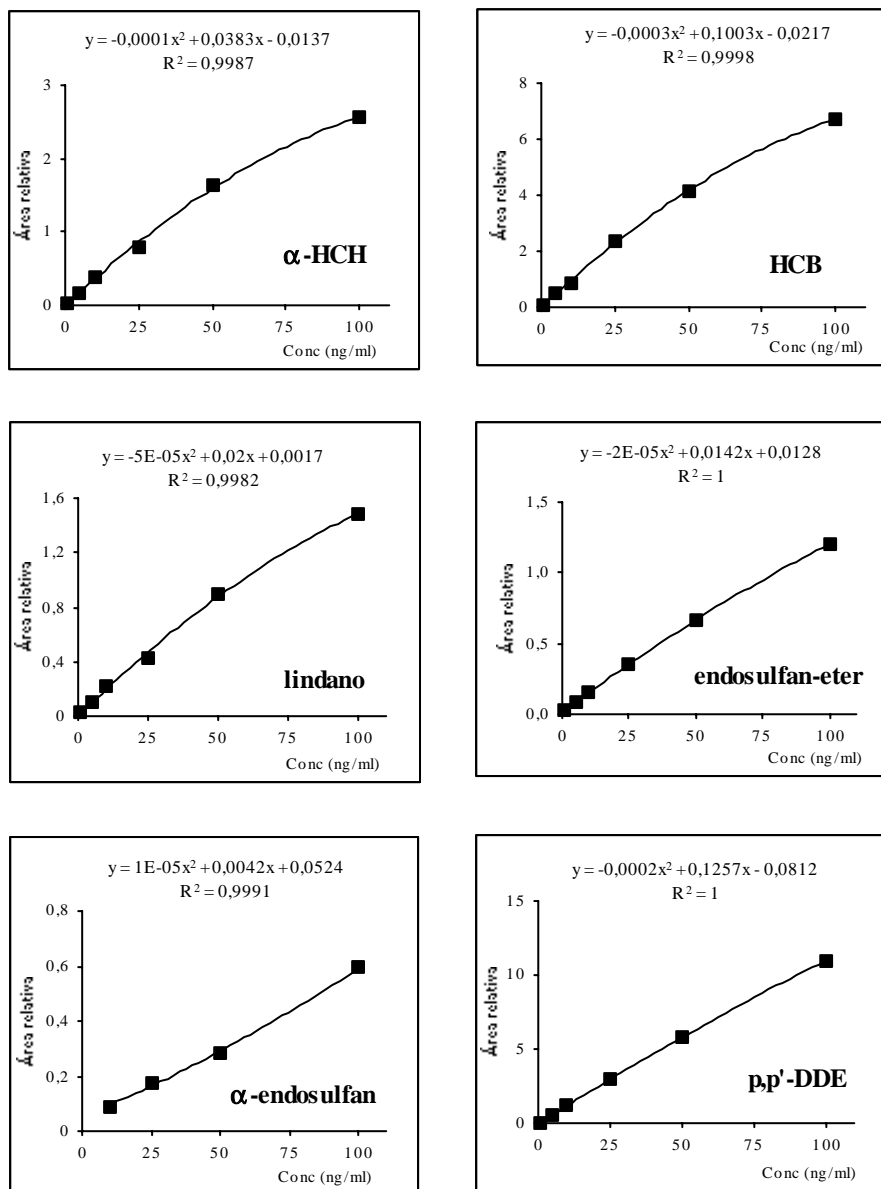


Figura 4.30. Curvas de calibrado correspondientes a la extracción por HS-SPME de disoluciones patrón de plaguicidas OCs preparadas en suero y usando patrones internos HCB ¹³C₆ (para α-HCH, HCB, lindano y endosulfan éter) y p,p'-DDE D₈ (para α-endosulfan, p,p'-DDE, p,p'-DDD, endosulfan sulfato y p,p'-DDT).

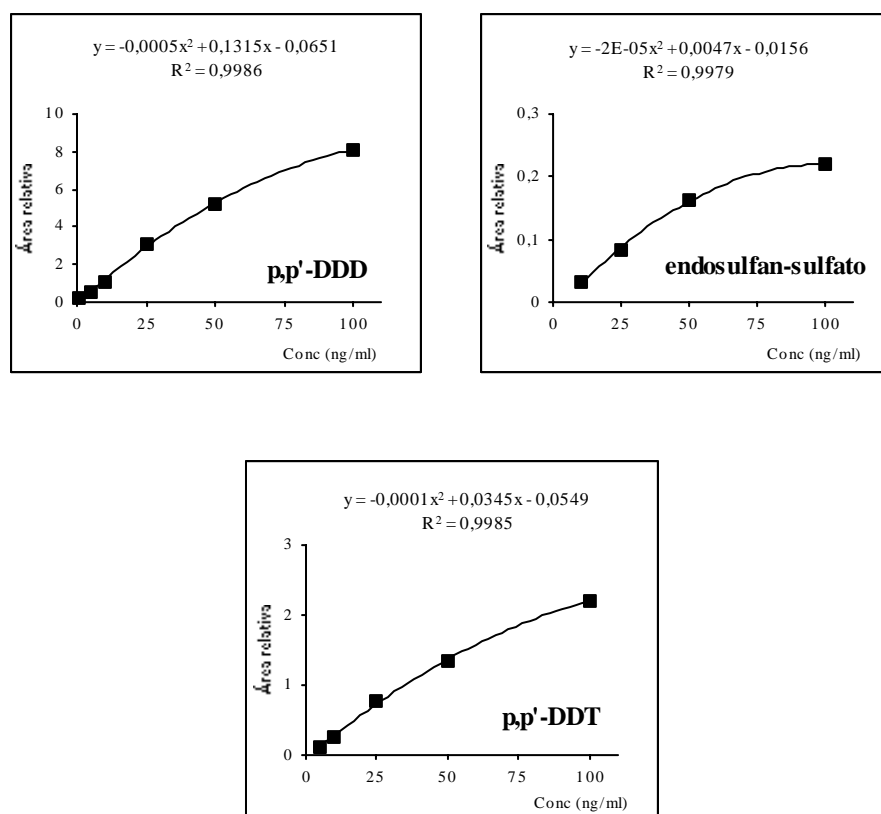


Figura 4.30 (cont.). Curvas de calibrado correspondientes a la extracción por HS-SPME de disoluciones patrón de plaguicidas OCs preparadas en suero y usando patrones internos HCB ¹³C₆ (para α-HCH, HCB, lindano y endosulfan éter) y p,p'-DDE D₈ (para α-endosulfan, p,p'-DDE, p,p'-DDD, endosulfan sulfato y p,p'-DDT).

4.2.6.3. Artículo científico 4: Chromatographia (en prensa)**GAS CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF SELECTED PESTICIDES IN HUMAN SERUM BY HEAD-SPACE SOLID PHASE MICROEXTRACTION**

J. Beltran / E. Pitarch / S. Egea / F.J. López / F. Hernández*

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Dept., University Jaume I, P.O. Box 8029, E12080, Castellón, Spain

Key words

Gas chromatography

Solid phase microextraction

Serum analysis

Pesticides

Summary

A simple and rapid method for the simultaneous determination of nine organochlorine (α -HCH, hexachlorobenzene, lindane, endosulfan ether, α -endosulfan, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, endosulfan sulfate and *p,p'*-DDT) and five organophosphorus pesticides (fonofos, parathion methyl, fenitrothion, chlorpyrifos and ethion) in human serum samples was developed using the head-space solid phase microextraction technique followed by gas chromatography/mass spectrometry. 1 mL aliquot of serum sample, adding 50 μ L of H₂SO₄ 9 M, 2 mL water and 50 μ L of surrogate/internal standard solution (*p,p'*-DDE D₈, hexachlorobenzene-¹³C₆ and fenitrothion D₆) was head space SPME sampled at 90°C for 30 min. Quantitation was carried out by means of calibration curves

prepared in serum, using areas relative to surrogates. Precision was found to be better than 20% at the 3 concentration levels assayed in the range of ng mL^{-1} . The detection limits were in the range of 0.1 to 6 ng mL^{-1} for all compounds.

Finally, the optimized procedure was applied to serum samples obtained from agricultural workers, allowing us to detect some pesticides. Hexachlorobenzene, *p,p'*-DDE and chlorpyrifos were the most frequently found in the samples analyzed.

Introduction

Exposure to hazardous pesticides is of great concern for the general population, because of the widespread use of the compounds in agriculture, human public health, home gardening and industry purposes. The best way to measure human exposure to pesticides is to measure them (or their metabolites) directly in biological fluids (biological monitoring). This requires the development of accurate analytical procedures for the determination of pesticides and/or metabolites at the low levels found in this type of samples. Indirect determination of exposure to organophosphorus (OP) and carbamate insecticides is sometimes monitored by measuring the inhibition of blood cholinesterase activity.

Solid phase extraction (SPE), typically using C_{18} cartridges, has been used to determine organochlorine (OC) and OP pesticides in blood and serum samples [1-5]. The complexity of these matrices usually necessitates the development of procedures which include one or more clean-up steps to remove interferences and, consequently, to improve detection limits and the accuracy of the determinations. Different clean up techniques of different complexity have been reported, especially for the determination of OC compounds. Thus, treatment with sulfuric acid has been widely used [6-10] for sample clean up, as has SPE [3, 11-13].

Solid phase microextraction (SPME), a relatively new extraction technique developed by Pawliszyn and co-workers [14, 15], has been used as a solvent-free alternative to conventional liquid-liquid extraction and SPE procedures. Although SPME is usually better suited to the analysis of water samples, it has also been used

to extract biological samples (urine, serum and blood), soil and other complex matrices, because its use enables reduction of sample manipulation, and even the elimination of clean-up steps [16-18]. The literature contains a few reports of direct immersion (DI) SPME for analysis of biological fluids – the determination of drugs in urine [19, 20], plasma [21, 22], and blood [20]. Despite its limited application for non-volatile analytes, to avoid interferences from the sample matrix the headspace approach has been preferred to direct immersion of the fiber into the sample. The direct headspace analysis of organochlorine pesticides in serum samples, as part of an intercomparison program, has been reported in the literature [23]. Several applications of head space SPME have been reported for the determination of OC [24] and OP [25-27] pesticides, and dinitroaniline herbicides [28], in blood samples.

The final measurement of OC and OP pesticides by gas chromatography is improved coupling with mass spectrometry (GC-MS), thus enabling unequivocal identification of the analytes in biological samples for which interfering peaks are usually present in the chromatograms. Quantitative analysis of pesticides in these complex matrices can also be difficult, because of the lack of suitable internal standards. When quantitation is performed by GC-MS, the use of isotopically labeled surrogate standards with similar physico-chemical behavior is feasible.

We have previously proposed the use of a procedure based on direct immersion SPME for the determination of selected OC and OP pesticides in human urine and serum samples [29]. Quantitative application of this procedure required dilution of the samples at least fiftyfold with ultrapure water, to reduce the influence of the matrix on SPME, and the use of surrogate/internal standards. By this means it was feasible to perform quantitation by means of external standards prepared in ultrapure water. Sample dilution led to relatively high limits of determination, however. The aim of the work reported in this paper was to improve the sensitivity of the above-mentioned procedure to enable its application to a wider range of samples. This paper deals with the development of a head-space SPME multiresidue procedure for the determination of OC and OP pesticides in human serum samples. Chromatographic determination is performed by GC-MS in SIM mode, and accurate

quantitation was achieved by use of calibration curves prepared by spiking blank serum samples, and use of labeled surrogate standards.

Experimental

Reagents

Pesticide standards (purity 96.5-99.7%) were purchased from Dr Erhenstorfer (Promochem, Wesel, Germany) and used without further purification. Stock standard solutions mixtures of OC (α -HCH, hexachlorobenzene, β -HCH, lindane, endosulfan ether, α and β -endosulfan, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, endosulfan sulfate and *p,p'*-DDT; 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ except 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for hexachlorobenzene) and OP (azinphos methyl, dichlorvos, methamidophos, methidathion, phorate, diazinon, fenitrothion, fonofos, chlorpyrifos and ethion; 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ except 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for chlorpyrifos, ethion and fonofos) were prepared in acetone from stock solutions of individual standards and stored at -18°C . Working solutions were prepared by dilution with methanol and stored at 4°C . Spiked serum samples were prepared by adding the appropriate volume of methanol standard solution (maintaining a final methanol content below 2.5%), thoroughly shaking, and leaving to equilibrate at 4°C overnight.

4,4'-DDE D_8 (Dr Ehrenstorfer), hexachlorobenzene- $^{13}\text{C}_6$ and fenitrothion-O,O-dimethyl- D_6 (Cambridge Isotope Labs, Inc. Andover, MA) were used as surrogate/internal standards. Stock solutions of labeled standard (ca 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared in acetone and stored at -18°C . Two working solutions (for labeled OP and OC compounds) were prepared by dilution with methanol and used as surrogate/internal standards.

Organic solvents (methanol and acetone) were of pesticide residue analysis grade (Scharlau, Barcelona, Spain). Sulfuric acid (Scharlau) was of analytical grade, and trichloroacetic acid (TCA) 99.5% (Panreac) was for analysis-ACS (American Chemical Society).

Samples

Serum samples used for method development and optimisation were obtained from supposedly unexposed healthy subjects and supplied by Gabinete de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Conselleria de Trabajo, Generalitat Valenciana. Blood samples were collected by venipuncture, by use of serum separator Vacutainer (TAPVAL) blood tubes. The blood was left to clot, and the serum was extracted. Serum samples were then stored at -18°C until analysis.

Instrumentation

The SPME device for manual extraction, a holder assembly and several replaceable fibers, was purchased from Supelco (Spain). Four different fiber types were compared, from non polar polydimethylsiloxane (PDMS, $100\ \mu\text{m}$) to more polar polyacrylate (PA, $85\ \mu\text{m}$), Carboxen/PDMS (CX/PDMS, $75\ \mu\text{m}$), and Carbowax/divinylbenzene (CW/DVB, $65\ \mu\text{m}$). Before use the fibers were conditioned, as recommended by the manufacturer, by heating them in the injection port of the chromatograph for 0.5-2 h at $250\text{-}300^{\circ}\text{C}$, depending on the fiber coating.

Chromatographic analysis was performed with a Hewlett-Packard 5890 Series II gas chromatograph (Agilent Technologies Spain, Madrid, Spain) equipped with a splitless injector (2 mm i.d. glass liner; 5 min splitless time) and mass spectrometric detector (Hewlett-Packard 5971 MSD). The chromatograph was fitted with a 25 m x 0.2 mm i.d., $0.33\ \mu\text{m}$ film, HP Ultra 2 (5% phenyl methylsiloxane) column. The injector temperature was 250°C ; the oven temperature was maintained at 60°C for 5.5 min after injection then programmed $30^{\circ}\text{C}\ \text{min}^{-1}$ to 180°C and then $4^{\circ}\text{C}\ \text{min}^{-1}$ to 270°C , which was held for 5 min. Helium was used as carrier gas at a flow-rate of $0.5\ \text{mL}\ \text{min}^{-1}$.

The MSD transfer-line temperature was 280°C . Electron-impact ionization was performed at an electron energy of 70 eV; the electron multiplier potential was

1800 V. The mass range for full-scan experiments was m/z 50-500. The m/z values used for selected-ion monitoring (SIM) mass detection are listed in **Table I**, as also are quantifier ions selected for extracted-ion mode.

Analytical Procedure

For extraction of OC and OP pesticides human serum (1 mL), surrogate/internal standards mixture (200 ng mL⁻¹, 50 µL), and H₂SO₄ solution (9 M, 50 µL) were placed in a 7-mL clear glass vial (52 mm x 14 mm i.d.) which was then sealed with silicone rubber-lined septum screw cap. The vial was shaken for 1 min by means of a vortex mixer and ultrapure water (2 mL) was then added. The sealed vial was heated at 90°C, with stirring, in a silicone oil bath. After heating for 30 min, the septum-piercing needle of the SPME device was passed through the septum and the PDMS fiber was then pushed from the needle and exposed to the headspace of the vial for 30 min. After absorption, the fiber was thermally desorbed for 5 min at 250°C in the glass liner of the GC injection port, maintaining the initial oven temperature at 60°C. Samples were quantitated by use of a calibration curve prepared by spiking blank serum samples; isotopically labeled pesticides were used as surrogate/internal standards.

Table I. Ions (m/z) selected for SIM mass detection.

Compound	m/z
Organochlorine pesticides	
1 α -HCH	181, 183, <u>219</u> *
2 Hexachlorobenzene	249, <u>284</u> , 286
3 Lindane	181, 183, <u>219</u>
4 Endosulfan ether	239, 241, <u>277</u>
5 α -Endosulfan	195, 239, 241, <u>339</u>
6 p,p' -DDE	<u>246</u> , 318
7 p,p' -DDD	165, <u>235</u> , 237
8 Endosulfan sulfate	239, 241, <u>272</u> , 387
9 p,p' -DDT	165, <u>235</u> , 237
Organophosphorus pesticides	
10 Fonofos	109, 137, <u>246</u>
11 Parathion methyl	109, 125, <u>263</u>
12 Fenitrothion	125, <u>277</u>
13 Chlorpyrifos	197, 258, <u>314</u>
14 Ethion	125, 153, <u>231</u>
Labelled internal standards	
$^{13}\text{C}_6$ HCB	255, <u>290</u> , 292
D_8 p,p' -DDE	<u>254</u> , 326
D_6 fenitrothion	131, <u>283</u>

* Underlining indicates quantifier ion (m/z) in extracted ion mode

Results and Discussion

Direct-Immersion SPME

Initially several experiments were performed with fortified serum samples, using the direct-immersion SPME procedure proposed previously [29] to study the effect of sample dilution on chromatographic response and to improve the sensitivity

of the method. Dilution factor studied ranged between 3 and 12, the amount of analyte in the extracted sample (3 mL) being maintained constant (5 ng). Analysis of selected OC pesticides (α -HCH, hexachlorobenzene, β -HCH, lindane, endosulfan ether, α - and β -endosulfan, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, endosulfan sulfate, and *p,p'*-DDT) after SPME was performed by GC-MS in selected ion monitoring (SIM) mode.

The results obtained showed that more than threefold dilution of the serum sample did not lead to better recoveries. In addition, sample volume is usually limited to ca 1 mL and in our experiment the application of DI SPME with 7-mL glass vials requires a sample volume of at least 3 mL. Thus threefold dilution (1 mL serum sample + 2 mL ultrapure water) was selected for subsequent experiments, because it resulted in a noticeable reduction in matrix complexity while still maintaining adequate sensitivity.

Many analytical procedures for determination of pesticides or drugs in human body fluids include deproteination with acids [20-21, 24-26, 30] or organic solvents such as methanol [4, 10, 13, 31] or acetonitrile [9]. To improve recoveries the effect of the addition of sulfuric acid, trichloroacetic acid (TCA), and methanol on the efficiency of extraction of OC pesticides in direct immersion SPME was studied. Recoveries obtained were not satisfactory, and were similar for all reagents and concentrations tested, and most interferences were still present in the final chromatogram. Use of direct-immersion SPME was, therefore, discontinued and the head space SPME technique was selected for further investigations, to develop an adequate procedure for determination of OC pesticides in serum samples.

Head Space SPME

Before studying the use of HS SPME with serum samples, the effects of most relevant SPME variables (fiber type and extraction time) on the head space behavior of OC pesticides in aqueous samples were checked. Several types of fiber were

evaluated, and the best results were obtained with PDMS and PA; extraction times were extremely high (up to several hours) to ensure working under equilibrium conditions. Variables involved in HS technique, e.g. the use of a pre-extraction heating and the extraction temperature, were also studied. Pre-extraction heating time was fixed at 30 min (equal to the extraction time) to achieve maximum throughput when using in manual extraction. Extraction temperatures of 45 and 90°C were tested, and the best responses were obtained at 90°C. Temperatures higher than 90°C were not considered to avoid boiling of the sample.

The effect of several deproteinating agents on head space extraction efficiency (with PDMS fiber) was again studied by adding H₂SO₄ (9M, 50 µL), TCA (2M, 50 µL), or methanol (500 µL) to serum samples spiked with OC pesticides (1 mL), shaking the sample for 1 min by means of a vortex mixer, and then diluting the sample with distilled water (2 mL).

Addition of sulfuric acid greatly improved the response for all pesticides studied, and removed interfering peaks present in the chromatograms. TCA and methanol also improved the responses, but this resulted in severe problems in the handling of samples, because of the formation of a solid phase during the heating step. Thus, H₂SO₄ was chosen as deproteinating agent. As an example, **Figure 1** shows the increase of peak response for four OC pesticides when sulfuric acid was added to serum sample. As an exception to this behavior, detection of β-HCH and β-endosulfan in serum samples was inadequate, because of their extremely poor recoveries. These compounds were, therefore, not considered for further investigation and removed from the standard mixture. The effect of addition of salt was not checked, owing to unpublished data obtained by us and data reported by other authors [26, 28].

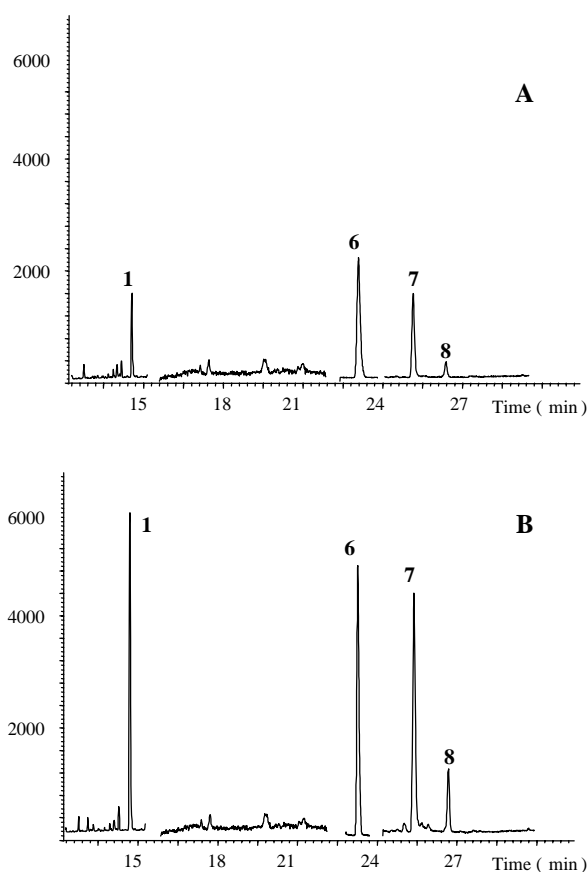


Figure 1. Extracted ion GC-SIM chromatograms obtained after HS SPME of a spiked serum sample (50 ng mL^{-1}). A. Serum diluted with water (2 mL). B. Serum plus H_2SO_4 (9M, $50 \mu\text{L}$) and diluted with water (2 mL). Peaks: 6 = *p,p'*DDE, 7 = *p,p'*-DDD, 9 = *p,p'*-DDT. (The *m/z* values used are given in Table I).

When the extraction conditions had been established, validation of the HS SPME (PDMS fiber) procedure with subsequent analysis by GC/MS for the determination of selected OC pesticides was performed with regard to linearity range, precision, and limits of determination.

As indicated in the literature [32-33], accurate quantitative analysis of complex matrices such as human serum usually requires the use of internal/surrogate standards and/or the application of standard addition calibration procedures. In this paper, calibration curves were prepared by spiking blank serum samples with OC

pesticides and using labeled surrogate/internal standards. The blank serum was a pooled sample obtained by mixing approximately 20 individual serum samples. Because this pool was found to contain HCB and *p,p'*-DDE, it was necessary to correct the quantitative results by subtracting blank values. For correct quantitation of the nine OC pesticides the use of two surrogate standards was necessary - $^{13}\text{C}_6$ HCB for the early eluting peaks (α -HCH, HCB, lindane, and endosulfan ether) and D_8 *p,p'*-DDE for the late eluting peaks (α -endosulfan, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, endosulfan sulfate, and *p,p'*-DDT). The linearity of the method was tested over the range 1-100 ng mL⁻¹ (0.5-50 ng mL⁻¹ for HCB) by use of six concentration levels and analyzing each level in triplicate. The first-order calibration curves obtained were indicative of linear behavior between 1 and 50 ng mL⁻¹ (0.5-25 ng mL⁻¹ for HCB) with correlation coefficients (r^2) higher than 0.99 (0.98 for *p,p'*-DDT). When second-order calibration curves were used, however, better fitting of the experimental points was obtained, with $r^2 > 0.99$ for all compounds over the whole range tested, with no negative intercept that might lead to quantitation problems at low concentration levels when using the first-order fit.

The precision of the procedure tested was determined by replicate analysis of six spiked human serum samples each at three concentration levels each (1, 10 and 50 ng mL⁻¹; **Table II**). Most recoveries were in the range of 80 to 120% with coefficients of variation better than 15%. At the lowest level assayed excessively high recoveries were observed for α -HCH and lindane, probably because of poor correction of matrix effects at this fortification level, which is close to their LOD.

Table II also shows the LOD calculated from chromatograms obtained from HS SPME and GC/MSD (SIM and extraction ion mode) determination of serum samples spiked at the 1 or 10 ng mL⁻¹ level, calculated as the peaks having a signal-to-noise ratio of 3. It is apparent that experimental LOD were between 0.1 and 6 ng mL⁻¹, with most of values at the lower end of the range. The results obtained were indicative of improved sensitivity compared with our previously proposed procedure based on direct immersion SPME and GC-ECD analysis [29], mainly for the compounds HCB, *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDD (LOD between 2 and 10 ng mL⁻¹). Thus,

the procedure developed is applicable to the determination of OC pesticides in serum samples from exposed and non-exposed populations in monitoring programs.

Intermediate precision ($n=9$) was also studied by analyzing three replicates of serum samples spiked at three concentration levels (1, 10 and 50 ng mL^{-1}), on three different days covering a total period of 5 days. The results obtained, shown in **Table III**, were not significantly different from those in **Table II**, i.e. most of recoveries were better than 80% with coefficients of variation below 22%.

Figure 2 shows the chromatogram obtained after application of the recommended HS SPME procedure to a serum sample spiked at 5 ng mL^{-1} for HCB and 10 ng mL^{-1} for the other OC pesticides.

The next step was to apply the optimized HS SPME procedure developed for OC pesticides to the determination of selected OP pesticides in serum samples. Initially the HS SPME procedure was applied to aqueous samples spiked with eleven OP pesticides. Some of the compounds (azinphos methyl, dichlorvos, methamidophos, methidathion, and phorate) were not extracted adequately during headspace extraction, probably because of their low volatility. Determination of diazinon was also unsatisfactory, because it was degraded by sulfuric acid. The recommended HS SPME procedure (1 mL serum + $50 \mu\text{L H}_2\text{SO}_4$ + 2 mL distilled water; headspace extraction of stirred samples for 30 min at 90°C with PDMS fiber) was applied over spiked serum samples at different concentration with D_6 fenitrothion as surrogate/internal standard. Initial results showed that quantitation of malathion was not feasible, because of the presence in the chromatogram of an interfering peak with m/z 173. Because the EI spectrum of malathion contains solely the ion of m/z 173, it was not possible to select another ion to improve quantitation. A possible solution to this problem might be the use of MS-MS, because of its greater selectivity. The OP pesticides studied by HS SPME were the five compounds listed in **Table I**.

Table II. Mean recoveries and coefficients of variation (n=6), and limits of detection (ng ml⁻¹), for application of HS SPME to the determination of OC pesticides in spiked serum samples.

	50 ng ml ⁻¹		10 ng ml ⁻¹		1 ng ml ⁻¹		L.O.D. (ng ml ⁻¹)
	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	
α-HCH	95	11	105	4	153	7	0.5
Hexachlorobenzene*	105	1	115	2	96	19	0.1
Lindane	109	11	116	6	144	2	1
Endosulfan ether	116	8	119	6	80	11	0.5
α-Endosulfan	108	5	84	14	–	–	6
<i>p,p'</i> -DDE	112	2	109	3	132	13	0.1
<i>p,p'</i> -DDD	78	5	73	3	117	7	0.5
Endosulfan sulfate	88	14	99	10	–	–	6
<i>p,p'</i> -DDT	107	8	100	4	–	–	5

*Fortification levels 25 ng ml⁻¹, 5 ng ml⁻¹ and 0.5 ng ml⁻¹

Table III. Mean recoveries and coefficients of variation (three replicates in three different days, n=9) obtained for application of HS SPME to the determination of OC pesticides in spiked serum samples.

	50 ng ml ⁻¹		10 ng ml ⁻¹		1 ng ml ⁻¹	
	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
α -HCH	86	9	105	6	147	5
Hexachlorobenzene*	102	2	113	2	104	14
Lindane	98	8	116	6	136	9
Endosulfan ether	110	10	117	5	94	22
α -Endosulfan	102	15	88	19	–	–
<i>p,p'</i> -DDE	105	4	105	3	128	13
<i>p,p'</i> -DDD	75	7	74	5	118	4
Endosulfan sulfate	85	17	103	9	–	–
<i>p,p'</i> -DDT	96	18	103	6	–	–

*Fortification levels: 25 ng ml⁻¹, 5 ng ml⁻¹ and 0.5 ng ml⁻¹

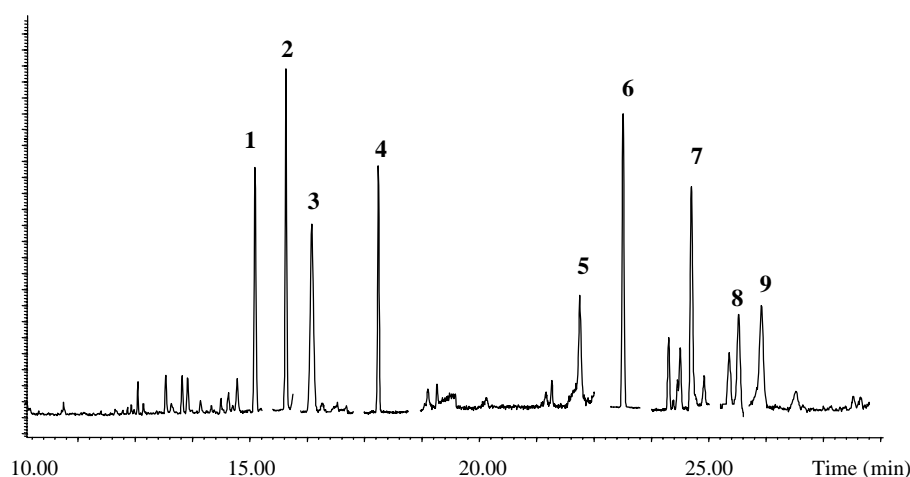


Figure 2. Extracted ion SIM chromatogram obtained after HS SPME of a serum sample spiked with OC pesticides at 10 ng mL^{-1} . Peaks: 1 = α -HCH, 2 = hexachlorobenzene, 3 = lindane, 4 = endosulfan ether, 5 = α -endosulfan, 6 = *p,p'*-DDE, 7 = *p,p'*-DDD, 8 = endosulfan sulfate, 9 = *p,p'*-DDT. (The *m/z* values used are given in Table I).

Linearity was checked over the range $2.5\text{--}250 \text{ ng mL}^{-1}$ for parathion methyl and fenitrothion and between 0.5 and 50 ng mL^{-1} for fonofos, chlorpyrifos and ethion, using six concentration levels and triplicate analysis of each level. Results obtained showed responses to be linear up to 125 and 25 ng mL^{-1} , respectively, with $r^2 > 0.99$.

Table IV shows the results obtained from six replicate analyses at three concentration levels. Recoveries and coefficients of variation were usually satisfactory. Detection limits obtained for OP pesticides in serum samples (**Table IV**) ranged between 0.1 and 0.8 ng mL^{-1} , except for parathion-methyl (5 ng mL^{-1}). These values enable the determination of OP pesticides in serum samples in monitoring programs. The intermediate precision of the method was also studied, in the same manner as for the OC pesticides; the results obtained (**Table V**) were satisfactory, with coefficients of variation usually below 15%.

Table IV. Mean recoveries and coefficients of variation (n=6), and limits of detection (ng ml⁻¹), obtained for application of HS SPME to the determination of OP pesticides in spiked serum samples.

	Level 1 ^a		Level 2 ^b		Level 3 ^c		L.O.D. (ng ml ⁻¹)
	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	
Fonofos	108	13	104	8	131	9	0.1
Parathion methyl	96	8	96	4	98	15	5
Fenitrothion	93	6	91	4	117	8	0.8
Chlorpyrifos	94	10	104	6	80	24	0.1
Ethion	91	8	80	5	108	12	0.4

^a125 ng ml⁻¹ of parathion methyl and fenitrothion; 25 ng ml⁻¹ of fonofos, chlorpyrifos and ethion

^b25 ng ml⁻¹ of parathion methyl and fenitrothion; 5 ng ml⁻¹ of fonofos, chlorpyrifos and ethion

^c5 ng ml⁻¹ of parathion methyl and fenitrothion; 1 ng ml⁻¹ of fonofos, chlorpyrifos and ethion

Table V. Mean recoveries and coefficients of variation (three replicates in three different days, n=9) obtained for application of HS SPME to the determination of OP pesticides in spiked serum samples.

	Level 1 ^a		Level 2 ^b		Level 3 ^c	
	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Fonofos	117	12	109	11	122	12
Parathion methyl	100	12	100	11	96	12
Fenitrothion	97	13	95	14	105	8
Chlorpyrifos	110	12	107	14	91	23
Ethion	107	14	92	8	81	9

^a125 ng ml⁻¹ of parathion methyl and fenitrothion; 25 ng ml⁻¹ of fonofos, chlorpyrifos and ethion

^b25 ng ml⁻¹ of parathion methyl and fenitrothion; 5 ng ml⁻¹ of fonofos, chlorpyrifos and ethion

^c5 ng ml⁻¹ of parathion methyl and fenitrothion; 1 ng ml⁻¹ of fonofos, chlorpyrifos and ethion

Figure 3 shows the GC-MS (SIM) chromatogram obtained from a serum sample spiked with 5 ng mL^{-1} parathion methyl and fenitrothion and 1 ng mL^{-1} fonofos, chlorpyrifos, and ethion by application of the recommended HS SPME method.

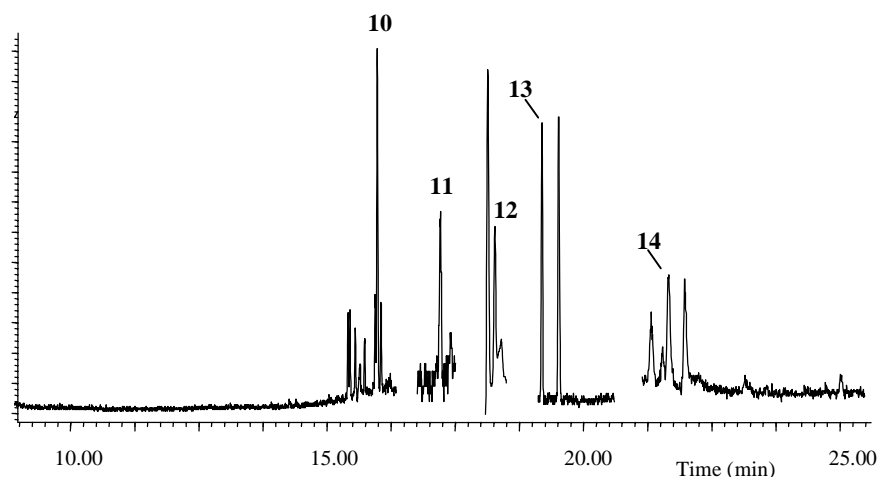


Figure 3. Extracted ion SIM chromatogram obtained after HS SPME of a serum sample spiked with OP pesticides at 5 ng mL^{-1} (11 = parathion methyl, 12 = fenitrothion) or at 1 ng mL^{-1} (10 = fonofos, 13 = chlorpyrifos, 14 = ethion). (The m/z values used are given in Table I).

Application of SPME to Real-World Samples

The multiresidue HS SPME procedure was applied to 15 serum samples from agricultural workers from the Castellon province (Spain) all engaged in citrus fruit production, and thus possibly exposed to different pesticides, which are widely used in this area. Because of the limited volume of sample available, only one replicate of each sample was analyzed. **Table VI** shows the results obtained.

HCB and p,p' -DDE were detected in all samples analyzed at concentrations between 0.4 and 6.5 ng mL^{-1} and 1.6 and 29 ng mL^{-1} , respectively. Paralell behavior was observed for the analytes – high levels of HCB (at or above 5 ng mL^{-1}) were

accompanied by high levels of *p,p'*-DDE (above 15 ng mL⁻¹). *p,p'*-DDT was also detected in two samples, at a concentration close to the limit of detection of the method (5 ng mL⁻¹). In these samples, *p,p'*-DDE (transformation product of *p,p'*-DDT) was also found at high concentration (15 and 29 ng mL⁻¹). These findings are in agreement with those reported in other monitoring surveys of human populations - detection of OC pesticides such as HCB, *p,p'*-DDT and metabolites, and HCHs is still frequent, even though their use has been banned in most countries [34-36].

Chlorpyrifos (an OP insecticide widely used nowadays in our agricultural areas) was also found in most samples at concentrations between 1.0 and 2.8 ng mL⁻¹. An endosulfan metabolite (endosulfan ether) was also detected in one sample - endosulfan is one of the few OC pesticides still in use in agriculture. Martínez Vidal et al. [37] found that endosulfan ether was the main metabolite in the urine from pest-control operators from Almeria (Spain). As an example, **Figure 4** shows a chromatogram obtained from a real serum sample (number 3, see **Table VI**) in which hexachlorobenzene, chlorpyrifos and, *p,p'*-DDE were detected.

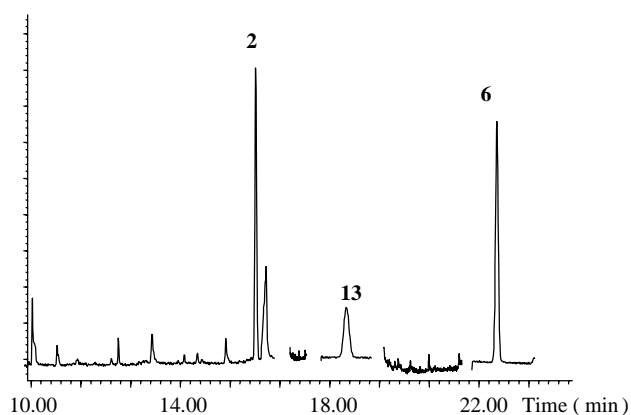


Figure 4. Extracted ion SIM chromatogram obtained from a real-world serum sample (number 3) after HS SPME. Peaks: 2 = hexachlorobenzene, 13 = chlorpyrifos, 6 = *p,p'*-DDE. (The *m/z* values used are given in Table I).

Table VI. Concentrations (ng mL^{-1}) of pesticides detected in samples of human serum by application of the HS SPME procedure.

	Sample number														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Hexachlorobenzene	0.4	0.6	2.4	0.4	5.2	0.4	3.1	6.5	1.7	1.3	3.4	4.8	3.5	2.5	2.6
Endosulfan ether	–	–	–	–	1.0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Chlorpyrifos	2.6	1.3	1.5	2.0	2.6	2.8	1.4	1.0	1.8	1.2	0.7	0.6	–	–	–
<i>p,p'</i> -DDE	1.8	1.6	6.7	1.8	15	1.7	12	29	2.9	5.0	13	27	4.8	16	7.0
<i>p,p'</i> -DDT	–	–	–	–	d*	–	–	d	–	–	–	–	–	–	–

* detected.

Conclusions

This SPME procedure enables an important reduction in sample treatment compared with traditional techniques, e.g. liquid-liquid and solid-liquid extraction. Although SPME is usually applied in the direct immersion mode, we were compelled, by the complexity of the serum matrix, to perform extraction in the HS mode, especially if quantitative results were required. The use of calibration curves prepared by use of spiked blank serum provides accurate results for quantitation; it was necessary to use isotopically labeled surrogate/internal standards to correct for the effect of the matrix. The efficiency of the overall procedure enabled us to determine OC and OP pesticides simultaneously, with satisfactory precision and low detection limits ($0.05\text{-}5\text{ ng mL}^{-1}$) for most of the pesticides studied; this makes the method suitable for monitoring control both the exposed and non-exposed population.

When the procedure was applied to real-world samples, some OC pesticides and one OP compound (chlorpyrifos) were detected.

Acknowledgements

This work forms a part of the project “Nuevas estrategias en la determinación de residuos de plaguicidas y de metabolitos en fluidos biológicos. Simplificación de la etapa de preparación de muestra”, developed with the financial support of Fundación Caixa Castelló. The authors thank Gabinete de Seguridad e Higiene en el Trabajo de la Conselleria de Trabajo de la Generalitat Valenciana for providing samples of human serum.

References

- [1] Ameno, K.; Fuke, C.; Ameno, S.; Kiriu, T.; Ijiri, Y. *J. Anal. Toxicol.* **2000**, 13, 150-151.
- [2] Liu, J.; Suzuki, O.; Kumazaya, T.; Seno, H. *Forensic Sci. Int.* **1989**, 41, 67-72.
- [3] Brock, J.W.; Burse, V.W.; Ashley, D.L.; Najam, A.R.; Green, V.E.; Korver, M.P.; Powell, M.K.; Hodge, C.C.; Needham, L.L. *J. Anal. Toxicol.* **1996**, 20, 528-536.
- [4] Guardino, X.; Serra, C.; Obiols, J.; Rosell, M.G.; Berenguer, M.J.; López, F.; Brose, J. *J. Chromatogr. A* **1996**, 719, 141-147.
- [5] Johnston, J.J.; Petty, E.E.; Volz, S.A. *J. High Resol. Chromatogr.* **1997**, 20, 405-409.
- [6] Otero, R.; Santiago Silva, M.; Grimalt, J.O. *J. Chromatogr. A* **1997**, 778, 87-94.
- [7] Waliszewski, S.M.; Szymczynski, G.A. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1991**, 46, 803-809.
- [8] Gill, U.S.; Schwartz, H.M.; Wheatley, B. *Chemosphere* **1996**, 32, 1055-1061.
- [9] Pauwels, A.; Wells, D.A.; Covaci, A.; Schepens, P.J.C. *J. Chromatogr. B* **1999**, 723, 117-125.
- [10] Atuma, S.S.; Aune, M. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, 62, 8-15.
- [11] Matos, C.; Ferreira, C.B.; Valente, D.S.; Rocha, J.M.; Noronha, M.I. *J. Chromatogr. B* **1998**, 716, 147-152.
- [12] Bucholski, K.A.; Begerow, J.; Winneke, G.; Dunemann, L. *J. Chromatogr. A* **1996**, 754, 479-485.
- [13] Najam, A.R.; Korver, M.P.; Williams, C.C.; Burse, V.W.; Needham, L.L. *J. AOAC Int.* **1999**, 82, 177-185.

- [14] Arthur, C.L.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2145-2148.
- [15] Arthur, C.L.; Killam, L.M.; Buchholz, K.D.; Pawliszyn, J.; Berg, J.R. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 1960-1966.
- [16] Beltran, J.; López, F.J.; Cepria, O.; Hernández, F. *J. Chromatogr. A* **1998**, 808, 257-263.
- [17] Beltran, J.; López, F.J.; Hernández, F. *J. Chromatogr. A* **2000**, 885, 389-404.
- [18] Hernández, F.; Beltran, J.; López, F.J.; Gaspar, J.V. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2313-2322.
- [19] Koster, E.H.M.; Hofman, N.S.K.; de Jong, G.J.; *Chromatographia* **1998**, 47, 678-684.
- [20] Kumazawa, T.; Sato, K.; Seno, H.; Ishii, A.; Suzuki, O. *Chromatographia* **1996**, 43, 59-62.
- [21] Krogh, M.; Grefslie, H.; Rasmussen, K.E. *J. Chromatogr. B* **1997**, 689, 357-364.
- [22] Ulrich, S.; Martens, J. *J. Chromatogr. B* **1998**, 696, 217-234.
- [23] Schaller, K.H., Angerer, J., Lehnert, G. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1993**, 346, 830-832.
- [24] Röhrig, L.; Püttmann, M.; Meisch, H.U. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998**, 361, 192-196.
- [25] Namera, A.; Yashiki, M.; Nagasawa, N.; Iwasaki, Y.; Kojima, T. *Forensic Sci. Int.* **1997**, 88, 125-131.
- [26] Lee, X.P.; Kumazawa, T.; Sato, K.; Suzuki, O. *Chromatographia* **1996**, 42, 135-140.
- [27] Musshoff, F.; Junker, H.; Madea, B. *Clin. Chem. Lab. Med.* **1998**, 37, 639-642.

- [28] Guan, F.; Watanabe, K.; Ishii, A.; Seno, H.; Kumazawa, T.; Hattori, H.; Suzuki, O. *J. Chromatogr. B* **1998**, 714, 205-213.
- [29] López, F.J.; Pitarch, E.; Egea, S.; Beltran, J.; Hernández, F. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 433, 217-226.
- [30] Takekawa, K.; Oya, M.; Kido, A.; Suzuki, O. *Chromatographia* **1998**, 47, 209-214.
- [31] Burse, V.W.; Head, S.L.; Korver, M.P.; McClure, P.C.; Donahue, J.F.; Needham, L.L. *J. Anal. Toxicol.* **1990**, 14, 137-142.
- [32] Beeson, M.D.; Driskell, W.J.; Barr, D.B. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3526-3530.
- [33] Hill, R.H.; Shealy, D.B.; Head, S.L.; Willams, C.C.; Bailey, S.L.; Gregg, M.; Baker, S.E.; Needham, L.L. *J. Anal. Toxicol.* **1995**, 19, 323-329.
- [34] Krauthacker, B. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1991**, 46, 797-802.
- [35] Bjerregaard, P.; Hansen, J.C. *Sci. Total Environ.* **2000**, 245, 195-202.
- [36] Kocan, A.; Petřík, J.; Drobná, B.; Chovancová, J. *Chemosphere* **1994**, 29, 2315-2325.
- [37] Martínez Vidal, J.L.; Arrebola, F.J.; Fernández-Gutiérrez, A.; Rams, M.A. *J. Chromatogr B* **1998**, 719, 71-78.

4.3. Referencias

- Ai, J. (1997), *Headspace solid phase microextraction. Dynamics and quantitative analysis before reaching a partition equilibrium*, Anal. Chem., **69**, 1230.
- Arthur, C.L., Pawliszyn, J. (1990), *Solid-phase micro-extraction with thermal desorption using fused-silica optical fibres*, Anal. Chem., **62**, 2145.
- Beeson, M.D., Driskell, W.J., Barr, D.B. (1999), *Isotope dilution high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of atrazine, malathion and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid*, Anal. Chem., **71**, 3526.
- Belardi, R.P., Pawliszyn, J. (1989), *The application of chemical modified fused silica fibres in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary column*, Water Pollut. Res. J. Canada, **24**, 179.
- Beltrán, J., López, F.J., Cepriá, O., Hernández, F. (1998), *Solid-phase microextraction for quantitative analysis of organophosphorus pesticides in environmental water samples*, J. Chromatogr. A, **808**, 257.
- Beltran, J., Lopez, F.J., Hernández, F. (1993), *Solid phase extraction of pesticides residues in groundwater: A comparison between C₁₈ cartridges and extraction disks*, Anal. Chim. Acta, **283**, 297.
- Beltran, J., López, F.J., Hernández, F. (2000), *Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis*, J. Chromatogr. A, **885**, 389.
- Gorecki, T., Pawliszyn, J. (1997), *Effect of sample volume on quantitative analysis by solid phase microextraction. Part I. Theoretical considerations*, Analyst, **122**, 1079.
- Hernández, F., Beltran, J., Lopez, J.F., Gaspar, J.V. (2000), *Use of solid phase microextraction for the quantitative determination of herbicides in soil and water samples*, Anal. Chem., **72**, 2313.

- Hernández, F., Morell, I., Beltran, J., Lopez, F.J. (1993), *Multi-residue procedure for the analysis of pesticides in groundwater: application to samples from the Comunidad Valenciana, Spain*, *Chromatographia*, **37**, 303..
- Hill, R.H., Shealy, D.B., Head, S.L., William, C.C., Bailey, S.L., Gregg, M., Baker, S.E., Needham, L.L. (1995), *Determination of pesticide metabolites in human urine using an isotope dilution technique and tandem mass spectrometry*, *J. Anal. Toxicol.*, **19**, 323.
- Lee, X.-P., Kumazawa, T., Sato, K., Suzuki, O. (1996), *Detection of organophosphate pesticides in human body fluids by headspace solid-phase microextraction (SPME) and capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection.*, **42**, 135.
- Lopez Avila, V., Edgell, K. (1990), *Gas chromatographic-electron capture detection method for determination of 29 organochlorine pesticides in finished drinking water: collaborate study*, *J. AOAC*, **382**, 276.
- Magdic, S., Pawliszyn, J. (1996), *Analysis of organochlorine pesticides using solid-phase microextraction*, *J. Chromatogr A*, **723**, 111.
- Mills, G.A., Walker, V. (2000), *Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and material*, *J. Chromatogr A*, **902**, 267.
- Noble, A. (1993), *Partition coefficients (n-octanol-water) for pesticides*, *J. Chromatogr.*, **642**, 3.
- Tomlin, C.D.S. (1997), *The Pesticide Manual*, 11th ed., British Crop Protection Council.
- Ulrich, S. (2000), *Solid-phase microextraction in biomedical analysis*, *J. Chromatogr A*, **902**, 167.

CAPÍTULO 5

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOCLORADOS EN MUESTRAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO

5.1. Introducción

En general, los compuestos OCs, incluyendo tanto plaguicidas como PCBs, son detectados en una gran variedad de muestras medioambientales y biológicas tales como peces, mamíferos marinos, pájaros y animales terrestres (Brown, 1997; Lee *et al.*, 1997; Roche *et al.*, 2000; Serrano *et al.*, 1999), lo cual pone de manifiesto la amplia dispersión de estos compuestos en el compartimento biótico del medio ambiente. Debido a su elevada liposolubilidad y resistencia a metabolizarse, los OCs tienden a bioacumularse a través de la cadena trófica, llegando a alcanzar niveles de concentración elevados. Wania y Mackay (1993) realizaron un extenso estudio sobre las causas de la contaminación de compuestos OCs en las regiones polares, puesto que en esas zonas las concentraciones encontradas suelen ser elevadas, seguramente, como resultado a largo plazo del transporte atmosférico. Estos autores sugirieron que los compuestos con presión de vapor relativamente baja eran los que preferentemente tendían a acumularse en las regiones polares.

Asimismo, la población en general también se encuentra expuesta a contaminantes OCs a través de la dieta y de otras vías, por ejemplo por exposición en el lugar de trabajo, pudiéndose encontrar elevados niveles de concentración en la grasa corporal, incluyendo tejidos adiposos, los lípidos de la sangre y la leche humana.

Las muestras de tejido adiposo destacan por su alto contenido en grasa, constituyendo una matriz difícil y compleja de analizar. Normalmente, debido a la baja selectividad del método de extracción utilizado en la determinación de contaminantes en este tipo de muestras, gran parte de los materiales interferentes presentes en la matriz, principalmente lípidos, son co-extraídos con los analitos de interés. Esto hace necesario un sistema de purificación eficaz que elimine las sustancias interferentes previamente a la determinación cromatográfica, evitando daños en la columna y la contaminación de los detectores. Además, para que se pueda considerar útil su aplicación en estudios de control, es necesario que el procedimiento de purificación sea razonablemente sencillo, rápido y económico.

Los métodos convencionales para la determinación de OCs en muestras grasas humanas, particularmente en tejido adiposo humano, suelen implicar varios pasos incluyendo una etapa de extracción, otra de eliminación de los lípidos mediante digestiones con ácidos (Gómez-Catalán *et al.*, 1993; Moriya y Hashimoto, 1999), cromatografía de adsorción en columna (Ludwicki y Góralczyk, 1994; Dewailly *et al.*, 1999) o SPE (Asakawa *et al.*, 1996), y una determinación analítica por GC-ECD o GC-MSD.

La utilización de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la purificación de extractos de muestras de tejido adiposo humano supone una mejora en cuanto a la eficacia de la purificación y el tiempo de análisis respecto a otras técnicas clásicas, y además posibilita la automatización del proceso.

5.2. Experimental

En este apartado se estudia el potencial de la HPLC en fase normal con columna de Silicagel para la purificación de extractos de muestras de tejido adiposo humano como etapa previa a la determinación de compuestos OCs mediante GC. El empleo de la cromatografía en fase normal permite la inyección directa de los extractos purificados en el cromatógrafo de gases, gracias a la compatibilidad de los disolventes utilizados con los detectores y las columnas de GC.

El primer grupo de plaguicidas OCs seleccionados fue el correspondiente a los isómeros *endosulfan* (α y β), y a sus *metabolitos* (*-éter*, *-sulfato*, *-lactona* y *-diol*). Esta primera selección se realizó en base a que es uno de los pocos plaguicidas OCs que todavía se sigue utilizando en la agricultura de nuestra área geográfica. En una etapa posterior, se incorporaron a la lista otros plaguicidas OCs muy frecuentemente detectados en este tipo de muestras grasas humanas, *HCB*, β -*HCH*, *p,p'*-*DDT*, *p,p'*-*DDD* y *p,p'*-*DDE*. La lista de compuestos estudiados en este apartado se completó con 7 PCBs de números IUPAC: 28 (triclorobifenil), 52 (tetraclorobifenil), 101 y 118 (pentaclorobifenil), 138 y 153 (hexaclorobifenil), y 180 (heptaclorobifenil).

La determinación de los analitos se llevó a cabo mediante técnicas selectivas y sensibles, como GC-MS y GC-MS/MS. Sobre todo esta última se revela como una herramienta poderosa para el análisis de matrices complejas, ya que aporta un factor adicional por la realización del espectro de los iones secundarios formados a partir de un precursor seleccionado en el espectro del analito. La adecuada selección de los iones precursores y de los iones secundarios permite disponer de una de las técnicas más sensibles y selectivas para trabajar con muestras complejas.

Finalmente, cabe destacar que los procedimientos desarrollados se han aplicado a dos grupos de muestras reales de tejidos grasos procedentes, la mayoría de ellos, de pared abdominal. Varios plaguicidas OCs, principalmente *HCB*, β -*HCH* y *p,p'*-*DDE*, han sido encontrados en muestras de población, asimismo también se han detectado los PCBs con más contenido en cloro (*PCB 138*, *153* y *180*).

El presente apartado se ha estructurado del siguiente modo: en primer lugar, se describen detalladamente los reactivos, el material y el equipo instrumental utilizado para todas las experiencias; en segundo lugar, se estudia la optimización de los procedimientos de purificación mediante HPLC en fase normal; y finalmente, se resumen las experiencias de optimización de la técnica cromatográfica GC-MS/MS.

Los artículos científicos presentados en este capítulo son dos:

- “Multiresidue determination of endosulfan and metabolic derivatives in human adipose tissue using automated liquid chromatography clean up and gas chromatography analysis”

J. Anal. Toxicol. (en prensa)

- “Determination of organochlorine compounds in human adipose tissue using automated liquid chromatography clean up and gas chromatography analysis coupled to tandem mass spectrometry”

Chromatographia (enviado)

5.2.1. Reactivos, material y equipos instrumentales

Reactivos

- Patrones de plaguicidas OCs: *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDT, α y β endosulfan y sus metabolitos (-diol, -éter, -lactona y -sulfato), β -HCH y HCB, de 97-99.7% de pureza (Dr. Ehrenstorfer, Promochem, Wesel, Alemania). Se prepararon por pesada disoluciones individuales stock de cada compuesto del orden de 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en acetona, que se almacenaron en el congelador a -20°C. A partir de estas disoluciones individuales, se prepararon mezclas stocks (aprox. 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en n-hexano. Las disoluciones de trabajo, tanto par la fortificación de las muestras como para la inyección en LC y GC, se prepararon por dilución en n-hexano, eliminando cualquier residuo de acetona por evaporación a 40°C en un baño con N₂.

Patrones de PCBs: Mezcla 3 PCB (10 $\mu\text{l ml}^{-1}$ en isooctano) formada por los PCBs de números IUPAC: 28, 52, 101, 138, 153 y 180 (Dr. Ehrenstorfer, Promochem, Wesel, Alemania). Las disoluciones de trabajo se prepararon a partir de ésta por dilución en n-hexano.

Patrones de plaguicidas deuterados: *p,p'*-DDE D₈ (Dr. Ehrenstorfer), HCB ¹³C₆ y 2,2',3,4,4',5'- hexaclorobifenil ¹³C₁₂ (Cambridge Isotope Labs, Inc. Andover, MA).

- Disolventes orgánicos, calidad para análisis de ultra-trazas: acetona, acetato de etilo y n-hexano (Scharlab, Barcelona, España).
- Sulfato sódico anhidro, calidad para análisis de residuos de plaguicidas (Baker, Deventer, Holland), purificado en estufa a 300°C durante toda la noche.
- N-(tert- butyldimethylsilyl) -N- methyl trifluoroacetamide (MTBSTFA) de 97% de pureza (Aldrich, Milwaukee, WI, USA).

Material

- Material de vidrio: tubos de rosca, tubos graduados de 15 ml y sin graduar, provistos de tapón de vidrio esmerilado, pipetas Pasteur, etc.
- Material volumétrico tipo A (pipetas, aforados, etc.).
- Bloque calefactor Multiblock, Selecta.
- Agitador vibrador para tubos Reax 2000 (Vortex).
- *Gases*: Helio y nitrógeno (99.9995% de calidad), utilizados en el sistema cromatográfico fueron suministrados por Carburos Metálicos (Barcelona, España).

Muestras

- Muestras de tejido adiposo humano obtenidas de dos grupos poblacionales distintos. El primer grupo estuvo formado por muestras de tejido adiposo mamario y tejido abdominal pertenecientes a un colectivo de mujeres de la provincia de Almería. El otro grupo fueron muestras de pared abdominal pertenecientes a hombres y mujeres de la provincia de Castellón trabajando en diferentes actividades profesionales. Además, para la validación del método para la determinación de plaguicidas OCs y PCBs, se utilizaron muestras arbitrarias de tejido adiposo humano de glúteos y pared abdominal.

Procedimiento de extracción

- Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Se tomaron aproximadamente 0.5 - 1.5 g de tejido húmedo, se cortó y se homogeneizó con 5-10 g de sulfato sódico anhidro. Seguidamente, se extrajo dos veces con 5 ml de n-hexano mezclando en vortex durante 3 min y se filtró. El extracto se preconcentró en un baño de nitrógeno a 40°C y el residuo final se ajustó a 3 ml con n-hexano. El extracto obtenido se sometió a una purificación

mediante HPLC con columna de Silicagel y la determinación final se llevó a cabo por GC-MS o GC-MS/MS.

Equipos instrumentales

- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 series II con detector ECD, un autoinyector HP 7673 y una columna capilar de sílice fundida HP Ultra 2 (crosslinked 5% fenil-metil siloxano) 25 m x 0.25 mm d.i., 0.33 μm . Helio fue usado como gas portador a un flujo 0.5 ml min^{-1} . Condiciones de ECD: temperatura 300°C, N_2 60 ml min^{-1} . Temperatura del inyector, 270°C. El programa de temperatura del horno fue programado de la siguiente manera: 80°C durante 0.5 min, a 20°C min^{-1} hasta 230°C, a 5°C min^{-1} hasta 260°C, a 20°C min^{-1} hasta 280°C (7 min). Volumen de inyección, 2 μl en modo *splitless*.
- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 series II equipado con detector selectivo de masas MSD 5971, un *splitless* autoinyector HP 7673 y columna capilar HP-5MS (5% fenil metil siloxano) 25 m x 0.25 mm d.i., 0.25 μm . Helio fue usado como gas portador a 1 ml min^{-1} . La temperatura del inyector, 270°C. Mismo programa de temperatura del horno que en GC-ECD. Las características del detector de masas fueron: modo de impacto (70 eV) con un multiplicador de voltaje de 1700V; temperatura de la línea de transferencia 280°C; rango de masas para las experiencias en *full scan* 50-500 m/z . El análisis se llevó a cabo mediante el modo de detección selectiva de iones (SIM).
- Cromatógrafo de gases GC 8000 Top (CE Instruments, Milan, Italy) equipado con un espectrómetro de masas de trampa de iones (Finnigan GCQ, Austin, Texas, USA) operando en modo de ionización de impacto electrónico (EI) y con un autoinyector AS 800. Las características de la columna capilar fueron: sílice fundida DB-5MS (5% fenil metil siloxano) 30 m x 0.25 mm d.i., 0.25 μm . Helio fue usado como gas portador a 1 ml min^{-1} . El programa de temperatura del horno fue el siguiente: 90°C durante 1 min, a 30°C min^{-1} hasta 180°C, a 4°C min^{-1} hasta 300°C (5 min). La temperatura del inyector, 240°C.

Volumen de inyección, 2 μl en modo *splitless*. Las condiciones experimentales del espectrómetro de masas se verán en apartados posteriores. Los análisis se llevaron a cabo mediante el modo de detección MS/MS.

La cuantificación de las muestras se llevó a cabo mediante calibrados con patrones en hexano y haciendo uso de patrones internos deuterados usando detección por GC-MS/MS.

➤ Sistema de HPLC. El esquema del sistema HPLC puede observarse en los artículos que se adjuntan a este capítulo (sección 5.2.4 y 5.2.5) y consta del siguiente equipamiento:

- Válvula de inyección (IV) Rheodyne (Cotati, CA, USA) con un bucle de 1 ml.
- Bomba isocrática de HPLC 305 Master, Gilson, USA.
- 2 válvulas de alta presión (HPV) de 6 vías con un bucle de 4 ml montado en una de ellas (VICI Valco Instruments Co. Inc.) controladas electrónicamente.
- Bomba peristáltica (PP) de tres vías (Scharlab, Barcelona) y tubo Solvent Resistant Elkay, Galway, Irlanda.
- Columna: 150 x 3.9 mm d.i., 4 μm Sílica Novapack (Waters, Milford, MS, USA).
- Detector de barrido de diodos (DAD) 2140 LKB (Bromma, Suecia).
- Colector de fracciones, FC 203B, Gilson, USA.
- Fase móvil: n-hexano o mezclas de hexano-acetato de etilo, flujo: 1 ml min^{-1} .

5.2.2. Estudio de la etapa de purificación por HPLC en fase normal

El estudio de la etapa de purificación se llevó a cabo sobre extractos de tejido adiposo humano obtenidos aplicando el procedimiento de extracción con n-hexano a 0.5-1.5 g de tejido adiposo fresco y disolviéndolo en un volumen final de 3 ml de hexano, tal y como se indica en los dos artículos adjuntos.

La optimización de los procedimientos de purificación se llevó a cabo siguiendo el esquema que se presenta a continuación:

- 1° Estudio del modelo de elución de los lípidos presentes en el tejido adiposo
- 2° Estudio del modelo de elución de patrones de los plaguicidas objeto de estudio en hexano
- 3° Aplicación del procedimiento de purificación a extractos grasos fortificados con los compuestos OCs, con objeto de seleccionar el método más apropiado para esta etapa

El objetivo final fue conseguir fracciones de HPLC en las que eluyeran los plaguicidas libres de grasas.

En primer lugar, se estudió el modelo de elución de las grasas. Para ello, se inyectó 1 ml de extracto hexánico en la columna de Silicagel utilizando como fases móviles hexano o diferentes mezclas de hexano y acetato de etilo a un flujo de 1 ml min⁻¹. El sistema HPLC utilizado permite la incorporación a la fase móvil de 4 ml de disolventes de mayor polaridad, a cualquier tiempo de elución. De este modo, se puede modificar fácilmente la fuerza eluotrópica de la fase móvil para conseguir la elución de los compuestos de mayor polaridad. Los procedimientos de purificación ensayados fueron los siguientes:

Procedimiento 1- fase móvil, hexano; min 16, 4 ml acetato de etilo.

Procedimiento 2- fase móvil, hexano; min 2, 4 ml hexano:acetato de etilo (99:1, v/v); min 16, 4 ml acetato de etilo.

Procedimiento 3- fase móvil, hexano:acetato de etilo (97.5:2.5, v/v); min 16, 4 ml acetato de etilo.

Procedimiento 4- fase móvil, hexano:acetato de etilo (95:5, v/v); min 16, 4 ml acetato de etilo.

Procedimiento 5- fase móvil, hexano:acetato de etilo (50:50, v/v); min 16, 4 ml acetato de etilo.

En los cinco procedimientos descritos se incorporaron a la fase móvil 4 ml de acetato de etilo a los 22 minutos con el objeto de regenerar la columna.

A la salida de la columna se recogieron fracciones de 1 ml, determinando el contenido de lípidos totales por espectrofotometría usando el procedimiento colorimétrico descrito por Zöllner y Kersch (1962). Se comprobó la linealidad de dicho método colorimétrico utilizando una disolución patrón de triglicéridos (Sigma diagnostics, USA) en un rango desde 0 hasta 1000 μg de lípidos. La **Figura 5.1** muestra un ejemplo de curva de calibrado del patrón de triglicéridos.

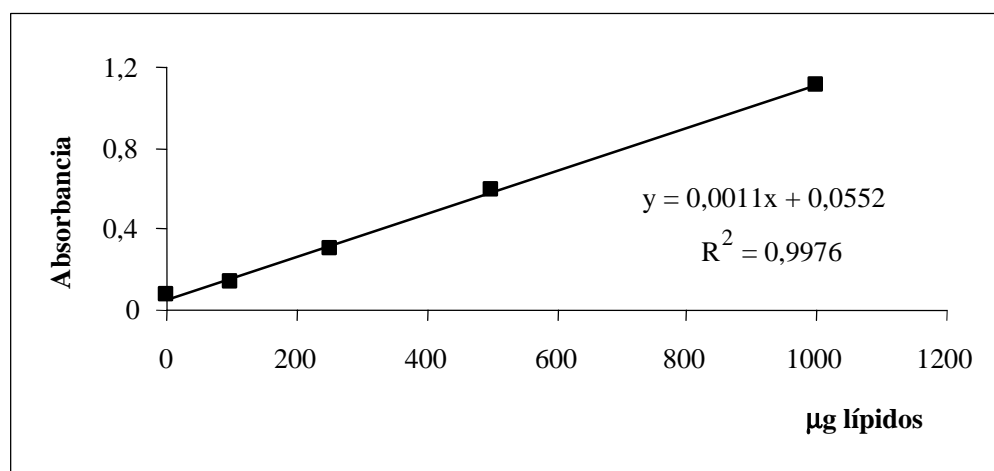


Figura 5.1. Curva de calibración de triglicéridos mediante el método colorimétrico de Zöllner y Kersch.

El siguiente paso fue la aplicación de los mismos procedimientos de purificación a 1 ml de disolución patrón de *endosulfan* y sus *metabolitos* de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. A la salida de la columna se recogieron fracciones de 1 ml que se analizaron directamente por GC, estableciéndose así los volúmenes de elución para cada compuesto.

La **Figura 5.2** muestra los modelos de elución de los diferentes presentes en el extracto de tejido adiposo tras la aplicación de los procedimientos descritos, así como la elución del *endosulfan* y sus *metabolitos* en las distintas fracciones HPLC. Como era de esperar, los procedimientos que utilizaban fases móviles y modificadores de mayor polaridad adelantaban de manera apreciable la elución de los lípidos y de los plaguicidas.

Cuando se aplicó el Procedimiento 1, en el cual se utilizó hexano como fase móvil, el único plaguicida que eluyó antes del pulso de acetato de etilo al minuto 16, fue el más apolar (α -*endosulfan* en la fracción 8). El resto de plaguicidas (más polares) eluyeron en las fracciones 17, 18 y 19, gracias a la incorporación de 4 ml de acetato de etilo al minuto 16.

En el Procedimiento 2, la incorporación de 4 ml de hexano:acetato de etilo (99:1, v/v) a la fase móvil de hexano en el minuto 2, adelantó la elución de los plaguicidas más apolares a la fracción 3 (α -*endosulfan*) y a la fracción 16 (*endosulfan éter*), mientras que el resto empezó a eluir a partir de la fracción 18.

Los Procedimientos 3 y 4, los cuales aumentaron la polaridad de la fase móvil, consiguieron adelantar la elución de los plaguicidas, pero también la de la grasa, la cual mayoritariamente eluyó entre las fracciones 3 y 6. En estos casos, el metabolito *endosulfan lactona* siguió eluyendo después del pulso de 4 ml de acetato de etilo, quedando reflejada de este modo la mayor polaridad de este compuesto.

El Procedimiento 4 permitió obtener *endosulfan éter* (fracción 5), β -*endosulfan* (fracción 9), *endosulfan sulfato* (fracción 13) y *endosulfan lactona* (fracción 19) en fracciones HPLC libres o con un bajo contenido de grasa. Sin embargo, con este procedimiento fue imposible el análisis del plaguicidas más

apolar (α -endosulfan) puesto que eluye en la fracción 3 con una gran cantidad de lípidos.

Por último, con la utilización de hexano:acetato de etilo (50:50, v/v) como fase móvil (Procedimiento 5), no se obtuvieron resultados satisfactorios porque la grasa eluyó entre las fracciones 2 y 4, juntamente con todos los analitos.

Debido a esta gran diferencia de polaridades entre los compuestos estudiados, se consideró necesario aplicar más de un procedimiento de purificación para llevar a cabo el análisis de todos los plaguicidas seleccionados. Como último paso, con el objeto de confirmar los resultados obtenidos y determinar los procedimientos más adecuados para la purificación de la matriz se aplicaron a extractos hexánicos fortificados a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada plaguicida.

PROCEDIMIENTO 1

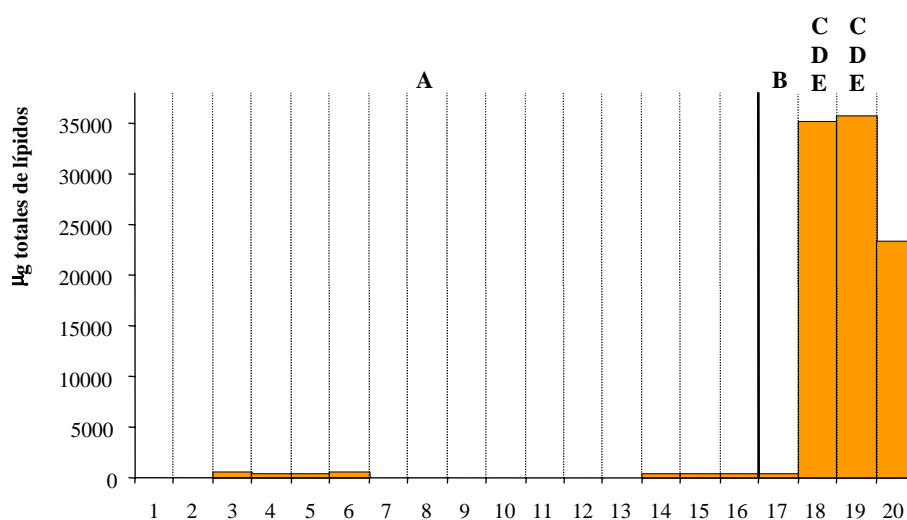
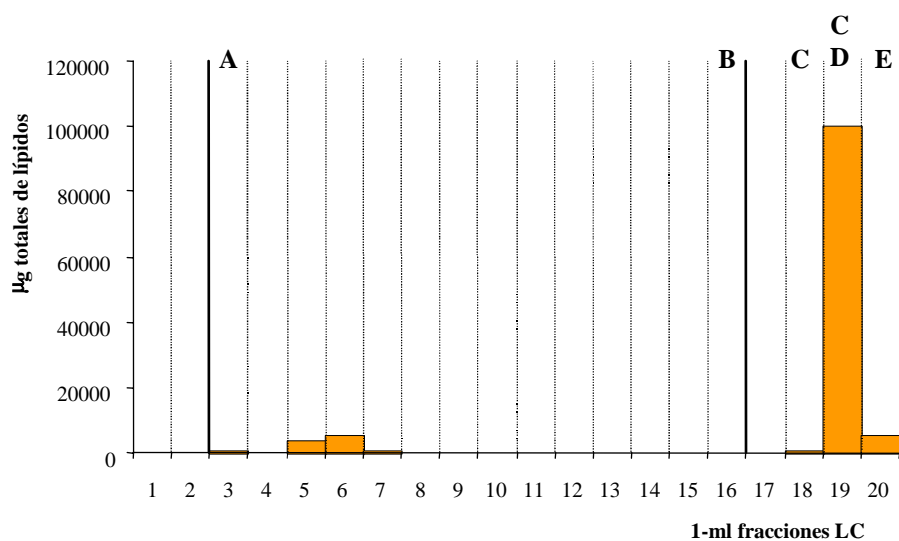


Figura 5.2. Modelo de elución de endosulfan y metabolitos y de lípidos presentes en extracto de tejido adiposo humano en columnas de HPLC-Silicagel.

(A) α -endosulfan, (B) endosulfan éter, (C) β -endosulfan, (D) endosulfan sulfato y (E) endosulfan lactona.

PROCEDIMIENTO 2



PROCEDIMIENTO 3

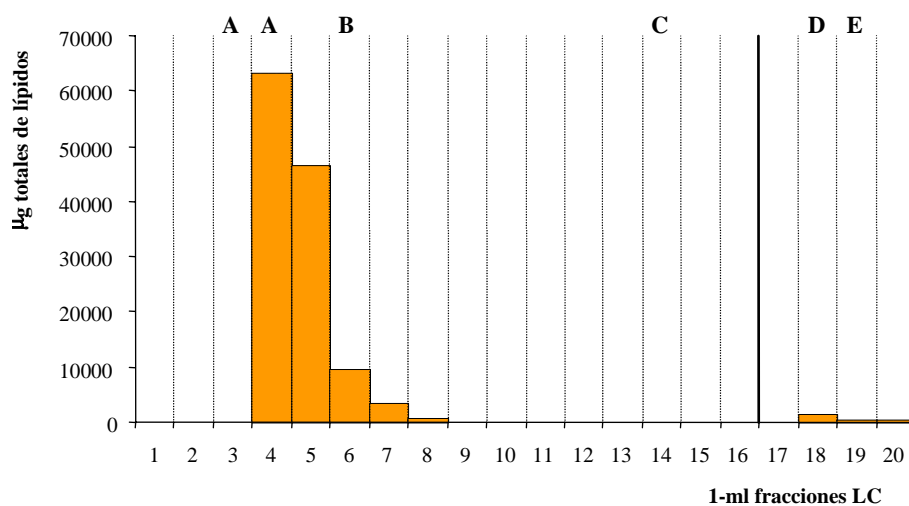
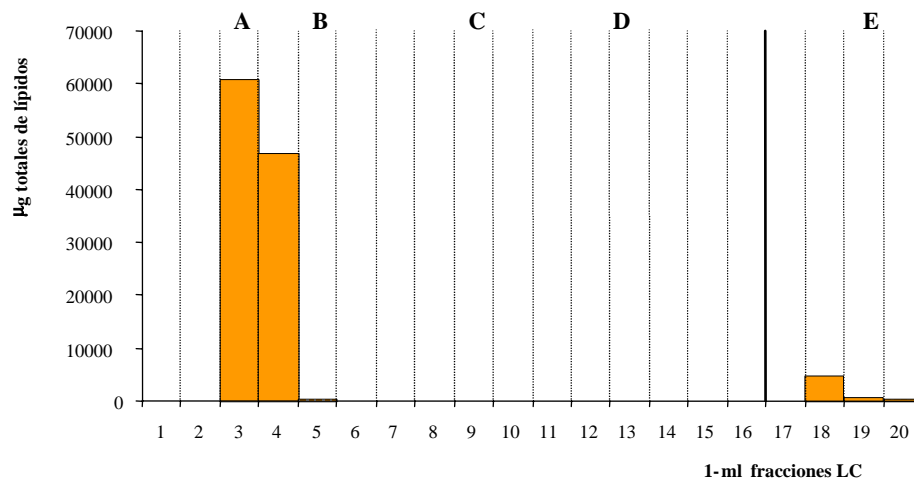


Figura 5.2 (cont.). Modelo de elución de endosulfan y metabolitos y de lípidos presentes en extracto de tejido adiposo humano en columnas de HPLC-Silicagel.

(A) α -endosulfan, (B) endosulfan éter, (C) β -endosulfan, (D) endosulfan sulfato y (E) endosulfan lactona.

PROCEDIMIENTO 4



PROCEDIMIENTO 5

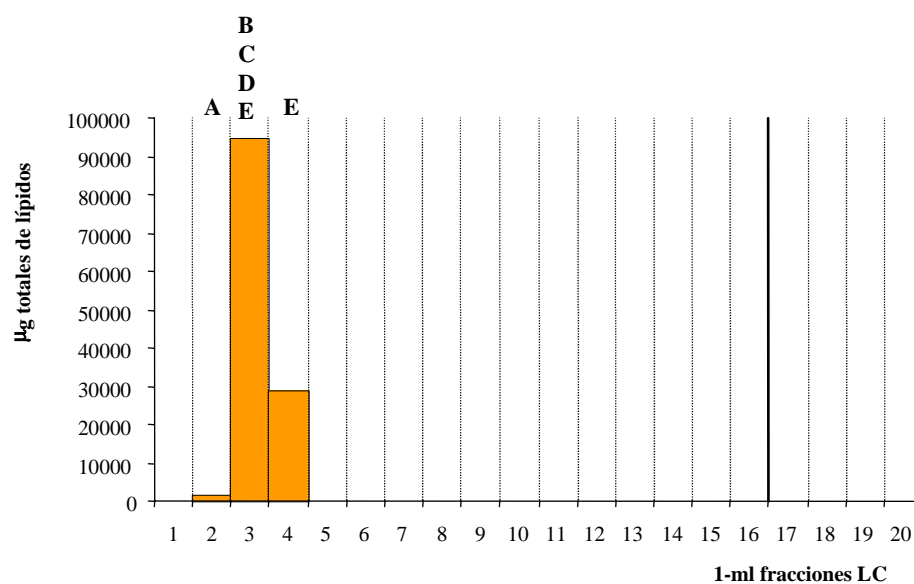


Figura 5.2 (cont.). Modelo de elución de endosulfan y metabolitos y de lípidos presentes en extracto de tejido adiposo humano en columnas de HPLC-Silicagel.

(A) α-endosulfan, (B) endosulfan éter, (C) β-endosulfan, (D) endosulfan sulfato y (E) endosulfan lactona.

La cantidad de grasa que se inyectó en el sistema HPLC para realizar estas experiencias (1 ml de extracto graso) fue de aproximadamente 140-420 mg, teniendo en cuenta que el porcentaje de grasa extraíble de tejido adiposo es de aproximadamente 84%. Por otra parte, el límite de carga para columnas capilares de GC es del orden de 600 ng (Grob *et al.*, 1991), produciéndose el deterioro de las mismas para cantidades mayores de grasa. Este parámetro se ha tenido en cuenta a la hora de elegir los procedimientos de purificación más adecuados que permitan la inyección directa de 2 μ l del eluato obtenido en fracciones de 1 ml del sistema HPLC automatizado.

Por consiguiente, para α -*endosulfan* se seleccionó el **Procedimiento 2**, en el cual eluyó en una fracción de 1 ml (fracción 3) que contenía menos de 300 μ g de lípidos. También se hubiese podido seleccionar el Procedimiento 1 puesto que eluía en una fracción libre de grasa (fracción 8), pero el tiempo de análisis comparado con el Procedimiento 2 era mayor. Para el resto de los plaguicidas, se aplicó el **Procedimiento 4** como método de purificación puesto que todos ellos eluían en fracciones de 1 ml libres de grasa, o bien con un contenido menor de 300 μ g de lípidos, como fue el caso de *endosulfa lactona* (fracción 19).

Cuando en una fase posterior se estudió la elución de patrones de otros plaguicidas OCs (*HCB*, β -*HCH* y *DDTs*) y *PCBs*, se pudo comprobar la semejanza de polaridad de éstos con α -*endosulfan*, y por tanto se optó por utilizar el mismo procedimiento (**Procedimiento 2**, en el cual eluyeron en las fracciones 3 y 4).

Como resultado de este trabajo se han publicado dos artículos científicos: uno sobre determinación de *endosulfan* y sus *metabolitos*, y otro sobre determinación de plaguicidas OCs y *PCBs*. La validación de los métodos desarrollados, incluyendo purificación por HPLC y medida final por GC-MS o GC-MS/MS (ver apartados 5.2.4 y 5.2.5), se llevó a cabo evaluando los siguientes parámetros:

Linealidad- la curva de calibración para *endosulfan* y *metabolitos* fue obtenida en el intervalo de concentración 10-1000 ng ml⁻¹ usando GC-MS; en el resto de

plaguicidas OCs, entre 5-2000 ng ml⁻¹ usando GC-MS/MS; y para PCBs, entre 5-1000 ng ml⁻¹ usando GC-MS/MS.

Exactitud- estudiada mediante ensayos de recuperación (n=5) analizando muestras de tejido adiposo fortificado a tres niveles de concentración: *endosulfan* y *metabolitos* (50, 500 y 5000 ng ml⁻¹), resto de plaguicidas OCs y PCBs (50, 500 y 2000 ng ml⁻¹).

Precisión- determinada como la repetibilidad en un mismo día (n=5) de las recuperaciones a cada nivel de fortificación ensayado.

Límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LQ)- obtenidos cuando la señal fue 3 y 10 veces, respectivamente, el ruido de fondo en el cromatograma correspondiente al nivel más bajo de concentración para el analito.

5.2.3. Optimización del método cromatográfico GC-MS/MS

En este apartado se abordó la determinación de los compuestos OCs, tanto insecticidas OCs como PCBs, mediante la técnica GC-MS/MS en modo de ionización por impacto electrónico (EI). Por lo que respecta a los plaguicidas OCs, se tomaron los mismos parámetros optimizados en la sección 4.2.5.3 para unas condiciones de ionización de 220°C, como temperatura de la fuente, y 30 mTorr de presión. Para el estudio de las condiciones de fragmentación de los PCBs, se siguieron los mismos pasos de optimización considerando la selección del ión precursor, la ventana de aislamiento, el rango de masas y el voltaje de excitación.

En primer lugar, se estudiaron los espectros de masas de cada uno de los compuestos usando disoluciones patrones preparadas en n-hexano. En este caso, debido a la posibilidad de obtener un extracto purificado de tejido adiposo de un volumen adecuado (fracciones HPLC 3 y 4), las condiciones MS/MS se aplicaron también a la determinación de los analitos en la matriz objeto de estudio. Esta experiencia permitió comparar el comportamiento de los analitos, en cuanto a señal y espectros fragmentados, en patrones hexánicos y en la matriz real.

La **Figura 5.3** muestra un ejemplo de dos cromatogramas MS/MS y las áreas correspondientes a cada uno de los 7 PCBs estudiados en patrón hexánico fortificado a un nivel de 50 ng ml^{-1} , y en matriz de tejido adiposo (extracto 0.5 g ml^{-1}) fortificada a 100 ng g^{-1} tras la purificación (concentración final en el extracto, 50 ng ml^{-1}). Como puede observarse en la figura, las áreas de los picos mostraron una cierta similitud, aunque las correspondientes al cromatograma en matriz fueron ligeramente superiores. Este hecho fue debido a la existencia de PCBs, a niveles inferiores a 10 ng g^{-1} , en el blanco de tejido adiposo utilizado para la comparación. En el caso de los plaguicidas OCs, la comparación de la señal no fue tan sencilla puesto que el blanco de tejido adiposo contenía los plaguicidas OCs estudiados a niveles de concentración mucho mayores que el nivel de fortificación ($100\text{-}600 \text{ ng g}^{-1}$). Por otra parte, cuando se compararon los espectros de fragmentación para cada compuesto en patrón hexánico y en matriz, no se observó ninguna diferencia. Las **Figuras 5.4** y **5.5** muestran los espectros MS/MS correspondientes a cada uno de los compuestos OCs estudiados en matriz de tejido adiposo.

Los dos métodos desarrollados en el Capítulo 5, uno relativo a *endosulfan* y *metabolitos*, y otro a plaguicidas OCs y PCBs, se aplicaron a muestras reales de tejido adiposo abdominal correspondientes a dos grupos poblacionales diferentes. *p,p'*-DDE, HCB y β -HCH fueron los plaguicidas que se detectaron con mayor frecuencia, y además a altos niveles de concentración. Residuos de los metabolitos *endosulfan éter* y *endosulfan sulfato* también se encontraron en algunas muestras del grupo de mujeres de Almería en niveles menores de concentración ($5\text{-}27 \text{ ng g}^{-1}$). Los PCBs con mayor grado de cloración (138, 153 y 180) fueron los más detectados en el análisis del grupo poblacional de la provincia de Castellón. Para más detalles, se pueden consultar los artículos científicos mostrados en los apartados 5.2.4 y 5.2.5.

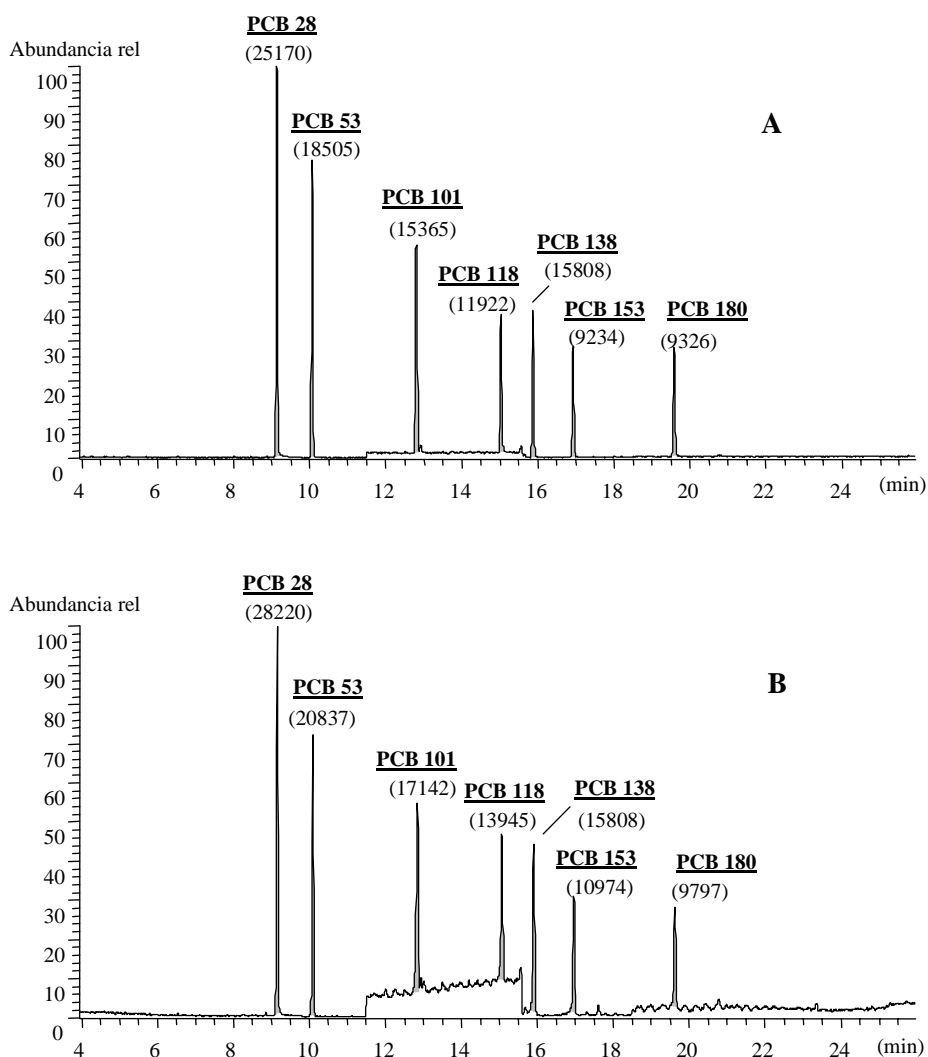
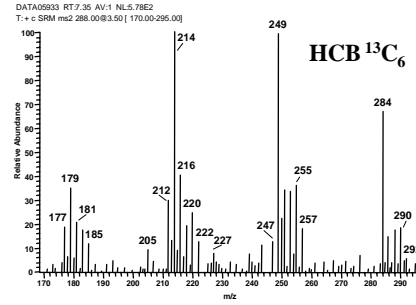
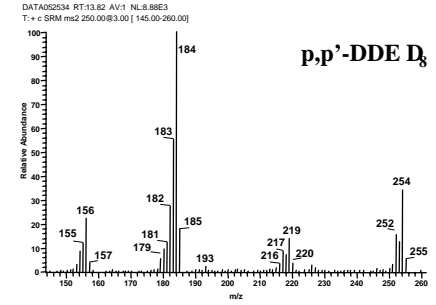


Figura 5.3. Cromatogramas MS/MS correspondientes a la mezcla de 7 PCBs en patrón hexánico a 50 ng ml^{-1} (A) y en extracto purificado (0.5 g ml^{-1}) de tejido adiposo, fortificado a 100 ng g^{-1} (B). Los valores entre paréntesis corresponden a las áreas de los picos.

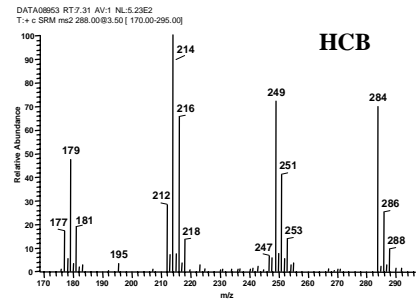
3.50 V (288 ±5)



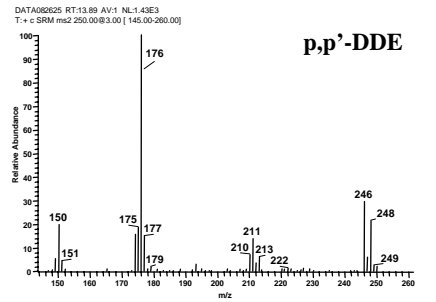
3.00 V (250 ± 5)



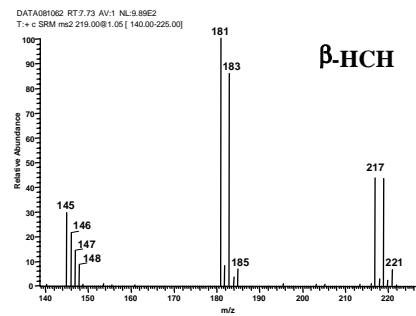
3.50 V (288 ±5)



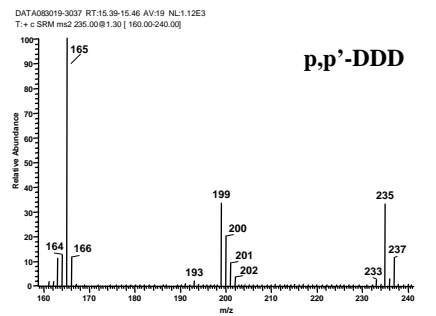
3.00 V (250 ± 5)



1.05 V (219 ±2.5)



1.30 V (235 ± 2.5)



1.70 V (235 ±4)

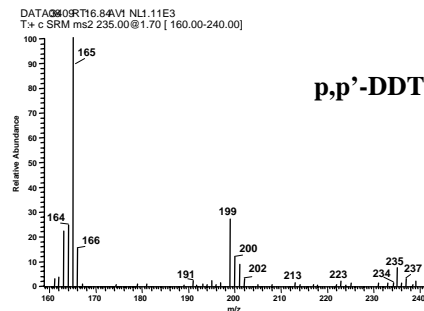
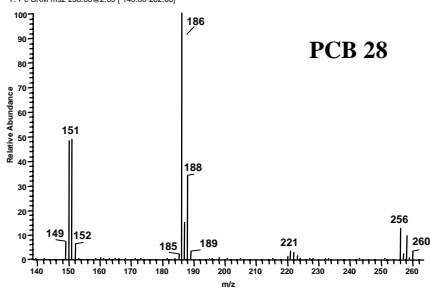


Figura 5.4. Espectros MS/MS correspondientes a plaguicidas OCs en extracto purificado de tejido adiposo humano.

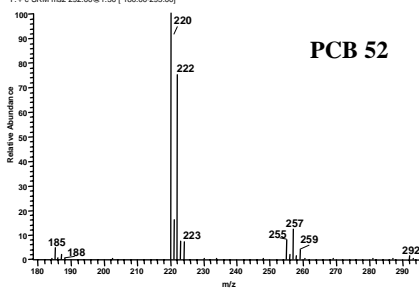
2.00 V (258 ± 2)

DATA071431 RT:9.16 AV:1 NL:4.16E3
T: + c SRM ms2 258.00@2.00 [140.00-262.00]



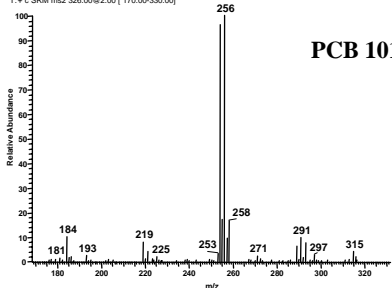
1.50 V (292 ± 2)

DATA071671 RT:10.10 AV:1 NL:3.80E3
T: + c SRM ms2 292.00@1.50 [180.00-296.00]



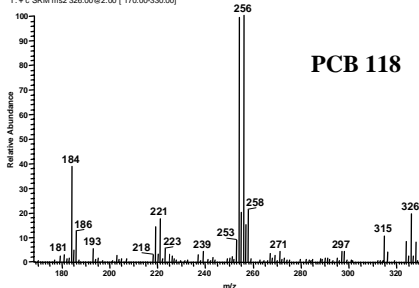
2.00 V (326 ± 2)

DATA02352 RT:12.84 AV:1 NL:2.00E3
T: + c SRM ms2 326.00@2.00 [170.00-330.00]



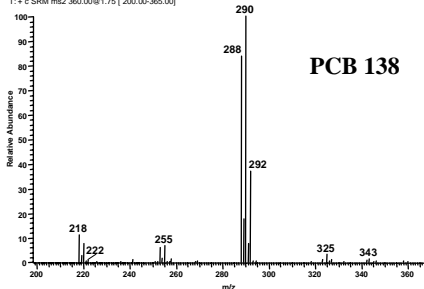
2.00 V (326 ± 2)

DATA072875 RT:15.07 AV:1 NL:1.16E3
T: + c SRM ms2 326.00@2.00 [170.00-330.00]



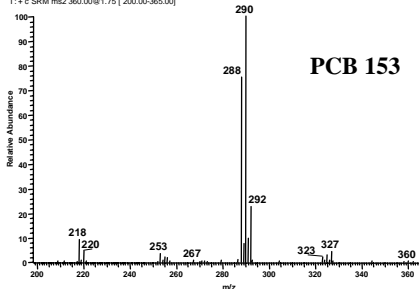
1.75 V (360 ± 4)

DATA073073 RT:15.91 AV:1 NL:1.73E3
T: + c SRM ms2 360.00@1.75 [200.00-365.00]



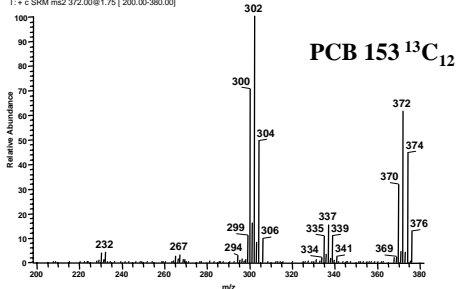
1.75 V (360 ± 4)

DATA073325 RT:16.96 AV:1 NL:1.39E3
T: + c SRM ms2 360.00@1.75 [200.00-365.00]



1.75 V (372 ± 4)

DATA063230 RT:16.99 AV:1 NL:2.04E4
T: + c SRM ms2 372.00@1.75 [200.00-380.00]



2.25 V (396 ± 4)

DATA073948-3960 RT:19.59-19.65 AV:13 NL:6.09E2
T: + c SRM ms2 396.00@2.25 [220.00-402.00]

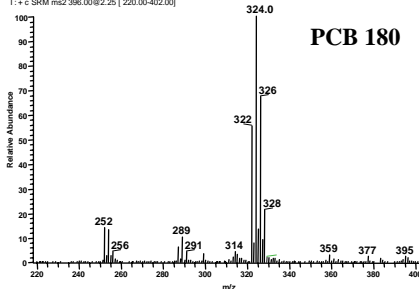


Figura 5.5. Espectros MS/MS correspondientes a plaguicidas PCBs en extracto purificado de tejido adiposo humano.

5.2.4. Artículo científico 5: J Anal Toxicol (en prensa)**MULTIRESIDUE DETERMINATION OF ENDOSULFAN AND METABOLIC DERIVATIVES IN HUMAN ADIPOSE TISSUE USING AUTOMATED LIQUID CHROMATOGRAPHY CLEAN UP AND GAS CHROMATOGRAPHY ANALYSIS**F. Hernández*, E. Pitarch, R. Serrano, J.V. Gaspar, N. Olea¹

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

¹ Laboratory of Medical Investigations, Dept. Radiology, University of Granada, 18071 Granada, Spain**Abstract**

A multiresidue method based on normal-phase LC clean up and GC/ECD/MSD analysis has been developed for the determination of endosulfan and its main metabolic derivatives in human adipose tissues. Analytes were extracted by dissolving the fat samples in n-hexane, and the hexanic extracts were directly injected on the silicagel column of the automated LC clean up system. Purified LC extracts were analysed by GC-ECD or GC-MSD, without any solvent exchanges or pre-concentration steps. The high efficiency of the HPLC clean up for the elimination of fats allowed to reach detection limits for all analytes at the low ng/g concentration level.

The optimized overall analytical procedure was applied to 18 selected human mammary adipose and abdominal fat tissue samples. *p,p'*-DDE, HCB and β -HCH were the most frequently detected compounds, and residues of endosulfan-sulfate and -ether were also found in several samples. All findings were confirmed by an additional GC/MS-MS analysis of the LC sample extracts.

Introduction

Currently, organochlorine compounds (OCs) including pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs), are identified in a wide variety of environmental samples such as fish and fish foods (1-6), marine mammals (7, 8), birds (9) and terrestrial animals (10), which demonstrates that these compounds are dispersed in the biotic compartment of the environment, world-wide. Due to their high liposolubility, OCs tend to bioaccumulate along the food chain involving a wide range of trophic levels.

Humans are exposed to OCs through diet and other ways, especially through different types of exposure at the workplace, and are usually detected in human tissues and fluids. Thus, compounds as β -HCH, *p,p'*-DDE or hexachlorobenzene (HCB) are present in most of serum samples analysed (11-13). Also, individuals employed in intensive greenhouse agriculture in Southern Europe have been shown to be subject to high exposure levels (14, 15). Some of these chemicals accumulate and persist in adipose tissue due to their lipid solubility and resistance to metabolism, reaching levels 200-1000-fold those found in serum (16). Therefore, fat deposits can maintain elevated levels of OCs in the circulation for years, even when there has been no exposure during this period.

Serum levels of OCs are frequently used as biomarkers of exposure, on the assumption that they represent fat reservoir content and are reliable indicators of total body burden. However, a perfect relationship between serum levels and adipose tissue content is not always evident, and several authors have recommended the direct measurement of adipose tissue content (16, 17).

Besides, many of these OC pollutants, as DDT and metabolites, metoxychlor, kepone, toxaphen, dieldrin or endosulfan, possess sex steroid activity (18) and has been studied their role in the increasing incidence of breast cancer in women and reproductive problems in men (14, 19, 20), what become it in a potential danger to the public health.

Although the use in agricultural activities of some of OC pesticides such as DDT, lindane or chlordane has been banned or restricted, others as endosulfan are still used currently in developed countries and frequently found in the environment in Spain (21, 22) and in human tissues and fluids of people working in agriculture in Southern Spain (15, 23, 24).

The endosulfan isomers α and β , present in the technical product used in agricultural activities, are biotransformed by oxidation metabolic routes that take place within the organisms rendering metabolic derivatives in the biological tissues, like endosulfan-sulfate, -alcohol (diol), -ether or -lactone. Therefore, it is necessary a feasible and rapid analytical methodology to analyse endosulfan and their metabolites to investigate the presence of these compounds in human tissues, in order to prevent negative effects on public health. In this type of analysis, the sample material is very difficult to obtain and only a very small amount of sample is available. Hence, very specific and sensitive analytical methodology is required for the identification and quantitation of these compounds. Moreover, multiresidue analysis is necessary in order to analyse both parents and metabolites in one sample.

Conventional methods for the analysis of OCs in fatty samples, and particularly in human adipose tissue, usually involve several steps including extraction, elimination of the fat using acid digestion (25), column adsorption chromatography (26) or solid phase extraction (27), and analytical determination by GC-ECD or GC-MSD.

Normal phase liquid chromatography (NPLC) was used already in our laboratory for the analysis of OCs in whale blubber and presented several advantages: short clean up time, high degree of automatization and high efficiency in the elimination of the fat, which joined to a sensitive determination by GC led to low detection limits, generally below 5 ng/g (fresh weight) (7, 8). This technique has also been used by some authors for the analysis of human adipose tissues (28, 29), improving former procedures based in other clean up techniques, that include several steps thus increasing the possibility of analytical errors.

The aim of this work was to develop feasible and rapid multiresidual analytical methodology for the determination of endosulfan and their main metabolic derivatives in human adipose tissue samples. This multiresidual analysis is specially problematic due to the different polarities of the analytes investigated and also to the wide range of polarities of fats, which makes the separation difficult.

Experimental

Chemicals

Endosulfan isomers (α , β) and their metabolic derivatives (-ether, -sulfate, -alcohol (diol) and -lactone) were included in this study. Reference materials from *Dr. Ehrenstorfer* (Promochem, Wesel, Germany) with a purity 97-99.7% were used for the preparation of stock solutions by dissolving standards in acetone. These stock solutions (around 500 $\mu\text{g/mL}$) were stored in a freezer at -20°C . Working solutions for sample fortification and for injection in the LC and the GC system were prepared by diluting stock solutions in n-hexane. Acetone remaining in working and standard solutions was removed by evaporation at 40°C under N_2 stream. Ethyl acetate and n-hexane, ultra-trace quality, were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Anhydrous sodium sulfate of pesticide residue quality (Baker, Deventer, Holland) was dried for 18 hours at 300°C before use.

The derivatization agent used was N-(tert-butyldimethylsilyl)- N-methyl trifluoroacetamide (MTBSTFA) with a purity 97% and was obtained from Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

Sample material

Eighteen women with different diseases who were undergoing surgical treatments were included in the study; the mean age was 53 year (range 35-65). Most of them lived in rural areas, and only 6 women lived in urban areas. Half of the samples were adipose tissue obtained from biopsies taken in breast surgery. The

other nine samples were obtained from abdominal surgery. Adipose tissue was placed into a glass vial on ice, coded and frozen to -70°C , always within 30 min of being excised, and stored at the same temperature until they were processed. An homogenate of mammary adipose tissue previously tested and confirmed that it did not contain endosulfan residues was used as blank tissue for optimisation of the procedures and validation experiments.

LC instrumentation

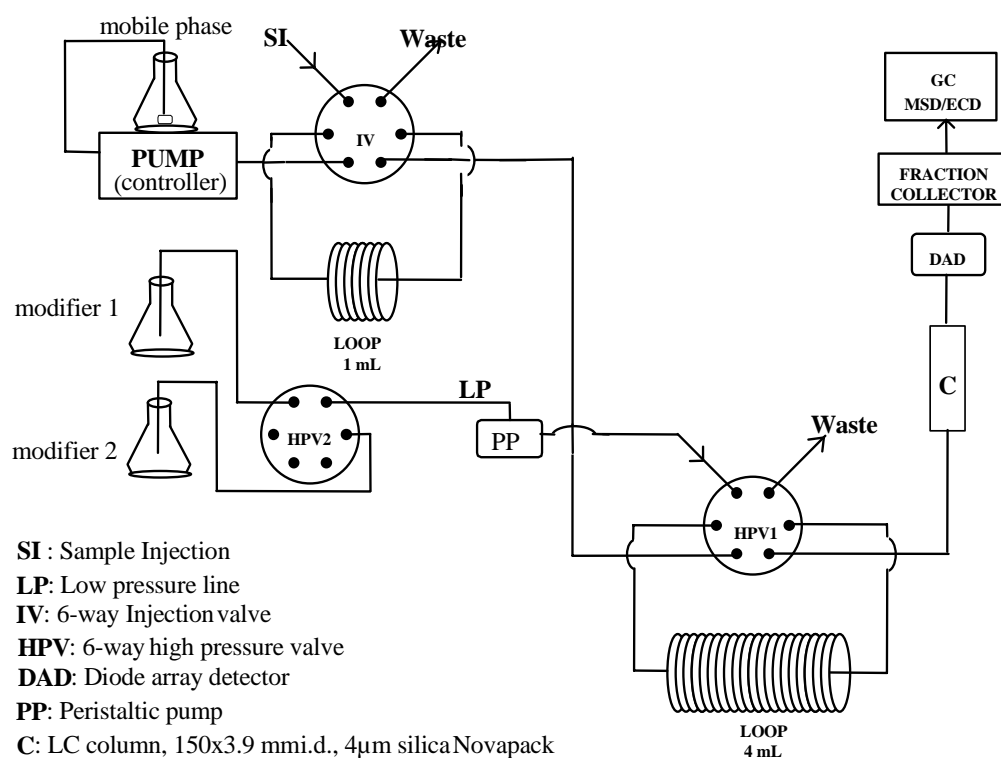


Figure 1. Scheme of the automated NPLC system used in this work.

A schematic representation of the LC system is shown in **Figure 1**. It was constructed with the following equipment: *LC Pump*: Master 305 piston pump, Gilson (Middleton, USA); *Peristaltic pump*: LKB (Bromma, Sweden), solvent flex

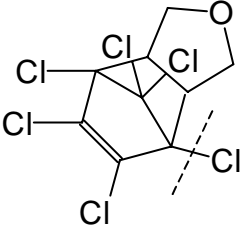
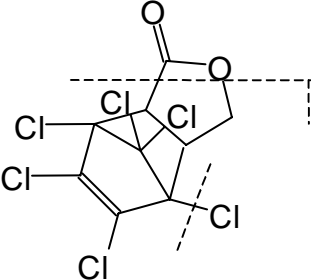
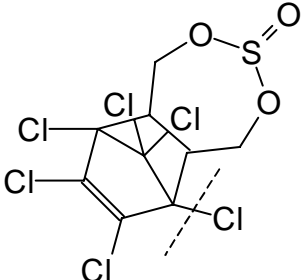
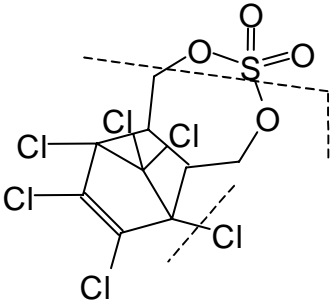
tubing (solvent resistant) ELKAY (Galway, Ireland); *Valves*: two 6 way high-pressure valves, VICI Valco, Europe Instruments (Schenkon, Switzerland), electronically controlled; *Sampler*: injection valve Rheodyne (Cotati, CA, USA) with 1.0-mL loop; *Column*: 150 x 3.9 mm I.D. packed with 4 μm silica Novapack (Waters, Milford, MA, USA); *Detector*: 2140 Rapid Spectral Detector LKB; *Fraction collector*: 2212 Helirac, LKB (Bromma, Sweden); *Mobile phases*: n-hexane and n-hexane/ethyl acetate mixtures; *Flow rate*: 1 mL/min.

GC instrumentation

GC-ECD analysis was performed on a Hewlett-Packard 5890 series II (Avondale, USA), equipped with an HP 7673 autosampler. Splitless injections of 2 μL were performed on a fused silica HP Ultra 2 capillary column coated with cross-linked 5% methyl-silicone with a length of 25 m x 0.20 mm I.D. and a film thickness of 0.33 μm . Helium was used as carrier gas at a flow of 0.5 mL/min and nitrogen at 60 mL/min. The injector and detector temperatures were 270 and 300°C, respectively. The oven temperature was programmed as follows: 80°C (0.5 min), 20°C/min to 230°C, 5°C/min to 260°C, 20°C/min to 280°C with a final hold for 7 min.

GC-MS operating in electron impact (EI) mode was performed with a Hewlett-Packard 5890 series II which was equipped with a HP 7673 autosampler and a MSD 5971 mass selective detector. Splitless injections of 2 μL were performed into a fused silica HP-5MS capillary column coated with cross-linked 5% phenyl methyl siloxane with a length of 30 m x 0.25 mm I.D. and a film thickness of 0.25 μm . Helium was applied as carrier gas at a flow of 1 mL/min. The injector temperature was 270°C, while the temperature program used was: 80°C (0.5 min), 20°C/min to 230°C, 5°C/min to 260°C, 20°C/min to 280°C with a final hold for 7 min. MSD conditions were as follows: transfer line temperature 280°C; 70 eV electron impact; electron multiplier voltage 1700V; mass range for full-scan experiments 50-500 m/z. Several m/z values were used for selected ion monitoring (SIM) mass detection as shown in **Table 1**.

Table 1. Selected ions for analyte determination by mass spectrometry (electron impact) single ion monitoring.

Compound	Structure	Selected Ions	Time (min)
<i>Endosulfan-ether</i>		[-1Cl] 307 [-3Cl] 239	3.00-10.50
<i>Endosulfan-lactone</i>		[-CO ₂ , -1Cl] 277	10.50-11.50
α, β <i>Endosulfan</i>		[-2Cl] 339 [-6Cl] 195	11.50-13.40
<i>Endosulfan-sulfate</i>		[-1Cl] 386 [-SO ₃ , -2Cl] 272	13.40-20.00

GC-MS/MS (EI and chemical ionization (CI) modes) were performed with a GC 8000 Top/ GCQ. The oven temperature was programmed as follows: 90°C (1 min), 30°C/min to 180°C, 4°C/min to 270°C, with a final hold for 7 min. Mass detector (EI) characteristics were as indicate in **Table 2**. Splitless injections of 2 µL were performed into a fused silica DB-5MS capillary column coated with cross-linked 5% phenyl methyl siloxane with a length of 30 m x 0.25 mm I.D. and a film thickness of 0.25 µm. The injector temperature was 240°C.

Table 2. Programme for MS/MS detection of studied compounds.

Compound	parent ion	time	window	mass range	voltage (V)
HCB	284	3.50	5	170-290	3.00
β and γ-HCH	219	8.00	5	140-225	1.05
Endosulfan-ether	241	9.00	8	165-245	1.50
Endosulfan-lactone	277	12.00	8	165-282	1.75
α-Endosulfan	241	13.00	8	165-245	2.50
p,p'-DDE	246	14.20	8	145-250	2.50
β-Endosulfan	241	16.00	8	165-245	2.50
p,p'-DDD	235	16.25	5	160-240	1.30
Endosulfan-sulfate	289	17.00	8	175-295	1.60
p,p'-DDT	235	17.75	5	160-240	1.30

Methods

Sample preparation and extraction

Samples were thawed at room temperature. Between 0.5 and 1.5 g of wet tissue were chopped and homogenised with 5-10 g anhydrous sodium sulphate, and extracted twice with 5 mL of n-hexane shaking in vortex during 3 min. After filtration, the extract was pre-concentrated under a gentle nitrogen stream at 40°C

and the final residue was adjusted to 3 mL with n-hexane. **Figure 2** shows a scheme of the whole analytical procedure.

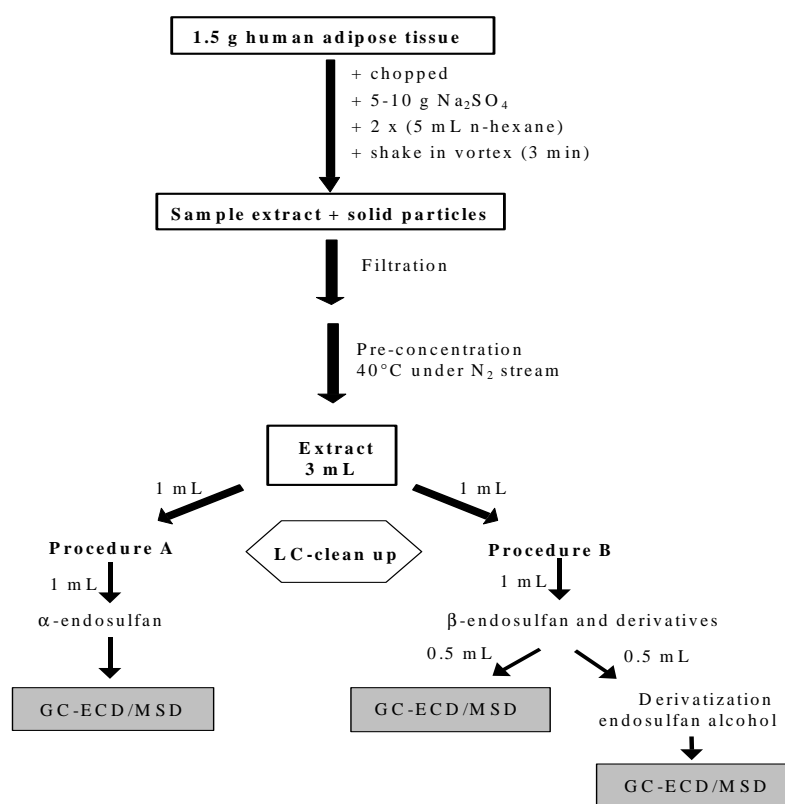


Figure 2. Scheme of the whole analytical procedure applied for the determination of endosulfan and metabolites in human adipose tissue.

General clean-up procedure

1 mL of the hexane extract was injected into the LC system using the 6-way injection valve (IV). The mobile phase (n-hexane or mixtures n-hexane/ethyl acetate) was set at a flow rate of 1 mL/min and diode array detector (DAD) was used at 280 nm for monitoring lipids elution on-line. The modifier solvent (hexane:ethyl acetate mixtures or ethyl acetate) loaded in the 4-mL loop mounted on the HPV1 valve was introduced at different programmed times in order to increase the polarity

of the mobile phase. The peristaltic pump (PP) (2 mL/min) was used for loading the 4-mL HPV1 loop with modifier solvents through a low pressure line (LP). The valve HPV2 allowed changing the modifier (**Figure 1**).

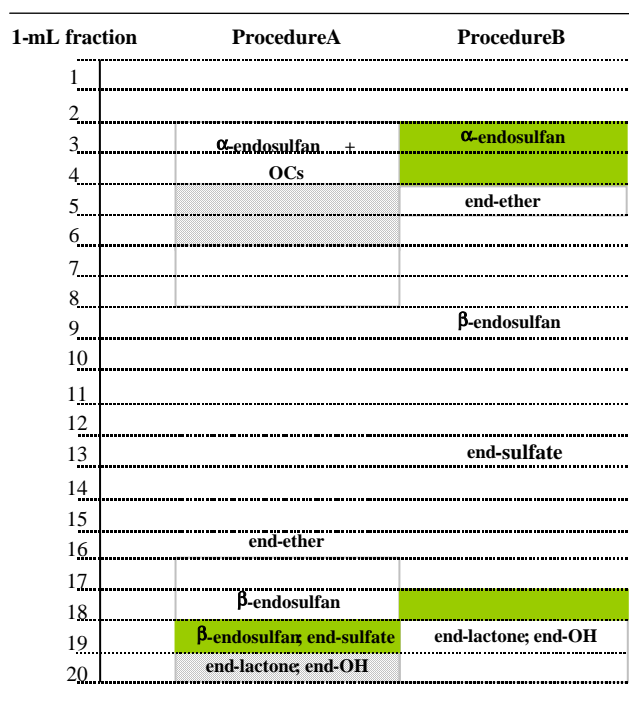
1-mL LC fractions were collected by means of the fraction collector in order to investigate both the fat and pesticides elution patterns, after the LC clean-up.

The whole procedure was completely controlled from the LC pump. The elution procedures assayed used mobile phases in increasing polarity ranged from hexane to hexane:ethyl acetate (50/50, v/v). After purification of sample extracts during 20 minutes, each LC procedure was programmed to inject 4-mL ethyl acetate at 22 minutes in order to clean the column of remainder fats. Elution patterns of pesticides and lipids were reproducible during at least two months of routine analysis.

Recommended clean-up procedure

Recommended clean-up procedures for endosulfan isomers and metabolites analysis in human adipose tissue were as follows (**Figure 3**):

α-endosulfan (Procedure A) - For the determination of *α-endosulfan* 1-mL hexanic sample extract was injected into the LC system, using n-hexane as mobile phase (flow: 1 mL/min). After 2 minutes, 4-mL n-hexane:ethyl acetate (99:1, v/v) was injected by using the 4-mL loop mounted on the HPV1 valve and then, a pulse of 4-mL ethyl acetate was introduced at 16 minutes of elution (beginning of fraction 17). In the LC-fraction collected between minute 2.5 and 3.5 (between fraction 3 and 4) eluted *α-endosulfan*. Silicagel column was regenerated by a 4 mL ethyl acetate flush step at 22 minutes. Other OCs and metabolites (PCBs, DDTs, HCHs and HCB) eluted, applying this procedure, between minute 2 and 4 (fractions 3 and 4).



* fractions 3 and 4 contain α -endosulfan and other OCs (DDTs, HCB, HCHs)

ProcedureA: f.m. hexane, 2 min hexane/ethyl acetate 1% 4 mL, 16 min ethyl acetate 4 mL

ProcedureB: f.m. hexane/ethyl acetate 5%, 16 min ethyl acetate 4 mL

- fractions with a fat content less than 300 ng/ μ L
- fractions with a fat content between 300-5000 ng/ μ L
- fractions with a fat content more than 5000 ng/ μ L

Figure 3. Elution pattern of endosulfan residues and lipid in human adipose tissue by applying the recommended clean-up procedures.

β -endosulfan and metabolites (Procedure B) - For the determination of β -endosulfan, endosulfan-ether, endosulfan-sulfate, endosulfan-alcohol and endosulfan-lactone, 1-mL hexane extract was injected into the LC system, using n-hexane:ethyl acetate 95:5 as mobile phase (flow: 1 mL/min) and a pulse of 4-mL ethyl acetate was introduced at 16 minutes of elution by using the 4-mL loop mounted on the HPV1 valve. Analytes eluted as follows: endosulfan

ether between minute 4 and 5 (fraction 5), β -endosulfan between minute 8 and 9 (fraction 9), endosulfan-sulfate between minute 12 and 13 (fraction 13), endosulfan-alcohol and -lactone between minute 18 and 19 (fraction 19). Silicagel column was regenerated by a 4 mL ethyl acetate flush step at 22 minutes.

GC analysis

Linearity of response of the analytes studied was proved in a concentration range from 10 to 1000 ng/mL for GC/ECD and from 10 to 5000 ng/mL for mass spectrometry.

The 1-mL LC fractions containing pesticides were directly injected into the GC system using detection by ECD or MS without any preconcentration step. Quantitation was carried out by means of external standard method, using SIM mode for MS detection. Endosulfan-alcohol had to be derivatized prior to its determination by GC: the silyl derivative (endosulfan-alcohol TBDMS) was analysed by GC-ECD, but its determination with GC-MS (EI) was not satisfactory and the use of negative chemical ionization (NCI) technique would have been required.

GC-MS/MS was only used as additional confirmation of analytes detected in real-world samples. MS/MS detection was performed by isolation of the corresponding parent ion for each compound inside the trap followed by application of an adequate excitation voltage for its subsequent fragmentation (see **Table 2**). The parent ions were selected considering the ions with high m/z values but also the chromatographic signals obtained after its isolation in the ion trap. Daughter ions obtained were scanned over a characteristic mass range leading to the MS/MS spectrum. Isolation and excitation conditions were optimized and selected in order to obtain characteristic MS/MS spectra with fragmentation patterns rich enough to allow the accurate identification of analytes detected. Therefore, the confirmation of

the residues detected in the adipose samples was made on the basis of the mass spectrum obtained from fragmentation of parent ions.

Validation study

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

linearity- the calibration curve for ECD was obtained by analyzing standard solutions by triplicate at 6 concentrations between 10 and 1000 ng/mL; for MSD, 8 concentrations between 10 and 5000 ng/mL were used.

accuracy- the accuracy was studied by mean of recovery assays, analysing representative samples fortified at three concentrations levels (50, 500 and 5000 ng/g, fresh weight, n=5 each).

precision- the precision of the method was determined as the repeatability (n=5) of the recoveries at each fortification level within and between days.

selectivity- the selectivity of the method was based on the appropriate selection of ions for the detection of each analyte by mass spectrometry single ion monitoring mode.

limit of detection- the limit of detection (LOD) was obtained when the signal was three times the background noise in the chromatogram at the lowest analyte concentration assayed.

Derivatization of endosulfan alcohol

500 μL of the LC-fraction containing endosulfan alcohol (fraction 19, *Procedure B*) were transferred into a 2-mL sample vial. 100 μL of MTBSTFA were added and the tightly closed vial was placed in water at 70°C for 30 minutes. 400 μL of toluene were added after reaching room temperature and mixed by shaking. The derivatized solution was injected into GC system for analytical determination.

Determination of fat

The total fat content in the sample extracts was determined by gravimetry, by evaporating the hexanic sample extracts at 95°C until constant weight. The low amount of fat in the LC fractions made necessary the use of a colorimetric method, that allowed the determination of fat at µg level. The colorimetric method used for total lipids determination is based on the sulpho-phosphovainilline reactivity (30). Triacylglycerids calibration solution (Sigma, St Louis, Missouri, USA) was used as standard. Calibration curve was performed between 0 and 1000 µg.

Results and Discussion

Firstly, lipid and pesticide elution patterns in the normal phase LC system were investigated. Different LC procedures using mobile phases with increasing eluotropic strength (see General Clean-up procedure) were applied separately to 1-mL hexanic extracts of adipose tissue (0.5 mg tissue per mL) and to 1-mL hexane standard solutions containing 1 µg/mL each pesticide. After studying the elution patterns of lipids in the blank sample and those of pesticide standards in the silicagel LC column, the results obtained were confirmed by application of the clean-up procedures to hexanic sample extracts fortified with pesticides.

Previous results obtained on marine organisms, including mammals (7, 31) showed a wide range of polarities of the lipids in these samples, leading to a different behaviour in the NPLC elution. In human adipose tissue, great differences in polarity were also found for lipids, as **Figure 3** shows. Percentage of extractable fat was very similar in both kinds of samples (mammary and abdominal) and was found to be $84 \pm 9\%$.

As regards the analytes investigated, 1-mL of mixed standard solutions containing 1 µg/mL of each pesticide were injected into the LC system. The 1-mL fractions collected were directly analysed by GC. Mobile phases with higher eluotropic strength accelerated the elution of analytes, decreasing the clean up time,

but unfortunately, pesticides eluted together with fat in most of cases. α and β endosulfan and derivatives eluted in well different LC fractions under all conditions investigated due to their differences in polarities. Liquid chromatographic separation of analytes and lipids was difficult, and it was not feasible to obtain a good clean-up in only one run. As **Figure 3** shows, the less polar α -endosulfan eluted well separated from the more polar endosulfan sulfate, lactone or alcohol. Under these circumstances, we focussed our work on the development of two separate clean-up procedures that allowed the analysis of the less polar analytes by one side and the more polar by the other, and directly injecting the fat-free LC-fractions in the gas chromatograph.

In order to select the more suitable clean-up conditions, we considered 600 ng as the maximum amount of lipids allowable for injection in the capillary GC column (32). Our experience also confirms that sample extracts with fat content close to 600 ng can be injected in the GC system, obtaining clean chromatograms with low background signal and allowing quantitation of chromatographic peaks at low concentration levels.

Using the clean-up procedure A, α -endosulfan eluted in the LC fraction collected between minute 2.5 and 3.5 containing less than 300 ng/ μ L (equivalent to 600 ng in a 2- μ L injection into the GC). The rest of compounds investigated eluted much later (fractions 17-20), in most of cases together with an excessive amount of fat. For these compounds another clean-up procedure was selected. We also proved that α -endosulfan coeluted with other OCs as DDTs (*p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDT), HCHs (lindane and isomers), HCB and PCBs, in such a way that slightly increasing the volume of the LC fraction (collecting fractions 3 and 4) we could determine all these compounds in adipose tissue samples.

β -endosulfan and other metabolites could be obtained in fat-free LC fractions (or with a fat content less than 300 ng/ μ L) using the clean-up procedure B. The fraction 19, containing endosulfan-lactone and -alcohol, was separated in two vials:

one to directly determine endosulfan-lactone and the other to derivatize the alcohol by means of a silylation process.

The application of the LC clean-up procedures to hexanic sample extracts fortified with pesticides and to pesticide standards in hexane showed that the behaviour of pesticides in the clean-up step was not dependent on the matrix, as they eluted in the same fractions.

The overall analytical procedure -including extraction with n-hexane, preconcentration, application of the automated silicagel clean-up procedure and final determination by GC-ECD and GC/MSD, was validated by applying it to human adipose tissues free of endosulfan residues (used as a blank) and fortified at three different levels (5000, 500 and 50 ng/g, fresh weight). **Table 3** shows recoveries and coefficients of variation (n=5) for endosulfan and metabolites calculated from ECD at three levels assayed and from MSD at the two lowest fortification levels. Most of recoveries were satisfactory with mean values higher than 80 %, except for α and β -endosulfan at the lowest fortification level (probably due to the proximity to the limits of detection values). Repeatability, within and between days, expressed as coefficients of variation of the recoveries were below 10 % in both cases for the most of the analytes at the three fortification levels assayed. Selectivity of the method was ensured by the use of GC-MS single ion monitoring mode. It seems interesting to remark that in first experiences the α -endosulfan recovery obtained by GC-MS was higher than expected (150%) when the ion 239 was selected for quantitation due to the presence of an interfering compound with the same fragment and coeluting together with the analyte. The problem was solved by selecting adequate fragments to perform the single ion monitoring programmes in order to avoid false positives when GC-MS (SIM) is applied (see **Table 1**). The silyl derivative of endosulfan alcohol was only investigated by ECD. The study by GC-MS (NCI) will be subject of future investigation research.

Table 3. Mean recoveries (%) and coefficients of variation (n=5) after application of the overall analytical procedure to samples fortified at 5000, 500 and 50 ng/g level. Limits of detection (LOD) in ng/g fresh weight.

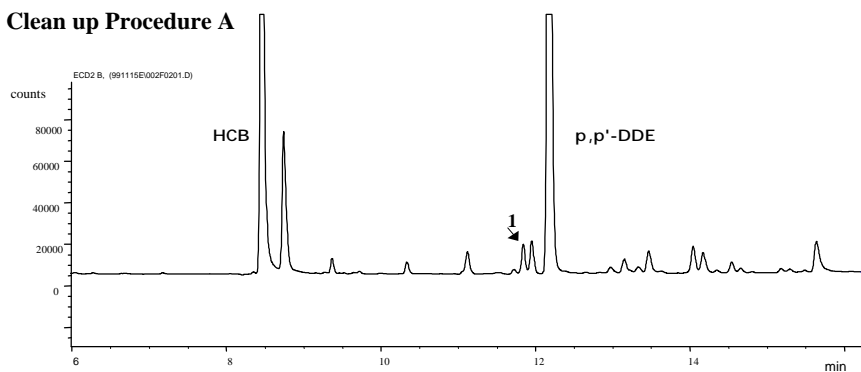
	Recoveries and coefficients of variation (%)*					LOD ng/g		
	5000 ng/g		500 ng/g		50 ng/g		ECD	MSD (SIM)
	ECD	MSD	ECD	MSD	ECD	MSD		
<i>α</i> -endosulfan	109(1)	82(10)	105(3)	58(7)	60(10)	10	50	
<i>endosulfan-ether</i>	96(6)	77(5)	81(6)	84(11)	92(7)	5	5	
<i>β</i> -endosulfan	100(4)	80(5)	83(7)	70(12)	78(9)	5	50	
<i>endosulfan-sulfate</i>	102(6)	85(6)	85(7)	85(6)	101(10)	5	7	
<i>endosulfan-OH TBDMS</i>	114(5)	—	101(6)	108(21)	—	25	—	
<i>endosulfan-lactone</i>	95(8)	93(15)	94(13)	106(17)	116(11)	5	5	

*coefficients of variation correspond to precision between days

The LC system applied in this work allowed us to perform step gradients injecting modifier solvents just before the column from the loop mounted on HPV1, avoiding diffusion processes between mobile phase and modifier and, as a consequence, obtaining good reproducibility in the elution times of both fats and pesticides.

Figures 4 and 5 show, as an example, ECD and MS chromatograms corresponding to tissues fortified at 50 ng/g level. As it can be seen, the ECD chromatograms were clean, which proves the efficacy of the clean-up procedure. Limits of detection, calculated from these chromatograms using a signal-to-noise ratio of three, were found to be at the low ng/g concentration level using ECD (Table 3). The limits of detection obtained using MS in mode SIM ranged between 5 and 50 ng/g (fresh weight). These values could be certainly improved by concentrating the 1-mL LC fractions, although more sample treatment would be necessary in such a case.

Clean up Procedure A



Clean up Procedure B

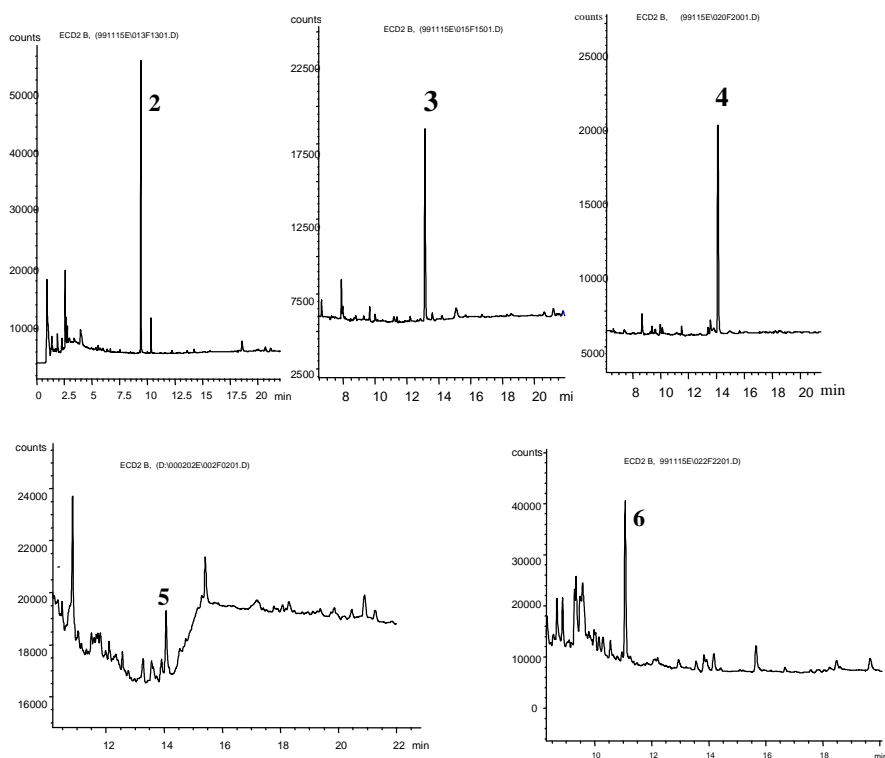
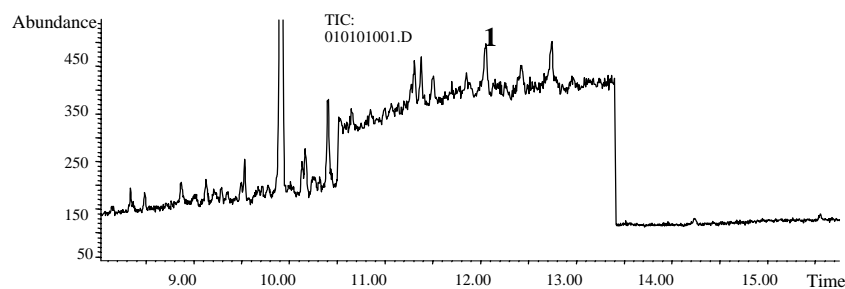


Figure 4. GC-ECD chromatograms corresponding to the analyse of mammary adipose tissue fortified at 50 ng/g: 1. α -endosulfan (Procedure A, fraction between minute 2.5 and 3.5), 2. endosulfan-ether (Procedure B, fraction 5), 3. β -endosulfan (Procedure B, fraction 9), 4. endosulfan-sulfate (Procedure B, fraction 13), 5. endosulfan-OH TBDMS (Procedure B, fraction 19), 6. endosulfan-lactone (Procedure B, fraction 19).

Clean up Procedure A



Clean up Procedure B

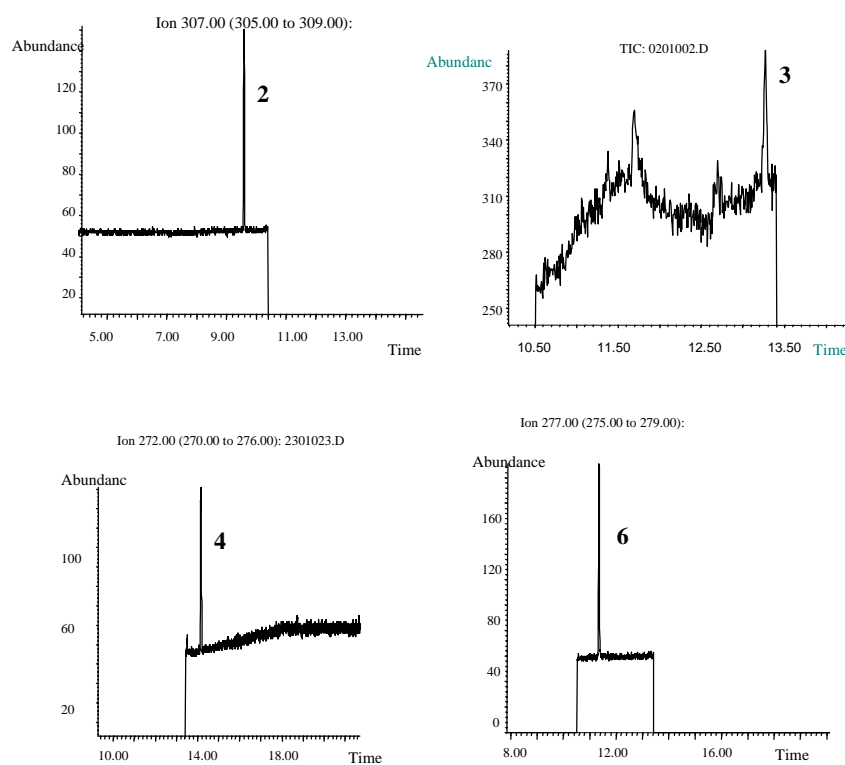


Figure 5. GC-MS (SIM) chromatograms corresponding to the analyse of mammary adipose tissue fortified at 50 ng/g: 1. α -endosulfan (Procedure A, fraction between minute 2.5 and 3.5), 2. endosulfan-ether (Procedure B, fraction 5), 3. β -endosulfan (Procedure B, fraction 9), 4. endosulfan-sulfate (Procedure B, fraction 13), 6. endosulfan-lactone (Procedure B, fraction 19).

Application of the developed procedure to human adipose tissue samples

The method developed in this paper was applied to the analysis of several human adipose tissue samples. 18 samples (nine of mammary adipose tissue and other nine of abdominal fat tissue) were analysed for endosulfan residues and, additionally, the LC-fraction containing α -endosulfan and other OCs was also investigated (**Table 4**). As a result, pesticide residues were detected in 85% of the samples analysed. *p,p'*-DDE and HCB were the compounds more often detected, as they were present in 85% and 72 % of the samples analysed, respectively. Additionally, they reached the highest concentrations among all pesticides detected, in some samples with levels above 2 $\mu\text{g/g}$, for *pp'*-DDE, and around 0.5 $\mu\text{g/g}$, for HCB. Lindane and its isomer β -HCH were detected in four and seven samples, respectively.

In relation to endosulfan residues, only the metabolites endosulfan-sulfate and endosulfan-ether were detected in 22% and 28 % of the samples analysed, respectively. Their concentrations in adipose tissue (between 5 and 27 ng/g) were generally lower than other organochlorines and by far much lower than *p,p'*-DDE and HCB. Parent endosulfan (α and β) and other endosulfan metabolites were not identified in any samples, although endosulfan-alcohol was not investigated. Two of the samples seemed to contain β -endosulfan at the few ng/g level (GC-MS, in SIM mode), but the subsequent analysis by GC-MS-MS did not allow us to confirm the presence of this compound.

It can be emphasised the samples 2017 and 4112 which presented a similar pattern as regards pesticide content: high levels of *p,p'*-DDE, HCB and β -HCH, and the presence of the two endosulfan metabolites. Moreover, the samples 2173 and 4076 also had similar profile, with high *p,p'*-DDE, HCB and β -HCH levels, but no presence of endosulfan residues. Finally, another set of three samples could be considered, as they contained only two organochlorines but at high concentrations: samples 31, 147 and 2080 with *p,p'*-DDE and HCB at levels ranging between 670-2200 ng/g (*p,p'*-DDE) and 200-930 ng/g (HCB).

In most of positive samples, pesticides detected by GC-MS in SIM mode were additionally confirmed by GC-MS-MS, except for 4 samples (suspicious to contain *p,p'*-DDD) and 2 samples (suspicious to contain β -endosulfan in all cases at very low ng/g level). The presence of these compounds was not confirmed by GC-MS-MS in any of these samples. Therefore, the risk of given false positives for these compounds should be carefully considered.

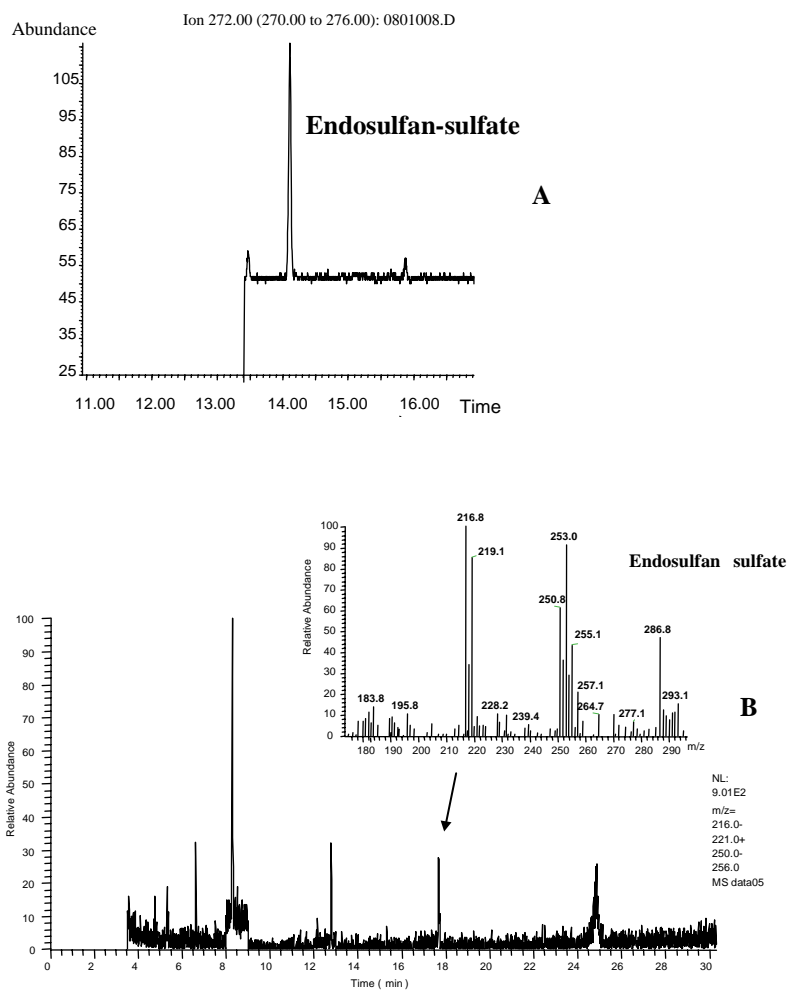


Figure 6. A) GC-MS (SIM-extract ion) chromatogram corresponding to sample 93 containing endosulfan-sulfate. B) Confirmation by GC-MS-MS (mode extract ion).

Table 4. Compounds detected in human adipose tissue samples. Concentrations expressed as ng/g in fresh tissue.

Compound	Sample number																	
	31	62	83	93	147*	2005	2017	2037	2053	2080	2092	2164	2173	4013	4035	4076	4112	4121
endosulfan-ether	–	–	–	<i>d</i>	–	–	12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	11	5
endosulfan-sulfate	–	–	27	21	–	–	25	–	–	–	20	–	–	–	–	–	15	–
p,p'-DDE	2200	5	6	3	1620	4	1459	–	16	670	<i>d</i>	–	1287	117	–	868	1028	25
p,p'-DDT	–	<i>d</i>	–	–	–	<i>d</i>	<i>d</i>	–	–	–	–	–	<i>d</i>	–	–	<i>d</i>	–	–
HCB	760	<i>d</i>	7	<i>d</i>	200	<i>d</i>	554	–	–	930	–	–	635	60	–	334	236	73
γ-HCH	–	–	77	–	–	112	–	–	48	–	–	–	–	106	–	–	–	–
β-HCH	–	–	<i>d</i>	35	–	–	397	–	–	–	93	–	402	–	–	304	162	–

d detected at low levels by MS/MS (non quantified)

* sample used as a blank for the method development of endosulfan

Conclusions

The method proposed in this paper allows the automated clean-up of adipose tissue extracts by normal phase LC prior to the GC determination of endosulfan and metabolites with a wide range of polarity. Depending on LC clean up conditions, the procedure can be used for the determination of α -endosulfan together with other organochlorines as HCB, HCHs, DDTs and PCBs by one side, as well as for the determination of β -endosulfan and endosulfan metabolites (-ether, -lactone, -sulfate, -alcohol) by the other. The clean-up procedure can be completely automated and it is efficient for the elimination of in such a way that the LC fractions can be directly analysed by GC without any additional sample treatment. The application of GC-MS and specially GC-MS/MS allows the unequivocal confirmation of the analytes in real samples where interfering peaks are often present in the chromatograms.

The application of overall procedure to eighteen human samples real-world shows: i) a high proportion of women with organochlorine residues in adipose tissue (only 3 out of 18 samples were free of pesticide residues), ii) OC pesticide levels are significant (2.2 μg of *p,p'*-DDE per g of adipose tissue), iii) the presence of endosulfan metabolites in 6 of the 18 samples analyzed, among other OCs.

The aim of this paper has been to develop rapid, accurate and sensitive analytical methodologies. A low number of real samples were analysed and, consequently, this fact does not allow us to obtain any conclusion about possible relationships between pesticides detected and characteristics of patients, as the presence of cancerous process or professional activity. In the near future, this method will be applied to the analysis of a number of samples in order to investigate the potential relationships between the presence and concentration of OC pesticides in adipose tissues and other parameters as type of samples, professional activity, living area of patients, cancer diseases or estrogenic activity, as the main factors.

Acknowledgments

This work forms a part of the project entitled “Nuevas estrategias en la determinación de residuos de plaguicidas y de metabolitos en fluidos biológicos. Simplificación de la etapa de preparación de muestra”, developed with the financial support of Fundación Caixa Castelló.

This research was also supported in part by grants the Spanish Ministry of Health (FIS, 00/543) and the Anticancer Foundation (FSFJ, 98/1P01).

Elena Pitarch has a FPI (Formación de Personal Investigador) grant supported by Conselleria de Cultura, Educació i Ciència.

References

1. P.J. Marquis, R.L. Hanson, M.L. Larsen, W.M. DeVita, B.C. Butterworth and D.W. Kuehl. Analytical methods for a national study of chemical residues in fish. II: Pesticides and Polychlorinated Biphenyls. *Chemosphere* **29**: 509-521 (1994).
2. L. Brown. Concentrations of chlorinated organic compounds in biota and bed sediment in streams of the San Joaquin Valley, California. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**: 357-368 (1997).
3. M.N. Jacobs, P.A. Johnston, C.L. Wyatt, D. Santillo and M.C. French. Organochlorine pesticide and PCB residues in pharmaceutical, industrial and food grade fish oils. *Int. J. Environ. Pollut.* **8**: 74-92 (1997).
4. J.S. Lee, S. Tanabe, N. Takimoto and T. Kubodera. Organochlorine residues in deep-sea organisms from Suruga Bay, Japan. *Mar. Pollut. Bull.* **34**: 250-258 (1997).
5. R. Fairey, K. Taberski, S. Lamerdin, E. Johnson, R.P. Clark, J.W. Downing, J. Newman and M. Petias. Organochlorines and other environmental contaminants in muscle tissues of sportfish collected from San Francisco Bay. *Mar. Pollut. Bull.* **34**: 1058-1071 (1997).

6. H. Roche, A. Buet, O. Jonot and F. Ramade. Organochlorine residues in european eel (*Anguilla anguilla*), crucian carp (*Carassius carassius*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*) from Vaccarès lagoon (French National Nature Reserve of Camargue)- effects on some physiological parameters. *Aquatic Toxicol.* **48**: 443-459 (2000).
7. R. Serrano, F.J. López and F. Hernández. Multiresidue determination of persistent organochlorine and organophosphorus compounds in whale tissues using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatographic-mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.* **855**: 633-643 (1999).
8. F. Hernández, R. Serrano, A.F. Roig-Navarro, Y. Martínez-Bravo and F.J. López. Persistent organochlorine and organophosphorus compounds and heavy elements in common whale (*Balaenoptera physalus*) from the Western Mediterranean Sea. *Mar. Poll. Bull.* **40**: 426-433 (2000).
9. M. Cleemann, F. Riget, G.B. Paulsen and R. Dietz. Organochlorines in Greenland glaucous gulls (*Larus hyperboreus*) and Icelandic gulls (*Larus glaucooides*). *Sci. Total Environ.* **245**: 113-130 (2000).
10. S.T.C. Gonzalez-Barros, M.E.A. Pineiro, J.S. Lozano and M.A.L. Yusty. Organochlorine pesticides in wolves from Galicia. *Ecotox. Environ. Safety* **45**: 247-252 (2000).
11. K.A. Bucholski, J. Begerow, G. Winneke and L. Dunemann. Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in human body fluids and tissues. *J. Chromatogr. A* **754**: 479-485 (1996).
12. J. To-Figueras, M. Sala, R. Otero, C. Barrot, M.S. Silva, M. Rodamilans, C. Herrero, J. Grimalt and J. Sunyer. Metabolism of hexachlorobenzene in humans: association between serum levels and urinary metabolites in a highly exposed population. *Env. Health Perspect.* **105**: 78-83 (1997).

13. A.R. Najam, M.P. Korver, C.C. Williams, V.W. Burse and L.L. Needham. Analysis of a mixture of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in human serum by column fractionation and dual-column capillary gas chromatography with electron capture detection. *J. AOAC Int.* **82**: 177-185 (1999).
14. N. Olea, M.J. Molina, M. Garcia-Martin and F. Olea-Serrano. Modern agricultural practices: the human price. *Comments Toxicology.* **5**: 455-474 (1996).
15. N. Olea, F. Olea-Serrano, P. Lardeli-Claret et al.. Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. *Toxicol. Ind. Health* **15**: 151-158 (1999).
16. L. Kohlmeier and M. Kohlmeier. Adipose tissue as a medium for epidemiology exposure assessment. *Environ. Health Perspect.* **103**: 99-106 (1995).
17. K.J. Aronson, A.B. Miller, Ch.G. Woolcott et al.. Breast adipose tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **9**: 55-63 (2000).
18. A.M. Soto, C. Sonnenschein, K.L. Chung, M.F. Fernández, N. Olea and F. Olea-Serrano. The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* **103**: 113-122 (1995).
19. S.H. Safe. Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem?. *Environ. Health Perspect.* **103**: 346-351 (1995).
20. N. Olea and F. Olea-Serrano. Oestrogens and the environment. *Eur. J. Cancer Prevent.* **5**: 491-496 (1996).
21. F. Hernández, R. Serrano, M.C. Miralles and N. Font. Gas liquid chromatography and enzyme-linked immune sorbent assay in pesticide monitoring of surface water from the Western Mediterranean (Comunidad Valenciana, Spain). *Chromatographia* **42**: 151-158 (1996).

22. G.A. Penuela and D. Barceló. Application of C-18 disks followed by gas chromatography techniques to degradation kinetics, stability and monitoring of endosulfan in water. *J. Chromatogr.* **795**: 99-108 (1996).
23. J.L.M. Vidal, F.J.E. Gonzalez, C.R. Glass, M.M. Galera and M.L.C. Cano. Analysis of lindane, alpha-endosulfan, beta-endosulfan and endosulfan sulfate in greenhouse air by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **765**: 99-108 (1996).
24. F.J. Arrebola, J.L. Martínez Vidal and A. Fernández Gutiérrez. Excretion study of endosulfan in urine of a pest control operator. *Toxicol. Lett.* **107**: 15-20 (1999).
25. L. Zupancic-Kralj, J. Jan and J. Marsel. Assessment of polychlorobiphenyls in human /poultry fat and in hair/plumage from a contaminated area. *Chemosphere.* **25**: 1861-1867 (1992).
26. J.L. Ludwicki and K. Goralczyk. Organochlorine pesticides and PCBs in human adipose tissues in Poland. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **52**: 400-403 (1994).
27. F. Asakawa, F. Jitsunari, H. Shiraishi, S. Suna, N. Takeda and T. Kitamado. Accumulation of chlordanes in adipose tissues of mice caused by long exposure of low level technical chlordane. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**: 909-916 (1996).
28. S.M. Gort, G.R. van der Hoff, R.A. Baumann, P. van Zoonen, J.M. Martin-Moreno and P van't Veer. Determination of *p,p'*-DDE and PCBs in adipose tissues using High-Performance Liquid Chromatography coupled on line to capillary GC-The EURAMIC study. *J. High Resol Chromatogr.* **20**: 138-142 (1997).
29. A. Rivas, N. Olea and F. Olea-Serrano. Human exposure to endocrine-disrupting chemicals: assessing the total estrogenic xenobiotic burden. *Trends Anal. Chem.* **16**: 613-619 (1997).

30. N. Zöllner and A. Kersch. Über die quantitative bestimmung von lipoiden (micromethode) mite es der vielen natürlichen lipoiden (allen bekamiten plasmalipoiden) gemeinsamen sulphosphovainillin reaktian. *Z. Ges. Exp. Med.* **135**: 545-548 (1962).
31. F. Hernández, R. Serrano, E. Pitarch and F.J. López. Automated sample clean-up procedure for organophosphorus pesticides in several aquatic organisms using normal phase liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta.* **374**: 215-229 (1998).
32. K. Grob, I. Kalin and A. Artho. Coupled LC-GC: the capacity of silica-gel (HP)LC columns for retaining fat. *J. High Resolut. Chromatogr.* **14**: 373-376 (1991).

5.2.5. Artículo científico 6: Chromatographia (enviado)**DETERMINATION OF ORGANOCHLORINE COMPOUNDS IN HUMAN ADIPOSE TISSUE USING AUTOMATED LIQUID CHROMATOGRAPHY CLEAN UP AND GAS CHROMATOGRAPHY ANALYSIS COUPLED TO TANDEM MASS SPECTROMETRY**

F. Hernández*, E. Pitarch, R. Serrano, C. Guerrero

Analytical Chemistry, Dept. Experimental Sciences, University Jaume I, 12004 Castellón, Spain. Tel: 34-964-728100, Fax: 34-964-728066, E-mail: hernandf@exp.uji.es

Abstract

A multiresidue method based on automated normal-phase LC clean up and GC-MS/MS analysis has been developed for the determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human adipose tissues. Analytes were extracted by dissolving the fat samples in n-hexane, and the hexanic extracts were injected onto the silicagel column of the automated LC clean up system prior to analysis by GC-MS/MS. The high efficiency of the HPLC clean up for the elimination of fats in combination with the use of GC with tandem mass spectrometry detection allowed to reach detection limits at the low ng g⁻¹ concentration level for all analytes using as low as 0.25 g of sample.

The overall analytical procedure was applied to several human abdominal fat tissue samples: HCB, β-HCH, p,p'-DDE and the higher chlorinated PCBs (138, 153 and 180) were the most frequently detected compounds, at levels of 26-1273 ng g⁻¹, 19-933 ng g⁻¹, 121-3945 ng g⁻¹ and 56-496 ng g⁻¹, respectively.

1. Introduction

Persistent organochlorine (OC) compounds – including pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) – were widely used in agriculture and industry for years. Most of these compounds are banned at present, although some specific uses are still allowed, as DDT which is used nowadays to fight against some tropical diseases. Besides, there are some non-intentional sources to obtain persistent contaminants (polychlorinated dibenzofuranes, HCB and PCBs) from incomplete thermal processes of organic matter and chlorine.

Due to their specific chemical and physical properties, OC compounds are resistant to physical and biological degradation. Their high lipid solubility leads to their bioconcentration in lipid-rich tissues of organisms as fish, fish foods, marine mammals, terrestrial animals, etc. [1-7] and their biomagnification through the trophic chain of the ecosystems.

Humans are also exposed to OC analytes through diet and other ways, as environmental and workplace exposure. As a consequence, OC pesticides, as β -HCH, p,p'-DDE or HCB, and PCBs are usually detected in most of serum samples [8-12]. Human milk monitoring has also been performed in many countries to check the presence of persistent OC compounds in infants' intake [13-16]. Several authors have recommended the direct measurement of adipose tissue content in human population [17-20] because these contaminants are usually found at high concentration levels in this kind of matrix.

Conventional methods for the analysis of OC compounds in fatty samples, and particularly in human adipose tissue, usually involve several steps including extraction, elimination of the fat using acid digestion [21], column adsorption chromatography [22] or solid phase extraction [23], and analytical determination by GC-ECD or GC-MSD.

Normal phase liquid chromatography (NPLC) has been successfully used in our laboratory for the analysis of OCs in whale tissues, including blubber [4], organophosphorus pesticides in marine organisms [24] and also for the

determination of endosulfan and metabolites in human adipose tissue [25]. This technique presents several advantages, as short clean up time, high degree of automatization and high efficiency in the elimination of the fat, which joined to a sensitive determination by GC leads to low detection limits. Other authors also used this technique for the analysis of human adipose tissues [26-27], improving former procedures based on other clean up techniques that included several steps thus increasing the possibility of analytical errors.

The analytical determination of OCs can be carried out by using different gas chromatography (GC) detectors. Electron capture detection has been traditionally used for this purpose, but nowadays it is preferable to use mass spectrometry detection in order to further assess peak identity. The use of MS detection clearly increases detection capabilities giving spectral identification of separated compounds, but in some cases the use of typical EI-MS detection suffers from peak detection problems even when using a selected ion for quantitation, especially when dealing with complex matrices as biological samples [25]. This situation can be overcome by using tandem mass spectrometry with an adequate selection of precursor and daughters ions as referenced in literature [28-29]. Thus, procedures based on a final determination by GC-MS/MS usually give satisfactory results, both for identification and quantitation of low pesticide concentrations in biological samples.

The aim of this work was to develop efficient and modern analytical methodology for the simultaneous analysis of several persistent OC compounds in human adipose tissue samples. This paper describes an automated procedure based on normal phase LC for the efficient clean-up of fatty extracts and GC-MS/MS for the selective and sensitive determination. The developed methodology has been applied to real world samples of human adipose tissue.

2. Experimental

2.1. Reagents

Reference materials from Dr. S. Ehrenstorfer (Promochem, Wesel, Germany) with a purity 97-99.7% were used for the preparation of standards of HCB, β -HCH and DDTs (p,p'-DDT, p,p'-DDD and p,p'-DDE). PCB mix 3 from Dr. S. Ehrenstorfer (10 $\mu\text{l ml}^{-1}$ in isooctane) was used for single quantitation of PCBs congeners IUPAC number 28, 52, 101, 138, 153 and 180.

Stock solutions (around 500 $\mu\text{l mL}^{-1}$) were prepared by dissolving standards in acetone and stored in a freezer at -20°C . Working solutions for sample fortification and for injection in the LC and the GC system were prepared by diluting stock solutions in n-hexane. Acetone residues were eliminated from working and standard solutions by evaporation at 40°C under N_2 stream. Ethyl acetate and n-hexane, ultra-trace quality, were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Anhydrous sodium sulphate of pesticide residue quality (Baker, Deventer, Holland) was dried for 18 hours at 300°C before use.

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

2.2. Sample material

All human adipose tissues were supplied from Hospital General of Castellón (Spain). A pool of sample obtained by mixing several abdominal and gluteus adipose tissue was used as a "blank" to optimize the overall procedure.

The real samples to be analysed corresponded to eleven individuals (9 men and 2 women) living in the province of Castellón and working in different activities.

The mean age was 61 year (range 37-83). Most of samples were taken from the abdominal tissue obtained from these patients.

2.3. LC Instrumentation

A schematic representation of the LC system used in this work is shown in **Figure 1**. It was constructed with the following equipment: *LC Pump*: Master 305 piston pump, Gilson (Middleton, USA); *Valves*: two 6 way high-pressure valves, VICI Valco, Europe Instruments (Schenkou, Switzerland), electronically controlled; *Sampler*: injection valve Rheodyne (Cotati, CA, USA) with 1.0-mL loop; *Column*: 150 x 3.9 mm I.D. packed with 4 μ m silica Novapack (Waters, Milford, MA, USA); *Fraction collector*: Gilson FC 203B (Middleton, USA); *Mobile phases*: n-hexane and n-hexane/ethyl acetate mixtures; *Flow rate*: 1 ml/min.

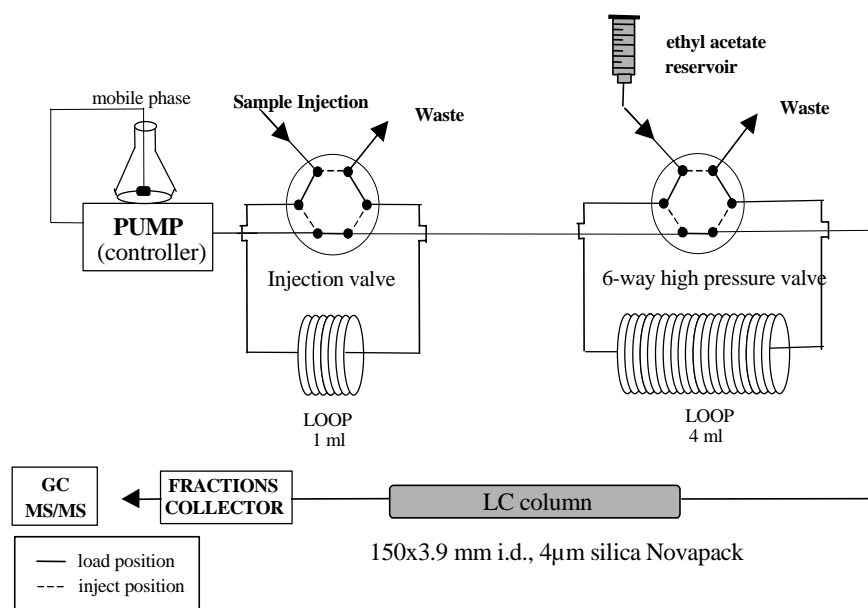


Figure 1. Scheme of the automated NPLC system used for clean-up of fatty extracts.

2.4. GC Instrumentation

GC-MS/MS was performed using an ion trap mass spectrometer (Finnigan GCQ, Austin, Texas, USA) operating in electron impact (EI) ionization mode. The GC 8000 Top (Carlo Erba Instruments, Milan, Italy) was equipped with a AS 800 autosampler. The oven temperature was programmed as follows: 90°C (1 min), 30°C min⁻¹ to 180°C, 4°C min⁻¹ to 300°C with a final hold for 5 min. Splitless injections (3 mm i.d. glass liner with a carbo-frit) of 2 µL were performed using a 30 m x 0.25 mm fused silica DB-5MS capillary column with a film thickness of 0.25 µm (cross-linked 5% phenyl methyl siloxane). Helium was used as carrier gas at a flow of 1 mL min⁻¹. The injector temperature was 240°C. Experimental mass spectrometer conditions are summarised in **Table I**.

Table I. Mass spectrometer conditions.

Ionisation mode	EI (70eV)
Multiplier voltage	1250 V
Multiplier gain	3.1E5
Source temperature	220°C
Transfer line temperature	275°C
Emission current	250 µA
AGC target	50
Trap offset	5

2.5. Sample preparation and extraction

Samples were prepared and extracted according to our previous paper [25]. After thawing at room temperature, approximately 0.25-0.5 g of wet tissue were chopped and homogenised with enough anhydrous sodium sulphate to eliminate the water, and extracted twice with 5 ml of n-hexane shaking in vortex during 3 min. After filtration, the extract was pre-concentrated under a gentle nitrogen stream at

40°C and the final residue was adjusted to 3 mL with n-hexane. Finally, the extract (0.08-0.17 g ml⁻¹ expressed as fresh weight tissue) contained between 0.21-0.42 g of extractable fat.

2.6. Clean-up procedure

The general clean-up procedure was based on our previous work [25]. 1 mL of the hexane extract was injected into the LC system using a 6-way injection valve. The mobile phase (n-hexane) was set at a flow rate of 1 mL min⁻¹ and the modifier solvent (hexane:ethyl acetate mixtures or ethyl acetate) loaded in the 4-mL loop was introduced at different programmed times in order to increase the polarity of the mobile phase. 1 mL LC-fractions were collected by means of the fraction collector in order to investigate both, the fat and pesticides elution patterns, after the LC clean-up.

Once optimized, the recommended procedure for the determination of PCBs and OC pesticides was as follows: 1 mL hexanic sample extract was injected into the LC system. After 2 minutes, 4 mL n-hexane:ethyl acetate (99:1, v/v) was injected by using the 4-mL loop mounted on a HPV1 valve and then, a pulse of 4 mL ethyl acetate was introduced at 16 minutes of elution. All PCBs and OCs investigated in this work eluted in the 2 mL LC-fraction collected between minutes 2 and 4. The Silicagel column was regenerated by a 4 mL ethyl acetate flush step at 22 minutes.

2.7. Determination of fat

The total fat content in the sample extracts and in the LC fractions was determined by gravimetry and colorimetry [30], respectively. The colorimetric method used for total lipids determination is based on the sulpho-phosphovainillina reactivity. Triacylglycerids calibration solution (Sigma, St Louis, Missouri, USA) was used as standard. Calibration curve was performed between 0 and 1000 µg.

3. Results and discussion

GC analysis

Linearity of response of the analytes was proved by analyzing standard solutions, by triplicate, at 5 concentrations in the range from 5 to 2000 ng mL⁻¹, for OC pesticides, and 5 to 1000 ng mL⁻¹, for PCBs. The values of r^2 were higher than 0.99 for all compounds in the whole range tested.

The 2-mL LC-fraction containing the selected analytes was concentrated under a N₂ gentle stream down to a volume of 1 mL. Before injecting into the GC system, 100 µL internal standard mixture (1 µg mL⁻¹) was added to vials containing 1 mL of extract. Quantitation was carried out using HCB- ¹³C₆ (for HCB and β-HCH), p,p'-DDE D₈ (for p,p'-DDT, p,p'-DDD and p,p'-DDE) and PCB 153- ¹³C₁₂ (for all PCB compounds) as internal standards.

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

In this paper, two MS/MS methods, both divided into five acquisition segments, were used, one for OC pesticides and another for PCBs (PCB 101 and 118, and PCB 138 and 153 into the same segment, respectively). Three values of the trapping parameter q (0.45, 0.35 and 0.25) were investigated. The higher response for most compounds were obtained with $q = 0.45$, so this value was selected for our method. Then, isolation and excitation conditions were optimised and selected in

order to obtain characteristic MS/MS spectra with fragmentation patterns rich enough to allow the accurate identification of analytes detected.

Table II shows the conditions corresponding to the optimised MS/MS method. The highest isolation windows (10 units of m/z) used corresponded to HCB and p,p'-DDE as the labelled HCB- $^{13}\text{C}_6$ and 4,4'-DDE D_8 were also included in these segments. In addition, the selected precursor ion in these isolation windows did not correspond to any base peak in their EI spectrum (284 for HCB and 246 for p,p'-DDE), but the selection of precursor ion and window was made in order to keep isolation mass range as short as possible, including the pesticide as well as the isotopically labelled compound. In the case of the segment corresponding to the determination of PCB 153 and PCB 153 $^{13}\text{C}_{12}$, it was unfeasible to select an only scan to fragment both of them because the difference was 12 units of m/z and the highest window of m/z allowed by the system was ± 5 units. The software of the instrument allows us to programme different *scans* (acquisition of dates) in the same time-window, so for PCB 138 and 153 a *scan* with the precursor ion of 360 was selected, and for PCB 153 $^{13}\text{C}_{12}$ another *scan* with 372 as the precursor ion was selected, all of them in the forth segment.

Table II. Programme for MS/MS detection of studied compounds.

Compound	time	window	mass range	parent ion	voltage (V)
HCB and HCB- $^{13}\text{C}_6$	3.50	10	170-295	288	3.50
β -HCH	7.50	5	140-225	219	1.05
p,p'-DDE and p,p'-DDE- D_8	13.40	10	145-260	250	3.00
p,p'-DDD	15.00	5	160-240	235	1.30
p,p'-DDT	16.40	8	160-240	235	1.70
PCB 28	3.50	4	140-262	258	2.00
PCB 52	9.80	4	180-295	292	1.50
PCB 101 and 118	11.50	4	170-330	326	2.00
PCB 138, 153 and PCB 153- $^{13}\text{C}_{12}$	15.60	8	200-380	360 (372)*	1.75
PCB 180	18.50	8	220-402	396	2.25

*the parent ion corresponded to labelled PCB

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

Table III. List of ions (*m/z*) extracted in MS/MS chromatograms used for quantitation (relative abundances %).

Compound	tr	m/z
1. HCB	7.31	212-216 (214, 100%)
2. β -HCH	7.71	181 (100%), 183 (85%)
3. p,p'-DDE	13.84	176 (100%)
4. p,p'-DDD	15.38	165 (100%), 199 (36%)
5. p,p'-DDT	16.79	165 (100%), 199 (30%)
6. PCB 28	9.14	186 (100%)
7. PCB 52	10.08	220(100%), 222 (80%)
8. PCB 101	13.00	254 (98%), 256 (100%)
9. PCB 118	15.05	254 (100%), 256 (98%)
10. PCB 138	15.90	288 (85%), 290 (100%)
11. PCB 153	16.94	288 (85%), 290 (100%)
12. PCB180	19.61	322 (55%), 324 (100%), 326 (70%)
<i>Labelled surrogate/internal standard</i>		
13. $^{13}\text{C}_6$ HCB	7.31	218-222 (220, 10 218-222 (220, 100%))
14. D ₈ p,p'-DDE	13.74	183 (80%), 184 (183 (80%), 184 (100%))
15. $^{13}\text{C}_{12}$ PCB 153	16.93	300-304 (302, 100%)

tr: retention time

LC clean-up

The cleanup procedure used in this paper for PCBs and OC pesticides determination was previously applied in our laboratory [25] to determine α -endosulfan in human adipose tissue, which co-eluted with HCB, HCHs, DDTs and PCBs. The amount of the extractable fat contained in the samples under investigation was similar to that determined in our previous paper on mammary and abdominal adipose tissue, $84 \pm 9\%$ [25].

The elution procedure (see Experimental) was applied to 1-mL hexanic standard solutions containing $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ each pesticide in order to know the elution of the studied compounds in the silicagel LC column. Then, 1-mL LC-fractions collected were directly analysed by GC. The results obtained with standards were confirmed later by application of the cleanup procedure to hexanic sample extracts spiked with pesticides.

Using the recommended cleanup procedure, the studied OC pesticides and PCBs eluted altogether between minutes 2 and 4 (1-mL fractions 3 and 4). In order to simplify the method and to increase its robustness, the two fractions were joined in a 2-mL LC fraction and then concentrating to a final volume of 1 mL. Then, OC pesticides and PCBs were separately analysed by GC (one MS/MS method for OC and another for PCBs). The amount of lipids in the final concentrated fraction was less than $300 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (equivalent to 600 ng in a $2 \mu\text{L}$ injection into the GC), which is in agreement with the maximum amount of lipid allowable for injection in the capillary column reported by Grob and co-workers [31] (fat content close to 600 ng). However, the use of a carbon frit installed into the glass liner of the injector port could also allow the injection of extracts with a fat content some higher than $300 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Validation Study

Sample used in the validation process consisted in a pool obtained by mixing several human abdominal adipose tissue samples. As all samples of human adipose tissue collected presented several of the analytes studied in this paper, it was necessary to consider the concentrations found in the pool sample in order to calculate the recoveries (**Table IV**).

Quantitation was performed using direct calibration and labelled internal standards, HCB- $^{13}\text{C}_6$ (for HCB and β -HCH), 4,4'-DDE D_8 (for p,p'-DDE, p,p'-DDD and p,p'-DDT) and PCB 153- $^{13}\text{C}_{12}$ (for all PCBs).

The precision (as repeatability) and accuracy of the overall analytical procedure - including extraction with n-hexane, preconcentration, application of the automated silicagel cleanup procedure and final determination by GC-MS/MS - were obtained by analysis of five spiked fat tissue replicate samples at three concentration levels 50, 500 and 2000 ng g $^{-1}$ (for OC pesticides) and 50, 500 and 1000 ng g $^{-1}$ (for PCBs) (**Table IV**). At the highest concentration level, results obtained were satisfactory for all compounds (recoveries between 78-107%), with coefficients of variation (CV) lower than 18%. However, at medium (500 ng g $^{-1}$) and low (50 ng g $^{-1}$) spiking levels some quantification problems arised for several PCBs. Thus, recoveries for PCBs 118 to 180, when calculated at these levels, were lower than 70%, although always above 50%. Additionally, at the lowest spiking level of 50 ng g $^{-1}$, the recoveries for some compounds could not be properly calculated due to the high concentrations found in the blank. This was the case of β -HCH, p,p'-DDT, PCB 138 and PCB 180. For some other compounds, as HCB, p,p'-DDE and PCB 153, which were also present at high concentrations in the blank (616, 1479 and 46 ng g $^{-1}$, respectively), we calculated recoveries at the lowest level by spiking samples with the corresponded labelled compounds, obtaining satisfactory values (from 95-102%) in all cases (see **Table IV**).

Table IV. Recoveries (n=5) and precision after application of the overall analytical procedure to human adipose tissue spiked at three concentration levels.**Concentrations expressed in ng g⁻¹.**

Compound	blank	added	Rec %	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)
HCB	616 (12)	2000	93 (4)	3 ^a	10 ^a
		500	97 (13)		
		50	101(8) ^a		
β-HCH	461 (14)	2000	121 (2)	3 ^b	13 ^b
		500	82 (7)		
		50	*		
p,p'-DDE	1497 (12)	2000	107 (1)	1 ^a	4 ^a
		500	103 (13)		
		50	102 (2) ^a		
p,p'-DDD	4 (12)	2000	102 (17)	3	9
		500	98 (13)		
		50	110 (3)		
p,p'-DDT	92 (5)	2000	78 (3)	25 ^c	70 ^c
		500	82 (11)		
		50	*		
PCB 28	–	1000	83 (5)	0.5	1
		500	102 (14)		
		50	117 (13)		
PCB 52	–	1000	84 (6)	0.5	3
		500	86 (10)		
		50	106 (9)		
PCB 101	10 (9)	1000	94 (16)	2	6
		500	73 (10)		
		50	84 (7)		
PCB 118	24 (7)	1000	100 (4)	5 ^d	16 ^d
		500	60 (12)		
		50	67 (13)		
PCB 138	74 (15)	1000	97 (5)	0.8	4
		500	55 (19)		
		50	*		
PCB 153	46 (2)	1000	93 (17)	5 ^a	15 ^a
		500	63 (12)		
		50	95(3) ^a		
PCB 180	50 (12)	1000	89 (2)	1	4
		500	50 (13)		
		50	*		

* not calculated due to the high analyte concentrations detected in blank

^a values obtained from the “blank” adipose tissue sample spiked with the corresponding labelled compound^b LOD and LOQ estimated from sample number 3^c LOD and LOQ estimated from sample number 6^d LOD and LOQ estimated from sample number 9

Selectivity of the method was ensured by the use of GC-MS/MS, and isolating adequate parent ion for each compound (see **Table II**) in order to avoid false positives.

Calculation of limits of detection (LOD) was problematic due to the presence of analytes in the blank. As a general rule, the LOD was obtained when the signal was three times the background noise in the chromatogram at the lowest analyte concentration assayed. When the labelled compound was available (HCB, p,p'-DDE, PCB 153), LOD were calculated from the chromatograms (using extracted ion chromatogram) of the sample spiked with their corresponding labelled standards. As it can be seen in **Table IV**, LODs were estimated between 1 and 5 ng g⁻¹ for the three deuterated compounds. As an example, **Figure 2** shows the extracted ion GC-MS/MS chromatogram of the pool "blank" tissue sample spiked at 50 ng g⁻¹ with the three labelled standards.

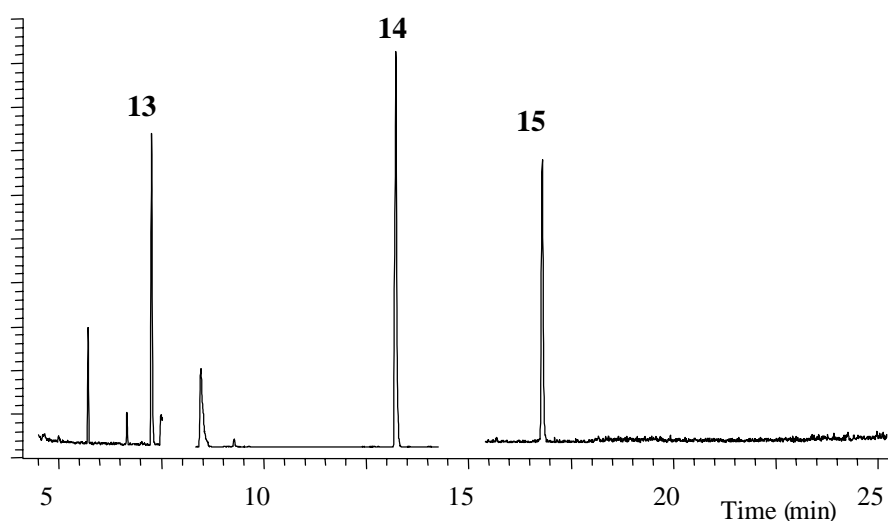


Figure 2. *Extracted ion GC-MS/MS chromatogram corresponding to adipose tissue spiked at 50 ng g⁻¹ with labelled internal standards. (13) ¹³C₆ HCB, (14) D₈p,p'-DDE, (15) ¹³C₁₂ PCB 153 (See Table IV for m/z used).*

LODs for PCB 28 and 52 were calculated from the blank sample spiked at 50 ng g⁻¹, as they were not detected in the pool used as a blank.

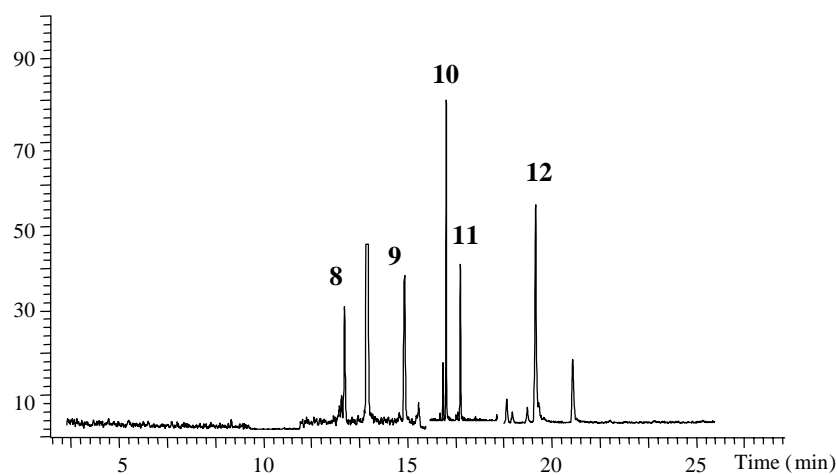
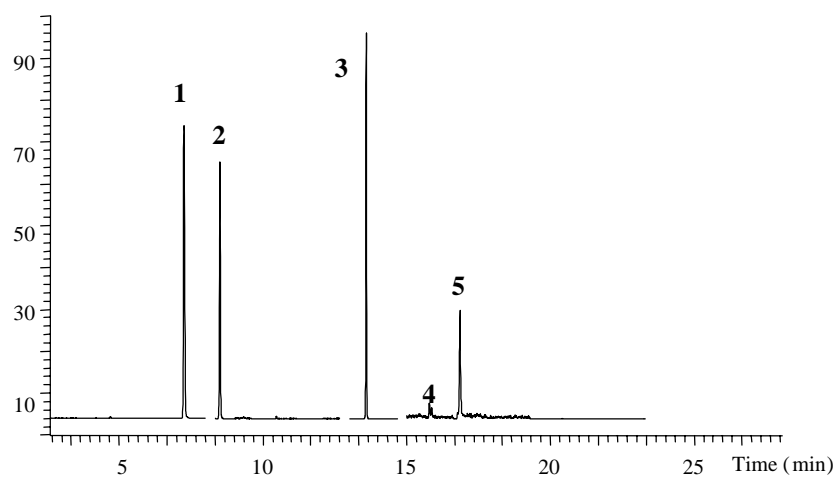


Figure 3. Extracted ion GC-MS/MS chromatogram corresponding to the “blank” of adipose tissue sample. (1) HCB, (2) β -HCH, (3) *p,p'*-DDE, (4) *p,p'*-DDD, (5) *p,p'*-DDT, (8) PCB 101, (9) PCB 118, (10) PCB 138, (11) PCB 153, (12) PCB 180 (See Table IV for *m/z* used).

For the rest of the compounds studied, LODs were estimated from chromatograms corresponding to the pool of tissue sample used as a blank (**Figure 3**) (“blank” sample: p,p'-DDD, 4 ng g⁻¹; PCB 101, 10 ng g⁻¹; PCB 138, 74 ng g⁻¹; PCB 180, 50 ng g⁻¹) or alternatively with the measured samples that contained the lowest analyte concentrations (sample 3: β-HCH, 19 ng g⁻¹; sample 6: p,p'-DDT, 50 ng g⁻¹; sample 9: PCB 118, 10 ng g⁻¹). As it can be seen in **Table IV**, experimental LOD for all compounds studied in this paper were in the range of 0.5-5 ng g⁻¹, except for p,p'-DDT (25 ng g⁻¹).

Table IV also shows the limits of quantification (LOQ) obtained when the signal was ten times the background noise in the chromatogram at the lowest analyte concentration assayed. They were calculated using the same chromatograms that those used for calculation of LODs.

Application of the developed procedure to human adipose tissue samples

The method developed in this paper was applied to the analysis of 11 human adipose tissue samples (**Table V**). Although the low number of samples analyzed did not allow us to reach definitive conclusion on possible relationships between pesticides detected and characteristics of patients, e.g. as the presence of cancerous process or professional activity, several interesting data can be pointed out. Thus, the compounds HCB and p,p'-DDE were present in all the samples analyzed. As expected, p,p'-DDE reached the highest concentration values in all samples, except for sample 11, with values around or above 1 μg g⁻¹ in most of samples. Such levels of p,p'-DDE residues in human adipose tissue are not considered unusually high and are comparable to those found in the literature [18, 19, 25, 26]. p,p'-DDT was detected in 5 samples and p,p'-DDD in only 3 samples. The high proportions of p,p'-DDE relative to the other DDTs could be consistent with a relatively long period since widespread use of this compound ceased.

β-HCH, considered to be the most persistent and bioaccumulative of HCH isomers, was detected in 9 samples at relatively high concentrations, as most of them

contained more than 200 ng g⁻¹. The reason could be related with the fact that the excretion of the β isomer from the human body takes five times longer than for other HCH isomers, and that the β -HCH ability to accumulate in tissue fat is from 10 to 30 times stronger for other isomers [16]. The amount reported for this compound in human and animal tissue from different regions of the world is usually in the same range of concentrations than those found in this paper [6, 15, 22, 25].

As regards PCBs, the congeners 138, 153 and 180 were found in all samples in the range of 97-487, 46-215 and 82-496 ng mL⁻¹, respectively. This fact is in agreement with the literature as the higher chlorinated PCBs congeners (usually penta-, hexa- and heptachlorobiphenyls) are the most frequently detected in biological samples [3, 6, 20]. PCB 28 was only found in one sample (number 6) at a low concentration level (5 ng g⁻¹) and PCB 52 was not identified in any sample.

As an example, **Figures 4** and **5** show the extracted ion GC-MS/MS chromatograms obtained for the determination of OC pesticides in adipose tissue sample number 1, and for the determination of PCBs in sample number 5, respectively.

Table VI. Compounds detected in human adipose tissue samples. Concentrations expressed as ng g⁻¹ in fresh tissue.

	Sample number										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
HCB	425	120	26	467	100	345	234	1273	501	54	52
β-HCH	250	53	19	349	133	240	933	621	319	–	–
p,p'-DDE	2160	1293	968	1107	1414	867	1831	3945	543	267	121
p,p'-DDD	82	–	–	32	–	<i>d</i>	–	119	–	–	–
p,p'-DDT	103	<i>d</i>	<i>d</i>	216	–	<i>d</i>	<i>d</i>	130	–	–	–
PCB 28	–	–	–	–	–	5	–	–	–	–	–
PCB 52	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
PCB 101	16	–	–	–	36	<i>d</i>	<i>d</i>	17	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>
PCB 118	54	19	–	18	34	<i>d</i>	<i>d</i>	48	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>
PCB 138	336	357	179	110	487	103	97	324	138	181	125
PCB 153	120	119	81	46	215	68	56	175	75	91	64
PCB 180	284	377	186	82	496	94	91	262	137	188	180

d detected at a concentration level between LOD and LOQ

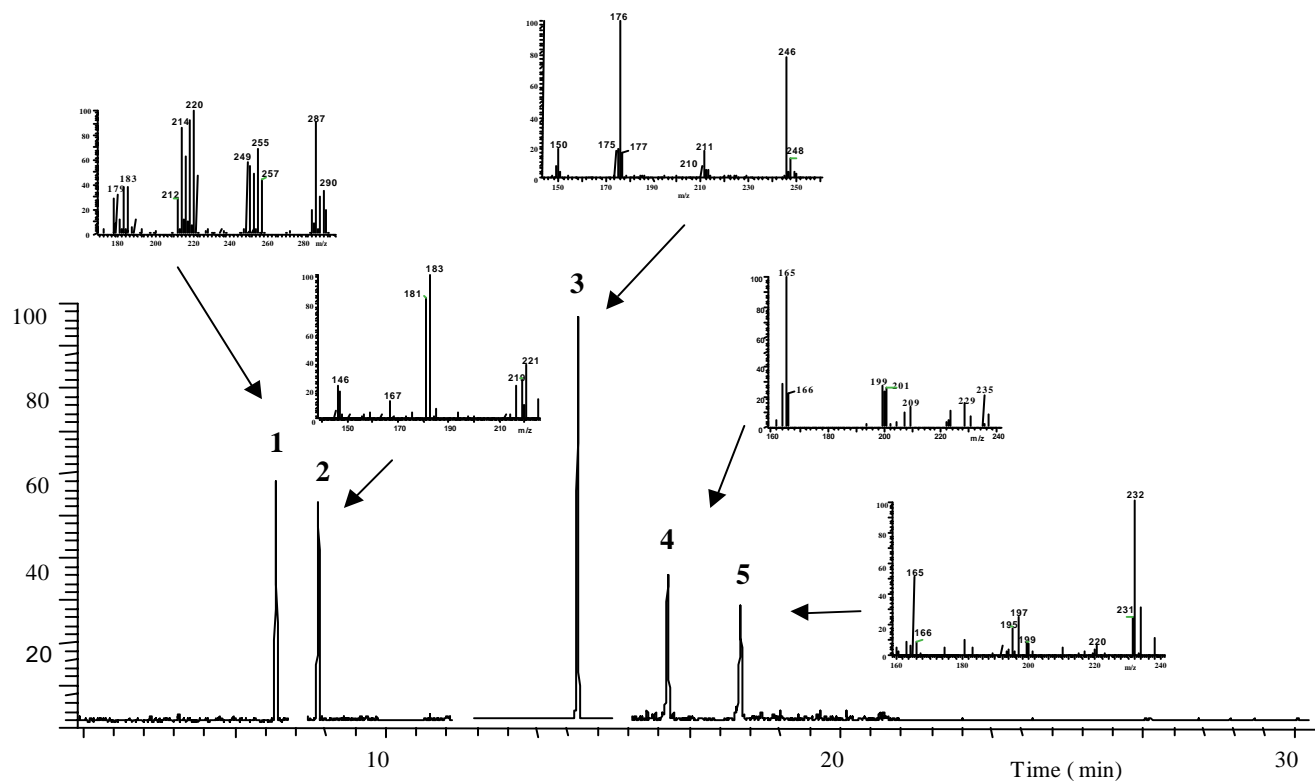


Figure 4. Extracted ion GC-MS/MS chromatogram of the adipose tissue sample 1.

(1) HCB, (2) β -HCH, (3) *p,p'*-DDE, (4) *p,p'*-DDD, (5) *p,p'*-DDT. (See Table IV for *m/z* used).

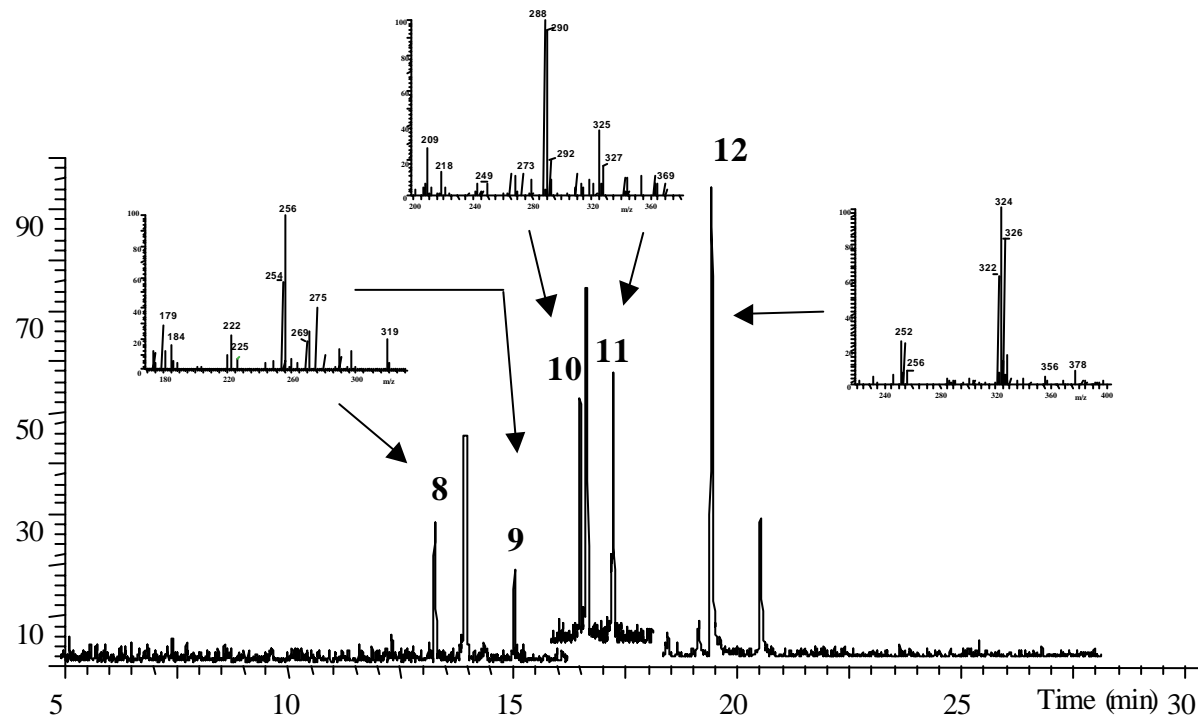


Figure 5. Extracted ion GC-MS/MS chromatogram of the adipose tissue sample 5.

(8) PCB 101, (9) PCB 118, (10) PCB 138, (11) PCB 153, (12) PCB 180. (See Table IV for m/z used).

Conclusions

In this paper we propose a multiresidue method for the determination of organochlorines in human adipose tissue samples, which is based on the normal phase LC clean-up of fatty extracts prior to the GC-MS/MS determination of analytes. The LC procedure applied in the cleanup step allows the subsequent GC determination of HCB, HCHs, DDTs and PCBs in an unique fraction of 2 mL. The clean-up procedure can be completely automated and is highly efficient for the elimination of fats, in such a way that the LC fraction can be directly analysed by GC with only an additional step of pre-concentration. The application of GC-MS/MS enables the unequivocal confirmation of the analytes in real samples where interfering peaks are often present in the chromatograms. The overall analytical procedure developed allows the rapid, accurate and sensitive determination of 12 organochlorine compounds with limits of detection in the range of 0.5-5 ng g⁻¹.

Several samples of abdominal tissue were analyzed, and some compounds (HCB, p,p'-DDE, PCB 138, PCB 153 and PCB 180) were detected in all the samples. The highest concentrations levels corresponded to p,p'-DDE and HCB, which reached maximum values of 4 µg g⁻¹ and 1.3 µg g⁻¹, respectively. As regards PCBs, the congeners 138, 153 and 180 were the most abundant reaching concentrations up to 0.5 µg g⁻¹ in some samples

Acknowledgments

This work forms a part of the project entitled "Nuevas estrategias en la determinación de residuos de plaguicidas y de metabolitos en fluidos biológicos. Simplificación de la etapa de preparación de muestra", developed with the financial support of Fundació Caixa Castelló.

Elena Pitarch has a FPI (Formación de Personal Investigador) grant supported by Conselleria de Cultura, Educació i Ciència.

The authors thank to Dr. Navarro from Hospital General (Castellón) for providing human adipose tissue samples.

References

- [1] Jacobs, M.N.; Johnston, P.A.; Wyatt, C.L.; Santillo, D.; French M.C.; *Int. J. Environ. Pollut.* **1997**, 8, 74-92.
- [2] Roche, H.; Buet, A.; Jonot, O.; Ramade, F.; *Aquatic Toxicol.* **2000**, 48, 443-459.
- [3] Menone, M.L.; Aizpún de Moreno, J.E.; Moreno, V.J.; Lanfranchi, A.L.; Metcalfe, T.L.; Metcalfe, C.D.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2000**, 38, 202-208.
- [4] Serrano, R.; López, F.J.; Hernández, F.; *J. Chromatogr. A.* **1999**, 855, 633-643.
- [5] Hernández, F.; Serrano, R.; Roig-Navarro, A.F.; Martínez-Bravo, Y.; López, F.J.; *Mar. Poll. Bull.* **2000**, 40, 426-433.
- [6] Andersen, G.; Kovacs, K.M.; Lydersen, C.; Skaare, J.U.; Gjertz, I.; Jenssen B.M.; *Sci. Total Environ.* **2001**, 264, 267-281.
- [7] Gonzalez-Barros, S.T.C.; Pineiro, M.E.A.; Lozano, J.S.; Yusty, M.A.L.; *Ecotox. Environ. Safety* **2000**, 45, 247-252.
- [8] Bucholski, K.A.; Begerow, J.; Winneke, G.; Dunemann, L.; *J. Chromatogr. A* **1996**, 754, 479-485.
- [9] Najam, A.R.; Korver, M.P.; Williams, C.C.; Burse, V.W.; Needham, L.L.; *J. AOAC Int.* **1999**, 82, 177-185.
- [10] Laden, F.; Neas, L.N.; Spiegelman, D., Hankinson, S.E., Willett, W.C., Ireland, K.; Wolf, M.S.; Hunter, D.J.; *Environ. Health Perspectives* **1999**, 107, 75-81.
- [11] Laden, F.; Hankinson, S.E.; Wolff, M.S.; Colditz, G.A.; Willett, W.C.; Speizer, F.E.; Hunter D.J.; *Int. J. Cancer* **2001**, 91, 568-574.ç
- [12] Vine, M.F.; Stein, L.; Weigle, K.; Schroeder, J.; Degnan, D.; Tse, C-K.J.; Backer L.; *American J. Epidemiology* **2001**, 153, 53-63.

- [13] Czaja, K.; Ludwicki, J.K.; Góralczyk, K.; Strucinski, P.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1997**, 58, 769-775.
- [14] Dagher, S.M.; Talhouk, R.S.; Nasrallah, S.S.; Tannous, R.I.; Mroueh, S.M.; *Food Additives and Contaminants* **1999**, 16, 307-312.
- [15] Gladen, B.C.; Monaghan, S.C.; Lukyanova, E.M.; Hulchiy, O.P.; Shkyryak-Nyzhnyk, Z.A., Sericano, J.L.; Little, R.E.; *Environ. Health Perspectivse* **1999**, 107, 459-462.
- [16] Czaja, K.; Ludwicki, J.K.; Góralczyk, K.; Strucinski, P.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, 36, 498-503.
- [17] Kohlmeier, L.; Kohlmeier, M.; *Environ. Health Perspect.* **1995**, 103, 99-106 (1995).
- [18] Aronson, K.J.; Miller, A.B.; Woolcott, Ch.G. et al.; *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2000**, 9, 55-63.
- [19] Waliszewski, S.M.; Pardio Sedas, V.T.; Infanzon, R.M.; Rivera, J.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1995**, 55, 43-49.
- [20] Dewailly, E.; Mulvad, G.; Pedersen, H.S.; Ayotte, P.; Demers, A.; Weber, J-P.; Hansen, J.C.; *Environ. Health Perspectives*, **1999**, 107, 823-828.
- [21] Zupancic-Kralj, L.; Jan, J.; Marsel, J.; *Chemosphere* **1992**, 25, 1861-1867.
- [22] Ludwicki, J.L.; Goralczyk, K.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1994**, 52, 400-403.
- [23] Asakawa; F.; Jitsunari, F.; Shiraishi, H.; Suna, S.; Takeda, N.; Kitamado, T.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1996**, 57, 909-916.
- [24] Hernández, F.; Serrano, R.; Pitarch, E.; López, F.J.; *Anal. Chim. Acta.* **1998**, 374, 215-229.
- [25] Hernández, F.; Pitarch, E.; Serrano, R.; Gaspar, J.V.; Olea, N.; *J. Anal. Toxicol.* (in press).

- [26] Gort, S..M.; van der Hoff, G.R.; Baumann, R.A.; van Zoonen, P.; *J. High Resol Chromatogr.* **1997**, 20, 138-142.
- [27] Rivas, A.; Olea, N.; Olea-Serrano, F.; *Trends Anal. Chem.* **1997**, 16, 613-619.
- [28] Hill, R.H.; Shealy, D.S.; Head, S.L.; Williams, C.C.; Bailey, S.L.; Gregg, M.; Baker, S.E.; Needham L.L.; *J. Anal. Toxicol.* **1995**, 19, 323-329.
- [29] Beeson, M.D.; Driskell, W.J.; Barr, D.B.; *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3526-3530.
- [30] Zöllner, N.; Kersch, A.; *Z. Ges. Exp. Med.* **1962**, 135, 545-548.
- [31] Grob, K.; Kalin, I.; Artho, A.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1991**, 14, 373-376.

5.3. Referencias

- Asakawa, F., Jitsunari, F., Shiraishi, H., Suna, S., Takeda, N., Kitamado, T. (1996), *Accumulation of chlordanes in adipose tissues of mice caused by long-term exposure of low level technical chlordane*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **57**, 909.
- Brown, L. (1997), *Concentrations of chlorinated organic compounds in biota and bed sediment in streams of the San Joaquin Valley, California*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **33**, 357
- Dewailly, E., Mulvad, G., Pedersen H.S., Ayotte, P., Demers, A., Weber, J-P., Hansen, J.C. (1999), *Concentration of organochlorines in human brain, liver and adipose tissue autopsy samples from Greenland*, Environ. Health Pers., **10**, 823.
- Gómez-Catalán, J., Planas, J., To-Figueras, J., Camps, M., Corbella, J. (1993), *Organochlorine pesticide residues in the population of Catalonia (Spain)*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **51**, 160.
- Grob, K., Kalin, I., Artho, A. (1991), *Coupled LC-GC: the capacity of silica-gel (HP)LC columns for retaining fat*, J. High Resolut. Chromatogr., **14**, 373.
- Lee, J.S., Tanabe, N., Takimoto, N., Kubodera, T. (1997), *Organochlorine residues in deep-sea organisms from Suruga Bay, Japan*, Mar. Pollut. Bull., **34**, 250.
- Ludwicki, J.K., Góralczyk, K. (1994), *Organochlorine pesticides and PCBs in human adipose tissues in Poland*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **52**, 400.
- Moriya, F., Hashimoto, Y. (1999), *Comparative studies on tissue distributions of organophosphorus, carbamate and organochlorine pesticides in decedents intoxicated with these chemicals*, J. Forensic Sci., **44**, 1131.

- Roche, H., Buet, A., Jonot, O., Ramade, F. (2000), *Organochlorine residues in european eel (Anguilla anguilla), crucian carp (Carassius carassius) and catfish (Ictalurus nebulosus) from Vaccarès lagoon (French National Nature Reserve of Camargue)- effects on some physiological parameters*, Aquatic Toxicol., **48**, 443.
- Serrano, R., López, F.J., Hernández, F. (1999), *Multiresidue determination of persistent organochlorine and organophosphorus compounds in whale tissues using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatographic-mass spectrometric detection*, J. Chromatogr. A, **855**, 633.
- Wania, F., Mackay, D. (1993), *Global fractionation and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in polar regions*, Ambio, **22**, 10.
- Zöllner, N., Kersch, A. (1962), *Über die quantitative bestimmung von lipoiden (micromethode) mite es der vielen natürlichen lipoiden (allen bekamiten plasmalipoiden) gemeinsamen sulphosphovainillin reaktian*, J. High Resolut. Chromatogr., **135**, 545.

- Se han desarrollado dos procedimientos multiresiduales sencillos para la determinación de 10 OPs y 18 OCs en muestras humanas de suero y orina, mediante GC-NPD y GC-ECD. Uno de ellos está basado en LLME usando diclorometano como disolvente, mientras que el otro se basa en la extracción con cartuchos SPE tipo C₁₈. La introducción de un divisor de flujo en la columna capilar del sistema cromatográfico (GC provisto de dos detectores ECD y NPD) permite obtener señales simultáneas en ambos detectores, lo cual supone una reducción del número de inyecciones a realizar, además de una información más completa sobre la posible presencia de plaguicidas en una muestra. Estos procedimientos, en especial los desarrollados para muestras de suero, pueden resultar apropiados para detectar la presencia de plaguicidas OCs en programas de control.
- La aplicación del procedimiento basado en SPE a muestras de fluidos biológicos resulta más adecuada para la determinación de plaguicidas que la LLME. El procedimiento de SPE es más rápido, evita la formación de las emulsiones, frecuentes en la técnica de extracción con disolventes orgánicos, y permite la obtención de extractos más limpios. Sin embargo, los límites de detección obtenidos son, en muchos casos, insuficientes para el control biológico de la población en general, aunque sí resultan adecuados para la determinación de altos niveles de contaminantes en población expuesta.
- La estabilidad de los plaguicidas OPs en suero (aproximadamente 7 días) es mayor que en orina (3 días). En cuanto a los plaguicidas OCs, se mantienen estables en suero durante todo el período de tiempo estudiado (1 mes).
- El uso de la técnica SPME para el análisis de fluidos biológicos permite simplificar notablemente el tratamiento de muestra en comparación con las técnicas tradicionales, lo cual supone una reducción del tiempo de análisis, así como una menor manipulación de la muestra.

- Atendiendo a la complejidad de las muestras investigadas en el presente trabajo, y a la importancia de la confirmación inequívoca de los tóxicos presentes en las muestras reales, se han desarrollado métodos cromatográficos basados en GC-MS y GC-MS/MS para la determinación de los plaguicidas OPs y compuestos OCs. La incorporación de estas técnicas de detección conlleva un aumento de la selectividad y sensibilidad, parámetros indispensables para el control biológico de la población. Además, proporcionan una valiosa información estructural permitiendo la confirmación inequívoca de los compuestos detectados, en especial la técnica de espectrometría de masas en tándem mediante el procedimiento de fragmentación de las masas.
- Se ha llevado a cabo la determinación de plaguicidas OCs y OPs en muestras de orina y suero mediante SPME seguida de GC-ECD y GC-FPD. La inmersión directa de la fibra (PDMS) requiere que las muestras sean diluidas con agua (50 veces en el caso del suero, y 10 veces en la orina) con el fin de aumentar la eficacia de la extracción, y al mismo tiempo para proteger la fibra de los componentes de la matriz. La cuantificación se puede llevar a cabo mediante calibrado con patrones acuosos externos, requiriéndose el uso de patrones internos/*surrogates*. Los límites de detección obtenidos en suero (3-10 ng ml⁻¹ para OCs y 1-5 ng ml⁻¹ para OPs) y en orina (0.1-0.5 ng ml⁻¹ para OPs) permiten su aplicación principalmente a población expuesta. La determinación de plaguicidas OCs en orina mediante SPME no ha sido del todo satisfactoria.
- La aplicación de la técnica SPME en espacio de cabeza (HS-SPME) ha permitido la determinación de los plaguicidas OCs y OPs más volátiles en muestras de suero y sangre, usando GC-MS y GC-MS/MS para la medida. Para la correcta cuantificación se requiere un calibrado en matriz y el uso de patrones internos/*surrogates* marcados isotópicamente. A diferencia de los procedimientos desarrollados por SPME en modo inmersión directa, en los que se requiere la dilución previa de las muestras, la modalidad de espacio de cabeza permite obtener precisiones satisfactorias y bajos límites de detección

(0.05-5 ng ml⁻¹ para suero y 0.02-0.7 ng ml⁻¹ para sangre total), muy adecuados para el control, tanto de población expuesta como de no expuesta.

- Se han llevado a cabo diversos análisis de muestras reales de orina, suero y sangre total de agricultores y de población supuestamente no expuesta a plaguicidas. Se han aplicado los procedimientos desarrollados de SPE, SPME en inmersión directa y HS-SPME, y en todos los casos se han confirmado los resultados mediante GC-MS o GC-MS/MS. La detección ocasional de algunos plaguicidas OPs (*clorpirifos* y *fosalone*) y, más frecuentemente de compuestos OCs (*HCB*, β -*HCH*, *p,p'*-*DDE*, *p,p'*-*DDD*, *p,p'*-*DDT* y, en algunos casos, *endosulfan* o sus *metabolitos*) demuestra la eficacia de los métodos investigados, así como la exposición general de la población a plaguicidas.
- Las muestras de tejido adiposo humano constituyen una matriz biológica bastante problemática en cuanto al análisis de plaguicidas. Su elevado contenido en lípidos (aproximadamente un 84%) y los diferentes rangos de polaridad de éstos dificultan notablemente la etapa de purificación de los extractos, especialmente cuando se deben determinar analitos de diferentes polaridades, como ocurre en el caso del *endosulfan* y sus distintos *metabolitos*. Tradicionalmente, se ha utilizado el ácido sulfúrico concentrado para la eliminación de los lípidos en el análisis de OCs. Frente a este sistema de purificación, el uso de la técnica HPLC en fase normal (columnas de Silicagel) se muestra como una alternativa muy adecuada, tal como se comprueba en la presente Memoria. En cualquier caso, en este tipo de muestras grasas resulta necesaria la aplicación de procedimientos de purificación de elevada eficacia que permitan la determinación posterior por cromatografía de gases.
- Se han desarrollado procedimientos automatizados para la purificación de muestras de tejido adiposo humano mediante HPLC en fase normal, con columnas de Silicagel, para la determinación de uno de los pocos plaguicidas organoclorados que todavía se sigue usando en la agricultura, el *endosulfan*. Se ha investigado el propio plaguicida (α - y β -*endosulfan*), así como sus

principales *metabolitos* (-éter, -sulfato, -lactona y -alcohol). La determinación final se ha llevado a cabo mediante GC-ECD y/o GC-MS. El amplio rango de polaridad de los lípidos presentes en la matriz, así como de los compuestos estudiados ha impedido proponer un único procedimiento de purificación para todos ellos, siendo necesaria la aplicación de, al menos, dos procedimientos distintos: uno para el compuesto más apolar (α -*endosulfan*) y otro para el resto de compuestos más polares (β -*endosulfan* y *metabolitos*).

- El procedimiento de purificación HPLC desarrollado para α -*endosulfan* también permite la determinación de otros plaguicidas OCs y PCBs en la misma fracción. El procedimiento analítico global basado en la medida final de la correspondiente fracción de HPLC mediante GC-MS/MS permite un análisis rápido, eficiente y sensible de todos los analitos investigados con límites de detección en el rango de 0.5-5 ng g⁻¹.
- Los procedimientos de purificación por HPLC desarrollados permiten obtener los plaguicidas y sus *metabolitos* en fracciones libres de grasa, o con un contenido menor de 300 µg en fracciones de 1 ml. De este modo, la cantidad máxima de grasa inyectada en GC (2 µl inyección) es siempre menor de 600 ng (la máxima carga de grasa recomendada para columnas de gases capilares). Esto hace posible la inyección directa de las fracciones HPLC en el cromatógrafo de gases. El uso de HPLC como técnica de purificación presenta las siguientes ventajas: poca manipulación de muestra, corto tiempo de purificación, alta eficacia en la eliminación de los lípidos, alto grado de automatización, no destruye algunos analitos, a diferencia del ácido sulfúrico concentrado, y es útil para distintos rangos de polaridades. Además de todas las ventajas citadas, la aplicación de la purificación por HPLC permite un control *on-line* de la grasa que eluye en las distintas fracciones si se usa un detector de barrido de diodos.

- La aplicación de los procedimientos desarrollados al análisis de muestras reales de tejido adiposo, ha permitido la determinación de dos metabolitos de *endosulfan* (-éter y -sulfato) a unos niveles de concentración en el rango de 5-27 ng g⁻¹. Asimismo, se han encontrado diversos insecticidas OCs y PCBs, algunos de ellos en elevados niveles de concentración (especialmente, *HCB*, *p,p'-DDE* y β -*HCH*, así como los *PCBs* 138, 153 y 180). Estos resultados se encuentran en consonancia con otros datos publicados, y evidencian la alta capacidad de acumulación de este tipo de compuestos en tejidos grasos.

- Two simple multiresidue procedures have been developed for the determination of 10 OPs and 18 OC pesticides in human serum and urine samples, using GC-NPD and GC-ECD. One of them is based on LLME using dichlorometane, and the other one is based on SPE using C₁₈ cartridges. The introduction of a flow splitter into the capillary column of the chromatographic system (GC with two detectors ECD and NPD) allows obtaining simultaneous signals in both detectors. This reduces the number of the injections gives more information about the pesticides detected in a sample. These procedures are suitable to detect OC pesticides in monitoring programs.
- The application of the SPE procedure for the analysis of biological fluid samples leads to several advantages over the LLME procedure. The SPE procedure is faster, avoids the formation of emulsions, which are very frequent in the extraction with organic solvents, and allows obtaining cleaner extracts. However, the limits of detection can be insufficient for monitoring pesticides in the general population, although they are appropriate for analysis of the higher levels encountered in the exposed population.
- The stability of the OPs pesticides in serum (approximately 7 days) is higher than in urine (3 days). In the case of OC pesticides, they remain stable in serum during the entire period studied (1 month).
- The use of the SPME technique for the analysis of biological fluids allows a higher reduction of sample treatment in comparison to the traditional techniques. As a consequence, the analysis time and the sample manipulation are simplified.
- Chromatographic methods based on GC-MS and GC-MS/MS have been developed for the determination of OPs and OC pesticides due to their inherent advantages and the unequivocal confirmation of the contaminants detected in real samples. The use of these detection techniques allows the increase of the sensitivity and the selectivity, very important parameters for the biological

monitoring in general population. In addition, these techniques give a valuable structural information to confirm the identity of the compounds, especially in the case of the use of tandem mass spectrometry by means of the mass fragmentation procedure

- The determination of OC and OPs pesticides in urine and serum samples has been carried out by means of SPME before the GC-ECD and GC-FPD measurement. The direct immersion of the fibre (PDMS) requires the dilution of samples with water (50-fold for serum and 10-fold for urine) in order to improve the extraction efficiency and to protect the fibre from the matrix components. Quantitation can be performed by external standards prepared in distilled water, but the use of internal standards/surrogates is required. The limits of detection obtained in serum (3-10 ng ml⁻¹, for OCs, and 1-5 ng ml⁻¹, for OPs) and in urine (0.1-0.5 g ml⁻¹ for OPs) allow its major application in samples from exposed population. However, the results obtained for the determination of OC pesticides in urine samples by means of SPME have not been satisfactory.
- The application of headspace SPME (HS-SPME) allowed the determination of the most volatile OPs and OC pesticides in serum and blood samples by means of GC-MS and GC-MS/MS. The use of calibration curves prepared in the same matrix and isotopically labelled surrogates/internal standards are required to obtain a correct quantitation. HS-SPME procedures led to satisfactory precisions and lower limits of detection (0.05-5 ng ml⁻¹ for serum and 0.02-0.7 ng ml⁻¹ for whole blood) than the direct immersion procedures in which the dilution of the sample is compulsory. The results obtained for the HS-SPME procedures are adequate for the biological monitoring of the exposed and non-exposed population.
- Analyses of real urine, serum and blood samples from agricultural workers and supposed non-exposed population have been carried out. SPE, direct immersion SPME and HS-SPME procedures have been applied, and the detections were

always confirmed by GC-MS or GC-MS/MS. Occasionally, some OPs pesticides (*chlorpyrifos* and *phosalone*) have been detected and, more frequently, OC compounds (*HCB*, β -*HCH*, *p,p'*-*DDE*, *p,p'*-*DDD*, *p,p'*-*DDT* and, occasionally, *endosulfan* or its *metabolites*). This fact demonstrates the efficiency of the investigated methods and the exposure of general population to pesticides.

- The determination of pesticides in human adipose tissue samples is problematic. The high level of lipids contained in this type of matrix (approximately 84%) and the different polarity of this lipid composition make difficult the cleanup step, especially in the determination of analytes with a wide range of polarity, like as *endosulfan* and its *metabolites*. Although, the treatment with concentrated sulphuric acid has been traditionally used to separate OC compounds from lipids, normal phase HPLC (Silicagel columns) appears as an adequate cleanup approach, as it can be seen in this Thesis. Anyway, the analysis of these type of fatty samples needs the application of efficient cleanup procedures, before the GC determination.
- Automated cleanup procedures by means of normal phase HPLC, using Silicagel columns, have been developed for the determination of *endosulfan*, an OC insecticide still used nowadays in agricultural activities, in human adipose tissue. The pesticide *endosulfan* ($-\alpha$ and $-\beta$) and its main metabolites (*-ether*, *-sulfate*, *-lactone* and *-alcohol*) have been investigated. The final determination has carried out by means of GC-ECD and/or GC-MS. Due to the wide range of polarity of lipids contained in the matrix and the analytes studied, it is not feasible to apply an only cleanup procedure to determine all the compounds. Two different procedures were required, one for the less polar compound (α -*endosulfan*) and another one for the rest of more polar compounds (β -*endosulfan* and *metabolites*).

- The HPLC cleanup procedure developed for α -*endosulfan* also allowed the determination of other OC pesticides and PCBs collected in the same HPLC fraction. The whole analytical procedure, including the final determination of the corresponding HPLC fraction by means of GC-MS/MS, allows obtaining a rapid, efficient and sensible analysis with limits of detection in the range of 0.5-5 ng g⁻¹.
- The cleanup procedures developed by HPLC allowed the elution of pesticides and their metabolites in fractions free of fat or with amounts lower than 300 µg in 1-ml fractions. Thus, the maximum amount of fat injected in the GC (2 µl injection) is always lower than 600 ng (the maximum amount of fat recommended for capillary gas columns). For this reason, the HPLC fractions can be injected directly into the gas chromatograph. The advantages of using HPLC as a cleanup technique are the following: little sample manipulation, short cleanup time, high efficiency in the elimination of lipids, high automation degree, no destruction of analytes, as happens often when using concentrated sulphuric acid, and it is useful for a wide range of polarities. In addition, the application of cleanup procedures by HPLC allows the on-line monitoring of fats elution using a diode array detector.
- The application of the developed procedures for the analysis of real adipose tissue samples led to the determination of two *endosulfan* metabolites (-*ether* and -*sulfate*) at concentration levels in the range of 5-27 ng g⁻¹. Other OC insecticides and PCBs have been also detected, some of them at high concentrations levels (especially, *HCB*, *p,p'*-*DDE*, and β -*HCH*, and *PCBs* 138, 153 and 180). These results are in agreement with other data published, and demonstrate the high capacity of OC compounds to be accumulated in these kind of fatty samples.

SUGERENCIAS PARA POSTERIORES TRABAJOS

La realización de la presente Tesis Doctoral ha permitido adquirir la experiencia necesaria para avanzar en esta línea de investigación, con el fin de completar y ampliar la metodología analítica desarrollada o diseñar nuevas experiencias de análisis. A continuación, se presentan algunas sugerencias sobre posibles actuaciones futuras.

- ✓ Desarrollo de un método multiresidual para la determinación de plaguicidas OPs y OCs basado en SPE y posterior medida mediante GC-MS/MS. De este modo, se intentará mejorar la sensibilidad y selectividad del método, disminuyendo el ruido de fondo de los cromatogramas así como los límites de detección, en relación con el método desarrollado en la presente Memoria.
- ✓ Desarrollo de metodología analítica para la determinación de diversos plaguicidas en muestras de suero, que incluya una etapa de purificación mediante HPLC en fase normal.
- ✓ Ampliación de esta línea de investigación, basada en el uso de cromatografía de gases capilar, al estudio de metabolitos, especialmente en muestras de orina. Se estudiarían tanto los metabolitos específicos como los más generales (alquilfosfatos), aplicando técnicas de extracción, tales como SPE o SPME, y detección mediante GC. Para esto último, se requerirá una etapa adicional de derivatización.
- ✓ Ampliación de la técnica SPME a la determinación de PCBs en muestras de suero y sangre total.
- ✓ Continuación del análisis de muestras reales, tanto de orina, suero, sangre como de tejido adiposo humano. Control biológico periódico de trabajadores expuestos y de población no expuesta, analizando un mayor número de muestras, con el fin de obtener más datos sobre la presencia de plaguicidas y de metabolitos en la población agrícola, y poder evaluar los resultados obtenidos.

ARTÍCULOS DE LA TESIS

- “Multiresidue determination of organophosphorus and organochlorine pesticides in human biological fluids by capillary gas chromatography”
E. Pitarch, F.J. López, R. Serrano, F. Hernández
Fresenius J. Anal. Chem. , 369, 502-509 (2001)
- “Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluid using solid phase microextraction”
F.J. López, E. Pitarch, S. Egea, J. Beltran, F. Hernández
Anal. Chim Acta, 433, 217-226 (2001)
- “Headspace solid phase microextraction in combination with gas chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human blood”
F. Hernández, E. Pitarch, J. Beltran, F.J. López
J. Chromatogr. B (en prensa)
- “Gas chromatographic determination of selected pesticides in human serum by head-space solid phase microextraction”
J. Beltran, E. Pitarch, S. Egea, F.J. López, F. Hernández
Chromatographia, 54(11/12), Diciembre 2001
- “Multiresidue determination of endosulfan and metabolic derivatives in human adipose tissue using automated liquid chromatography clean up and gas chromatography analysis”
F. Hernández, E. Pitarch, R. Serrano, J.V. Gaspar, N. Olea
J. Anal. Toxicol. (en prensa)

- “Determination of organochlorine compounds in human adipose tissue using automated liquid chromatography clean up and gas chromatography analysis coupled to tandem mass spectrometry”

F. Hernández, E. Pitarch, R. Serrano, C. Guerrero

Chromatographia (enviado)

OTROS ARTÍCULOS RELACIONADOS

- “Automated sample clean-up procedure for organophosphorus pesticides in several aquatic organisms using normal phase liquid chromatography”
F. Hernández, R. Serrano, E. Pitarch, F.J. López
Anal. Chim. Acta , 374, 215-229 (1998)
- “Toxicity and bioconcentration of chlorpyrifos in aquatic organisms: artemia parthenogenetica (crustacea), gambusia affinis and aphanis iberus (pisces)”
I. Varó, R. Serrano, E. Pitarch, F. Amat, F.J. López, J.C. Navarro
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 65, 623-630 (2000)
- “Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain. Study of protein HSP 70 as biomarker of sublethal stress in fish”
I. Varó, R. Serrano, E. Pitarch, F. Amat, F.J. López, J.C. Navarro
Arch. Environ. Contam. Toxicol. (en prensa)
- "Determination of parathion, methylparathion and fenitrothion metabolites in human urine by coupled-column liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry"
F. Hernández, J.V. Sancho, O. Pozo, E. Pitarch
J. Chromatogr. B (enviado)
- “Determination of free dissolved poly aromatic hydrocarbons (PAHs) in pore water samples”
J. Environmental Sci. & Techn. (en fase de preparación)