

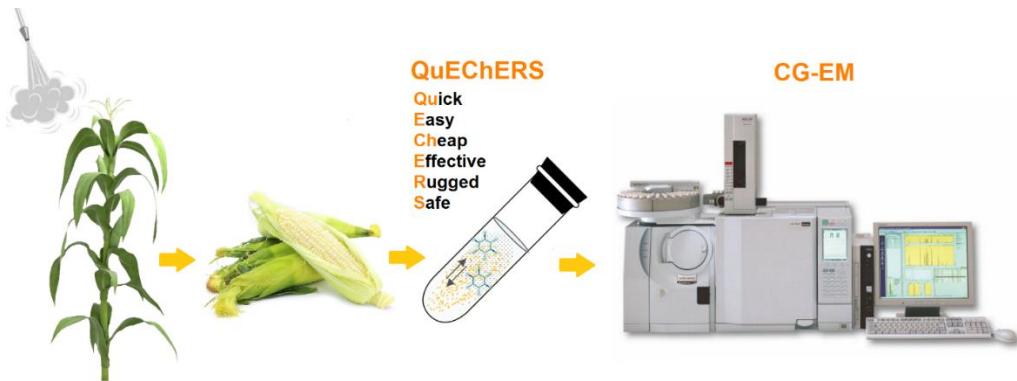


Jina M. Martínez^{1*}, Martha I. Páez¹

^{1*} Grupo de Investigación en Contaminación Ambiental por Metales y Plaguicidas GICAMP, Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali - Colombia

Corresponding author: jina.martinez@correounalvalle.edu.co

Graphycal abstract



Evaluation of the QuEChERS method with GC-MS detection for the determination of pesticides into white grain corn

Abstract

Corn is one of the most consumed cereal in the world; like most crops, the use of pesticides to control plagues is one of the main tools used during its production. Because the presence of these compounds in food can endanger human health, the analysis of residual pesticide is an important aspect of food security. The objective of this work was to evaluate the extraction methodology QuEChERS in the analysis of seven pesticides (Dichlorvos, α -BHC, β -BHC, Diazinon, Disulfoton, Chlorpyrifos, Endosulfan I) into white corn grains variety Amylase. The procedure involved an initial extraction phase using 10.0 g of sample and 10.0 mL of acetonitrile (ACN), followed by a liquid-liquid partitioning favored by 4.0 g of magnesium and 1.0 g of NaCl. The clean-up process was performed by dispersive solid phase extraction (d-SPE) using 150.0 mg of MgSO₄, 150.0 mg of PSA and 50.0 mg of C₁₈ per milliliter of extract. Quantitative analysis was performed by gas chromatography (GC) coupled with mass spectrometry (MS) operating in SIM / SCAN mode. Adequate recoveries (between 74.4-117.7%) with coefficients of variation (CV) of less than 12% were obtained, the detection limits (LoD) ranged was from 3.4 to 9.8 $\mu\text{g/L}$.

Keywords

QuEChERS

Corn

Pesticides extraction

Gas chromatography

Mass spectrometry

¹, and the quantification limits (LoQ) was between 8.8 to 29.7 $\mu\text{g L}^{-1}$. The method was used in corn samples collected in a crop in the Valle del Cauca, where the presence of Chlorpyrifos was detected, this pesticide is commonly applied to control pests such as *Phyllophaga spp.* and *Spodoptera frugiperda*.

Evaluación del método QuEChERS con detección por CG-EM para la determinación de pesticidas en granos de maíz blanco

Resumen

El maíz es uno de los cereales de mayor consumo en el mundo; como la mayoría de cultivos, el uso de plaguicidas para combatir las plagas es una de las principales herramientas utilizadas durante su producción. Debido a que la presencia de éste tipo de compuestos en los alimentos puede perjudicar la salud humana, el análisis de la residualidad de plaguicidas es un aspecto relevante de seguridad alimentaria. El objetivo de éste trabajo consistió en la evaluación de la metodología extractiva QuEChERS en el análisis de siete plaguicidas (Diclorvos, α -BHC, β -BHC, Diazinón, Disulfotón, Clorpirifos, Endosulfán I) en granos de maíz blanco de la variedad Amylace. El procedimiento implicó una primera fase de extracción utilizando 10.0 g de muestra y 10.0 mL de acetonitrilo (ACN), seguido de un particionamiento líquido-líquido propiciado por 4.0 g de magnesio y 1.0 g de NaCl. El proceso de limpieza se llevó a cabo por el método de dispersión en fase sólida (d-SPE), utilizando 150.0 mg de MgSO₄, 150 mg de PSA y 50.0 mg de C₁₈/mL de extracto. El análisis cuantitativo se llevó a cabo por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM) operando en modo SIM/SCAN. Se obtuvo recuperaciones apropiadas (entre 74.4-117.7%) con coeficientes de variación (CV) inferiores al 12%, los límites de detección (LOD) variaron entre 3.4 a 9.8 $\mu\text{g L}^{-1}$, y los límites de cuantificación (LOC) entre 8.8 a 29.7 $\mu\text{g L}^{-1}$. El método se utilizó en muestras de maíz recolectados en un cultivo en el Valle del Cauca, en donde se detectó la presencia de Clorpirifos, éste plaguicida es comúnmente aplicado para combatir plagas como la *Phyllophaga spp.* y la *Spodoptera frugiperda*.

Palabras claves

QuEChERS

Maíz

Extracción de plaguicidas

Cromatografía de gases

Espectrometría de masas

Received: 08-09-2016

Accepted: 02-10-2016

Publishing date: 15 - November - 2016

Revision Code: 20160908-EMCC [Pag. 15-29]

Corresponding author:

jina.martinez@correounalle.edu.co



Evaluación del método QuEChERS con detección por CG-EM para la determinación de pesticidas en granos de maíz blanco

Jina M. Martínez^{1*}, Martha I. Páez¹

^{1*} Grupo de Investigación en Contaminación Ambiental por Metales y Plaguicidas GICAMP, Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali - Colombia

Corresponding author: jina.martinez@correounivalle.edu.co

Resumen

El maíz es uno de los cereales de mayor consumo en el mundo; como la mayoría de cultivos, el uso de plaguicidas para combatir las plagas es una de las principales herramientas utilizadas durante su producción. Debido a que la presencia de éste tipo de compuestos en los alimentos puede perjudicar la salud humana, el análisis de la residualidad de plaguicidas es un aspecto relevante de seguridad alimentaria. El objetivo de éste trabajo consistió en la evaluación de la metodología extractiva QuEChERS en el análisis de siete plaguicidas (Diclorvos, α -BHC, β -BHC, Diazinón, Disulfotón, Clorpirifos, Endosulfán I) en granos de maíz blanco de la variedad Amylace. El procedimiento implicó una primera fase de extracción utilizando 10.0 g de muestra y 10.0 mL de acetonitrilo (ACN), seguido de un particionamiento líquido-líquido propiciado por 4.0 g de magnesio y 1.0 g de NaCl. El proceso de limpieza se llevó a cabo por el método de dispersión en fase sólida (d-SPE), utilizando 150.0 mg de MgSO₄, 150 mg de PSA y 50.0 mg de C₁₈/mL de extracto. El análisis cuantitativo se llevó a cabo por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM) operando en modo SIM/SCAN. Se obtuvo recuperaciones apropiadas (entre 74.4-117.7%) con coeficientes de variación (CV) inferiores al 12%, los límites de detección (LOD) variaron entre 3.4 a 9.8 $\mu\text{g L}^{-1}$, y los límites de cuantificación (LOC) entre 8.8 a 29.7 $\mu\text{g L}^{-1}$. El método se utilizó en muestras de maíz recolectados en un cultivo en el Valle del Cauca, en donde se detectó la presencia de Clorpirifos, éste plaguicida es comúnmente aplicado para combatir plagas como la *Phyllophaga spp.* y la *Spodoptera frugiperda*.

Palabras Claves

QuEChERS

Maíz

Extracción de plaguicidas

Cromatografía de gases

Espectrometría de masas

1. Introducción

El control químico de las plagas por medio del uso de plaguicidas, es uno de los principales recursos para mantener la rentabilidad y productividad de los cultivos [1]. Las problemáticas medioambientales que conllevan su uso, no sólo se originan por su mala disposición y aplicación, sino también por las propiedades fisicoquímicas de cada compuesto.

Estas propiedades juegan un papel fundamental, ya que muchos de ellos presentan una elevada persistencia, bioacumulación y facilidad de ser transportados a través del aire, agua y suelo [1-3]. Uno de las principales fuentes de exposición a los plaguicidas es el consumo de alimentos, por tanto, su determinación y monitorización rutinaria es un aspecto prioritario para la garantía de la seguridad alimentaria [4,5]. La Comisión del Codex

Alimentarius y la Unión Europea han definido los límites máximos de residuos de todos los alimentos y piensos [6,7]; para plaguicidas, éstos valores son relativamente bajos (en el orden de 10 ppb), lo que hace indispensable contar con metodologías eficaces para la determinación de éstos compuestos contaminantes.

La determinación analítica de plaguicidas en alimentos conlleva dos fases fundamentales: la extracción y la determinación instrumental [8-11]; en la extracción, el analito es aislado de los demás componentes de la matriz, lo que facilita su determinación instrumental. Dependiendo del tipo de plaguicida, generalmente el análisis instrumental se realiza por cromatografía de gases (CG) o cromatografía líquida (CL). Actualmente, este tipo de técnicas acopladas a espectrometría de masas (EM) es la más utilizada en el análisis de residuos de plaguicidas debido a su capacidad de identificación y sensibilidad [9].

En lo que respecta a métodos de extracción de plaguicidas en alimentos, se destaca el uso de los métodos de extracción en fase sólida (SPE) [12], microextracción en fase sólida (SPME) [13], extracción por microondas (MAE) [14], extracción acelerada con solventes (ASE) [15], entre otros. Sin embargo, éstos métodos requieren un mayor uso de solventes tóxicos, material de laboratorio, y diferentes etapas en la manipulación de las muestras; adicionalmente, la extracción de plaguicidas de diferentes polaridades suele ser una etapa experimental de relativa dificultad [8]. Entre los métodos actuales para el análisis de multiresiduos se destaca el método QuEChERS, acrónimo que hace referencia a sus principales ventajas Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe. Esta metodología ha tomado importancia debido a los buenos resultados a la hora de determinar una amplia gama de plaguicidas en frutas y vegetales, incluyendo una alta recuperación, repetitividad y facilidad del proceso extractivo [8,16-19]. De manera general, QuEChERS involucra una extracción basada en el reparto de los analitos entre una fase acuosa y una orgánica (solvente de extracción) inducida por la adición de sales; los extractos obtenidos son purificados por medio de una técnica de dispersión en fase sólida (d-SPE) que consiste en la interacción de la matriz con adsorbentes [8].

Por otro lado, desde su primera aplicación en el año 2003 [16], el método QuEChERS ha sido objeto de diferentes modificaciones. El método QuEChERS

original consiste en la extracción con acetonitrilo en una relación 1:1 muestra:solvente, con la adición de MgSO₄ y NaCl como sales de partición. Dos de los métodos modificados que han tenido mayor aceptación son: el método AOAC 2007.01 validado por la association of analytical communities (AOAC) en donde se utiliza un buffer de acetato con pH 4.5 [20] y el método EN 15662 validado por la European Committee for standardization (CEN) en donde se utiliza un buffer de citrato con pH 5.5 [21]. Teniendo en cuenta la importancia que ha adquirido la metodología QuEChERS como método de extracción, el objetivo de éste estudio fue la evaluación de la eficacia del método QuEChERS en la extracción de plaguicidas en granos de maíz blanco (variedad amylase o harinoso), implementando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) como técnica instrumental. La importancia del maíz como matriz de estudio radica en que éste es un alimento prioritario en muchos países, especialmente en Colombia, Perú y Bolivia [22].

2. Sección experimental

2.1 Materiales y reactivos

Se evaluaron siete plaguicidas (ver Tabla 1), cuatro organofosforados (OP), Diclorvos, Diazinón, Disulfotón, Clorpirifos y tres organoclorados (OC), α-Hexaclorobenceno (α-BHC), β-Hexaclorobenceno (β-BHC) y Endosolfán I; los cuales se adquirieron en ChemService y Dr Ehrertorfer con purezas superiores al 98%. Se prepararon soluciones individuales (1000 mgL⁻¹) y una mezcla de 5 mgL⁻¹ de todos los plaguicidas; esta última se utilizó en la preparación de las curvas de calibración. El 1-bromo-2-nitrobenceno (98% pureza, CehmService) se utilizó como estándar de recuperación.

En el proceso extractivo QuEChERS original 2003 (denotado como QuEChERS-2003), se utilizó como sales de partición MgSO₄ (Merck) y NaCl (Sigma Aldrich); para el método QuEChERS 2007.01 (denotado como QuEChERS-2007), el MgSO₄ anhidro y CH₃COONa se adquirieron de Agilent Technologies. En la limpieza de los extractos se usó una amina primaria secundaria (PSA, SPE Bulk Sorbent Agilent), Octadecilsilano (C₁₈, SampliQ Agilent) y carbón grafitado (GCB, SampliQ Agilent). El acetonitrilo (ACN) y el ácido acético glacial se adquirieron de J.T. Backer.

Tabla 1. Plaguicidas analizados y el estándar de recuperación con sus respectivos coeficientes de partición octanol agua (Kow), límites máximos de residuos y los iones monitoreados en CG-EM

Plaguicida	Tipo de plaguicida	Log Kow	Parámetros CG-EM, modo SIM	
			iones de cuantificación	Abundancia
Diclorvos	OP	1,43	109	100
Diazinón	OP	3,81	179	100
Disulfotón	OP	4,02	88	100
Clorpirifos	OP	4,96	197	100
α-BHC	OC	3,72	183	100
β-BHC	OC	3,72	183	100
Endosulfán I	OC	3,83	241	100
1-Br-2-nitrobenceno	-	2,5	201	100

2.2 Caracterización del maíz

Se determinó el contenido de agua y grasa del maíz, implementando la norma técnica NTC 2227 y extracción por soxhlet usando una mezcla de solvernte cloroformo:acetona 2:1, respectivamente. El porcentaje de proteína se calculó a través del contenido de nitrógeno total usando un equipo de análisis elemental Thermo Electron Corporation y un factor proteíco 6.25 para el maíz [23].

2.3 Métodos

2.3.1 Extracción QuEChERS y limpieza por dispersión en fase sólida (d-SPE)

Como un proceso de acondicionamiento, las muestras de maíz se homogenizaron agregando 30.0 mL de agua destilada por cada 50.0 g de maíz. El homogenizado se realizó a -4 °C. Inicialmente, dos versiones del método QuEChERS se compararon. Para el primer método, QueChERS-2003 [16], 10.0 g de maíz homogeneizado se mezclaron bajo agitación manual (1 min.) con 10.0 mL de ACN, a continuación, se adicionaron 4.0 g de sulfato de magnesio y 1.0 g de cloruro de sodio con posterior agitación (1 min.) y centrifugación (3.500 rpm, 1 min.). Para el segundo método, QuEChERS-2007 [20], se mezclaron 15.0 g de maíz y 15.0 mL de ACN acidificado al 1% con ácido acético glacial, posterior a la agitación de la mezcla se adicionaron 6.0 g de sulfato de magnesio y 1.5 g de acetato de sodio, para su posterior agitación y centrifugación de igual manera que en el método QueChERS-2003. En la limpieza de los extractos, se tomaron 5.0 mL de la fase orgánica y se mezclaron bajo agitación manual (1 min.) con 250 mg de PSA, 250 mg de C₁₈

y 750 mg de sulfato de magnesio anhidro (50 mg, 50 mg y 150 mg por mL de extracto, respectivamente), finalmente, la mezcla se centrifugó a 3500 rpm por 5 min. Una alícuota de 4.0 mL se tomó y se evaporó hasta sequedad con un flujo de nitrógeno constante. Después, los plaguicidas se redissolvieron con 1.0 mL de ACN para su posterior análisis cromatográfico. Adicionalmente, se realizaron dos pruebas de limpieza a los extractos obtenidos por el método QuEChERS-2003; la primera modificación consistió en el uso adicional de 7.5 mL de GCB/mL de extracto y la segunda modificación consistió en el aumento de la cantidad de PSA, utilizando 150 mg/mL de extracto.

2.3.2 Método instrumental

Los extractos se inyectaron en modo splitless usando CG-EM con triple cuadrupolo en la modalidad FASST (Fast Automated Scan/SIM Mode). Se utilizó helio como gas portador a una presión constante 57.5 kPa y una columna SHRXI 5MS (30 m x 0.25 d.i. x 0.25 μm e.f.). La programación del horno, inició en 60 °C por 2 min., seguido de un aumento de temperatura hasta 310 °C con una razón de 10 °C min⁻¹, manteniendo la temperatura por 13 min. Como modo de ionización en el EM se utilizó el impacto electrónico (+EI), con una temperatura de fuente de iones de 290 °C y de 280 °C en la interfase. Para cada plaguicida, los iones monitoreados en el modo SIM se muestran en la Tabla 1.

2.3.3 Parámetros de calidad analítica

La cuantificación instrumental de los plaguicidas se realizó por calibración externa, se evaluó el rango lineal de las curvas de calibración en ACN y en la

matriz, éstas últimas se prepararon a partir de extractos orgánicos obtenidos del maíz.

La precisión y exactitud del método extractivo QuEChERS se verificó fortificando muestras de maíz libre de plaguicidas y realizando las respectivas extracciones intra- e interdía. La sensibilidad se evaluó calculando límites de detección (LOD, $3.3\sigma/a$) y límites de cuantificación (LOC, $10 \sigma/a$) utilizando las desviaciones estándar (σ) y las pendientes (a) de las regresiones lineales. Adicionalmente, se evaluó el efecto matriz comparando las áreas cromatográficas de los plaguicidas en solvente y en matriz.

4. Resultados y discusión

4.1 Caracterización y procedimientos extractivos

El maíz es una matriz compleja debido a los diferentes tipos de compuestos que lo conforman, posee un alto contenido en lípidos, proteínas, vitaminas, azúcares, carbohidratos, entre otros [22]. Esta pluralidad en composición hace que, en los procesos extractivos mediados con solventes, muchos de estos compuestos logren pasar a la fase orgánica extractiva y de esta manera lleguen al sistema cromatográfico dificultando el análisis instrumental. El método QuEChERS es un método multiresiduos, lo que indica que es capaz de extraer compuestos de diferente polaridad, por tanto, cierta cantidad de compuestos diferentes a los analitos son extraídos, razón por la cual, la etapa de limpieza d-SPE es indispensable, puesto que permite que los co-extractivos sean retenidos en los adsorbentes [8,19].

En la Tabla 2 se muestra la caracterización realizada a los granos de maíz. Se obtuvo un porcentaje de grasa del 2.2%. Según Anastassiades y Lehotay (2003), para frutas y vegetales con porcentajes de grasa superiores al 2%, se sugiere la adición de C₁₈ en la etapa de limpieza [8], razón por la cual se tuvo en cuenta el uso de este adsorbente junto con el PSA en la etapa d-SPE.

A pesar del uso de los adsorbentes, diferentes compuestos fueron co-extraídos, principalmente ácidos grasos. En la Figura 1 se muestran los cromatogramas en modo Full-Scan tanto para el método QuEChERS-2003 como para el método QuEChERS-2007, evidenciándose una mayor cantidad de co-extractivos para el método bufferado.

Tabla 2. Caracterización del maíz blanco utilizado en los análisis

Parámetro	Valor
Porcentaje de humedad (%)	$72,1 \pm 2,2$
Porcentaje de grasa (%)	$2,2 \pm 0,3$
%N	$2,7 \pm 0,5$
%C	$41,7 \pm 0,9$
%H	$6,9 \pm 0,3$
%Proteína	$17,2 \pm 0,5$

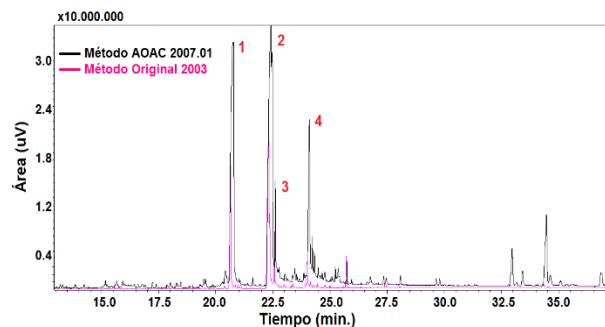


Figura 1. Cromatogramas en modo Full-scan de los extractos obtenidos de los métodos QuEChERS-2007 y QuEChERS-2003. Ácidos grasos identificados: (1) ácido pentadecanoico, (2) ácido linoleico, (3) ácido oleico, (4) ácido esteárico.

La mayor cantidad de co-extractivos lipídicos presentes en el método QuEChERS-2007 se debe posiblemente a la presencia de ácido acético adicionado, ya que por reacciones tipo ácido-base, la adsorción de azúcares y ácidos grasos por parte del PSA se puede ver inhibida. Resultados parecidos, han sido reportados por Lehotay y Matlosvska (2008) en extracciones realizadas en cereales [19]. Por lo anterior, se descartó el uso del método QuEChERS-2007 en la evaluación multi-residual en la matriz de análisis.

Para mejorar la limpieza de los extractos obtenidos con el método QuEChERS-2003, se realizaron dos modificaciones en la etapa d-SPE. En la Figura 2 se muestran tres cromatogramas, el primero corresponde al método inicialmente evaluado nombrado como L1 y los métodos L2 y L3 corresponden al método con adición de GCB y aumento de PSA respectivamente. La limpieza L3 mostró ser la más efectiva, por tanto, con la adición de PSA, gran cantidad de lípidos pueden ser removidos de la fase orgánica de los extractos.

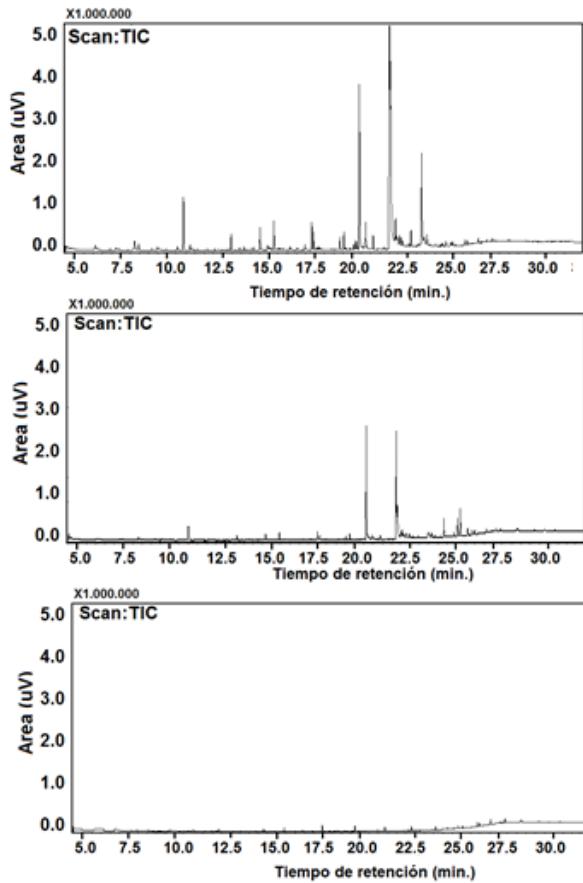


Figura 2. Cromatogramas en modo Full-scan de extracciones obtenidas del método QuEChERS-2003 con variaciones en la adición de adsorbente de limpieza. (1) 50 mg PSA, 50 mg C₁₈, (2) 50 mg PSA, 50 mg C₁₈, 7.5 mg GCB, (3) 150 mg PSA, 50 mg C₁₈ (Cantidades por mL de extracto).

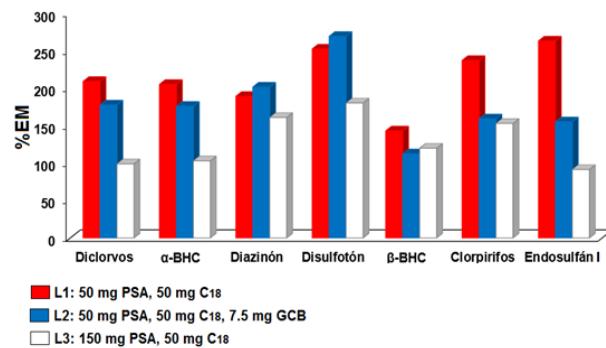


Figura 3. Comparación de los porcentajes de efecto matriz (%EM) determinados para cada método d-SPE evaluado (L1, L2, L3).

Con el objetivo de seleccionar el mejor método de limpieza, se determinó por medio de la Ec. 1 el

porcentaje de efecto matriz (%EM) para cada plaguicida con cada una de las variaciones d-SPE evaluadas. El %EM es un indicativo porcentual de la diferencia entre las áreas cromatográficas obtenidas con el solvente y las obtenidas con los extractos procedentes de las diferentes limpiezas evaluadas (L1, L2, L3).

$$\%EM = \frac{A_m}{A_s} \times 100 \quad (1)$$

Donde A_s y A_m son las áreas del solvente y de la matriz, respectivamente. Un menor %EM puede considerarse como indicio de un menor efecto de los componentes de la matriz en las áreas de los analitos [24]. En la Figura 3 se observa menores %EM para la limpieza L3, por tanto, ésta se seleccionó como limpieza d-SPE.

4.2 Parámetros de calidad analítica

La Figura 4 muestra el cromatograma en modo SIM y los tiempos de retención (tr) obtenidos mediante CG-EM al inyectar una mezcla estándar de los 7 plaguicidas en ACN. La elución de los analitos se produjo en un intervalo de tiempo comprendido entre los 11.9 y 22.8 minutos, siendo aceptable la resolución cromatográfica para todos ellos.

Las curvas de calibración en matriz presentaron coeficientes de correlación apropiados, $r^2 > 0.9914$, indicando un ajuste lineal entre las áreas cromatográficas y la concentración. En la Figura 5 se muestran las curvas de calibración, las ecuaciones de cada una de las rectas y los r^2 para cada plaguicida.

En la Tabla 3 se muestra los parámetros de calidad evaluados. Para el β-BHC, Clorpirifos y Endosulfán I se obtuvieron los mejores valores de sensibilidad instrumental y metodológica; para el método extractivo; los LOD variaron entre 3.4-9.8 $\mu\text{g L}^{-1}$, y los LOC entre 8.8 – 29.7 $\mu\text{g L}^{-1}$. En la Figura 6 se muestran los porcentajes de recuperación (%R) obtenidos en las fortificaciones realizadas en el maíz, los %R estuvieron entre 74.4 – 117.7% con coeficientes de variación < 12%, valores adecuados para la determinación cuantitativa de los plaguicidas. El porcentaje de recuperación relativamente bajo para el Diclorvos, puede ser explicado por su elevada solubilidad en agua y por su coeficiente de reparto octanol-agua bajo (18 kg L^{-1} y

1.90, respectivamente [25]), por tanto, es posible que durante el proceso de extracción, cierta cantidad de éste plaguicida se mantuviera en la fase acuosa y no llegara completamente a la fase orgánica, adicionalmente, se ha evidenciado que compuestos con estas características son más susceptibles a degradación o adsorción en el inyector durante el proceso de análisis croma-tográfico [24]. Los %R en las extracciones y los porcentajes de covarianza obtenidos están acordes con la normativa internacional española (SANTE, 2015) que establece porcentajes de recuperación entre 70-120% y coeficientes de variación < 20% [26].

4.3 Aplicación del método QuEChERS

El método evaluado se utilizó en maíz blanco harinoso proveniente de un cultivo ubicado en la zona rural del municipio de Pradera (Valle del Cauca, 3°24.8'N, 76°13.9'O). Éste cultivo fue fumigado principalmente con el producto químico comercializado como Lorsban, que contiene como ingrediente activo Clorpirifos, utilizado para combatir plagas como la *Phyllophaga spp.* (Gallina ciega) y la *Spodoptera frugiperda* (Oruga cogollera) [27].

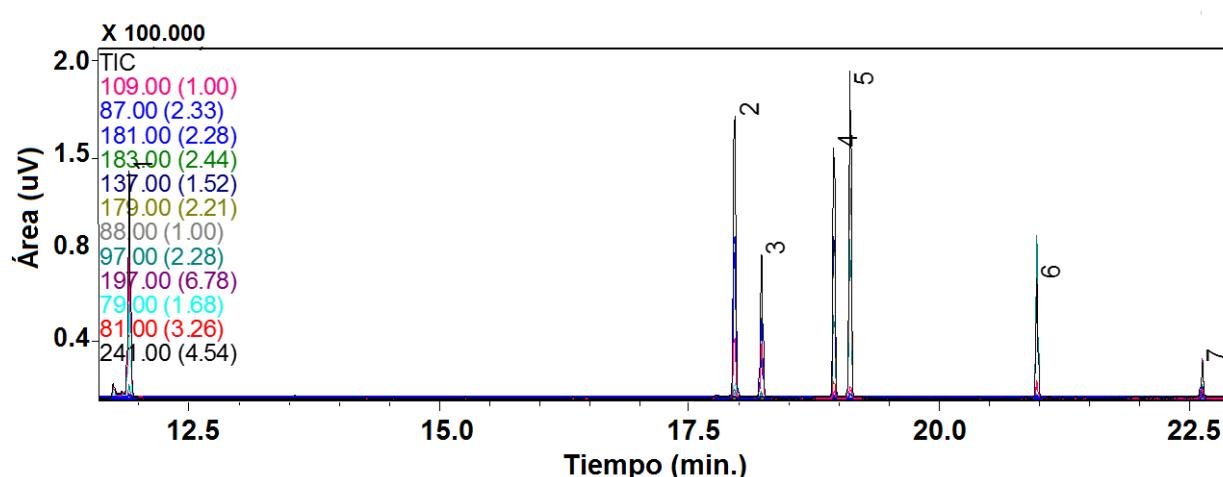


Figura 4. Cromatograma en modo SIM de la mezcla de plaguicidas en solvente a 100 ppb: (1) Diclorvos, tr: 11.9 (2) α -BHC, tr: 17.9 (3) β -BHC, tr: 18.2 (4) Diazinón, tr: 18.9 (5) Disulfotón, tr: 19.1 (6) Clorpirifos, tr: 20.9 (7) Endosulfán I, tr:22.6.

Tabla 3. Parámetros de calidad evaluados en la extracción y análisis de plaguicidas en maíz (Método QuEChERS/CG-EM). Porcentaje de recuperación (%R), Porcentaje de covarianza (%CV), Límite de cuantificación (LC), Límite de detección (LD).

Plaguicida	%R (n=6)	%CV (n=6)	Sensibilidad Instrumental (μgL^{-1})		Sensibilidad del método (μgL^{-1})	
			LOC	LOD	LOC	LOD
Diclorvos	74,4	15,1	66,1	22,1	26,4	8,8
α -BHC	106,0	7,4	34,2	11,3	13,7	4,5
β -BHC	114,7	18,1	25,8	8,5	10,3	3,4
Diazinón	99,6	19,6	74,1	24,5	29,7	9,8
Disulfotón	110,3	11,2	53,3	17,6	21,3	7,0
Clorpirifos	117,7	0,7	20,4	9,4	8,2	3,7
Endosulfán I	110,7	1,8	21,9	9,6	8,8	3,8

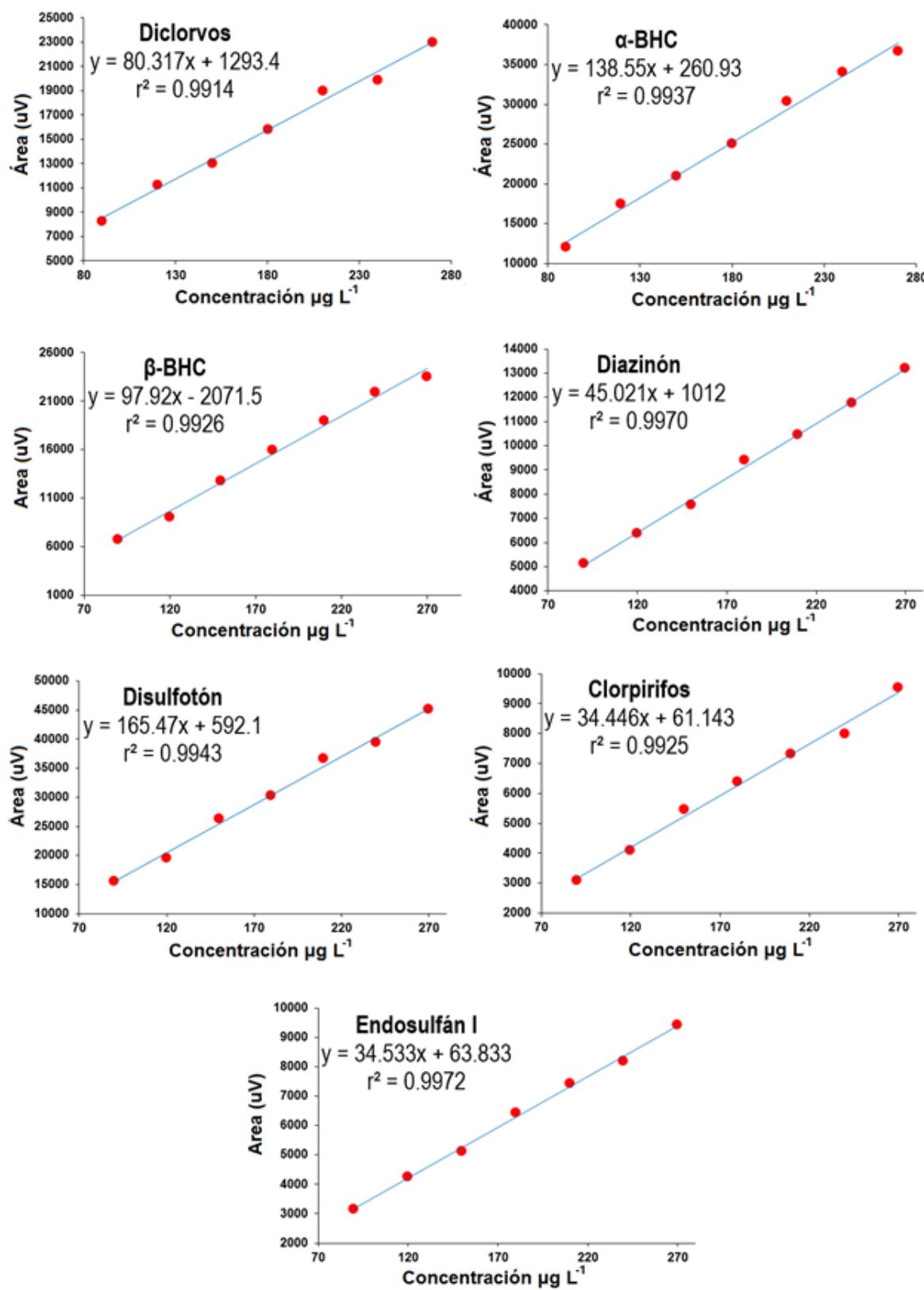


Figura 5. Curvas de calibración en matriz de los siete plaguicidas analizados.

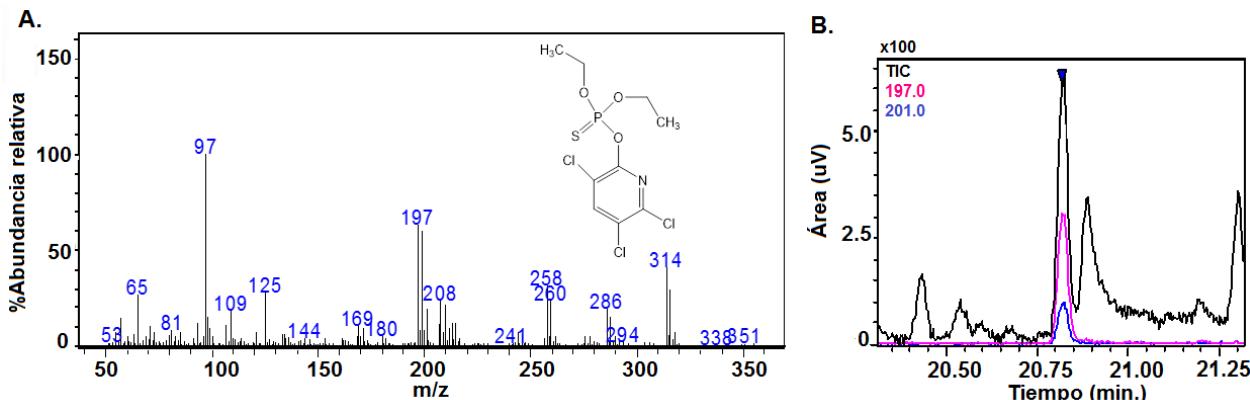


Figura 6. Clorpirifos detectado en una muestra de granos de maíz analizado con la metodología QuEChERS evaluada. (A) Espectro de masas, (B) Sección cromatográfica del compuesto detectado.

Como lo muestra la Figura 6, en una de las muestras colectadas se encontró residuos de éste plaguicida, la concentración no fue cuantificable puesto que se encontró por debajo del LOC, sin embargo, el seguimiento de los iones, el tiempo de retención concordante y el espectro de masas corroboró su presencia.

5. Conclusiones

La metodología preparativa QuEChERS y el análisis instrumental por CG-EM se evaluaron en la extracción y análisis de plaguicidas organoclorados y organofosforados en granos de maíz blanco. El método QuEChERS-2003 presentó menores efectos de matriz y cromatogramas más limpios comparados con los obtenidos en el método QuEChERS-2007, razón por la cual se seleccionó como método final extractivo combinándolo con una limpieza d-SPE basada en la adición de 150 mg de PSA y 50 mg de C₁₈ por mililitro de extracto. Se obtuvo porcentajes de recuperación entre 74.4-117.7 % con CV < 12%, resultados analíticos acordes con las exigencias internacionales. Finalmente, el método fue utilizado en el análisis de muestras de maíz en las cuales se detectó Clorpirifos, un plaguicida organofosforado de uso extendido en los cultivos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Jose Manuel Martínez por su colaboración en el desarrollo de éste trabajo.

Autores agradecen al Program for Scientific Knowledge Diffusion of Mindtech s.a.s. (PSKD 2016-2020) por los fondos asociados a los costos de publicación.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses de ningún tipo en relación a la publicación.

Referencias

- [1] Aktar, W., Sengupta, D., Chowdhury, A. *Interdisc Toxicol.* **2009**; 2(2):1-12
- [2] Wong, M., Leung, O., Chan, J., Choi, M. *Chemosphere*, **2005**; 60(6):740.
- [3] Sharma, B., Bharat, G., Tayal, S., Nizzetto, L., Cupr, P., Larssen, T. *Environ. Int.*, **2014**; 66: 48.
- [4] EPA, US Environmental Protection Agency, <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/assessing-human-health-risk-pesticides>.
- [5] Barrio, R., Lemos, J., Sampedro, C., De Arriño, A., Ortiz, A. *J Food Compost Anal.* **2016**; 49(1): 35-41
- [6] Codex Alimentarius, <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html?lang=es>.
- [7] Directorate General for Health & Consumers-European Commission. Pesticide Residues MRLs-Regulation (EC) No. 396/2005. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm.
- [8] Wilkowska, A., Biziuk, M. *Food Chemistry*. **2011**; 125:803-812
- [9] Lambroupoulou, D., Albanis, T. *Anal Bioanal Chem.* **2007**; 389:1663-1683
- [10] Zhang, L., Liu, S., Cui, X., Pan, C., Zhang, A., Chen, F. *Cent Eur J of Chem.* **2012**; 10(3):900-925.
- [11] Gilbert-López, B., García-Reyes, J., Molina-Díaz, A. *Talanta*. **2009**; 79(2):109-128
- [12] Yang, X., Zhang, H., Liu, Y., Wang, J., Zhang, Y., Dong, A., Zhao, H., Sun, C., Cui, J. *Food Chem.* **2011**; 127: 855-865.
- [13] Filho, A., Santos, F., Pereira, P. *Talanta*. **2010**; 81:346-354.
- [14] Papadakis, E., Vryzas, A., Mourkidou, E. *J Chromatogr A*. **2006**; 1127: 6-11

- [15] Sun, H., Ge, X., Lv, Y., Wang, A. *J Chromatogr A*. **2012**; 1237: 1–23.
- [16] Anastassiades, M., Lehotay, S., Stajnbaher, D., Schenck, F. *J AOAC Int.* **2003**; 86(2): 412–431.
- [17] Cieślik, E., Sandowska-Rociek, A., Molina, J., Surma-Zadora, M. *Food Chemistry*. **2011**; 125(2):773–778.
- [18] Lehotay, S., Son, K., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., Leepipatpiboon, N. *J Chromatogr A*. **2010**; 1217(16): 2548–2560.
- [19] Mastovska, K., Dorweiler, K., Lehotay, S., Wegscheid, J., Szpylka, K. *J Agric Food Chem*. **2010**; 58(10): 5959–5972.
- [20] AOAC Official Method 2007.01. http://www.weber.hu/PDFs/QuEChERS/AOAC_2007_01.pdf.
- [21] BS EN 15662:2008 2008. http://www.chromnet.net/Taiwan/QuEChERS_Dispersive_SPE/QuEChERS_EN156622008.
- [22] Ranum, P., Peña-Rosas, J., García-Casal, M., Ann, N. *Acad Sci*. **2014**; 1312:105–112.
- [23] FAO, Methods of food analysis. <http://www.fao.org/docrep/006/y5022e/y5022e03.htm>.
- [24] Poole, C. *J Chromatogr A*. **2007**; 1158(1-2): 241–250.
- [25] Dichlorvos, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2931.html>.
- [26] SANTE/11945/2015. Analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, European Commission. Guía, UE, 42 p.
- [27] Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de maíz; Bib. Orton IICA/CATIE, 1990: Turrialba, Costa Rica, 1990; 28–31p.

**Appendix A:** Evaluation of the QuEChERS method with GC-MS detection for the determination of pesticides into white grain cornJina M. Martínez^{1*}, Martha I. Páez¹^{1*} Grupo de investigación en contaminación ambiental por metales y plaguicidas GICAMP, Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali - ColombiaCorresponding author: jina.martinez@correounalvalle.edu.co**Abstract**

Corn is one of the most consumed cereal in the world; like most crops, the use of pesticides to control plagues is one of the main tools used during its production. Because the presence of these compounds in food can endanger human health, the analysis of residual pesticide is an important aspect of food security. The objective of this work was to evaluate the extraction methodology QuEChERS in the analysis of seven pesticides (Dichlorvos, α-BHC, β-BHC, Diazinon, Disulfoton, Chlorpyrifos, Endosulfan I) into white corn grains variety amylose. The procedure involved an initial extraction phase using 10.0 g of sample and 10.0 mL of acetonitrile (ACN), followed by a liquid-liquid partitioning favored by 4.0 g of magnesium and 1.0 g of NaCl. The clean-up process was performed by dispersive solid phase extraction (d-SPE) using 150.0 mg of MgSO₄, 150.0 mg of PSA and 50.0 mg of C₁₈ per milliliter of extract. Quantitative analysis was performed by gas chromatography (GC) coupled with mass spectrometry (MS) operating in SIM / SCAN mode. Adequate recoveries (between 74.4-117.7%) with coefficients of variation (CV) of less than 12% were obtained, the detection limits (LoD) ranged from 3.4 to 9.8 µg L⁻¹, and the quantification limits (LoQ) was between 8.8 to 29.7 µg L⁻¹. The method was used in corn samples collected in a crop in the Valle del Cauca, where the presence of Chlorpyrifos was detected, this pesticide is commonly applied to control pests such as *Phyllophaga spp.* and *Spodoptera frugiperda*.

[\[Complete version\]](#)**1. Introduction**

Chemical control of pests through the use of pesticides, is one of the main resources to maintain profitability and productivity of crops. Environmental problems involving its use, not only are caused by bad application, the physicochemical properties of each compound also play a key role, since many of them have high persistence, bioaccumulation and are easily transported through the air, water and soil. One of

the main sources of exposure to pesticides is food consumption, therefore, their determination and routine monitoring is a priority area at the food security. The Codex Alimentarius Commission and the European Union set maximum residue limits of all food and feed; for pesticides, these values are relatively low (in the order of 10 ppb). The analytical determination of pesticides in food involves two basic stages: extraction and instrumental determination; in the extraction stage, the analyte is isolated from the other components of

Keywords

QuEChERS

Corn

Pesticides extraction

Gas chromatography

Mass spectrometry

the matrix, which facilitates its determination instrumental. Depending on the type of pesticide, usually the instrumental analysis, by gas chromatography (GC) or liquid chromatography (LC), is the most widely used in the analysis of waste pesticide because of its ability to identification and sensitivity. Usually, GC and LC techniques are coupled to mass spectrometry (MS). Among the food-pesticide extraction methods are solid phase extraction, solid phase microextraction, microwave extraction stands, accelerated solvent extraction.

However, these methods require greater use of toxic solvents, robust laboratory equipment, and different stages in the handling of samples; additionally, the extraction of pesticides with different polarities is often difficult. Among the current multianalysis methods, the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe stands) permits to obtain good results in determining a wide range of pesticides in fruits and vegetables, with high recovery, repeatability and ease of extraction process. Generally, QuEChERS extraction is based on the distribution of the analytes between an aqueous phase and an organic (solvent extraction) induced by the addition of salts; later, the extracts obtained are purified by a technique solid phase dispersion (d-SPE) by the interaction of the matrix with adsorbents.

Given the importance attached to the QuEChERS methodology as extraction method, the objective of this work was to evaluate the extraction methodology QuEChERS in the analysis of seven pesticides (dichlorvos, α -BHC, β -BHC, diazinon, disulfoton, chlorpyrifos, endosulfan I) in white corn grains variety Amylase. The importance of maize as study material is its importance as food in many countries, especially in Colombia, Peru and Bolivia.

For additional information:

- See long version of article ([spanish version](#)),
- Consult the reference list ([see references](#)) or
- Write to corresponding author:
jina.martinez@correounivalle.edu.co

2. Methodology

2.1. Material and reagents

Pesticides evaluated were: four organophosphorus (dichlorvos, diazinon, disulfoton, chlorpyrifos) and three organochlorine (α -hexachlorobenzene (α -BHC), β -hexachlorobenzene (β -BHC), endosulfán I) with 5 mg L^{-1} of concentration (for individual pesticides and mixture with all pesticides). 1-bromo-2-nitrobenzene was used as recovery standard. In addition, the extraction method used was the original QuEChERS (2003), which uses magnesium sulfate and sodium chloride. Primary Secondary Amine, octadecylsilane (C_{18}) and graphited carbone were used for cleaning of the extracts.

2.2. Maize characterization

The water content and fat were determined by standard technique (NTC 2227) and soxhlet extraction, respectively. The percentage of protein was determined by total nitrogen content (proteic factor for maize was 6.25).

2.3. Methods

2.3.1. Extraction by QuEChERS and cleaning by solid phase dispersion (d-SPE)

Maize samples were homogenized adding 30.0 mL of bidistilled water per 50.0 g of maize at -4°C . Two QuEChERS methods were compared: original QuEChERS 2003 (10.0 g of maize + 10 mL of acetonitrile + 40 g of MgSO_4 + 1.0 g of NaCl) and QuEChERS 2007.01 (15.0 g of maize + 15 mL of acetonitrile + acetic acid 1% + 6.0 g of MgSO_4 + 1.5 g of CH_3COONa) [see details in ref. 16 and 20].

For the cleaning of the extracts, 5.0 mL of organic phase were mixed with 250 mg of PSA, 250 mg of C_{18} and 750 mg of MgSO_4 (3500 rpm per 5 min). An aliquot of 4 mL was taken and evaporated to dryness with a constant flow of nitrogen. Then, pesticides were redisolved with 1.0 mL of acetonitrile for later chromatographic analysis.

Two cleaning methods were performed for original QuEChERS-2003. The first modification

was the additional use of 7.5 mL of GBC (graphite carbone) per mililiter of extract, and the second modification was the increase of PSA amount, utilizing 150 mg per mililiter of extract.

2.3.2. Instrumental method

Extracts were injected at splitness mode using a gas chromatograph coupled to mass spectrophotometer with triple quadrupole at mode FASST (Fast Automated Scan / SIM Mode). Helium was used as gas transporter (57.5 kPa) and using a colum SHRXI 5MS (30 m x 0.25 d.i. x 0,25 μm e.f.). Programming the oven, starting from 60 °C for 2 min., and increasing the temperature to 310 °C with a rate of 10 °C min⁻¹, keeping the temperature 13 min. Electron impact (EI +) was used as ionisation mode in MS, in addition, an ion source temperature of 290 °C and 280 °C at the interface were used. For each pesticide, the monitored ions are described in the Table 1 (see [Table 1](#), long version).

2.3.3. Analytical quality parameters

The instrumental quantification of pesticides was performed by external calibration, the linear range of the calibration curves was evaluated using acetonitrile and in the matrix, the latter are prepared from organic extracts obtained form maize. The precision and accuracy extractive method QuEChERS was verified fortifying the samples using pesticide-free corn and making the intra- and interday extractions. The sensitivity was evaluated by calculating the limits of detection and quantification using the slope and standard deviation of the linear regressions. In addition, the matrix effect was evaluated by comparing the areas of pesticides chromatographic solvent and matrix.

3. Results and discussion

The Quechers method is a multiresidue method, indicating that is capable of extracting compounds of different polarities, therefore, a number of different compounds to analytes are extracted, for this reason, the cleaning step d-SPE is indispensable, since it allows that the co-extractives are retained in the adsorbents. The results of the characterization are shown in the

[Table 2](#) (results are: moisture percentage: 72.1 ± 2.2 %, greasy percentage: 2.2 ± 0.3 %, %N: 2.7 ± 0.5 %, %C: 41.7 ± 0.9 %, %H: 6.9 ± 0.3 %, and protein percentage: 17.2 ± 0.5 %).

Different compounds were co-extracted, mainly fatty acids (see [Figure 1](#)). Most co-extractives lipid obtained by the method Q-2007 is possibly due to the presence of acetic acid added, which can promote such acid-base reactions, adsorption of sugars and the adsorption of fatty acids by the PSA can be inhibited.

Two modifications of cleaming method were performed (see [Figures 2](#) and [Figure 3](#)). The cleaning L3 (150 mg of PSA and 50 mg of C₁₈) showed be the most effective, therefore, with the addition of PSA, large amounts of lipids can be removed from the organic phase of extracts. In addition, the percentage of matrix effect was lower for the modification L3 (this percentage can be considered as an indication of a lesser effect of the matrix components in the areas of analytes).

[Figure 4](#) shows the chromatogram in SIM mode and retention times (tr) obtained by GC-MS to inject a standard mixture of seven pesticides in ACN (elution time for analytes were 11.9 and 22.8 minutes, being an adequate cromathografic resolution for all them) (see [Table 3](#)).

Calibration curves for pesticides are shown in the [Figure 5](#). The best results were obtained for β-BHC, Chlorpyrifos and Endosulfan I, with detection and quantization limits of 3.4-9.8 and 8.8 – 29.7 μg L⁻¹, respectively. The percentages of recovery were between 74.4 and 117.7 % with variation coefficient: 12 %.

The relatively low percentage recovery for Dichlorvos, can be explained by its high water solubility and by its low octanol-water partition coefficient (18 kgL⁻¹ and 1.90, respectively). Therefore, it is possible that during the extraction process, a quantity of the pesticide is retained in the aqueous phase and not fully reach the organic phase, additionally, it has been shown that compounds with these characteristics are more susceptible to degradation or adsorption in the injector during the chromatographic analysis process.

The method was evaluated QuEChERS flouy white maize from a crop located in the rural area of the municipality of Pradera (Valle del Cauca, 3°24.8'N, 76°13.9' W). This culture was fumigated primarily with chemical marketed as

Lorsban, containing as active ingredient Chlorpyrifos, used to control pests such as *Phyllophaga spp.* (Blind chicken) and *Spodoptera frugiperda* (Caterpillar cogollera).

As it is shown in the [Figure 6](#), in one of the samples collected, residue of Clorpirifos is found, the concentration was not quantifiable since this was below to quantification limit, however, the monitoring of ions, retention time and mass spectrum are concordant and confirmed its presence.

4. Conclusions

QuEChERS preparative methodology and instrumental analysis by GC-MS were evaluated in the extraction and analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in grains of white corn. The QuEChERS-2003 method had lower matrix effects and chromatograms cleaner compared with those obtained in the QuEChERS-2007 method; for this reason, it was selected as extractive method the QuEChERS-2003, which

was combined with a cleaning d-SPE based addition of 150 mg of PSA and 50 mg of C₁₈ per milliliter of extract. Recovery percentages were between 74.4-117.7 % with coefficient of variation < 12%, being these results consistent with the international requirements. Finally, Chlorpyrifos was detected using the selected method for the analysis of local white maize.

Acknowledgment

The authors thank Dr. Jose Manuel Martinez for their collaboration in the development of this work. Authors thanks to Program Mindtech for Scientific Knowledge Diffusion of Mindtech s.a.s. (PMSKD 2016-2020) by funds associated to the publication costs.

Interest conflict

No interst conflict

References

See long version.