

# Determinación de insecticidas por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

POR

S. NAVARRO, A. BARBA y M. A. CAMARA

## RESUMEN

Se establecen las condiciones analíticas para la determinación por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y detector universal espectrofotométrico de los insecticidas organoclorados: Aldrín, Heptacloro, DDT, HCH, Endosulfán, Endrín y Dieldrín, y de los organofosforados: Paratión y Metilparatión. En el caso de Aldrín, Heptacloro y DDT se pueden determinar hasta 5 ng, acoplando dos columnas en serie de CianoSil X-I y AminoSil X-I. Para llegar a 10 ng con Endosulfán, Endrín y Dieldrín, se elimina la columna de CianoSil X-I. En ambos casos se utiliza como eluyente n-Hexano, a un flujo de 3 ml/min, 45° C de temperatura y lectura de la absorción a 220 nm. El HCH no se puede determinar a niveles de residuos en estas condiciones. Se llega a idénticos niveles de los insecticidas Paratión y Metilparatión usando la columna de CianoSil X-I y como eluyente la mezcla n-Hexano/Tetrahidrofurano (95/5) a un flujo de 2 ml/min, 25° C de temperatura y leyendo la absorción a 266 nm.

## SUMMARY

The analytical conditions for the determination by high performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometric universal detector for the organochlorinated insecticides: Aldrin, Heptachlor, DDT,



HCH, Endosulfan, Endrin and Dieldrin, and the organophosphorous Parathion and Metylparathion, are established. In the Aldrin, Heptachlor and DDT it is possible to determine till 5 ng by coupling two columns of CianoSil X-I and AminoSil X-I. To get determination 10 ng with Endosulfan, Endrin and Dieldrin, the CianoSil X-I column is eliminated. In both cases, the eluent used is n-Hexane, at 3 ml/min flow, 45° C and an absorption reading at 220 nm. HCH can not be determined at residues ranges under these conditions. It is possible to get the same accuracy for the Parathion and Metylparathion, using a CianoSil X-I column and n-Hexane/THF (95/5) as eluent, at a 2 ml/min flow, 25° C and a absorption at 266 nm.

## INTRODUCCION

En los últimos años la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) ha alcanzado un gran auge en el análisis de mezclas complejas. Este amplio desarrollo es debido no sólo a la gran cantidad de formas y mecanismos de utilización que presenta, sino también a su rapidez operativa y a que no es necesario ningún tratamiento térmico o conversión previa en derivados de los compuestos a determinar (1, 2, 3). Concretamente, en el campo de los plaguicidas se está realizando una amplia investigación mediante esta técnica de separación y análisis (4, 5, 6, 7, 8).

Se ha escogido este grupo de insecticidas clorados y fosforados debido a que han sido muy utilizados en cultivos agrícolas y suelos dedicados a ellos y a su posible empleo en la actualidad, a pesar de la prohibición establecida en nuestra legislación en cuanto a su comercialización, venta y uso (9, 10). Creemos conveniente destacar que estos productos, por su elevada toxicidad y persistencia, pueden ser causa de graves riesgos para la salud humana y son los más controlados en el mercado europeo en cuanto a residuos de tratamientos fitosanitarios en alimentos y productos agrícolas (11, 12, 13).

En este trabajo se exponen las condiciones analíticas y los resultados obtenidos en la identificación y cuantificación de determinados insecticidas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### MATERIAL Y REACTIVOS

Se ha utilizado un cromatógrafo de alta presión Perkin Elmer, modelo 601, equipado con doble bomba, válvula de inyección Rheodyne

(175  $\mu$ l) y con detector espectrofotométrico de longitud de onda variable (UV-VIS) Perkin Elmer, mod. LC-55, que lleva acoplado un scanner digital y un registrador de la citada marca. Las columnas cromatográficas son de acero, de 25 cm de longitud y 2 mm de diámetro interno.

Los insecticidas estudiados han sido: Aldrín, Heptacloro, DDT, HCH, Endosulfán, Endrín, Dieldrín, Paratión y Metilparatión, todos ellos de calidad standard de cromatografía.

Para la preparación de las disoluciones patrón se empleó n-Hexano de calidad análisis de residuos. Todos los eluyentes fueron de calidad espectrofotometría.

#### CONDICIONES DE TRABAJO

Las fases estacionarias utilizadas han sido: CianoSil X-I y AminoSil X-I, Perkin Elmer, de tamaño de partícula  $13 \pm 5 \mu$  y de área superficial 400 m<sup>2</sup>/g.

En el caso de los insecticidas organoclorados, las condiciones de trabajo fueron:

- Flujo de la fase móvil (n-hexano): 3 ml/min.
- Temperatura de la columna: 45° C.
- Lectura de absorción en UV: 220 nm.
- Columnas: AminoSil X-I + CianoSil X-I y AminoSil X-I.

Para los organofosforados fueron:

- Flujo de la fase móvil (n-hexano/Tetrahidrofurano, 95/5): 2 ml/minuto.
- Temperatura de la columna: 25° C.
- Lectura de absorción en UV: 266 nm.
- Columna: CianoSil X-I.

#### RESULTADOS Y DISCUSION

Con el fin de establecer las condiciones óptimas de análisis, se realizaron previamente distintos ensayos, en los que se utilizaron diferentes fases estacionarias (sílice, fase ligada, etc.) y varias fases móviles de distinta polaridad, variando su flujo.

En la figura 1 se muestra un cromatograma de los insecticidas organoclorados estudiados, fijadas las condiciones anteriores y utilizando las columnas de AminoSil X-I y CianoSil X-I, conectadas en serie.

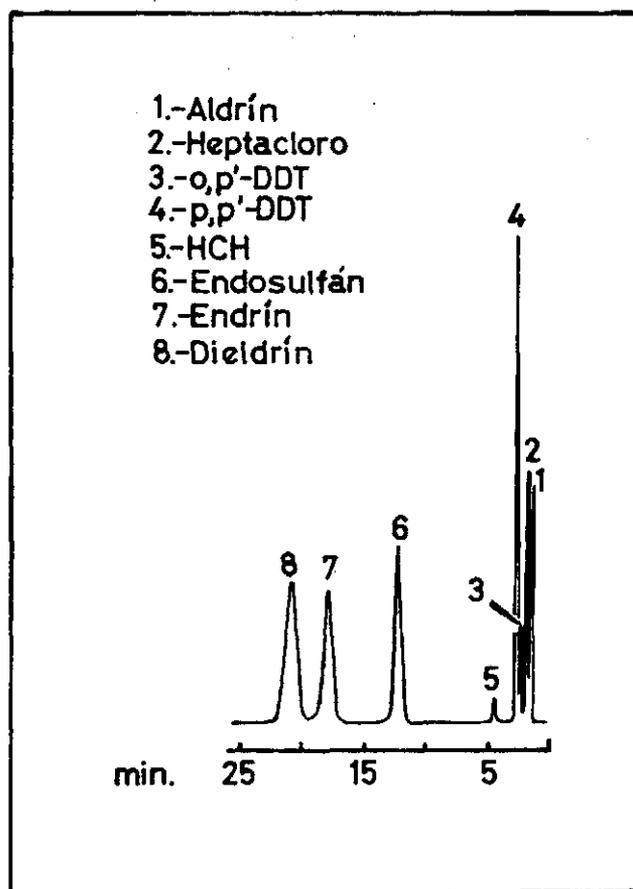


Figura 1. Cromatograma de los insecticidas organoclorados analizados con dos columnas conectadas en serie de AminoSil X-I y CianoSil X-I

La separación de Aldrín, Heptacloro, DDT (o,p' y p,p') y HCH es rápida y adecuada (tiempo de resolución, 5 minutos aproximadamente), mientras que los restantes, por su estructura y mayor polaridad, se eluyen más lentamente (entre 10 y 25 minutos), con una notable pérdida de resolución.

En la tabla I se exponen los valores de los máximos de absorción de cada uno de estos insecticidas y sus tiempos de retención relativos a dos de ellos.

TABLA I

MAXIMOS DE ABSORCION Y TIEMPOS DE RETENCION RELATIVOS A ENDOSULFAN y p,p'-DDT DE LOS INSECTICIDAS ANALIZADOS

Insecticida	Máximo (nm)	t' <sub>R</sub> -p,p'-DDT	t' <sub>R</sub> -Endosulfán
Aldrín ... ..	218	0,575	0,106
Heptacloro ... ..	218	0,680	0,126
o,p'-DDT ... ..	221	0,880	0,165
p,p'-DDT ... ..	237	1,000	0,186
HCH ... ..	213	1,808	0,335
Endosulfán ... ..	217	5,391	1,000
Endrín ... ..	225	7,900	1,475
Dieldrín ... ..	219	9,200	1,716

Estos datos, junto con los espectros de absorción que se representan en la figura 2 y que se pueden obtener con la ayuda del scanner acoplado al detector espectrofotométrico (desconectando las bombas cuando se alcanza la altura máxima de cada pico en el cromatograma), permiten una total identificación de cada uno de los componentes de la mezcla analizada.

En la tabla II se incluyen los rangos de concentración detectables, las ecuaciones de regresión y los coeficientes de correlación de cada uno de estos compuestos. El HCH, debido a su baja respuesta en este tipo de detector, sólo puede cuantificarse en concentraciones superiores a 100 µg (14).

TABLA II

RANGOS DE CONCENTRACION, ECUACIONES DE REGRESION Y COEFICIENTES DE CORRELACION EN LA CUANTIFICACION DE LOS INSECTICIDAS ESTUDIADOS

Insecticida	Concentración		Ecuación	Coeficiente correlación
	ng	µg		
Aldrín ... ..	5	100	y = 0,06 x - 7,04	0,9965
Heptacloro ... ..	5	100	y = 0,05 x - 3,97	0,9977
DDT (suma) ... ..	5	100	y = 0,02 x - 7,90	0,9911
HCH ... ..		> 100	y = 2,25 x - 587,3	1,0000
Endosulfán ... ..	10 <sup>3</sup>	100	y = 0,11 x - 3,71	0,9999
Endrín ... ..	10 <sup>3</sup>	100	y = 0,08 x + 3,33	0,9996
Dieldrín ... ..	10 <sup>3</sup>	100	y = 0,06 x + 6,45	0,9996



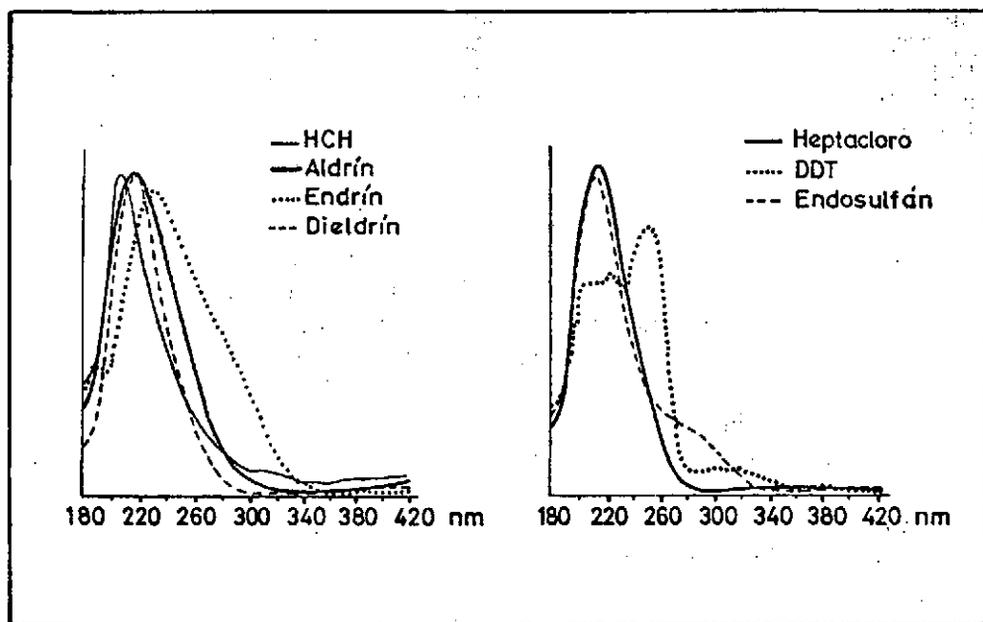


Figura 2. Espectros de absorción de los distintos insecticidas organoclorados estudiados

La determinación de Endosulfán, Endrin y Dieldrin a nivel de residuos se logra eliminando la columna de CianoSil X-1, sin variar el resto de las condiciones.

En la figura 3 se muestra un cromatograma de los insecticidas citados, utilizando una sola columna. Es de destacar que en este caso, si bien se mejora sensiblemente la resolución de los tres últimos picos y se acorta el tiempo de análisis (duración total de 8 minutos), se pierde en los cuatro primeros, que se agrupan en sólo dos.

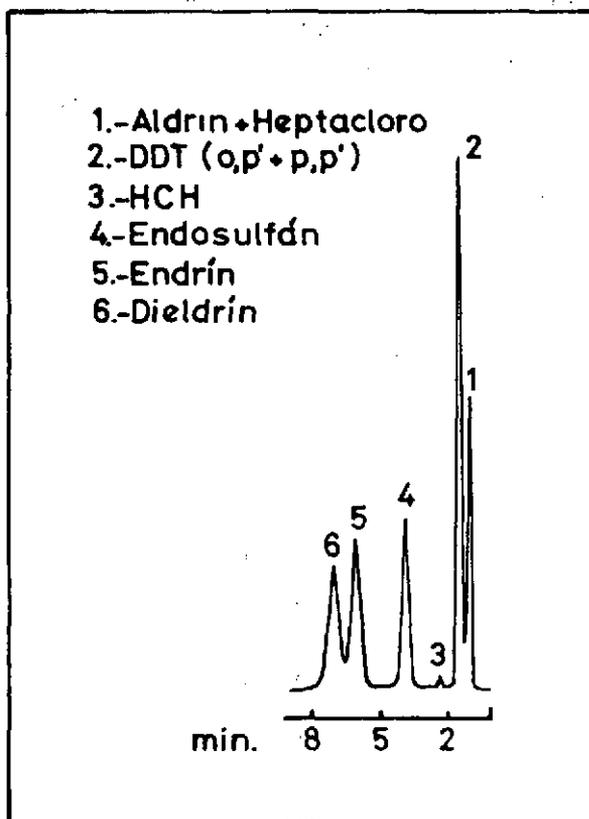


Figura 3. Cromatograma de los insecticidas organoclorados analizados con una columna de AminoSil X-I

En la tabla III se exponen los nuevos rangos de concentración cuantificables, las ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación de estos tres insecticidas en las nuevas condiciones.

TABLA III

RANGOS DE CONCENTRACION, ECUACIONES DE REGRESION Y COEFICIENTES DE CORRELACION EN LA CUANTIFICACION DE ENDOSULFAN, ENDRIN Y DIELDRIN EN LAS NUEVAS CONDICIONES

Insecticida	Concentración		Ecuación	Coeficiente correlación
	ng	µg		
Endosulfán ... ..	10	100	$y = 0,06 x - 0,03$	0,9999
Endrín ... ..	10	100	$y = 0,06 x + 0,05$	1,0000
Dieldrín ... ..	10	100	$y = 0,04 x + 0,08$	0,9999



En el caso de los insecticidas organofosforados, tal como podemos observar en la figura 4, el tiempo de análisis es muy pequeño y por tanto su resolución altamente satisfactoria; el pico correspondiente al Paratión aparece en el cromatograma a los 57 segundos, siendo el tiempo total empleado en el análisis de 1 minuto y 55 segundos.

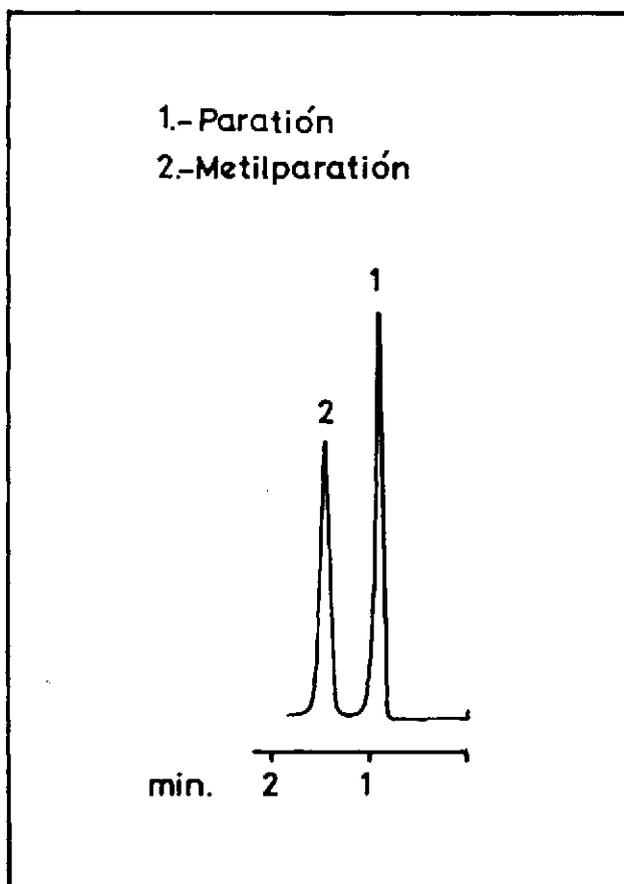


Figura 4. Cromatograma de los insecticidas organofosforados analizados con una columna de CianoSil X-I

En la tabla IV se indican los máximos de absorción de ambos compuestos y sus tiempos de retención absolutos y relativos al Paratión. Estos datos, acompañados de los espectros de absorción que se representan en la figura 5, permiten su total identificación.

TABLA IV

MAXIMOS DE ABSORCIÓN Y TIEMPOS DE RETENCION ABSOLUTOS ( $t_R$ ) Y RELATIVOS AL PARATION ( $t'_R$ ) DE LOS INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS ESTUDIADOS

Insecticida	Máximo (nm)	$t_R$	$t'_R$ -Paratión
Paratión	266	1,120	1,000
Metilparatión	267	1,850	1,652

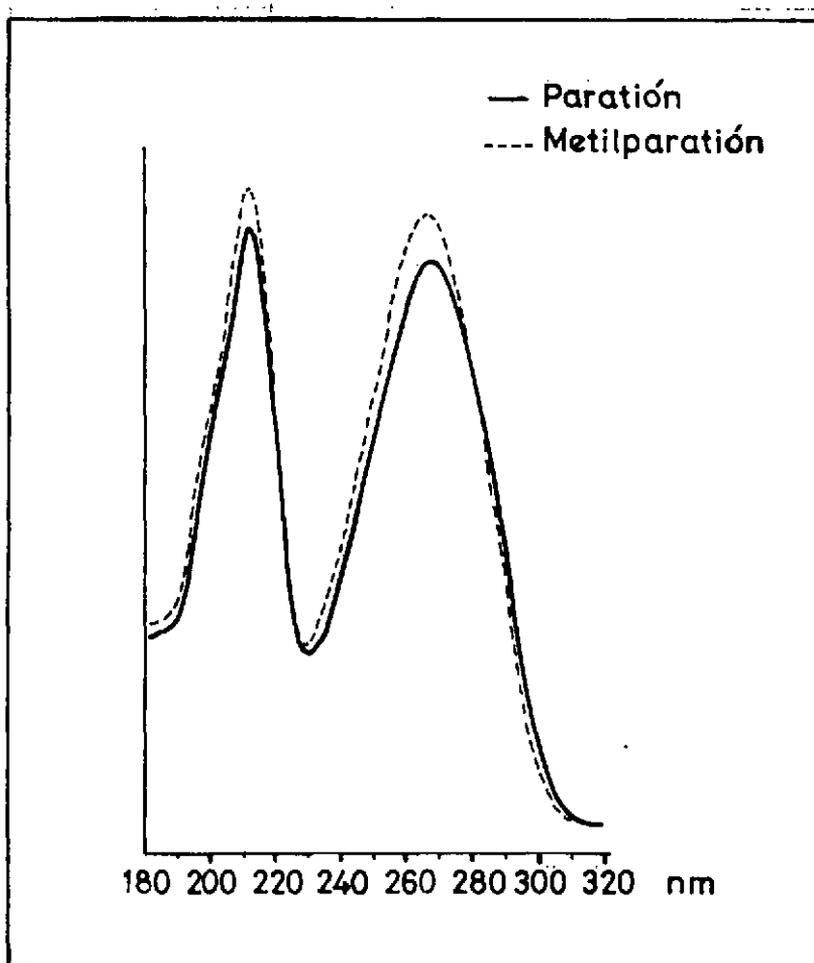


Figura 5. Espectros de absorción de los insecticidas organofosforados estudiados

En la tabla V se representan los rangos de concentración determinados para estos insecticidas, así como sus ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación.

TABLA V

RANGOS DE CONCENTRACION, ECUACIONES DE REGRESION Y COEFICIENTES DE CORRELACION EN LA CUANTIFICACION DE PARATION Y METILPARATION

Insecticida	Concentración		Ecuación	Coeficiente correlación
	ng	µg		
Paration ... ..	10	100	$y = 478,53 x - 57,71$	0,9999
Metilparation ... ..	10	100	$y = 456,35 x + 63,83$	0,9999

Los resultados expuestos conducen a establecer las siguientes consecuencias:

La cromatografía líquida de alta resolución puede ser de gran utilidad en la determinación de insecticidas como DDT, de gran interés por su persistencia, toxicidad y capacidad de acumulación en tejidos grasos, y que en otras técnicas cromatográficas tengan una peor resolución.

La facilidad de operación que presenta CLAR, en cuanto a cambios de fases estacionarias, disolventes, flujos, etc., lleva a conseguir tiempos de análisis mucho menores.

En aquellos insecticidas en los que se consigue una mejor eficacia se hace más exacta la cuantificación por métodos rápidos, como el de comparación de alturas con patrón externo.

Las diferencias entre los límites de detección de esta técnica y otras como cromatografía de gases no se deben a su naturaleza, sino al sistema de detección utilizado. En nuestro caso se ha empleado un detector de tipo universal y no específico; en el caso de poder utilizar los mismos tipos de detectores, se llegaría a idénticos resultados.

Puede afirmarse que esta metodología de análisis es válida para experiencias en las que se trate de controlar, mediante muestreos rápidos, la contaminación por residuos de estos insecticidas en suelos agrícolas, ya que se establecen, en general, valores medios de 1 ppm como rango de contaminación elevada.

La determinación de insecticidas por esta técnica y detección por absorción en el ultravioleta, tanto por su rapidez como por su eficacia, puede ser muy útil en el control de calidad y fabricación de productos técnicos y formulados comerciales.

BIBLIOGRAFIA

1. MAJORS, R. E., *J. AOAC*, 60 (1977), 186.
2. SIDWELL, J. A., *Med. Fac. Landbouwn. Rijksuniv. Gent.*, 42 (1977), 1803.
3. MOYE, H. A., *J. Chrom. Sci.*, 13 (1975), 268.
4. BRINKNAN, U. A.; SEETZ, J. W., y REYMER, H. G., *J. Chrom.*, 116 (1976), 353.
5. HENRY, R. A.; SCHMEIT, J. A.; DIECKMAN, J. F., y MURPHY, F. J., *Anal. Chem.*, 43 (1971), 1053.
6. LAWRENCE, F. J., *J. Agric. Food Chem.*, 25 (1977), 211.
7. FREI, R. W.; LAWRENCE, F. J.; HOPE, J., y CASSIDY, R. M., *J. Chrom. Sci.*, 12 (1974), 40.
8. FARRINGTON, D. S.; HOPKINS, R. G., y RUZICKA, J. H., *Analyst*, 102 (1977), 377.
9. Orden de Presidencia de Gobierno de 20-2-79, «B.O.E.» de 12 de marzo.
10. Orden del Ministerio de Agricultura de 26-5-79, «B.O.E.» de 8 de junio.
11. Reglamento de cantidades máximas de productos de tratamientos de plantas (Ministerio Federal de la Juventud, de la Familia y de la Salud, R.F.A.), junio de 1978.
12. Orden del Ministerio de Sanidad de Italia de 6-1-79, «G.O.» de 8 de febrero.
13. Directorio del Consejo de las Comunidades Europeas de 21-12-78, «J.O.» de 8 de febrero de 1979.
14. WILLMOT, F. W., y DOLPHIN, R. J., *J. Chrom. Sci.*, 12 (1974), 695.

