

Optimización y validación de un método de extracción y limpieza en fase sólida para la determinación de insecticidas organofosforados en cebollín (*Allium fistulosum* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum* L.)

Extraction and cleanup method optimization and validation in solid phase for determining organophosphorus insecticides on green onion (*Allium fistulosum* L.) and coriander (*Coriandrum sativum* L.)

G. Ettiene^{1*}, S. Ortega², D. Medina¹, J. Sepúlveda³ y L. Sandoval⁴

¹Departamento de Química. ²División de Extensión. ⁴Instituto de Investigaciones Agronómicas. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. ³MSc. en Ciencias Ambientales. Universidad del Zulia.

Resumen

Se optimizó y validó un método analítico para la extracción y limpieza de residuos de insecticidas organofosforados (OPs: diazinón, malatión, paratión, disulfotón, fenitrotión, fenclorfos, clorfenvinfos, y metidatión) en cebollín (*Allium fistulosum* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum* L.). Se calcularon los porcentajes de recuperación de los OPs para evaluar la eficiencia del método, adicionando a 4g de muestra de cada matriz, libre de residuos de insecticidas, una concentración conocida de los OPs (0,2-10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). La cuantificación se realizó empleando cromatografía de gases capilar (CGC) con detección selectiva nitrógeno fósforo. La fase sólida carbón activado/florisil (200:700mg), permitió la obtención de altos porcentajes de recuperación (96-105%) y extractos limpios. El método de extracción propuesto mostró una alta precisión en términos de repetibilidad (RSD <3%) y reproducibilidad (RSD <7%) y bajos límites de detección (0,0061-0,020 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), pudiendo ser empleado para el monitoreo rutinario de niveles residuales de OPs en los materiales vegetales evaluados.

Palabras clave: Insecticidas organofosforados, métodos de extracción, extracción en fase sólida, residuos de insecticidas.

Abstract

An analytical method for extraction and cleanup of organophosphorus pesticides residues (OPs: diazinon, Malathion, parathion, disulfoton, fenitrothion, fenclorphos, chlorfenvinphos, and methidathion) in green onion (*Allium fistulosum* L.) and coriander (*Coriandrum sativum* L.) was validated and optimized. The percentage of recovery of the OPs were calculated to evaluate the efficiency of the method, adding to 4g of sample of each matrix, free of insecticide residues, a known concentration of the OPs ($0.2-10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). The quantification was carried out employing capillary gas chromatography (GCC) with selective detection nitrogen phosphorus. The solid phase activated charcoal/florisil (200:700mg), allowed the obtaining of highly percentages of recovery (96-105%) and clean extracts. The extraction method proposed showed a high precision in terms of repeatability (RSD <3%) and reproducibility (RSD<7%), and low detection limits ($0.006-0.020 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), could be used for the routine monitoring of residual levels of OPs in the vegetable materials evaluated here in.

Key words: Organophosphorus insecticides, extraction methods, solid phase extraction, insecticides residues.

Introducción

Los insecticidas han proporcionado beneficios a la agricultura porque ha permitido controlar y eliminar las plagas y enfermedades que atacan y afectan a plantaciones agrícolas tales como frutales y hortalizas; sin embargo, se ha demostrado que su empleo intensivo e incontrolado constituye un alto riesgo para la salud humana debido a su alta toxicidad directa y residual (Buscema *et al.*, 2004; Calonge, 2002; Danis *et al.*, 2002; Ettiene *et al.*, 1997).

El uso excesivo e indiscriminado de estas sustancias, puede ocasionar que niveles no inocuos permanezcan en los cultivos hasta el momento de la cosecha, e incluso, hasta la postcosecha, lo cual conlleva un alto riesgo de contaminación de los consumidores. Esto implica que el riesgo de intoxicación o envenenamiento sea

Introduction

The use of insecticides has proportioned benefits to the agriculture because it has permit to control and eliminate pests and diseases that attack and affects to agricultural plantations like fruits and vegetables; however, it has been demonstrate that its intensive and no controlled use constitutes a high risk for human health due to its high toxicity direct and residual (Buscema *et al.*, 2004; Calonge, 2002; Danis *et al.*, 2002; Ettiene *et al.*, 1997).

The excessive and indiscriminate use of these substances could cause that not innocuous levels remain on crops until the moment of harvest, and even, until post harvest, that takes to high contamination risk of consumers. This implies high risk of poisoning be so high, especially when it deals with products that are

muy alto, sobre todo cuando se trata de productos que se consumen frescos y sin tratamiento tecnológico, como es el caso de muchas frutas y hortalizas (Calonge, 2002; Danis *et al.*, 2002; Prieto *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2005; Schenck y Lehotay, 2000).

La determinación de niveles residuales de OPs requiere disponer de métodos analíticos sensibles que permitan cuantificar niveles trazas de concentración ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), y diseñar propuestas de extracción analíticas como etapas preliminares de tratamiento de muestra. En la actualidad, no existe una sola secuencia de extracción que se pueda aplicar a todo tipo de OPs. La elección de la etapa preliminar depende de la naturaleza química de los componentes y de los sustratos en los que se encuentran (Picó y Font, 2003; Stan, 2000).

La extracción líquido-líquido es una técnica universal de gran aplicación para la extracción de insecticidas de matrices complejas que proporciona excelentes resultados. Sin embargo, el proceso es largo y tedioso y presenta ciertos inconvenientes tales como el empleo de grandes cantidades de disolvente cuyo costo es muy elevado (Itoh *et al.*, 1996; Mol *et al.*, 2003; Tang, 2005).

La extracción en fase sólida (EFS) es una técnica muy utilizada para la extracción de OPs (kadenniczki *et al.*, 1992), que además de permitir el empleo de menores cantidades de solventes, evita otros inconvenientes asociados a la extracción líquido-líquido, tales como la separación incompleta de las fases y las interferencias de la matriz. Por otra parte, se obtienen ventajas al permitir la reducción de

consumed in a fresh way and without toxicological treatment, like the most of fruits and vegetables (Calonge, 2002; Danis *et al.*, 2002; Prieto *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2005; Schenck and Lehotay, 2000).

Determination of residue levels of OPs requires the disposition of sensitive analytical methods that permits to quantify concentration traces levels ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), and to design proposals of analytical extraction like preliminary stages of sampling treatment. Nowadays, there is no only one extraction sequence that could be applied to every type of OPs. The selection of a preliminary stage depend on the chemical nature of compounds and substrates in where they are (Picó and Font, 2003; Stan, 2000).

The liquid-liquid extraction is one universal technique of application for the insecticides extraction of complex matrix that proportion excellent results. However, process is long, boring and it has several troubles like the use of high quantities of dissolving with a high cost (Itoh *et al.*, 1996; Mol *et al.*, 2003; Tang, 2005).

The solid phase extraction (SPE) is a so used technique for the extraction of OPs (kadenniczki *et al.*, 1992), that besides of permitting the employ of little quantities of solving, avoid other troubles related to the liquid-liquid extraction, such as incomplete separation of phases and matrix interferences. On the other hand, several advantages are obtained because they permit the reduction of sample quantity and the extraction time.

The analytical techniques

la cantidad de muestra y del tiempo de extracción.

Las técnicas analíticas comúnmente utilizadas para la determinación de los niveles residuales de OPs son cromatografía líquida (CL) y cromatografía de gases (CG). La mayor parte de los métodos de análisis emplean una variedad de técnicas de detección, entre ellas se han publicado aplicaciones con sistemas de detección nitrógeno fósforo (DNP) (Lucio *et al.*, 2004; Oliva *et al.*, 2000; Prieto *et al.*, 1999; Prieto *et al.*, 2002), detección fotométrica a la llama (DFLL) (Calonge, 2002; Tang *et al.*, 2005) y espectrometría de masas (EM) (Itoh *et al.*, 1996). De éstas, la cromatografía de gases acoplada al detector de masas (CG-EM) y la CG acoplada al detector nitrógeno-fósforo (CG-DNP) constituyen las técnicas analíticas más empleadas en la determinación de OPs en diferentes tipos de frutas y vegetales, proporcionando resultados altamente confiables (Calonge, 2002; Prieto *et al.*, 1999; Prieto *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2005).

El objetivo de este trabajo fue optimizar y validar un método de extracción y limpieza de residuos de los OPs (diazinon, malatión, paratión, disulfoton, fenitrotión, fenclorfos, clorfenvinfos y metidatión) en cebollín (*Allium fistulosum* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum* L.).

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en la Sección de Cromatografía del Instituto de Investigaciones Agronómicas de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Maracaibo.

Estándares de OPs de alta pu-

commonly used for determination of residual levels of OPs are liquid chromatograph (LC) and gases chromatograph (GC). The larger part of analysis methods uses a variety of detection techniques, among them, applications have been published with nitrogen phosphorus detection systems (DNP) (Lucio *et al.*, 2004; Oliva *et al.*, 2000; Prieto *et al.*, 1999; Prieto *et al.*, 2002), photosynthetic to flame detection (PFD) (Calonge, 2002; Tang *et al.*, 2005) and mass spectrometry (MS) (Itoh *et al.*, 1996). From these, the gases chromatograph connect to the mass detector (GC-MD) and the GC connect to the nitrogen-phosphorus detector (GC-NPD) constitutes to the analytical techniques used in the OPs determination in different types of fruits and vegetables, proportioning results highly accurate (Calonge, 2002; Prieto *et al.*, 1999; Prieto *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2005).

The objective of this study was to optimize and to evaluate and validate an extraction method and residues cleanup of OPs (diazinon, Malathion, parathion, disulfoton, fenitrothion, fenclorfos, chlorfenvinphos and methidathion) in green onion (*Allium fistulosum* L.) and coriander (*Coriandrum sativum* L.).

Materials and methods

Research was developed in the Chromatography Section of the Institute of Agronomical Researches of the Agronomy Faculty, University of Zulia.

OPs standards of a high purity of diazinon (98.9%), disulfoton (97.09%),

reza de diazinón (98,9%), disulfotón (97,09%), fenclorfos (99,1%), fenitrotión (97,0%), malatión (98,5%), paratión (99,2%), clorfervinfos (95,0%) metidatión (97,7%), (Dr. Ehrenstorfer GmbH®, Alemania), se utilizaron para preparar, soluciones madre (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de cada insecticida en acetato de etilo grado HPLC (Baker®, USA), a partir de las cuales se prepararon por dilución soluciones de calibración en acetato de etilo grado HPLC (Baker®, USA) y soluciones para adición estándar en metanol. (Baker®, USA).

Se preparó una solución madre (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) del estándar interno trifenilfosfato (TPP) (99%) (Riedel de Haën®, Alemania), en acetato de etilo. Todas las soluciones se protegieron de la luz con papel de aluminio y se almacenaron bajo refrigeración (4°C).

Carbón Grafitado (120/400 mesh, CarboGraph®, Alltech), Carbón Activado (6-60, Fisher Scientific, USA) y Florisil (Riedel de Haën®, Alemania) 0,1502–0,25 mm (60-10 mesh Astm) se utilizaron como fases sólidas en los ensayos para la limpieza de los extractos de los materiales vegetales utilizados (cebollín y cilantro).

Los análisis se realizaron empleando un Cromatógrafo de Gas, modelo Auto System, Perkin-Elmer, equipado con un detector termoiónico (Nitrógeno-Fósforo), un muestreador Automático Perkin-Elmer, una columna capilar (30 m x 0,53 mm x 1,2 μm de espesor de película, de 5% fenil 95% metil silicona (AT-5, ALLTECH, USA). El registro de los cromatogramas y la integración del área de los picos se realizaron en un computador, equipado con un soft-

fenclorphos (99.1%), fenitrothion (97.0%), malathion (98.5%), parathion (99.2%), chlorfenvinphos (95.0%), methidathion (97.7%), (Dr. Ehrenstorfer GmbH®, Alemania), were used for preparing pattern solutions (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) of each insecticide in acetate of HPLC (Baker®, USA) high degree, from which it was prepared by dilution, calibration solutions in ethyl acetate degree HPLC (Baker®, USA) and solutions for standard addition in ethanol (Baker®, USA).

A pattern solution (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) of trifenilfosfato internal standard (TPP) (99%) (Riedel de Haën, Alemania) was prepared, in ethyl acetate. All the solutions were protected for light with aluminum paper and they were stored on refrigeration (4°C).

Graphited charcoal (120/400 mesh, CarboGraph®, Alltech), activated charcoal (6-60, Fisher Scientific, USA) and Florisil (Riedel de Haën®, Alemania) 0.1502–0.25 mm (60-10 mesh Astm) were used like solid phases in the essays for cleanup of extracts of vegetable material used (green onion and coriander).

Analysis were made by using a Gas Chromatograph, Auto System model, Perkin-Elmer, equipped with a thermo ionic detector (Nitrogen-Phosphorus), an automatic sampler Perkin-Elmer, a capillary column (30 m x 0.53 mm x 1.2 μm of film thickness, of 5% phenyl 95% methyl silicone (AT-5, ALLTECH, USA). Registration of chromatograms and the integration of peaks area were made on a computer, equipped with a Tubochrom Navigator software version 4.1 (Perkin-Elmer).

Optimization of the chromatographic separation

ware Tubochrom Navigator versión 4,1 (Perkin-Elmer).

Optimización de la separación cromatográfica

La optimización de la separación cromatográfica de los OPs se realizó empleando las condiciones reportadas por Ettiene *et al.*, (1997). Las curvas de calibración por el método del estándar interno se obtuvieron por inyección de soluciones patrón ($0,25-4,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) conteniendo todos los OPs y el estándar interno.

Los límites de detección (Miller-Miller, 1993) se determinaron inyectando por triplicado soluciones patrón de los OPs ($0,025-0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Optimización del método de extracción y limpieza

La etapa de optimización de la extracción de los OPs en cebollín (*Allium fistulosum* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum* L.), constituyó la fase más importante de este trabajo por cuanto se debió cumplir simultáneamente con dos objetivos: obtener la mayor cantidad del analito en los extractos, es decir, porcentajes de recuperación superiores al 80% y obtener extractos libres de interferencias.

Muestras frescas de 300g de cada una de las especies vegetales estudiadas (cebollín y cilantro), se cortaron en trozos pequeños y se llevaron a un procesador de alimentos eléctrico por 2 min, hasta homogeneizarlas. Entre 2,0 y 4,0g de esta preparación se colocaron en un matraz erlenmeyer de 25 mL, limpio y se adicionó 1 mL de solución metanólica conteniendo los OPs ($1-40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), inmediatamente, se adicionaron NaCl (0,2 g), sulfato de sodio anhidro (5 g), acetato de etilo/acetona

Optimization of chromatographic separation of OPs was made by using conditions reported by Ettiene *et al.*, (1997). Calibration curves by the internal standard method of pattern solutions injection ($0.25-4.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) containing all the OPs and the internal standard.

Detection limits (Miller-Miller, 1993) were determined by injecting by triplicate pattern solutions of OPs ($0.025-0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Optimization of the extraction and cleanup method

The optimization stage of OPs extraction in green onion (*Allium fistulosum* L.) and coriander (*Coriandrum sativum* L.), constituted the more important phase of this research because two objectives had to be simultaneously accomplished: to obtain the higher quantity of analyte in the extracts, it means, recovery percentages superior to 80% and to obtain extracts free of interferences.

Fresh mass of 300g each one of vegetable species studied (green onion and coriander), were cut in little pieces and they were taken to an electric feeding processor during 2 min, until make them homogenized. Between 2.0 and 4.0g of this preparation were placed in an Erlenmeyer of 25 mL, clean and 1 mL of methanol solution containing the OPs ($1-40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added, immediately, NaCl (0.2 g), sodium anhydride Sulphate (5 g), ethyl/cetone acetate (9 mL, 90:10) were also added; the magnetic extraction was accomplished during 15 min. Very reddish extracts were obtained after preliminary extraction which required the cleanup optimization of

(9 mL, 90:10) y se realizó la extracción magnética durante 15 min. Se obtuvieron extractos muy coloreados, después de la extracción preliminar, lo que requirió optimizar la limpieza de los extractos antes del análisis cromatográfico. Se realizaron ensayos de limpieza usando como fases sólidas carbón grafitado, carbón activado y mezclas en diferentes proporciones de carbón activado/florisil.

Extractos de 10mL se pasaron, en un sistema al vacío ($5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), a través de cartuchos de 100 mg de carbón grafitado acondicionados con metanol (10 mL) y acetato de etilo/acetona (10 mL, 90:10), seguidamente, se hizo la elución de los OPs retenidos en el cartucho agregando acetato de etilo/acetona (3x 2 mL, 90:10). Estos extractos se transfirieron a un tubo de ensayo y se evaporaron bajo corriente de N_2 en un baño de María (35°C) hasta un volumen final (2 mL). Posteriormente, los extractos se transfirieron a un vial al que se le adicionó el estándar interno (TPP) y se inyectó (1,0 μL) por duplicado en el cromatógrafo de gas.

Se evaluó la eficiencia de la extracción con carbón grafitado (250 mg) y carbón activado (250 mg), manteniendo las condiciones de acondicionamiento y elución. Se realizaron modificaciones al procedimiento anteriormente descrito mezclando carbón grafitado/florisil y carbón activado/florisil (250mg:1400mg).

La eficiencia del empaque carbón activado/florisil se evaluó usando dos formas de empaque: carbón activado: florisil: carbón activado 100mg:1400mg:100mg y 150 mg:1400mg:150mg. El cartucho se acondicionó con metanol (10 mL) y

extracts before the chromatographic analysis. Cleanup test were carried out by using as a solid phases graphited charcoal, activated charcoal and mixtures in different proportions of activated charcoal/florisil.

Extracts of 10mL were passed, in at vacuum system ($5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), through the cartridges of 100 mg of graphited charcoal conditioned with methanol (10 mL) and ethyl/acetone acetate (10 mL, 90:10), after the OPs elution was made retained in the cartridge by adding ethyl/acetone (3x 2 mL, 90:10). These extracts were transferred to essay tube and were evaporated under N_2 on a water bath (35°C) until a final volume (2 mL). After, extracts were transferred to a vial added to the internal standard and 1.0 μL was added by triplicate in the gas chromatograph.

The extraction efficiency was evaluated with graphited (250 mg) and activated charcoal (250 mg), by keeping the conditioning and elution conditions. Changes were made to the procedure previously describe by missing graphited charcoal/florisil and activated charcoal/florisil (250mg:1400mg).

The package efficiency activated charcoal/florisil was evaluated by using two package shapes: activated: florisil: activated charcoal 100mg:1400mg:100mg and 150 mg:1400mg:150mg. The cartridge was conditioned with methanol (10 mL) and ethyl/acetone acetate (10 mL, 90:10). Elution was accomplished by adding to the mixture of ethyl/acetone acetate (2x5 mL, 90:10).

The extracts complexity and the necessity of diminishing the analysis

acetato de etilo/acetona (10 mL, 90:10). La elución se llevó a cabo agregando la mezcla acetato de etilo/cetona (2x5 mL, 90:10).

La complejidad de los extractos y la necesidad de disminuir los costos del análisis hizo necesario llevar a cabo ensayos de limpieza adicionales, tal como el empaçado del cartucho con carbón activado/florisil en menores proporciones (200:700 mg), que permitieron la reutilización de los cartuchos. La elución se realizó con acetato de etilo/acetona (7x5 mL, 90:10).

Los resultados de la optimización de los métodos de extracción y limpieza correspondientes a cada insecticida se analizaron con estadística descriptiva (media, desviación estándar, desviación estándar relativa, coeficientes de correlación de las curvas de calibración) y se realizaron análisis de varianza y pruebas de significancia (Prueba de Tukey) para comparar los métodos de extracción.

Resultados y discusión

Optimización de la separación cromatográfica

Las condiciones instrumentales del cromatógrafo de gases (Buscema *et al.*, 2004; Ettiene *et al.*, 1997; Prieto *et al.*, 1999; Prieto *et al.*, 2002), permitieron la cuantificación de los OPs en las matrices estudiadas. El tiempo para completar la separación fue de 35 min.

El cuadro 1 muestra los tiempos de retención y los factores de respuesta relativos a trifenilfosfato (TPP).

La figura 1 muestra un cromatograma típico de la separación cromatográfica de los OPs (diazinon,

costs require of additional cleanup essays, like the cartridge package with activated charcoal/florisil in little proportions (200:700 mg) that permitted the reutilization of cartridges. Elution was made with ethyl/acetone acetate (7x5 mL, 90:10).

Results of the optimization of extraction and cleanup corresponding to each insecticide were analyzed with descriptive statistic (medium, standard deviation, relative standard deviation, correlation coefficients of calibration curves) and analysis of variance and significance tests were also accomplished (Tukey test) for comparing the extraction methods.

Results and discussion

Optimization of chromatographic separation

Instrumental conditions of gases chromatograph (Buscema *et al.*, 2004; Ettiene *et al.*, 1997; Prieto *et al.*, 1999; Prieto *et al.*, 2002), gave the OPs quantification in the studied matrixes. Time for comparing separation was of 35 min.

Table 1 shows the retaining times and the response factors relatives to trifenilfosfato (TPP).

Figure 1 shows a typical chromatograph of the chromatographic separation of OPs (diazinon, disulfoton, fenclorophos, fenitrothion, Malathion, parathion, chlorfenvinphos, methidathion) and of TPP. The elution order of compounds was similar to those reported in literature (Holland *et al.*, 1994). Coefficients of lineal correlation resulted superior to 0.999 for all the OPs studied, by showing a high linear in the intervals studied concentration.

Cuadro 1. Tiempos de retención de los insecticidas organofosforados y factores de respuesta relativos a trifenilfosfato empleados para la cuantificación.

Table 1. Retaining time of organophosphorus insecticide and response factors relatives to triphenylphosphate.

| Insecticida organofosforado | Tiempo de retención (Min) | Factor de respuesta relativo |
|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Diazinon | 14,68 | 0,6971 |
| Disulfotón | 15,67 | 0,7292 |
| Fenclorfos | 17,78 | 0,6199 |
| Fenitrotión | 18,39 | 0,5969 |
| Malatión | 18,88 | 0,5049 |
| Paration | 19,52 | 0,7694 |
| Clorfenvinfos | 21,59 | 0,4505 |
| Methidatión | 22,48 | 0,4746 |
| Trifenilfosfato | 28,90 | 1,0000 |

disulfotón, fenclorfos, fenitrotión, malatión, paratión, clorfenvinfos, metidatión) y del TPP. El orden de elución de los compuestos fue similar a los reportados en la literatura (Holland *et al.*, 1994). Los coeficientes de correlación lineal resultaron superiores a 0,999 para todos los OPs estudiados, indicando una alta linealidad en los intervalos de concentración estudiados.

El cuadro 2 muestra los límites de detección obtenidos para los OPs. Puede observarse que la concentración más baja correspondió a malatión (0,00168 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Sánchez *et al.*, (2005) publicaron un límite de detección mayor para malatión (0,017 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en frutos de guayabo. Calonge (2002), señalaron mayores límites para malatión (0,010 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en frutos y vegetales, pero similares para fenitrotión (0,025 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y paratión (0,020 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Table 2 shows the detection limits obtained for the OPs. It can be observed that lower concentration corresponded to malathion (0.00168 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Sanchez *et al.*, (2005) published a superior detection limit for Malathion (0.017 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) in guava fruits. Calonge (2002) reported larger limits for Malathion (0.010 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) in fruits and vegetables, but similar for fenitrothion (0.025 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and parathion (0.020 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Optimization of extraction and cleanup procedure

Recovery percentages obtained in green onion and coriander by using 100 mg of graphited charcoal is shown in figure 2. Green onion samples showed lower recovery percentages. In contrast, in coriander, superior recovery percentages were obtained. Nevertheless, with the exception of Malathion and chlorfenvinfos, these

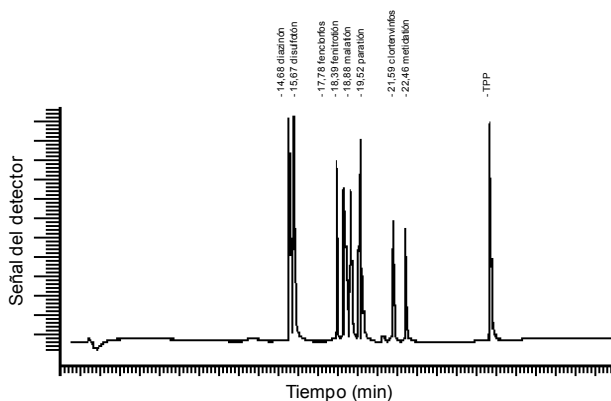


Figura 1. Cromatograma típico de la separación de los insecticidas organofosforados.

Figure 1. Typical chromatogram of the organophosphorus insecticides separation.

Optimización del Procedimiento de Extracción y Limpieza

Los porcentajes de recuperación obtenidos en cebollín y cilantro empleando 100 mg de carbón grafitado se presentan en la figura 2. Las muestras de cebollín presentaron bajos porcentajes de recuperación. En contraste, en cilantro se obtuvieron porcentajes de recuperación superiores. Sin embargo,

values are not inside of safety intervals established by the Agriculture Department of the United States (USDA, 1991). With this phase quantity (100 mg of graphited charcoal) extracts were not cleaned.

As a function of these results the necessity of increasing the graphited charcoal quantity (250 mg) and to reduce the sample quantity (2.0 g) was

Cuadro 2. Límites de detección para los insecticidas en estudio.

Table 2. Detection limits for the studied insecticides.

| Insecticida organofosforado | Límites del detección ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) |
|-----------------------------|---|
| Diazinon | 0,006090 |
| Disulfotón | 0,005602 |
| Fenclorfos | 0,011413 |
| Fenitrotión | 0,012558 |
| Malatión | 0,001688 |
| Paratión | 0,020463 |
| Clorfenvinfos | 0,018977 |
| Metidatión | 0,012006 |

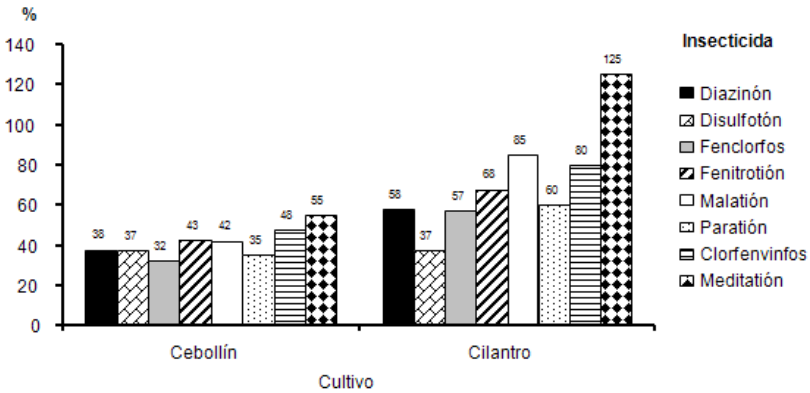


Figura 2. Porcentajes de recuperaci3n de los OPs en ceboll3n y cilantro empleando 100 mg de carb3n grafitado.

Figure 2. Recovery percentages of OPs in green onion and coriander by using 100 mg of graphitized charcoal.

a excepci3n de malation y clorfeninfos, estos valores no est3n dentro de los intervalos de seguridad establecidos por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 1991). Por otra parte, con esta cantidad de fase (100 mg de carb3n grafitado) los extractos no se limpiaron.

En funci3n de estos resultados se plante3n la necesidad de aumentar la cantidad de carb3n grafitado (250 mg) y disminuir la cantidad de muestra (2,0 g). Los resultados obtenidos en ceboll3n, no arrojaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en relaci3n con 100mg de carb3n grafitado (figura 3). La recuperaci3n fue baja para todos los OPs.

En cilantro se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$) para disulfot3n (73%). Estos bajos porcentajes de recuperaci3n pueden deberse a la retenci3n de los analitos en la fase s3lida (Lucio *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2002). Por otra parte, el color

pointed out. Results obtained in green onion, did not showed significant differences ($P > 0.05$) in relation to 100mg of graphitized charcoal (figure 3). Recovery was little for all the OPs.

In relation to green onion, significant differences were obtained ($P < 0.05$) for disulfoton (73%). These little recovery percentages could be adapted to the analytes retaining in the solid phase (Lucio *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2002). On the other hand, the original color of extracts lightly decreased.

Studies carried out have shown the efficiency of 250 mg of graphited charcoal like solid phase of extraction and cleanup. So, high recovery percentages were obtained by Ettiene *et al.*, (1997), for malathion (100%) and parathion (102%) in grape juice samples; Prieto *et al.*, (2002) for diazinon and malathion (75-105%), in tomato samples; Norman and Panton (2001) for parathion (110%), in maize

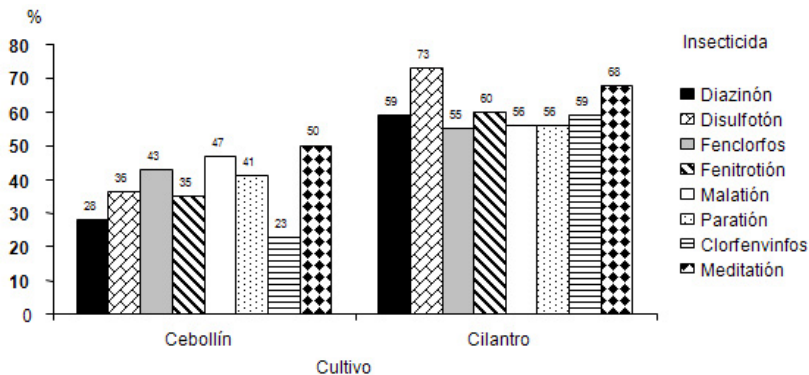


Figura 3. Porcentajes de recuperación de los OPs en cebollín y cilantro empleando 250 mg de carbón grafitado.

Figure 3. Recovery percentages of OPs in green onion and coriander by using 250 mg of graphited charcoal.

original de los extractos disminuyó levemente.

Estudios realizados han demostrado la eficiencia de 250 mg de carbón grafitado como fase sólida de extracción y limpieza. Así, altos porcentajes de recuperación fueron obtenidos por Ettiene *et al.*, (1997), para malatión (100%) y paratión (102%) en muestras de mosto de uvas; Prieto *et al.*, (2002) para diazinon y malatión (75-105%), en muestras de tomate; Norman y Pantón (2001) para paratión (110%), en muestras de maíz; Danis *et al.*, (2002) para paratión (112%) en durazno fresco.

Basados en los resultados anteriores, se sustituyó el carbón grafitado por carbón activado (250 mg), lo que permitió obtener porcentajes de recuperación más altos en ambos tipos de materiales vegetales.

Se puede observar que la mayoría de los OPs se sobrecuperó (figura 4). Esto puede deberse a coextractos que eluyen con el analito y producen un in-

crease in the original samples; Danis *et al.*, (2002) for parathion (112%) in fresh peach.

Based on previous results, the graphited charcoal was substituted by activated charcoal (250 mg) which permitted to obtain larger recovery percentages in both types of vegetable materials.

It can be observed that the most of OPs was over recovered (figure 4). This can be due to co extracts that elutes with the analyte and produce an increase on its chromatographic signal (Prieto *et al.*, 2002). Additionally, a partial cleanup of extracts was obtained which was evident by the yellow coloration of them.

As a function of results obtained with graphited and activated charcoal (250 mg), package was modified by using cartridges with graphited charcoal/florisil (250:1400mg) and activated charcoal/florisil (250:1400mg). In figures 5 and 6 the obtained recovery percentages are

cremento en su señal cromatográfica (Prieto *et al.*, 2002). Adicionalmente, se obtuvo una limpieza parcial de los extractos, que se evidenció por la coloración amarilla de los mismos.

En función de los resultados obtenidos con carbón grafitado y activado (250 mg), se modificó el empaque empleando cartuchos con carbón grafitado/florisil (250:1400mg) y carbón activado/florisil (250:1400mg). En las figuras 5 y 6 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos, los cuales fueron superiores cuando se empleó carbón activado/florisil en ambas matrices. Sin embargo, la recuperación en cilantro, resultó inferior a la obtenida en cebollín.

Los bajos porcentajes de recuperación con carbón grafitado/florisil se atribuyen a la alta afinidad de los insecticidas por esta fase (Lentza-Rizos *et al.*, 2001; Lehotay *et al.*, 2005; Lucio *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2002), que se pudo comprobar cuando se ensayó con carbón grafitado puro.

En la búsqueda de la máxima eficiencia en la recuperación de todos

shown, which were superior when activated charcoal/florisil was used in both matrixes. However, coriander recovery was inferior to those observed in green onion.

The lower recovery percentages with graphited charcoal/florisil are attributed to the high affinity of insecticides by this phase (Lentza-Rizos *et al.*, 2001; Lehotay *et al.*, 2005; Lucio *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2002) that can be corroborated when the essay was made with pure graphited charcoal.

Looking for the maximum efficiency in the recovery of every OPs was evaluated a new package modality by refilling the cartridge in three stages: graphited charcoal/florisil/graphited charcoal (100:1400:100mg) and activated charcoal/florisil/ activated charcoal (100:1400:100mg).

In figures 7 and 8 the same tendency is newly observed with 250 mg of charcoal, it means, larger percentages were observed when activated carob/florisil/activated

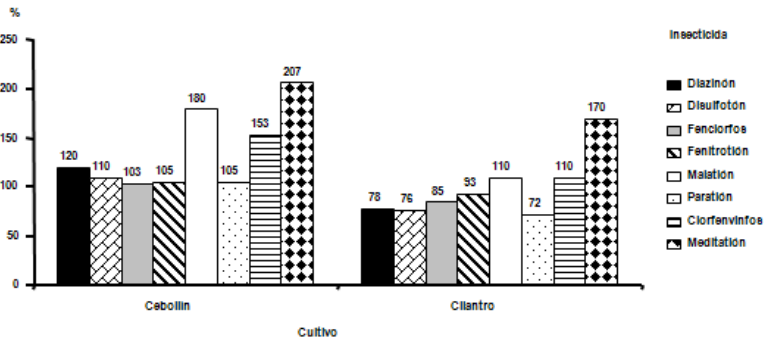


Figura 4. Porcentajes de recuperación de los OPs en cebollín y cilantro empleando 250 mg de carbón activado.

Figure 4. Recovery percentages of OPs in green onion and coriander by using 250 mg of activated charcoal.

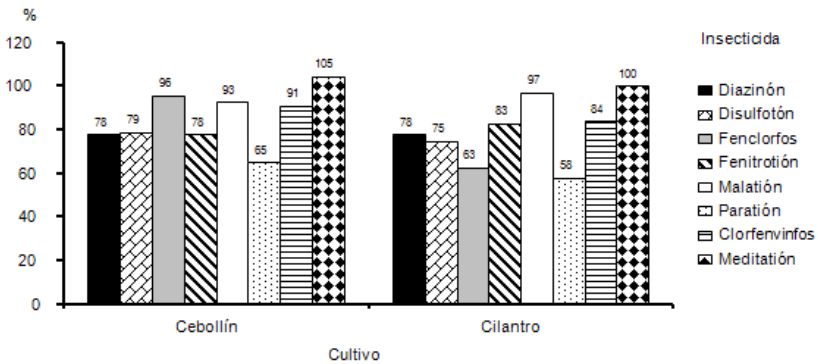


Figura 5. Porcentajes de recuperación de los OPs en cebollín y cilantro empleando carbón grafitado/florisil (250mg:1400mg).

Figure 5. Recovery percentages of OPs in green onion and coriander by using graphited charcoal/florisil (250mg:1400mg).

los OPs se evaluó una nueva modalidad de empaque rellenando el cartucho en tres capas: carbón grafitado/florisil/carbón grafitado (100:1400:100mg) y carbón activado/florisil/carbón activado (100:1400:100mg).

En las figuras 7 y 8 se aprecia la misma tendencia observada con 250 mg de carbón, es decir, se obtuvieron porcentajes superiores cuando se empleó carbón activado/florisil/carbón

charcoal (100:1400:100mg) was used in both matrix, also with the larger impacts in green onion.

Because of essayed procedures did not show optimum recovery percentages for all the OPs and as a function of recovery percentages are superior with activated charcoal was packaged a cartridge containing activated charcoal/florisil/activated charcoal in the proportion 150:1400:150mg. Results are shown in

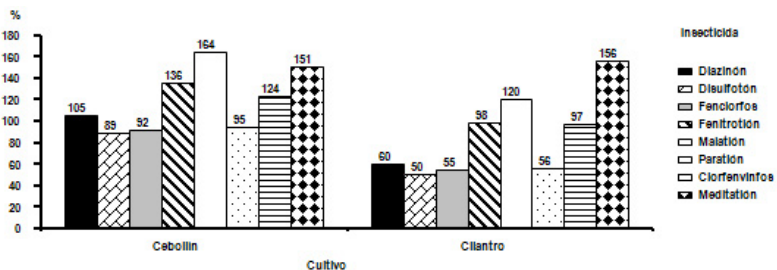


Figura 6. Porcentajes de recuperación de los OPs en cebollín y cilantro empleando carbón activado/florisil (250mg:1400mg).

Figure 6. Recovery percentages of OPs in green onion and coriander by using activated charcoal/florisil (250mg:1400mg).

activado (100:1400:100mg) en ambas matrices, también con las mayores recuperaciones en cebollín.

Debido a que los procedimientos ensayados no arrojaron óptimos porcentajes de recuperación para todos los OPs y en función de que los porcentajes de recuperación son superiores con carbón activado se empacó un cartucho conteniendo carbón activado/florisil/carbón activado en la proporción 150:1400:150mg. Los resultados se muestran en figura 9. Se observan tanto en cebollín como en cilantro porcentajes de recuperación superiores al 60%. Sin embargo, con esta modalidad de empaque se obtuvo un efecto memoria de fenclorfos, fenitrotión, malatión, clorfenvinfos y metidatión en cebollín, y de diazinon, disulfotón, fenclorfos, fenitrotión, paratión, clorfenvinfos y metidatión en cilantro, indicando una fuerte retención de estos OPs en la fase sólida

figure 9. Both in green onion and in coriander, recovery percentages superior to 60% are observed. However, with this package modality a memory effect fenclorphos, fenitrothion, malathion, chlorfenvinphos and methidathion in green onion, and of diazinon, disulfoton, fenclorphos, fenitrothion, parathion, chlorfenvinphos and methidathion in coriander was observed, by showing a strong retaining of these OPs in solid phase (Lentza-Rizos *et al.*, 2001; Lehotay *et al.*, 2005; Lucio *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2002; Schenck and Lehotay, 2000; Yi *et al.*, 2006).

For corroborating the memory effect, the quantity of activated charcoal and florisil was diminished (200mg:700mg). In figure 10 a decrease of recovery percentages in both matrixes is observed.

With these cleanup conditions the memory effect was maintained. In

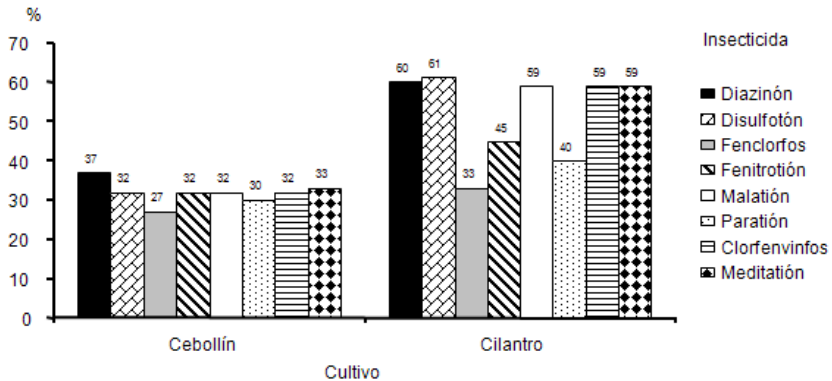


Figura 7. Porcentajes de recuperación de los OPs en cebollín y cilantro empleando carbón grafitado/florisil/carbón grafitado (100mg:1400mg:100mg).

Figure 7. Recovery percentages of OPs in green onion and coriander by using graphited charcoal/florisil/graphited charcoal (100mg:1400mg:100mg).

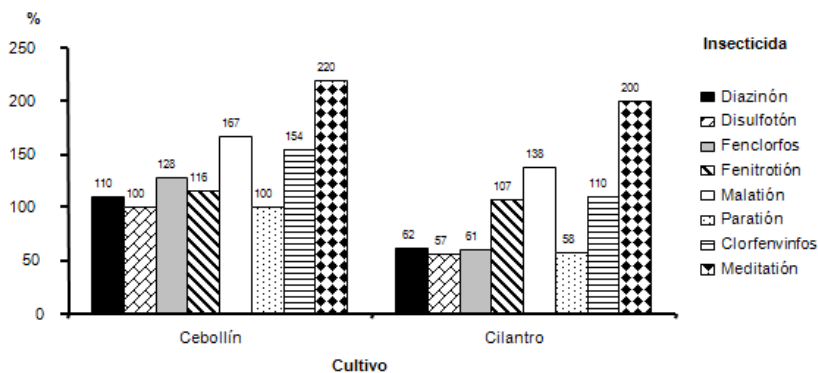


Figura 8. Porcentajes de recuperación de los OPs en cebollín y cilantro empleando carbón activado/ florisil/carbón activado (100mg:1400mg:100mg).

Figure 8. Recovery percentages of the OPs in green onion and coriander by using activated charcoal/florisil/activated charcoal (100mg:1400mg:100mg).

(Lentza-Rizos *et al.*, 2001; Lehotay *et al.*, 2005; Lucio *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2002; Schenck y Lehotay, 2000; Yi *et al.*, 2006).

Para corroborar el efecto memoria, se disminuyó la cantidad de car-

a second elution, from green onion extract were recovered recurrent quantities of diazinon, disulfoton, fenitrothion and parathion, whereas from coriander extract were recovered diazinon, disulfoton fenchlorphos,

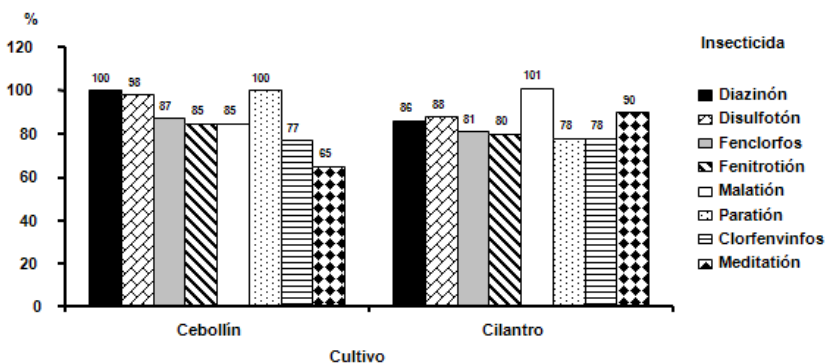


Figura 9. Porcentajes de recuperación de los OPs en cebollín y cilantro empleando carbón activado/ florisil/carbón activado (150mg:1400mg:150mg).

Figure 9. Recovery percentages of the OPs in green onion and coriander by using activated charcoal/florisil/activated charcoal (150mg:1400mg:150mg).

bón activado y de florisil (200mg:700mg). En la figura 10 se observa una disminución de los porcentajes de recuperación en ambas matrices.

Con estas condiciones de limpieza se mantuvo el efecto memoria. En una segunda elución se lograron recuperar del extracto de cebollín cantidades remanentes de diazinon, disulfotón, fenitrotión y paratión, mientras que del extracto de cilantro se recuperaron diazinon, disulfotón fenclorfos, fenitrotión, paratión y clorfenvinfos, demostrándose una fuerte afinidad de estos OPs por la fase sólida.

Finalmente, se aumentó el volumen de solvente de elución (7x5 mL) para lograr la total remoción de los OPs de la fase adsorbente. La figura 11 muestra la eficiencia en la extracción de los OPs en ambas matrices.

Las desviaciones estándar relativas entre corridas (repetibilidad), resultaron menores a 3% y entre

fenitrothion, parathion and chlorfenvinphos, being showed a strong ambiguity of these OPs by the solid phase.

Finally, the volume of elution solvent was increased (7x5 mL) for achieving the total removal of the OPs of the absorbent phase. Figure 11 shows the efficiency in the OPs extraction in both matrixes.

The relative standard deviations between batches (repeatability), were lower than 3% and between samples (reproductively) lower than 7%, by showing a high precision of optimized method, therefore, it is consider adequate for its applying in the residual analysis of OPs insecticides in green onion and coriander.

Conclusions

Extraction and cleanup procedure in solid phase by using a package activated charcoal/florisil (200:700mg), permitted to fulfill with

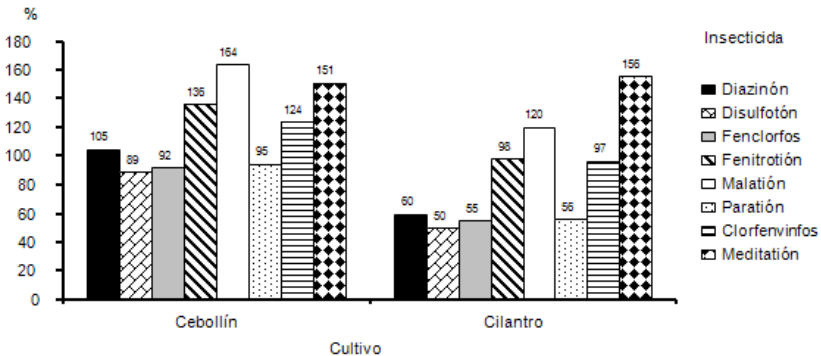


Figura 10. Porcentajes de recuperación de los OPs en cebollín y cilantro empleando carbón activado/ florisil (200mg:700mg).

Figure 10. Recovery percentages of the OPs in green onion and coriander by using activated charcoal/florisil (200mg:700mg).

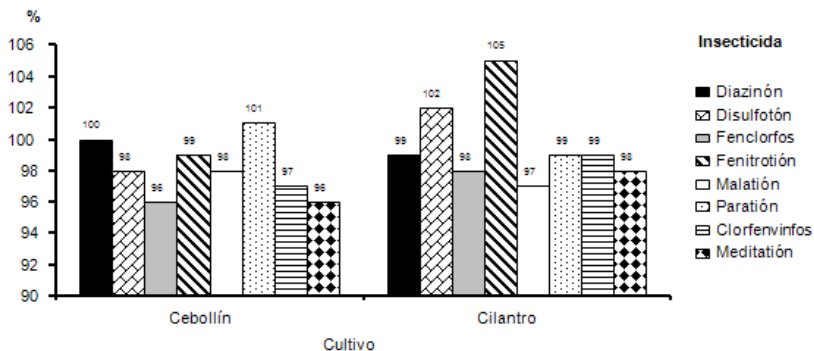


Figura 11. Porcentajes de recuperación de los OPs en cebollín y cilantro empleando carbón activado/ florisil (200mg:700mg) y elución con acetato de etilo acetona (7x5 mL, 90:10).

Figure 11. Recovery percentages of the OPs in green onion and coriander by using activated charcoal/ florisil (200mg:700mg) and elution with ethyl acetone acetate (7x5mL, 90:10).

muestras (reproducibilidad) menores a 7%, indicando una alta precisión del método optimizado, por lo que se considera adecuado para su aplicación en el análisis de residuos de insecticidas OPs en cebollín y cilantro.

Conclusiones

El procedimiento de extracción y limpieza en fase sólida empleando un empaque de carbón activado/florisil (200:700mg), permitió cumplir con los dos objetivos de la etapa de extracción y limpieza, ya que se obtuvo óptimos porcentajes de recuperación (96-105%) para todos los OPs en las dos matrices y extractos libres de pigmentos.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al CONDES por el financiamiento del proyecto CC-0257-02.

the two objectives of the extraction and cleanup phases, because optimum recovery percentages were obtained (96-105%) for all the OPs in the two matrix and extracts free of pigments.

Acknowledgements

Authors want to express their thanks to the CONDES by the financing of the project CC-0257-02.

End of english version

Literatura citada

- Buscema, I., G. Ettiene, D. Medina y A. Prieto. 2004. Método de extracción en fase sólida de residuos de insecticidas organofosforados en aguas naturales. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 21:280-289.
- Calonge, P. 2002. Determination of pesticides residues in fruits and

- vegetables by gas chromatography and NPD detector/MS. *J. Chromatogr. A.* 1005:215-228.
- Danis, T., V. Sakkas, T. Stratis and A. Albanis. 2002. Pesticides multiresidues analysis in fresh and canned peaches using solid phase extraction and gas chromatography techniques. *Bull. Contam. Toxicol.* 69:674-681.
- Ettiene, G., A. Prieto, D. Medina, I. Buscema, L. Sandoval y L. Unda. 1997. Residuos de insecticidas organofosforados en mosto y vino de uvas. *Rev. Fac. Ing. LUZ.* 20(3):223-230.
- Holland, P., D. Mcnaughton y C. Malcom. 1994. Multiresidue analysis of pesticides in wines by solid-phase extraction. *J. AOAC.* 17(1):79-86.
- Itoh, H., S. Kawasaki y J. Tadano. 1996. Application of HPLC with mass spectrometry detection for pesticides analysis. *J. Chromatogr. A.* 754:61-76.
- Kadenczki, L., Z. Arpad, I. Gardi, A. Ambrus, L. Gyorfí, G. Reese y W. Ebing. 1992. Column extraction of quantity of pesticides residues from fruit and vegetables: simple analysis method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 75:53-61.
- Lentza-Rizos, Ch., E. Avramides y F. Cherasco. 2001. Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *J. Chromatogr. A.* 912:135-142.
- Lehotay, S., A. de Kok, M. Hiemstra and P. Bodegraven. 2005. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometry detection. *J. AOAC Int.* 88 (2):595-614.
- Lucio F., C. Melo y I. Jardin. 2004. New materials for solid phase extraction and multiclass high-performance liquid chromatographic analysis of pesticides. *J. of Chromatogr. A.* 1032(1-2):51-58.
- Miller-Miller. 1993. Estadística para la química analítica. McGraw Hill. 3^{ra} edición. México.
- Mol, H., R. Van Dam y O. Steijger. 2003. Analysing residues of pesticides in plants by gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1015:119-127.
- Norman, K. and S. Panton. 2001. Supercritical fluid extraction and quantitative determination of organophosphorus pesticides in wheat and maize using gas chromatography with flame photometric and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.* 907:247-255.
- Oliva, J., A. Barba, N. Vela, F. Melendreras y S. Navarro. 2000. Determination of chlorpiriphos, penconazol, phenarimol, vochlozolin, y methalaxil in grapes, most and wine. *J. Chromatogr. A.* 882:213-220.
- Picó, J., y Y. Font. 2003. Determinación de residuos de plaguicidas en muestras de alimentos. *Rev Toxicol.* 20:166-175.
- Prieto, A., G. Ettiene, D. Medina, I. Buscema, G. González and L. Araujo. 1999. Analysing organophosphorus pesticides in wines using graphitized carbon black extraction cartridges. *J. Food Add. and Contam.* 16(2):57-61.
- Prieto, A., D. Molero, G. González, I. Buscema, G. Ettiene y D. Medina. 2002. Persistence of methamidophos, diazinon and malathion in tomatoes. *Bull. Environ. Contam.* 69:479-485.
- Sánchez, J., G. Ettiene, I. Buscema y D. Medina. 2005. Persistencia de malathion y clorpyriphos en guayaba. *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 22:65-75.
- Schenck, F. and S. Lehotay. 2000. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food. *J. Chromatogr. A.* 868:51-61.
- Stan, H.J. 2000. Analysing of residues pesticides in apples using gas

chromatography with atomic emission detection. J. Chromatogr. A. 892, 347-22.

Tang, F., Y. Yongde, H. Rimao, G. Shimei and J. Tang. 2005. Development of methods for determination of the residues of 15 pesticides in medicinal herbs *Isatis indigotica Fort* By capillary gas chromatography with electron capture or flame photometric detection. J. AOAC. 88 (3):720-728.

USDA. United States Department of Agriculture. 1991. Analytical Chemistry Laboratory Guidebook

Residue Chemistry. Science and Technology. FSIS. Washington, D.C.

Yi, X., Q. Hua and Y. Lu. 2006. Determination of organophosphorus pesticide residues in the root of *platycodon grandiflorum* by solid-phase extraction and gas chromatography with flame photometric detection. J. AOAC. 89(1):225-231.