

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF GC/MS METHODS FOR TRACE ANALYSIS OF VOCs AND PESTICIDES IN WATER

Beatriz Antolín^{1,2,✉}, Milagros Acitores³, Juan José Jiménez^{1,2}, Marisol Vega^{1,2}

¹Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Valladolid, Campus Miguel Delibes, Paseo de Belén 7, 47011 Valladolid, Spain

²Institute of Sustainable Processes, UVa, Dr. Mergelina s/n, 47011 Valladolid, Spain

³Laboratorio de Aguas, Confederación Hidrográfica del Duero, c/ Canal 6, 47009 Valladolid

E-mail[✉]: beantolin_4@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Los compuestos orgánicos volátiles, VOCs, abarcan una gran variedad de compuestos como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, compuestos orgánicos halogenados, alcoholes, ésteres o cetonas. Se caracterizan por tener una presión de vapor superior a 0.01 kPa a 20 °C, elevada toxicidad y persistencia en el medio ambiente, además de ser precursores de la formación de ozono y smog fotoquímico a nivel troposférico. Las principales fuentes antropogénicas de estos compuestos para el medio ambiente acuático son pinturas y recubrimientos, carburantes, disolventes, aguas residuales industriales y deposiciones atmosféricas.

Los pesticidas se usan tanto en agricultura, para el control de plagas, como en salud pública para eliminar vectores de enfermedades, como los mosquitos. Los residuos de pesticidas pueden persistir en los alimentos, el suelo y las aguas de riego, representando un grave riesgo para el medio ambiente y la salud humana.

La elevada toxicidad y persistencia de estos contaminantes se debe fundamentalmente a su carácter lipófilo, que facilita su bioacumulación a través de la cadena alimentaria y la consiguiente biomagnificación de sus efectos. En consecuencia la exposición, incluso a muy bajas concentraciones de estas sustancias, supone un grave riesgo para la salud humana. Por ello, la Unión Europea, la Organización Mundial de la Salud o la Agencia de Protección Ambiental norteamericana (EPA), regulan la monitorización y control de estas sustancias tanto en alimentos como en aguas, estableciendo los límites máximos admisibles [1,2].

La determinación de trazas de VOCs en aguas implica el empleo de técnicas de preconcentración para poder cuantificarlos con la suficiente precisión y veracidad. Se han utilizado técnicas de preconcentración como la de purga y trampa [3,4] y el espacio de cabeza, pudiendo operar en modo estático [5,6], dinámico [7] o HS-SPME [6,8-10], acopladas a cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas. En la determinación de residuos de pesticidas se emplean habitualmente, como técnicas de preconcentración, extracción en fase sólida, SPME [11-13] y extracción adsorptiva con barras magnéticas, SBSE, con la que se reducen los límites de detección hasta 1000 veces. Para la separación y detección se emplean la cromatografía líquida de alta resolución con detectores de masas, así como la cromatografía de gases con detector de masas o de captura electrónica [14].

El análisis de trazas de contaminantes ambientales exige una cuidadosa optimización y validación de los métodos analíticos para producir resultados precisos y veraces que aseguren el cumplimiento de los límites legislados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Los puntos de muestreo pertenecen a la red de control de calidad de las aguas superficiales y de vertidos de la Confederación Hidrográfica del Duero, CHD. Un total de 16 muestras de vertidos industriales y 20 muestras de aguas superficiales fueron recogidas por técnicos de CHD. Las muestras se conservaron, sin filtrar, en botellas de vidrio color topacio de 1 L de capacidad, refrigeradas a 6 °C hasta su análisis, que se realizó dentro de las 24 horas siguientes para evitar la degradación o pérdida de analitos.

Preparación de patrones y muestras

VOCs: Se prepararon patrones de concentraciones entre 0 y 50 µg/L de 30 VOCs, mezclando 10 mL de agua desionizada, 2 g de NaCl, los volúmenes necesarios de un multipatrón concentrado, 100 µL de la mezcla de 1,2-dicloroetano-D4 y p-bromoclorobenceno (patrones de control, 10 µg/L) y tolueno-D8 (patrón interno, 10 µg/L), y el metanol necesario para igualar el volumen total de todos los viales, que fueron cerrados herméticamente y depositados en la bandeja del automuestreador HS. Volúmenes de muestra de 10 mL fueron tratados de idéntica forma.

Pesticidas: En un Erlenmeyer se disuelven 20 g de NaCl en 100 mL de muestra, se introduce un *twister* de PDMS (Gerstel) y se agita durante unas 16 h a una velocidad entre 850-1000 rpm. Para preparar las disoluciones patrón, se añade el volumen necesario de la mezcla patrón de 25 pesticidas para preparar cada una de las disoluciones de calibración de 0 a 100 ng/L, sustituyendo el volumen de muestra por agua desionizada. Finalizada la agitación se extrae el *twister*, se lava y seca, y se introduce en la unidad de termodesorción para su análisis por GC-MS.

Los patrones de VOCs y pesticidas y las sustancias usadas como patrón interno fueron suministradas por Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania).

Determinación

Para la determinación cromatográfica de los VOCs se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 7890B acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5977 y equipado con un automuestreador de espacio de cabeza Agilent 7697A y una

columna DB-5ms de dimensiones 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm (Agilent Technologies, EE.UU.).

La separación y detección de los pesticidas se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N con inyector PTV (Gerstel), acoplado a un espectrómetro de masas Agilent modelo 5973N. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna HP-5MS de idénticas dimensiones (Agilent Technologies, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización de la extracción de VOCs por SHS

Los factores fundamentales que afectan a la extracción de VOCs por SHS (espacio de cabeza estático) son la temperatura y el tiempo de extracción. Para hallar los valores óptimos de estos parámetros que permitan la recuperación cuantitativa de VOCs de muestras de agua se empleó un diseño factorial completo de dos factores a tres niveles (diseño 3²). La Tabla 1 muestra la combinación de niveles de los factores ensayados en los 9 experimentos, realizados por duplicado con una disolución acuosa homogénea dopada con 10 μg/L de los 30 VOCs.

Tabla 1. Matriz experimental para optimizar la extracción de VOCs por SHS

Experiencia	Temperatura, T (°C)	Tiempo, t (min)
1	70	10
2	70	5
3	70	15
4	65	10
5	65	5
6	65	15
7	75	10
8	75	5
9	75	15

Debido al elevado número de variables a optimizar (30 VOCs), se usó un método de optimización multirespuesta consistente en reducir la dimensionalidad aplicando el análisis en componentes principales, ACP, a los resultados analíticos de los nueve experimentos. Sólo los dos primeros componentes principales CP1 y CP2, con valor propio mayor que la unidad, explican más varianza (91.6% y 3.7%, respectivamente) que las respuestas originales.

El gráfico de cargas (*loadings*), Figura 1, muestra la similitud entre todos los VOCs analizados, con carga elevada y positiva en CP1, a excepción de dibromoclorometano, que también tiene carga positiva elevada en CP2. Este agrupamiento compacto de los VOCs indica que responden de forma similar a las condiciones de extracción. La Figura 2 muestra el gráfico de puntuaciones (*scores*) de los 9 experimentos. Se observa que las réplicas aparecen más próximas entre sí que los diferentes experimentos, indicando la existencia de un efecto significativo de las condiciones de extracción. Por otro lado, se observa que los experimentos 1, 3 y 7, con CP1 positivo y elevado, maximizan la extracción de VOCs, mientras que el menor

tiempo de extracción, 5 min, extrae menos cantidad de compuestos.

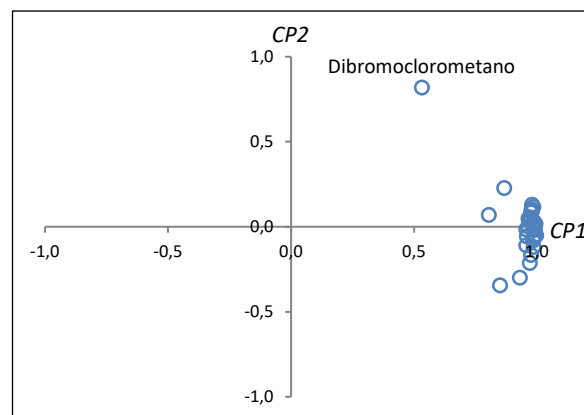


Fig. 1. Gráfico de cargas de los 30 VOCs

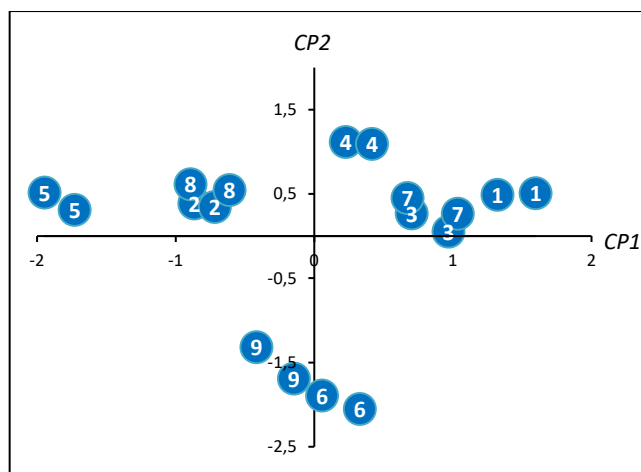


Fig. 2. Gráfico de puntuaciones de los 9 experimentos

Como CP1 agrupa a 29 de los 30 VOCs investigados y explica más del 90% de la varianza total, el ANOVA de las puntuaciones de los 9 experimentos en CP1 permitirá identificar si los efectos de tiempo y temperatura influyen significativamente en la extracción de VOCs. ANOVA demostró que ambos factores son significativos ($p < 0.0000$), siendo el efecto del tiempo más notable ($F = 186.4$) que el de la temperatura ($F = 39.8$). La interacción de los factores resultó ser significativa ($p = 0.0022$), como se muestra en el gráfico de las puntuaciones medias de CP1 (Figura 3).

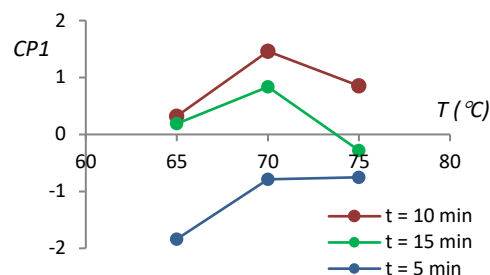


Fig. 3. Puntuaciones medias de CP1 para cada nivel de tiempo y temperatura de extracción HS.

Se observa que la máxima extracción se consigue aplicando una temperatura de 70 °C durante 10 min, y que existe interacción entre ambos factores. Así, mientras a temperatura baja un aumento del tiempo de extracción de 10 a 15 min no incrementa el rendimiento de la extracción, la combinación de tiempo largo de extracción y temperatura elevada provoca una disminución en la cantidad de VOCs extraída, posiblemente debida a fenómenos de degradación de los analitos, siendo tanto más acusada cuanto mayor es la temperatura aplicada. A la vista de los resultados experimentales se han seleccionado los valores óptimos de los parámetros de la extracción SHS de VOCs: 10 minutos a 70°C.

Validación de los métodos HS-GC/MS y SBSE-GC/MS

Los parámetros analíticos de validación de los métodos de análisis para la determinación de VOCs y pesticidas en aguas de Castilla y León fueron evaluados siguiendo las pautas de AOAC (2002). Cada método se validó en términos de precisión, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), linealidad, veracidad (sesgo) y factor de recuperación. Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Parámetros de validación de VOCs: LOD, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), R², sesgo y recuperación

VOC	LOD (µg/L)	%RSD repet.	%RSD reprod.	R ²	% E _{rel}	% Recup.
Diclorometano	0.28	0.8	6.5	0.9983	6.8	105
Triclorometano	0.11	1.6	8.5	0.9987	6.4	101
1,1,1-Tricloroetano	0.10	4.0	9.7	0.9979	9.5	100
1,2-Dicloroetano	0.17	1.2	9.2	0.9996	5.6	121
Benceno	0.03	4.0	8.1	0.9984	5.4	95
Tetraclorometano	0.06	5.6	8.8	0.9981	8.4	104
Tricloroetileno	0.06	7.9	9.9	0.9981	9.1	92
Bromodichlorometano	0.06	6.3	8.8	0.9995	9.4	105
Tolueno	0.06	3.1	8.0	0.9978	6.2	89
1,1,2-Tricloroetano	0.20	6.8	7.1	0.9997	7.0	104
Dibromoclorometano	0.25	2.0	6.9	0.9980	1.5	78
Tetracloroetileno	0.08	9.7	6.7	0.9983	9.6	94
Clorobenceno	0.03	8.3	6.6	0.9984	8.3	91
Etilbenceno	0.02	4.6	6.0	0.9965	8.8	82
p-Xileno	0.03	7.8	6.6	0.9970	7.7	80
m-Xileno	0.03	7.9	6.8	0.9970	9.3	82
Estireno	0.04	8.0	6.8	0.9971	9.9	87
o-Xileno	0.04	6.5	7.2	0.9974	3.6	85
Tribromometano	0.25	6.3	6.5	0.9999	8.4	112
Isopropilbenceno	0.04	0.7	7.7	0.9967	0.1	81
1,3,5-Trimetilbenceno	0.02	7.8	5.8	0.9964	4.9	85
1,2,4-Trimetilbenceno	0.02	2.6	9.8	0.9968	7.6	92
1,3-Diclorobenceno	0.02	7.6	6.5	0.9990	0.2	90
1,4-Diclorobenceno	0.03	8.2	6.8	0.9991	10.3	96
1,2-Diclorobenceno	0.03	4.8	6.4	0.9992	7.1	95
1,3,5-Triclorobenceno	0.05	3.7	6.2	0.9985	6.4	120
1,2,4-Triclorobenceno	0.04	3.0	5.8	0.9988	5.8	94
Naftaleno	0.32	5.2	6.7	0.9994	2.5	90
1,1,2,3,4,4-Hexacloro-1,3-butadieno	0.03	3.9	6.7	0.9986	2.0	95
1,2,3-Triclorobenceno	0.04	3.5	6.1	0.9994	5.6	99

Precisión. Para calcular la repetibilidad (precisión intra-día), se analizaron por triplicado muestras de agua sin dopar. Para evaluar la reproducibilidad (inter-día), se inyectaron muestras de agua por triplicado en tres días alternos. La precisión se expresó como % RSD, aceptándose imprecisiones máximas del 10% RSD de reproducibilidad.

Tabla 3. Parámetros de validación de pesticidas: LOD, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), R², sesgo y recuperación

PESTICIDA	LOD (ng/L)	%RSD repet.	%RSD reprod.	R ²	% E _{rel}	% Recup.
Isoproturón	0.26	8.1	5.7	0.9963	5.0	83
Clortolurón	1.52	3.8	6.1	0.9940	8.9	108
Diurón	0.35	9.1	6.8	0.9961	9.2	86
Mevinfós	1.60	9.1	11.2	0.9950	8.8	104
Molinato	0.34	3.1	3.9	0.9987	5.6	99
Atrazina	0.75	7.5	4.8	0.9939	8.3	115
Propazina	0.22	9.0	7.4	0.9983	0.6	108
Fonofos	0.42	5.1	3.6	0.9938	6.5	81
Trietazina	0.40	4.4	2.6	0.9993	9.1	99
Terbutilazina	0.17	3.5	2.9	0.9994	2.3	105
Disulfotón	1.51	6.1	6.2	0.9969	6.0	108
Metil-paratión	2.44	4.9	6.1	0.9980	7.5	98
Alachlor	0.22	1.7	3.4	0.9994	3.2	104
Ametrina	0.07	3.2	2.6	0.9993	4.3	103
Prometrina	0.51	0.7	2.0	0.9988	8.0	97
Terbutrina	0.11	0.5	1.7	0.9987	8.2	96
Fenitrotión	1.74	2.7	2.6	0.9984	7.6	98
Malatión	0.28	3.8	2.3	0.9973	9.4	99
Metolacoloro	1.56	4.2	3.0	0.9993	1.0	109
Clorpirifós	0.41	12.1	8.1	0.9965	6.3	96
Clorfenvinfos	1.16	2.4	3.0	0.9990	3.2	106
Etil-bromofos	0.50	1.9	2.1	0.9985	0.9	90
Imazalil	2.28	4.6	2.7	0.9978	0.2	81
Triazofos	0.59	6.5	4.7	0.9984	4.6	98
Fosalón	1.01	8.9	8.5	0.9985	8.0	97

Límites de detección, LOD, y cuantificación, LOQ. Se estimaron comparando el área de los picos de analito de una muestra de agua dopada y el área de un blanco (aire contenido en un vial vacío) al mismo tiempo de retención que el de los picos de los analitos. Las inyecciones se realizaron por triplicado. A la señal de la muestra dopada se resta la señal en área del blanco de la muestra, obteniendo así la señal de matriz a la que se le asigna un valor de concentración que se relaciona con la señal del ruido en una determinada ventana de tiempos de retención en torno al de cada uno de los analitos. Los valores de LOD y LOQ se calculan a partir de la relación señal/ruido como:

$$LOD = 3 \cdot S/N ; LOQ = 10 \cdot S/N$$

Los valores obtenidos fueron muy inferiores a los niveles máximos admisibles de estos contaminantes en aguas, asegurando así la adecuación de los métodos analíticos empleados en este trabajo a la determinación de trazas de VOCs y pesticidas en aguas continentales.

Linealidad. Se obtuvieron a partir de las correspondientes líneas de calibrado construidas con 9 patrones. Los valores de los R² fueron mayores de 0.990. Los intervalos de confianza para la ordenada incluyeron en todos los casos el cero, por lo que la respuesta es lineal en el intervalo de calibración y no se evidencian errores sistemáticos debidos a una inadecuada corrección del blanco.

Veracidad. El sesgo, expresado como error relativo (%E_{rel}), se ha calculado a partir de la desviación entre un valor teórico (señal calculada con la ecuación de la recta para la concentración teórica de un patrón) y un valor real (señal analítica de dicho patrón). Se estableció un sesgo máximo del 10% y fue inferior en todos los casos excepto para 1,4-Diclorobenceno.

Factor de recuperación. Se obtuvo analizando una alícuota de una muestra dopada con 10 µg/L de los VOCs investigados, y una segunda alícuota de la misma muestra con 15 ng/L de los pesticidas de interés. Casi todos los valores obtenidos están en el rango 80-120%, indicando una buena recuperación de los analitos a esos niveles de concentración.

Aplicación al análisis de VOCs y pesticidas en muestras de agua de la cuenca del Duero.

En general, las aguas analizadas muestran concentraciones de VOCs y pesticidas inferiores a los niveles límite establecidos por regulaciones nacionales y europeas para aguas. Se han hallado puntualmente concentraciones de triclorometano superiores al valor límite en las proximidades de algunas industrias de la región. De los 30 VOCs analizados, 19 no fueron detectados en el 50% de las muestras. De los 25 pesticidas analizados, 13 fueron detectados en casi todas las muestras de agua.

Con los resultados de los contaminantes más abundantes y frecuentes se realizó un análisis de conglomerados jerárquicos (*cluster*) para visualizar las similitudes entre variables (pesticidas) y muestras analizadas. Los datos fueron estandarizados, se usó la distancia euclídea como medida de similitud y el método de unión de Ward. La Figura 4 muestra los dendrogramas de muestras y de variables (pesticidas), complementados con un mapa de calor para facilitar la interpretación.

Fosalón) se encuentran en mayor concentración en aguas de los ríos Zapardiel y Adaja. Una muestra del río Esla tiene elevadas concentraciones de casi todos los pesticidas. Una muestra del río Tormes presenta elevadas concentraciones de pesticidas del grupo CV₃ (Fenitrotion, Metolaclo, Triazofos).

Agradecimientos

Los autores agradecen a CHDuero el acceso a equipamiento y muestras.

Referencias

- [1] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.
- [2] EPA. National Primary Drinking Water Regulations. May 2009, EPA 816-F-09-004. <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>.
- [3] Fernández Villarrenaga, V., López Mahía, P., Muniategui Lorenzo, S., Prada Rodríguez, D. Optimisation of purge-and-trap gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile organic compounds in water. *Chem Anal-Warsaw*, 51 (2006) 89–98.
- [4] Martínez, E., Lacorte, S., Llobet, I., Viana, P., Barceló, D. Multicomponent analysis of volatile organic compounds in water by automated purge and trap coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 959 (2002) 181.
- [5] Pascale, R., Bianco, G., Calace, S., Masi, S., Mancini, I.M., Mazzone, G., Caniani, D. Method development and optimization for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in water at trace levels by static headspace extraction coupled to gas chromatography-barrier ionization discharge detection. *J. Chromatogr. A*, 1548 (2018) 10–18.
- [6] Balseiro, M., Chaves, R., Monterroso, C. Development and optimization of headspace and headspace-solid phase microextraction for the determination of volatile fuel compounds in environmental samples. *Spanish J. Soil Sci.*, 6 (2016) 230.
- [7] Herrera López, S., Gómez, M.J., Hernando, M.D., Fernández Alba, A.R. Automated dynamic headspace followed by a comprehensive two-dimensional gas chromatography full scan time-of-flight mass spectrometry method for screening of volatile organic compounds (VOCs) in water. *Anal. Methods*, 5 (2013) 1165.
- [8] Egli, C., Pfister, R., Moffatt, L., Kelting, R. Solid-phase microextraction (SPME) and Triple Quadrupole Gas Chromatography (GC-MS-MS). Simultaneous Analysis of VOCs and 1,4-Dioxane in water. *LC-GC Europe*, 27 (2014) 674.
- [9] Sarafraz-Yazdi, A., Vatani, H. A solid phase microextraction coating based on ionic liquid sol-gel technique for determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene in water samples using gas chromatography flame ionization detector. *J. Chromatogr. A.*, 1300 (2013) 104.
- [10] Martínez, C., Ramírez, N., Gómez, V., Pocurull, E., Borrull, F. Simultaneous determination of 76 micropollutants in water samples by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 116 (2013) 937.
- [11] Beltrán, J., López, F.J., Hernández, F. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 389.
- [12] Forcada, M., Beltrán, J., López, F.J., Hernández, F. Multiresidue procedures for determination of triazine and organophosphorus pesticides in water by use of large-volume PTV injection in gas chromatography. *Chromatographia*, 51 (2000) 362–368.
- [13] Hernández, F., Beltrán, J., López, F.J., Gaspar, J.V. Use of solid phase microextraction for the quantitative determination of herbicides in soil and water samples. *Anal. Chem.* 72 (2000) 2313.
- [14] Uhnak, J., Sackmauerova, M., Szokolay, A., Palusova, O. (1974). Use of an electron-capture detector for determination of pesticides in water. *J. Chromatogr.*, 91 (1974) 545.

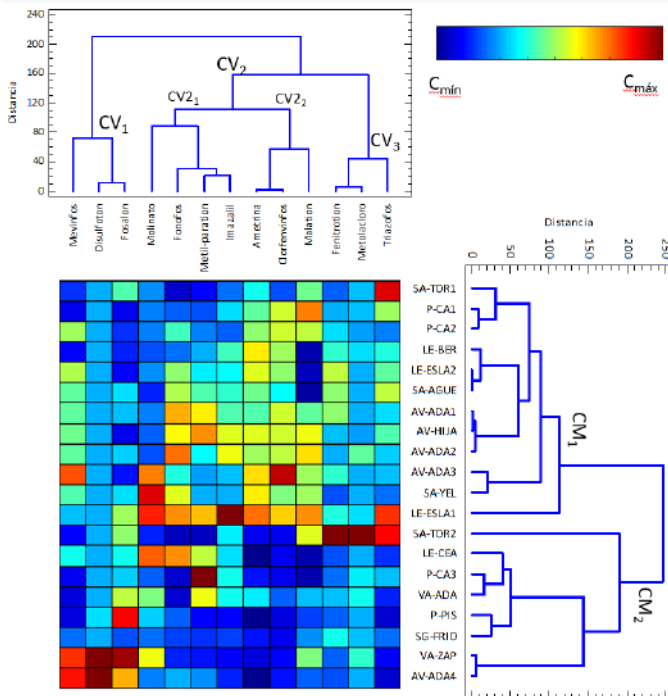


Fig. 4. Análisis clúster de pesticidas en agua superficial.

Los tonos azules indican concentraciones inferiores a la media, que tienden a rojo cuando la concentración es elevada. Los pesticidas más ubicuos son los del grupo CV₂ (Fonofos, Ametrina, Clorfenvinfos...), abundantes en muestras CM₁ (ríos de Ávila, León y Palencia, en general). Los pesticidas agrupados en CV₁ (Mevinfos, Disulfotón,