

# ANÁLISIS DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS: USO DE TÉCNICAS DE CROMATOGRAFÍA (GC Y LC) Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

Rosalía López Ruiz, Antonio Jesús Maldonado Reina, Jesús Marín-Sáez, Roberto Romero-González, José Luis Martínez-Vidal, Antonia Garrido French

Grupo de investigación Química Analítica de Contaminantes, Departamento de Química y Física, Universidad de Almería. 04120. Almería. España. rosaliar@ual.es

## Abstract

Este estudio propone una metodología para la caracterización de productos fitosanitarios (PPPs) basada en análisis de sospechosos y desconocidos. Esta se dividió en tres etapas principales: preparación de muestras, separación y detección, y análisis de datos. La primera se basó en estrategias de “dilute and shoot”, empleando diferentes disolventes dependiendo tanto del tipo de compuestos como del tipo de PPPs a analizar. Para la etapa de separación y detección se utilizan técnicas cromatográficas, como la cromatografía líquida (LC) y la cromatografía de gases (GC), acopladas a analizadores de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). La HRMS permitió un gran número de posibilidades en términos de adquisición de datos, revelando las opciones más adecuadas y los principales parámetros para maximizar una detección precisa. Finalmente, se indican consejos y recomendaciones para realizar el análisis de datos, proporcionando las estrategias de preprocesamiento y procesamiento necesarias para llevar a cabo el cribado de sospechosos y el análisis de desconocidos.

## 1. Introducción

El uso de productos fitosanitarios (PPPs) en la agricultura ha sido uno de los factores más importantes que han llevado al aumento de los rendimientos [1]. El uso de PPPs sigue creciendo, alcanzando un valor estimado de mercado de casi 130,7 mil millones de dólares para 2023 (desde 84,5 mil millones de dólares en 2019) [2]. Cabe destacar que las cuestiones de química verde se han vuelto cada vez más importantes en los últimos años, debido al aumento de los datos sobre seguridad ambiental requeridos por los organismos reguladores [3].

Los PPPs están regulados por el Reglamento (UE) N° 1107/2009 [4], que establece que están compuestos por la sustancia activa (pesticida), que tiene la propiedad de proteger las plantas, matar o atacar plagas, mejorar la conservación, destruir partes no deseadas, o controlar el crecimiento indeseado, y por otros compuestos llamados impurezas y aditivos (Fig. 1). Las impurezas son cualquier otro componente, incluyendo todos los isómeros que no forman parte de la definición de sustancia activa, que están presentes en los PPPs originados durante el proceso de fabricación o por la degradación durante el almacenamiento. Los aditivos se añaden intencionalmente a los PPPs para mejorar sus características, y pueden

clasificarse como protectores, sinergistas, co-formulantes o adyuvantes

La aplicación de PPPs en el campo inevitablemente lleva a la presencia de residuos de sustancias activas en los cultivos tratados, así como de residuos de aditivos y/o impurezas. En el Espacio Económico Europeo, el reglamento sobre los PPPs [4] proporciona una descripción completa sobre definiciones, aditivos, control de calidad, embalaje, etiquetado y métodos de análisis. Este reglamento define los residuos como una o más sustancias presentes en o sobre plantas o productos vegetales, productos animales comestibles, agua potable o en otros lugares del medio ambiente resultantes del uso de un PPP, incluidos sus metabolitos, productos de reacción. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por controlar los PPPs, la evaluación de riesgos y la regulación de los residuos se limitan al pesticida (sustancia activa) y a los metabolitos seleccionados, para los cuales se establecen niveles máximos de residuos en o sobre los alimentos. Las impurezas y los aditivos no se mencionan.

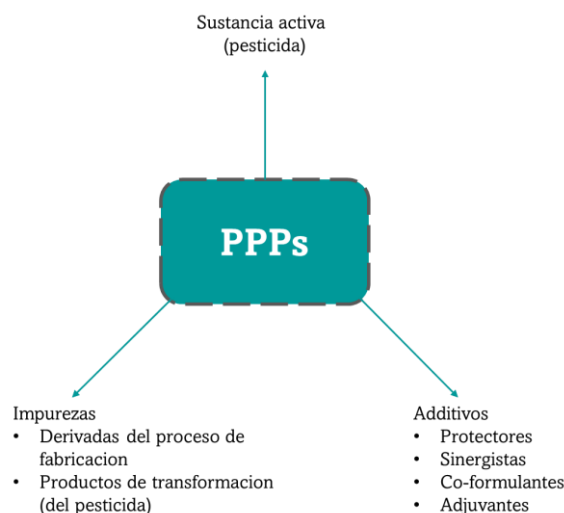


Fig. 1. Composición de los PPPs.

En lo que respecta a la comercialización de los PPPs, el Reglamento (UE) N° 284/2013 [5] enumera los pasos a seguir, mientras que el Reglamento (UE) N° 546/2011 [6] establece una serie de principios generales y específicos que deben cumplir los PPPs para su evaluación y autorización, tales como las condiciones de aplicación, o su impacto en los seres humanos, las plantas y el medio ambiente. El etiquetado es una de las partes más importantes de la comercialización y autorización de los

PPPs. Por esta razón, todas las sustancias incluidas en un PPP deben ser enumeradas (incluyendo impurezas y aditivos). Sin embargo, en el Reglamento (UE) N° 547/2011 [7], que proporciona los requisitos necesarios para el etiquetado de los PPPs, no se consideran las impurezas y los aditivos, y en consecuencia, existe muy poca información disponible sobre su naturaleza y magnitud [8].

El Reglamento (UE) N° 547/2011 [7] indica que la información debe ser clara e indeleble en el envase y contener detalles como el nombre comercial, el nombre de la sustancia activa, la cantidad, el número de lote y la fecha de producción, la seguridad, la acción del producto, el tipo de producto, los usos e instrucciones, el plazo de seguridad, la toxicidad y el almacenamiento [8].

En los últimos años, pocos estudios se han centrado en el análisis de aditivos e impurezas en alimentos, a pesar de la importancia de este problema. Por ejemplo, en el estudio realizado por Balmer et al. [8], se determinaron las vidas medias de los co-formulantes en cultivos tratados. Parece que su vida media es superior a un día, por lo que pueden representar un problema de salud subestimado. En consecuencia, pocos estudios han analizado estos compuestos en productos comerciales [9], así como en el medio acuático [10,11] o en sedimentos marinos [12]. A pesar de ello, las impurezas y los aditivos de los PPPs no suelen ser monitoreados en frutas o verduras, por lo que el alcance real de su peligrosidad sigue siendo desconocido.

En el pasado, se utilizaron métodos analíticos que empleaban cromatografía líquida (LC) [13-16] y cromatografía de gases (GC) [17-21] acopladas a espectrometría de masas (MS), predominando el uso de analizadores de espectrometría de masas de baja resolución (LRMS) frente a los de alta resolución (HRMS) [9,22]. Además, se utilizaron detectores clásicos como el detector ultravioleta-visible (UV) o el detector de ionización de llama (FID) [20, 23]. Sin embargo, para lograr una caracterización completa, se debe emplear HRMS.

Por lo tanto, el objetivo principal de este artículo es proponer un flujo de trabajo analítico para realizar una evaluación integral de la composición de los PPPs utilizando enfoques de HRMS, que incluye el tratamiento de muestras, la separación cromatográfica y el análisis de datos, abarcando la adquisición de datos (control de calidad (QC)) y el procesamiento de datos (identificación, validación y cuantificación).

## 2. Métodos de tratamiento de muestra para el análisis de PPPs

La caracterización integral de los PPPs utilizando técnicas analíticas ha sido poco estudiada. Existen solo unos pocos artículos sobre este tema, y aún menos que aborden la evaluación de los aditivos en los PPPs.

En términos de tratamiento de muestras, el método de "dilute and shoot" puede emplearse de manera efectiva utilizando diferentes disolventes. La selección del disolvente dependerá de la polaridad de los compuestos y de la técnica de inyección y/o separación utilizada (Fig. 2). Por ejemplo, acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) o acetato de etilo pueden utilizarse para el análisis de analitos no

polares mediante GC [9,20,22], mientras que agua, acetonitrilo, alcohol isopropílico o metanol pueden emplearse para disolver los PPPs antes del análisis por LC [9,13,15] (Fig. 2). Por lo tanto, la solubilidad de los PPPs en los disolventes seleccionados debe estudiarse cuidadosamente para asegurarse de que el PPP esté correctamente disuelto antes del análisis.

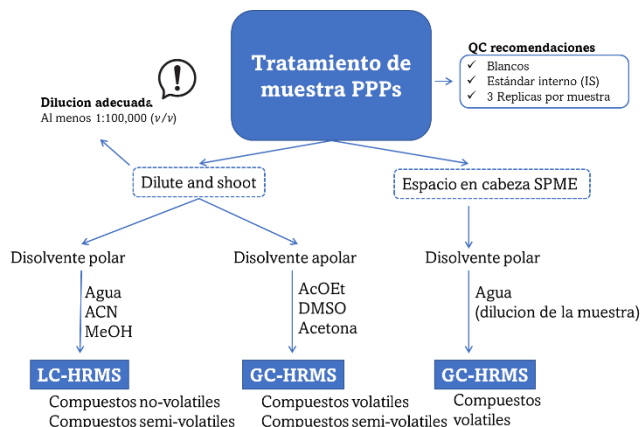


Fig. 2. Pasos en el tratamiento de muestra para el análisis de PPPs.

Otros métodos también pueden emplearse para la extracción de analitos polares, como los derivados de pirrolidona, como QuEChERS [16], que se aplicó para el análisis de co-formulantes en productos agroalimentarios de origen vegetal (manzana, repollo, tomate, pepino, arroz y trigo), o la extracción en fase sólida (SPE) [21], que se utilizó en formulaciones líquidas de pesticidas como un paso de limpieza. Estos métodos son más adecuados cuando la determinación de la sustancia activa y las impurezas y/o aditivos se realiza en matrices como alimentos, agua, suelos y sedimentos, para los cuales se requiere una extracción exhaustiva que elimine el efecto de la matriz, y se conoce alguna información sobre ellos [10-12]. Finalmente, para analitos no polares, se podrían emplear técnicas de extracción automática, incluyendo la microextracción en fase sólida (SPME) y la extracción en fase gaseosa (HS) (utilizadas juntas o por separado) (Fig. 2), teniendo en cuenta que requieren menos tiempo, permiten la preconcentración de los compuestos y facilitan la automatización.

Además, la contaminación de la muestra puede reducirse ya que el tratamiento de la muestra se minimiza, y se puede lograr una mayor repetibilidad, ya que se reducen los errores experimentales [24]. En este caso, las muestras pueden disolverse fácilmente en un disolvente adecuado, como el agua, eliminando los problemas de disolución indicados anteriormente, antes de llevar a cabo el procedimiento de extracción basado en HS-SPME. Por ejemplo, HS se utilizó para la determinación de compuestos volátiles como el tolueno o el benceno [18, 19]. HS-SPME se empleó para el monitoreo de co-formulantes en un PPP de miclobutanil (Mitrus) mediante GC-HRMS, lo que permitió la detección de siete compuestos derivados del benceno [25]. En este trabajo, HS-SPME se comparó con la inyección líquida, demostrando ser más adecuada para el análisis de

compuestos volátiles, debido a los bajos límites de detección obtenidos en comparación con la inyección líquida.

### 2.1. Tratamiento de muestra y control de calidad

Es importante señalar que podría producirse contaminación externa durante la preparación de las muestras, o incluso durante su análisis, si los analitos están presentes en el material de laboratorio utilizado o incluso en el equipo analítico. Por ello, como medida de control de calidad (QC), el uso de blancos de extracción (siguiendo el mismo procedimiento de disolución/extracción que las muestras) puede ser útil y obligatorio en el caso de análisis no dirigidos (Fig. 2). Si se observa contaminación, se debe identificar la fuente de dicha contaminación monitorizando el disolvente en el que se diluyen las muestras (blancos de disolvente), así como el equipo, inyectando metanol (LC) o acetato de etilo (GC) para evaluar el analizador de masas y el módulo cromatográfico. Además, estos deben inyectarse a lo largo del análisis para controlar la contaminación externa o el efecto de arrastre. Por ejemplo, el monoestearato de glicerilo, un co-formulante identificado en los PPPs [9], también se utiliza como agente antiestático en tubos de centrifuga [26] y podría migrar a la muestra durante el paso de extracción. Otro ejemplo es el lauril sulfato de sodio, presente en las soluciones de calibración de HRMS y en los PPPs, que interferiría a menos que la señal en la muestra sea notablemente más alta en comparación con la señal en el blanco, para que puedan distinguirse adecuadamente. Finalmente, se recomienda lavar el material de laboratorio sin jabón para evitar la contaminación derivada de los detergentes, especialmente los tensioactivos aniónicos, como el lauril sulfato de sodio, otro co-formulante previamente identificado en los PPPs [9].

Para evitar la contaminación cruzada entre muestras y la saturación del detector, las muestras de PPPs deben diluirse siempre antes del análisis cromatográfico-MS [22], ya que generalmente contienen más de 100 g/L de sustancia activa, lo que seguramente dejaría residuos tanto en el sistema cromatográfico como en el analizador. Por lo tanto, se sugiere una dilución de al menos 1:100,000 (v/v), o incluso 1:500,000 (v/v), para evitar la contaminación en el equipo (Fig. 2).

Además, cuando se realiza un análisis no dirigido, son necesarias las réplicas de muestras para verificar si los compuestos detectados están presentes en todas las réplicas o no, lo que puede ayudar a distinguir entre falsos positivos o posibles compuestos presentes en las muestras. Para ello, se deben analizar al menos 3 réplicas de cada muestra para obtener resultados fiables.

Otra actividad adicional de control de calidad (QC) es la adición de estándares internos (ISs) para asegurar que el análisis de la muestra se esté realizando correctamente y para controlar la ionización y fragmentación de los compuestos a lo largo del lote (Fig. 2). Los ISs deben tener propiedades similares a los compuestos esperados y se debe añadir al menos un IS para cada grupo de compuestos (es decir, pesticidas, plastificantes, etc.), teniendo en cuenta su disponibilidad comercial [27]. Los ISs

etiquetados isotópicamente pueden ser una alternativa debido a sus propiedades y ventajas, ya que en el análisis de detección de compuestos desconocidos o sospechosos el conocimiento previo sobre los compuestos presentes en las muestras es escaso. Por ejemplo, en este caso, el uso de fosfato de trifenilo etiquetado isotópicamente (TPP-d15), que puede detectarse tanto en LC-HRMS como en GC-HRMS, podría ser una buena opción.

### 3. Técnicas de separación y detección para el análisis de PPPs

En términos de separación, y debido a la complejidad de los compuestos a analizar, tanto la LC como la GC son necesarias para un análisis integral de los PPPs. La LC está indicada para compuestos relativamente polares, iónicos, termolábiles o no volátiles. Se utilizan columnas comunes como la C18, aunque se han empleado fases estacionarias específicas, como HILIC, para la determinación de cuatro adyuvantes en PPPs [16]. Sin embargo, las columnas C18 no ofrecen una selectividad óptima para el análisis simultáneo de surfactantes aniónicos, no iónicos y catiónicos utilizando el mismo sistema de fase móvil. En esos casos, otras columnas especialmente desarrolladas para la separación de surfactantes, como la ThermoFisher Acclaim™ Surfactant o la Shodex ODP2 HP-2D, una columna de cromatografía en fase inversa basada en polímeros, pueden mejorar la separación de estos compuestos.

Además, se utilizan fases móviles convencionales que contienen agua, metanol o acetonitrilo con ácido fórmico o ácido acético. El tiempo de elución y el gradiente aplicados son ligeramente más largos que en los métodos convencionales de LC debido a la variabilidad de los compuestos con diferentes fórmulas moleculares y polaridades. Algunos de ellos tienen cadenas largas de hidrocarburos o etoxilatos que se retienen fuertemente en las columnas analíticas, por lo que el tiempo de retención es mayor. Por lo tanto, se recomienda encarecidamente tiempos de análisis de más de 30 minutos y mantener el 100% de disolvente orgánico durante al menos 10 minutos para permitir la completa elución de los compuestos no polares.

Por otro lado, la GC es adecuada para compuestos volátiles, térmicamente estables y menos polares. Para GC, las columnas capilares 5MS ((5%-fenil)-metilpolisiloxano) son las más utilizadas, aunque se emplearon otras fases estacionarias, como la columna HP-1 (100% dimetilpolisiloxano) para determinar compuestos orgánicos volátiles [18].

Es importante destacar que algunos aditivos son isómeros, lo que significa que tienen características similares como la misma masa teórica y fragmentos. Sin embargo, la GC tiene la ventaja de separarlos en la corrida cromatográfica y proporcionar diferentes tiempos de retención, lo que representa uno de los mayores desafíos de esta técnica. Por ejemplo, los co-formulantes 4-etiltolueno y 1,3,5-trimetilbenceno, cuya fórmula molecular es C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>, tienen tiempos de retención diferentes de 5.89 y 6.21 minutos, respectivamente, por lo que pueden determinarse individualmente cuando se usa GC [28].

Finalmente, para la detección de sustancias activas, impurezas y/o aditivos, la MS es la técnica más adecuada. Los analizadores de LRMS previamente utilizados, como el cuadrupolo simple (Q), el triple cuadrupolo (QqQ) o el Qtrap, implicaban la realización de un análisis dirigido, ya que la masa de los analitos a monitorear debía conocerse antes del análisis. Cuando se está monitoreando la sustancia activa, este es un paso sencillo, pero en términos de aditivos, es un problema complejo, ya que normalmente no están incluidos en la etiqueta del PPP. Solo algunos de ellos están indicados en la etiqueta o en la hoja de seguridad, y por esta razón, hay muy poca literatura sobre este tema. Para abordar este problema, los instrumentos de HRMS, como (Q)-Orbitrap o (Q)-TOF, son los más adecuados.

#### 4. Avances en la adquisición y procesado de datos para el análisis de PPPs

Tanto el análisis de datos como el procesamiento de datos son las etapas más importantes en el análisis de compuestos sospechosos o desconocidos cuando se utiliza la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). La metodología implica el uso de software analítico complejo desarrollado para ese fin y requiere conocimientos previos sobre las técnicas empleadas. Por ello, en esta sección se ha propuesto un flujo de trabajo típico para el análisis de productos fitosanitarios (PPP) (Fig. 3), teniendo en cuenta los últimos estudios centrados en este problema [9, 22].

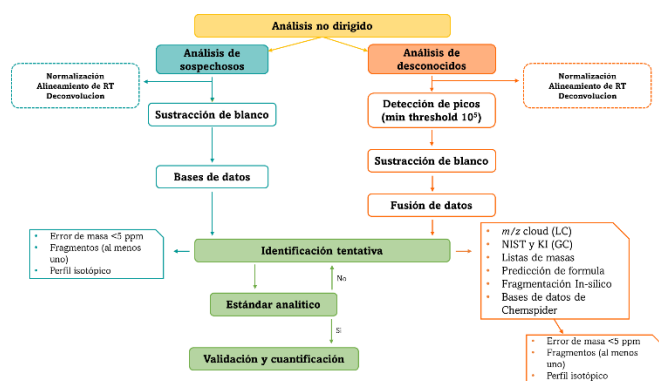


Fig. 3. Workflow aplicado en la caracterización de PPPs usando HRMS.

##### 4.1. Adquisición de datos

La principal cuestión relacionada con la adquisición de datos en la HRMS es el modo de adquisición. Cuando la GC se acopla a la HRMS, el modo de adquisición es sencillo, siendo un “full scan” de ionización positiva por impacto electrónico (Tabla 1). Cuando se utiliza LC-HRMS, se emplea “full scan” en electrospray (ESI), ionización positiva y negativa, para la adquisición de los compuestos. Para obtener los fragmentos, existen varios modos de fragmentación, siendo el análisis independiente de datos (DIA) el más útil en este tipo de análisis. Es similar al modo de fragmentación de todos los iones (AIF) pero empleando rangos de m/z establecidos por el usuario. Por ejemplo, rangos de m/z de 100 implican una fragmentación de 100

a 200, de 200 a 300, de 300 a 400, etc. Esto es realmente útil porque los espectros son más simples y contienen menos iones en comparación con AIF [29, 30], y es beneficioso cuando se analizan compuestos que presentan baja intensidad en la muestra (es decir, pesticidas presentes en frutas o verduras) [31], mejorando las posibilidades de búsqueda de fragmentos de compuestos desconocidos. Los otros parámetros mencionados en la Tabla 1 son características de los analizadores Q-Orbitrap, por lo que solo pueden replicarse en el mismo tipo de instrumento, pero pueden servir como guía para los usuarios de HRMS.

Tabla 1. Parámetros de adquisición para el análisis de PPPs mediante GC y LC-Q-Orbitrap-MS.

Modo de barrido	“Full Scan”	“DIA”
<b>GC-HRMS</b>		
Modo de ionización	Ionización electrónica	NA
Resolución (a m/z 200)	60000 FWHM	NA
AGC objetivo	1e6	NA
Max IT (microscans)	100 ms	NA
Rango de barrido (m/z)	50-500	NA
<b>LC-HRMS</b>		
Modo de ionización	Electrospray (Positivo/Negativo)	Positivo/Negativo
Resolución (a m/z 200)	70000 FWHM	35000 FWHM
AGC objetivo	1e6	2e5
Max IT (microscans)	250	Automático
Rango de barrido (m/z)	50-750	Rango de m/z 50 desde m/z 50 a 750, ej. m/z 50-100, m/z 100-150, etc.
Ventana de aislamiento (m/z)	NA	50
Primera masa en detector (m/z)	NA	50
Energía de colisión (eV)	NA	30

Los puntos críticos relacionados con la adquisición GC-HRMS son el uso del “full scan” en una amplia ventana de m/z, comenzando desde el valor más bajo de m/z detectable por el equipo hasta el máximo m/z según la potencia de resolución, de modo que pueda detectar el mayor número posible de compuestos (es decir, a 60,000 de Ancho Completo a la Mitad del Máximo (FWHM) de resolución, entre m/z 50–500) (Tabla 1). Para LC-HRMS, cuando se utiliza “full scan” (modo de ionización positiva y negativa para detectar compuestos en ambas polaridades), se debe seleccionar una ventana amplia de m/z desde el m/z más bajo detectable hasta el m/z máximo permitido por la resolución (es decir, a 70,000 FWHM, m/z 50–750); sin embargo, en algunos casos, los compuestos con un m/z

superior a 750 no pueden detectarse a una resolución adecuada si se utiliza Orbitrap como analizador. Por esta razón, cuando se esperan compuestos en un  $m/z$  más alto, se puede añadir un escaneo completo adicional al método introduciendo otro rango de  $m/z$  (es decir,  $m/z$  150–2000).

El paso de fragmentación es crítico, ya que es necesario elegir el rango correcto de ventanas de  $m/z$  para asegurar que los espectros MS/MS sean lo más limpios posible, especialmente cuando se selecciona DIA. Para la caracterización de PPPs, la ventana de  $m/z$  50 es la mejor opción (Tabla 1), aunque se obtenga un gran número de espectros de fragmentación para cada muestra, lo que hace que los datos sin procesar sean más pesados. No obstante, las herramientas de software actuales permiten interpretar cada uno de ellos y esos datos MS/MS pueden vincularse a los espectros de escaneo completo.

#### 4.2. Procesado de datos

El procesamiento de datos puede realizarse utilizando varios programas de software analítico proporcionados por las marcas comerciales de los analizadores de masas, como MetaboScape® de Bruker, MassHunter Mass Profiler® y MassHunter® Unknowns Analysis de Agilent, o Compound Discoverer® y TraceFinder® de ThermoFisher Scientific. También existen programas de código abierto como FOR-IDENT (<https://water.for-ident.org/#!home>),

MS-FINDER (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msfinder/main.html>) o patRoön [32]. Todos ellos permiten realizar análisis de compuestos desconocidos y sospechosos (Fig. 3).

Antes del análisis de datos, los datos brutos deben preprocesarse para generar una matriz de datos utilizable de diversas maneras, eliminando el ruido y reduciendo el peso de los datos. El paso clave es minimizar la varianza y el sesgo en el análisis de datos para reducir la complejidad y mejorar las señales significativas de interés. Por consiguiente, se han desarrollado e implementado varios algoritmos en los programas de software mencionados anteriormente, y también se han aplicado múltiples programas de código abierto para procesar datos brutos de MS adquiridos en LC-MS o GC-MS [33], como XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu/>) [34], MZmine (<http://sourceforge.net/projects/mzmine/>) [35], OpenMS (<http://open-ms.sourceforge.net/>) [36], y MetAlign (<http://www.metalign.nl>) [37]. Los pasos de preprocesamiento han llamado especial atención por su practicidad y eficacia. El primer paso en el preprocesamiento de datos brutos de LC-HRMS y GC-HRMS es la normalización para eliminar las variaciones confusas atribuibles a fuentes experimentales, como el ruido analítico o el sesgo experimental. El segundo paso es la alineación del tiempo de retención (RT) de las señales detectadas en diferentes muestras, cuyo objetivo es eliminar los desplazamientos entre las muestras para una determinada señal, con el fin de garantizar la extracción de información útil en etapas posteriores (Fig. 3). Para que sean aplicables a las grandes cantidades de datos bidimensionales generados por los sistemas

cromatográficos acoplados a instrumentos de HRMS, se debe reducir la dimensionalidad [33, 38].

Además, en el preprocesamiento de datos, hay un tercer paso: la deconvolución, que debe realizarse para aumentar la probabilidad de obtener una buena coincidencia en la búsqueda en la biblioteca, en comparación con los espectros no deconvolucionados (Fig. 3). El algoritmo de deconvolución puede generar cientos o incluso miles de picos detectados. Por lo tanto, es importante seleccionar adecuadamente los parámetros de deconvolución para minimizar el número de falsos positivos y negativos [39]. Este paso es más útil en los datos de GC-HRMS que en los de LC-HRMS, pero se puede usar en ambos.

#### 5. Conclusiones y posibles avances futuros

Este estudio propuso una metodología para caracterizar los PPPs utilizando técnicas cromatográficas (GC y LC) acopladas a HRMS. A pesar de que se describieron las etapas convencionales del método analítico, como el tratamiento de la muestra, la separación y detección, y el análisis de datos, se proporcionaron diferentes recomendaciones. Mientras que la separación de los compuestos se puede realizar utilizando fases estacionarias bien conocidas, como C18 o HILIC, algunas específicas desarrolladas para surfactantes, como ThermoFisher Acclaim™ Surfactant o Shodex ODP2 HP-2D, podrían ser alternativas adecuadas. Además de LC o GC, que han sido comúnmente utilizadas hasta ahora, la electroforesis capilar (CE) acoplada a HRMS ofrece grandes promesas para el análisis de metabolitos altamente cargados y polares, asegurando así una caracterización completa de los PPPs, combinando la información proporcionada por estas técnicas de separación.

En cuanto a las técnicas de detección, se podría añadir una nueva dimensión a la información proporcionada por HRMS con la espectrometría de movilidad iónica (IMS) ya que su principal ventaja es la resolución de isómeros o isóbaros, mejorando la información proporcionada por el equipo de HRMS.

Finalmente, este estudio resalta la necesidad de controlar los co-formulantes en los PPPs durante la monitorización de plaguicidas y la necesidad de mejorar la regulación de estas sustancias, considerando la amplia variedad de moléculas presentes en esta categoría, sus propiedades y sus aspectos toxicológicos.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Economía y Competitividad de España (MINECO) y a FEDER-UE (proyecto ref. PID2019-106201RB-I00) por el apoyo financiero. RLR agradece a la Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades de Andalucía por el apoyo financiero de las “Ayudas para Captación, Incorporación y Movilidad de Capital Humano de I+D+i (PAIDI 2020)”. AJMR agradece al Ministerio de Universidades de España por el apoyo financiero de las “Ayudas para la Formación del Profesorado Universitario (FPU)”, ref. FPU19/04260. JMS

agradece al Ministerio de Universidades de España y a la Unión Europea (Next Generation EU) por el apoyo financiero de las “Ayudas para la recualificación del sistema universitario español 2021–2023 (Margarita Salas)”.

## Referencias

- [1] H. Botitsi, D. Tsipi, A. Economou, Current legislation on pesticides, in: R. Romero González, A. Garrido Frenich (Eds.), Applications in high resolution mass spectrometry: food safety and pesticide residue analysis, Elsevier, 2017, pp. 83–130, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809464-8.00001-4>.
- [2] The business research company, Pesticides Market - By Type (Herbicides, fungicides and insecticides), by region, opportunities and strategies – Global Forecast To 2023, 2022.
- [3] European Crop Protection, (n.d.). [www.ecpa.eu](http://www.ecpa.eu).
- [4] European Union, Regulation (EC) No 1107/2009, (2009) 1–50.
- [5] European Union, Regulation (EC) No 284/2013, (2013).
- [6] European Union, Regulation (EC) No 546/2011, 2011.
- [7] European Union, Regulation (EC) No 547/2011, 2011.
- [8] M.E. Balmer, D. Janser, U. Schaller, J. Krauss, H.C. Geiser, T. Poiger, Magnitude and decline of pesticide co-formulant residues in vegetables and fruits: results from field trials compared to estimated values, *Pest Manag. Sci.* 77 (2021) 1187–1196, <https://doi.org/10.1002/ps.6128>.
- [9] R. López-Ruiz, E. Belmonte-Sánchez, R. Romero-González, J. Martínez Vidal, A. Garrido Frenich, Identification of adjuvants in plant protection products applying a suspect screening workflow based on orthogonal techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02662-0>.
- [10] A. Michel, H.J. Brauch, E. Worch, F.T. Lange, Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for trace analysis of trisiloxane surfactants in the aqueous environment: an alternative strategy for quantification of ethoxylated surfactants, *J. Chromatogr. A* 1245 (2012) 46–54, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.064>.
- [11] P.A. Lara-Martín, E. González-Mazo, B.J. Brownawell, Multi-residue method for the analysis of synthetic surfactants and their degradation metabolites in aquatic systems by liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4799–4807, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.031>.
- [12] B. Oliver-Rodríguez, A. Zafra-Gómez, F.J. Camino-Sanchez, J.E. Conde-González, J.P. Pérez-Trujillo, J.L. Vilchez, Multi-residue method for the analysis of commonly used commercial surfactants, homologues and ethoxymers, in marine sediments by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *Microchem. J.* 110 (2013) 158–168, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.03.006>.
- [13] I.H. Wang, R. Moorman, J. Burleson, Isocratic reversed-phase liquid chromatographic method for the simultaneous determination of (S)-methoprene, MGK264, piperonyl butoxide, sumithrin and permethrin in pesticide formulation, *J. Chromatogr. A* 983 (2003) 145–152, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01692-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01692-8).
- [14] J. Ungewiß, J.P. Vietzke, M. Strassner, C. Rapp, B. Feuerstein, Quantitative determination of non-ionic surfactants by high-performance liquid chromatography-ion trap mass-spectrometry, *Chromatographia* 57 (2003) 73–76, <https://doi.org/10.1007/BF02492086>.
- [15] D. Tush, K.A. Loftin, M.T. Meyer, Characterization of polyoxyethylene tallow amine surfactants in technical mixtures and glyphosate formulations using ultra-high performance liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1319 (2013) 80–87, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.032>.
- [16] H. Li, Z. Jiang, X. Cao, H. Su, H. Shao, F. Jin, A.M. Abd El-Aty, J. Wang, Simultaneous determination of three pesticide adjuvant residues in plant-derived agro-products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1528 (2017) 53–60, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.075>.
- [17] B. Ryckaert, P. Spanoghe, G. Haesaert, B. Heremans, S. Isebaert, W. Steurbaut, Quantitative determination of the influence of adjuvants on foliar fungicide residues, *Crop Prot.* 26 (2007) 1589–1594, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.02.011>.
- [18] M. Zeinali, L.L. McConnell, C.J. Hapeman, A. Nguyen, W.F. Schmidt, C.J. Howard, Volatile organic compounds in pesticide formulations: methods to estimate ozone formation potential, *Atmos. Environ.* 45 (2011) 2404–2412, <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.02.015>.
- [19] L. Cao, H. Jiang, J. Yang, L. Fan, F. Li, Q. Huang, Simultaneous determination of benzene and toluene in pesticide emulsifiable concentrate by headspace GC-MS, *J. Anal. Methods Chem.* (2013) 1–6, <https://doi.org/10.1155/2013/121783>.
- [20] J. Siebers, A. Besinger-Riedel, C. Vinke, Determination of active substances, co-formulants and impurities in plant protection products using high performance liquid chromatography and gas chromatography, *J. Verbrauch. Und Lebensm.* 9 (2014) 137–144, <https://doi.org/10.1007/s00003-014-0873-0>.
- [21] H. Li, Z. Jiang, X. Cao, H. Su, H. Shao, F. Jin, L. Zheng, A.M. Abd El-Aty, J. Wang, SPE/GC-MS determination of 2-pyrrolidone, n-methyl-2-pyrrolidone, and N-Ethyl-2-pyrrolidone in liquid pesticide formulations, *Chromatographia* 81 (2018) 359–364, <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3435-7>.
- [22] A.J. Maldonado-Reina, R. López-Ruiz, A. Garrido Frenich, F.J. Arrebola, R. Romero-González, Co-formulants in plant protection products: An analytical approach to their determination by gas chromatography-high resolution mass accuracy spectrometry, *Talanta* 234 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122641>.
- [23] E. Pose-Juan, R. Rial-Otero, E. Martínez-Carballo, E. López-Periago, J. Simal Gandara, Determination of metalaxyl and identification of adjuvants in wettable powder pesticide technical formulas, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1535–1544, <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2633-z>.
- [24] S. Merkle, K. Kleeberg, J. Fritsche, Recent developments and applications of solid phase

- microextraction (SPME) in food and environmental analysis—a review, *Chromatography* 2 (2015) 293–381, <https://doi.org/10.3390/chromatography2030293>.
- [25] J. Marín-Saez, R. López-Ruiz, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, I. Zamora Rico, Looking beyond the active substance: comprehensive dissipation study of myclobutanil-based plant protection products in tomatoes and grapes using chromatographic techniques coupled to high-resolution mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* (2022), <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01767>.
- [26] E.J. Hill, S.J. Martin, C.M. Weikart, Characterization of extractable species from polypropylene microplates, *SLAS Technol.* 23 (2018) 560–565, <https://doi.org/10.1177/2472630318769656>.
- [27] N. Caballero-Casero, L. Belova, P. Vervliet, J.P. Antignac, A. Castano, L. Debrauwer, M.E. Lopez, C. Huber, J. Klanova, M. Krauss, A. Lommen, H.G. J. Mol, H. Oberacher, O. Pardo, E.J. Price, V. Reinstadler, C.M. Vitale, A.L.N. van Nuijs, A. Covaci, Towards harmonised criteria in quality assurance and quality control of suspect and non-target LC-HRMS analytical workflows for screening of emerging contaminants in human biomonitoring, *TrAC Trends Anal. Chem.* 136 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116201>.
- [28] E. Hergueta Castillo, R. López-Ruiz, R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, Nontargeted analysis of co-formulants in antifungal pesticide formulations by gas chromatography-tandem high resolution mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* (2022).
- [29] Ł. Rajski, S. Petromelidou, F.J. Díaz-Galiano, C. Ferrer, A.R. Fernández-Alba, Improving the simultaneous target and non-target analysis LC-amenable pesticide residues using high speed Orbitrap mass spectrometry with combined multiple acquisition modes, *Talanta* 228 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122241>.
- [30] J.F. García-Reyes, D. Moreno-González, R. Nortes-Mendez, B. Gilbert-López, A. Molina Díaz, HRMS: Hardw. Softw. (2017), <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809464-8.00002-6>.
- [31] I.M. Huerfano Barco, J.C. Espana Amortegui, J.A. Guerrero Dallos, Development and validation of qualitative screening, quantitative determination and posttargeted pesticide analysis in tropical fruits and vegetables by LC-HRMS, *Food Chem.* 367 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130714>.
- [32] R. Helmus, T.L. ter Laak, A.P. van Wezel, P. de Voogt, E.L. Schymanski, patRoom: open source software platform for environmental mass spectrometry based nontarget screening, *J. Chemin.* 13 (2021), <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00477-w>.
- [33] L. Yi, N. Dong, Y. Yun, B. Deng, D. Ren, S. Liu, Y. Liang, Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: a review, *Anal. Chim. Acta* 914 (2016) 17–34, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.001>.
- [34] H.P. Benton, D.M. Wong, S.A. Trauger, G. Siuzdak, XCMS2: Processing tandem mass spectrometry data for metabolite identification and structural characterization, *Anal. Chem.* 80 (2008) 6382–6389, <https://doi.org/10.1021/ac800795f>.
- [35] M. Katajamaa, J. Miettinen, M. Oresic, MZmine: Toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data, *Bioinformatics* 22 (2006) 634–636, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btk039>.
- [36] M. Sturm, A. Bertsch, C. Gropl, A. Hildebrandt, R. Hussong, E. Lange, N. Pfeifer, O. Schulz-Trieglaff, A. Zerck, K. Reinert, O. Kohlbacher, OpenMS - an open-source software framework for mass spectrometry, *BMC Bioinform.* 9 (2008), <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-163>.
- [37] R.C.H. de Vos, S. Moco, A. Lommen, J.J.B. Keurentjes, R.J. Bino, R.D. Hall, Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 778–791, <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.95>.
- [38] R. Smith, D. Ventura, J.T. Prince, LC-MS alignment in theory and practice: a comprehensive algorithmic review, *Brief. Bioinform.* 16 (2013) 104–117, <https://doi.org/10.1093/bib/bbt080>.
- [39] V. Castro, J.B. Quintana, J. López-Vazquez, N. Carro, J. Cobas, D. Bilbao, R. Cela, R. Rodil, Development and application of an in-house library and workflow for gas chromatography–electron ionization–accurate-mass/high-resolution mass spectrometry screening of environmental samples, *Anal. Bioanal. Chem.* (2021), <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03810-w>.