

Desarrollo de un método en línea para la determinación del insecticida imidacloprid en muestras de agua empleando detección por fluorescencia inducida fotoquímicamente

Development of an online method for the determination of the insecticide imidacloprid in natural waters with photochemically induced fluorescence detection

K. Araujo¹, G. Ettiene², M. Hernández³, A. Cáceres⁴ y H. Pérez⁴

¹Laboratorio de Tecnología de Alimentos y Fermentaciones Industriales. Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia. ²Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. ³Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. ⁴Laboratorio de Desarrollo de Métodos, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

Resumen

Se desarrolló un método en línea simple y sensible para la determinación rápida del insecticida imidacloprid en muestras de agua potable empleando detección con fluorescencia inducida fotoquímicamente. El sistema se basó en la conversión de imidacloprid en el fluoróforo 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-2-(hidroximino)-3,4-dihidroimidazolideno. Se evaluó el efecto de variables físico-químicas (composición y pH de la solución portadora; Buffer Britton-Robinson pH 11,8, NaOH 0,01 mol.L⁻¹ pH11,80, NaOH 0,01 mol.L⁻¹ pH11,70 y NaOH 0,03 mol.L⁻¹ pH 11,97) y de las variables del sistema (volumen de muestra; 12, 50 y 100 µL, longitud del reactor; 1, 2 y 3 m y caudal; 0,5, 0,8 y 1 mL.min⁻¹) sobre la intensidad de la señal fluorescente. La máxima intensidad de fluorescencia se obtuvo con el reactor fotoquímico de 2 m de longitud, con un tamaño de muestra de 100 µL, NaOH 0,01 mol.L⁻¹ como solución portadora a un pH de 11,77 y un caudal de 0,5 mL.min⁻¹. El método mostró altas recuperaciones (93,43 y 107,15%) en el intervalo de concentración lineal evaluado (10-500 ng.mL⁻¹), con alta precisión en términos de repetibilidad ($DER_r < 0,57\%$) y de reproducibilidad ($DER_R < 4,76\%$) y bajos límites de detección (5,32 ng.mL⁻¹) y de cuantificación (7,43 ng.mL⁻¹).

Palabras clave: imidacloprid, sistemas continuos, fluorescencia inducida fotoquímicamente.

Abstract

An online simple and sensitive system for the determination of the insecticide imidacloprid using photochemically induced fluorescence detection was developed. The system is based on the conversion of imidacloprid into the fluorophore 1-(6-chloro-3-piridyl-methyl)-2-(hydroxyimino)-3,4-didehydroimidazolidine. The effects of physico-chemical variables (composition and pH of the solvent; Buffer Britton-Robinson pH 11,8, NaOH 0.01 mol.L⁻¹ pH11.80, NaOH 0.01 mol.L⁻¹ pH11.70 y NaOH 0.03 mol.L⁻¹ pH 11.97) and system variables (sample volume; 12, 50 y 100 µL, reactor length; 1, 2 y 3 m and flow; 0.5, 0.8 y 1 mL.min⁻¹) on the intensity of the fluorescent signal was studied. The maximum fluorescence intensity was obtained with the photochemical reactor 2 m long, with the loop of 100 µL using 0.01 M NaOH pH: 11.77 at a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹. The method showed high recoveries (93.43 y 107.15%) in the interval of linear concentration evaluated (10-500 ng.mL⁻¹), with high precision in terms of replication ($RSD_r < 0.57\%$) and of reproduction ($RSD_R < 4.76\%$) and low limits of detection (5.32 ng.mL⁻¹) and of quantification (7.43 ng.mL⁻¹).

Key words: imidacloprid, online system, photochemically induced fluorescence.

Introducción

El imidacloprid [1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilideneamina] es la primera forma representativa de la familia neonicotinoide, una nueva clase de insecticidas de baja toxicidad que se introdujo en el mercado hace aproximadamente 10 años. Fue desarrollado por Bayer (Leverkusen, Alemania) y es empleado para el control de una amplia variedad de insectos en cultivos vegetales. (Brunet *et al.*, 2004).

En Venezuela, es aplicado para el control de la Mota Blanca del Guayabo (MBG) (*Capulinia* sp) cercana a jaboticabae von Ihering (Hemiptera: Ericocidae), el cual es un insecto chupador que forma sus colonias en el tallo y las ramas de la planta causando su muerte (Chirinos-Torres *et al.*, 2000; Bastidas *et al.*, 2004; Marcano y González., 2000; Insulandi y Kumar, 2000).

Introduction

Imidacloprid [1-(6-chloro-3-piridyl-methyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine] is the first representative way of neonicotoids, a new type of low-toxicity pesticides introduced in the market approximately 10 years ago. It was developed by Bayer (Leverkusen, Alemania) and is employed for controlling a wide variety of insects in vegetal crops (Brunet *et al.*, 2004).

In Venezuela, it is applied for controlling *Capulinia* sp in guava (MBG) close to jaboticabae von Ihering (Hemiptera: Ericocidae), which is a sucking insect that forms colonies in the stem and branches of the plant, killing them (Chirinos-Torres *et al.*, 2000; Bastidas *et al.*, 2004., 2004; Marcano and González, 2000; Insulandi and Kumar, 2000).

Pesticides and agro-chemical compounds haven been detected in ge-

Los insecticidas y compuestos agroquímicos en general han sido detectados desde los años 50. Las Naciones Unidas estimaron que menos del 1% de todos los insecticidas utilizados en la agricultura cubren solamente los cultivos. La dosis remanente contamina la tierra, el aire y especialmente el agua (J.W Readmal *et al.*, 1993). Estos contaminantes en la mayoría de los casos son tóxicos y no biodegradables y tienden a acumularse en el ecosistema con consecuencias impredecibles (Kitsiou *et al.*, 2009).

En el caso del imidacloprid, por ser un insecticida altamente sistémico, una vez aplicado sin control adecuado puede permanecer no solo en frutos y vegetales (Hirota *et al.*, 2005), sino también en fuentes de aguas naturales superficiales o subterráneas por procesos de escorrentía o percolación. A pesar del aumento acelerado del uso del imidacloprid, son muy pocos los estudios realizados en relación al efecto de este insecticida en los cuerpos acuáticos (Tatjana *et al.*, 2009).

La persistencia de imidacloprid en el medio acuoso depende de factores ambientales, incluyendo la exposición a la luz, pH, temperatura y organismos microbianos, además de la tasa de aplicación y formulación (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2007).

Este insecticida exhibe un proceso de fotólisis en agua en aproximadamente 4 horas, tomando en consideración la frecuencia de la exposición de la luz durante el transcurso del día (Tomlin, 2000; Krohn y Hellpointner, 2002). Sin embargo, existe poca información con respecto al destino ambiental y de los fenómenos posibles como la

neral since the 50s. The United Nations estimated that less than 1% of the pesticides used in the agriculture only cover the crops. The remnant dose pollutes the land, the air and specially the water (J.W Readmal *et al.*, 1993). These pollutants in most of the cases are toxic and biodegradable and tend to accumulate in the ecosystem with unpredictable consequences (Kitsiou *et al.*, 2009)

In the specific case of imidacloprid, by being a highly systemic pesticide, once applied without an adequate control can remain not only in the fruits and vegetables (Hirota *et al.*, 2005), but also in sources superficial or underground spring water by runoff and percolation processes. In spite of the accelerate increment in the usage of imidacloprid, the researches done in relation to the effect of this pesticide in the aquatic bodies are limited (Tatjana *et al.*, 2009).

The persistence of imidacloprid in the aqueous media depends on environmental factors, including the exposure to the light, pH, temperature and microbial organisms, besides the application and formulation rates (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2007).

This pesticide exhibits a photolysis process in the water of approximately 4 hours, considering the frequency of the light exposure during the day (Tomlin, 2000; Krohn and Hellpointner, 2002). However, there is little information regarding the environmental destiny and the possible phenomena such as biodegrading and bioaccumulation. This reality, poses the necessity of developing fast and

biodegradación y bioacumulación. Esta realidad, impone la necesidad de desarrollar métodos analíticos rápidos y confiables que permitan la determinación de imidacloprid en diferentes matrices.

Vilchez *et al.*, 1996, desarrollaron un método basado en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para la determinación de imidacloprid en muestras de agua y suelo. Por otra parte, Navalón *et al.*, 1997, aplicaron GC-MS para la determinación de imidacloprid en vegetales. Sin embargo, debido a la baja volatilidad de imidacloprid, debió ser transformado en un compuesto más volátil, para ello emplearon hidrólisis en un medio básico, después de una extracción líquido-líquido con cloroformo.

En este sentido, se han propuesto diferentes métodos analíticos para la determinación de imidacloprid en diferentes matrices. Fernández-Alba *et al.*, (1999), propusieron un método basado en cromatografía líquida con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD) para la determinación de imidacloprid en extractos de vegetales. Ying *et al.*, (2004), desarrollaron un método cromatográfico (HPLC-DAD) para la determinación simultánea de imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam en muestras de agua y suelos.

López *et al.*, (2007), desarrollaron un sensor óptico para la determinación del imidacloprid combinando la retención selectiva del analito o su derivado en un soporte sólido apropiado con fluorescencia inducida fotoquímicamente en pimentones y aguas residuales. La determinación del insecticida se llevo a cabo midiendo la intensidad de fluorescencia del

accurate analytical methods that allow determining imidacloprid in different matrixes.

Vilchez *et al.*, 1996, developed a method based on the chromatography of gases coupled to the masses spectrometry (GC-MS) for determining imidacloprid in samples of water and soil. On the other hand, Navalón *et al.*, 1997, applied GC-MS for determining imidacloprid in vegetables. However, due to the low volatility of imidacloprid, it had to be transformed into a more volatile compound, for it, were employed hydrolysis in a basic media, after a liquid-liquid extraction with chloroform.

On this matter, different analytical methods have been proposed for determining imidacloprid in different matrixes. Fernández-Alba *et al.* (1999), proposed a method based on liquid chromatography with detection of diodes arrangements (HPLC-DAD) for determining imidacloprid in vegetables extracts. Ying *et al.* (2004) developed a chromatographic method (HPLC-DAD) for the simultaneous determination of imidacloprid, tiacloprid and tiametoxam in water and soil samples.

López *et al.* (2007) developed an optical sensor for determining imidacloprid combining the selective retention of the analyte or its derivation in an appropriate solid support with photochemical induced fluorescence in pepper and residual water. The determination of the pesticide was carried out measuring the intensity of the fluorescence of the photoproduct retained in the flow cell with C₁₈. Langelante *et al.* (2007)

fotoproducto retenido en la celda de flujo relleno con C_{18} . Langalante *et al.*, (2007), propusieron un método FIA para la cuantificación del imidacloprid basado en la disociación fotoquímica del imidacloprid, en la reducción química del nitrito a óxido nítrico y en la detección quimioluminiscente del óxido nítrico. Se aplicó el método en muestras de agua y en matrices vegetales.

Actualmente los métodos cromatográficos, siguen siendo los más utilizados, Lavine y Ding, (2011), desarrollaron una metodología para verificar la presencia de imidacloprid y sus residuos en agua potable empleando cromatografía líquida en fase reversa (RPLC). La principal característica del método es el empleo de una fase móvil compuesta por agua. Sin embargo el mayor inconveniente es los largos tiempos de retención cuando se emplean metanol y acetonitrilo como modificadores orgánicos. Los autores proponen para resolver el problema emplear alcoholes hidrofóbicos como el pentanol a baja concentración (menos de 1%).

La mayoría de los métodos que se han empleado para la determinación de imidacloprid requieren extensos tiempos de análisis, empleo de gran cantidad de reactivos y equipos costosos que no se encuentran disponibles en la mayoría de los laboratorios de investigación. Como una alternativa a estos métodos, Vilchez *et al.*, (2001) propusieron un método de análisis por inyección en flujo (FIA) basado en una reacción fotoquímica y medición de la intensidad de fluorescencia (PIF) para la detección y cuantificación de imidacloprid en

proposed a FIA method for quantifying the imidacloprid based on the photochemical dissociation of imidacloprid, in the chemical reduction of the nitrite to the nitric oxide and in the chemiluminescent detection of the nitric oxide. The method was applied in samples of water and vegetal matrixes.

Currently, the chromatographic methods continue being the most used, Lavine and Ding (2011), developed a methodology to verify the presence of imidacloprid and its residues on drinking water employing liquid chromatography in reverse phase (RPLC). The main characteristic of the method is the employment of a mobile phase composed by water. However, the highest inconvenience of this, are the long retention time when methanol and acetonitrile are used as organic modifiers. The authors propose employing hydrophobic alcohols such as pentanol in low concentrations (less than 1%) with the aim of solving the problem.

Most of the methods employed for determining imidacloprid require extend analysis times, employment of important quantity of reactive and expensive equipments which are not available in most of the research laboratories. As an alternative to these methods, Vilchez *et al.*, (2001) proposed an analysis method by flow injection (FIA) based on a photochemical reaction and measurement of the intensity of fluorescence (PIF) for detecting and quantifying imidacloprid in samples of natural water. Generally, the photochemical induction is fast and in most of the compounds the reaction generates a photoproduct with a good

muestras de aguas naturales. Generalmente, la inducción fotoquímica es rápida y en la mayoría de los compuestos la reacción genera un fotoproducto con un buen coeficiente de absorción molecular (Birks y Frei., 1982). Debido a su simplicidad, alta sensibilidad, ausencia de derivatización y de limpieza de los extractos, éste método presenta ventajas con respecto a los antes mencionados.

Estudios previos realizados por Vichez *et al.*, (2001), demostraron que el imidacloprid en soluciones acuosas no muestra propiedades fluorescentes, pero cuando el medio es irradiado con radiación UV es posible observar una señal fluorescente. El producto principal resultante de la fotodegradación del imidacloprid ha sido aislado e identificado como el 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-2-(hidroxiiimino)-3,4-dihidroimidazolideno (figura 1). El estudio de la reacción de reducción del compuesto se realizó con un electrodo de gota de mercurio, mediante el cual se determinó que el imidacloprid se reduce en dos ondas catódicas bien definidas, ambas de naturaleza difusiva, en la primera de ellas el grupo nitro-imina capta 4 hidrogeniones y 4 electrones originando el correspondiente grupo hidroxilamina, en la segunda onda la hidroxilamina capta 2 hidrogeniones y 2 electrones originando la correspondiente amina (El-Khattabi, 1997).

En este trabajo, se desarrolló un sistema de análisis en línea simple, sensible y rápido para la determinación del insecticida imidacloprid en muestras de agua empleando detección por fluorescencia inducida fotoquímicamente. El método propuesto se aplicó para la cuantificación de imidacloprid en muestras de agua potable fortificadas.

molecular absorption coefficient (Birks and Frei., 1982). Due to its simplicity, high sensitivity, lack of derivatisation and cleaning of the extracts, this method has advantages in relation to the others mentioned before.

Researches carried out by Vilchez *et al.*, (2001) showed that imidacloprid in aqueous solutions does not show fluorescent properties, but when the area is irradiated with an UV radiation it is possible to observe a sign of fluorescence. The main resulting product of the photo degradation of imidacloprid has been isolated and identified as -(6-cloro-3-piridyl-methyl-2-(hydroxyimino)-3,4-dihidroimidazolideno (figure 1). The reaction research of the compound reduction was done with drop electrode of mercury, to which was determined that imidacloprid reduces in two well defined cathode waves, both with diffusive nature, in the first the nitroimine group catches 4 hydrogen ions and 4 electrons originating the corresponding hydroxylamine group, in the second wave hydroxylamine catches 2 hydrogen ions and 2 electrons originating the corresponding amine (El-Khattabi, 1997).

In this research, was developed a simple, sensitive and fast linear analysis system, for determining imidacloprid pesticide in water samples employing detection by photochemical induced fluorescence. The method proposed was applied for quantifying imidacloprid in fortified drinking water.

Materials and methods

Reactive

All the reactive employed in this research were analytical. A

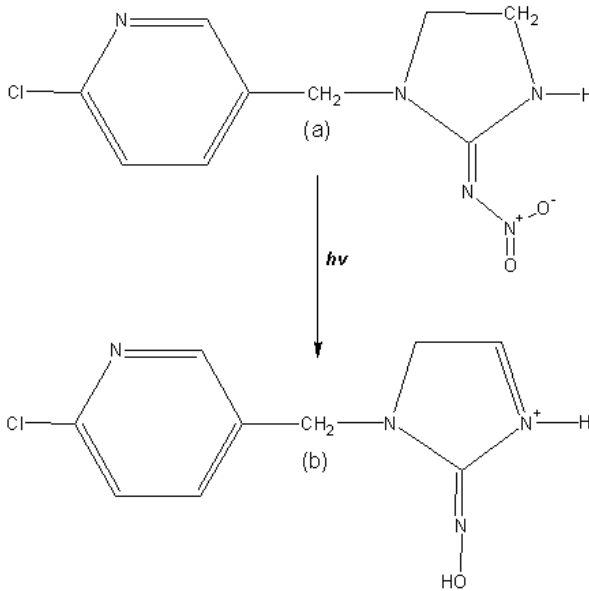


Figura 1. Estructura de (a) Imidacloprid y (b) 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-2-(hidroxiimino)-3,4-didehidroimidazolideno.

Figure 1. Structure of (a) Imidacloprid and (b) (6-chloro-3-pyridylmethyl) -2-(hydroxyimino) -3,4-didehydroimidazolidene.

Materiales y métodos

Reactivos

Todos los reactivos empleados en este trabajo fueron de grado analítico. Se preparó una solución patrón concentrada de imidacloprid (1000 mg.L^{-1}) a partir del estándar de alta pureza, 99% (Dr Ehrenstorfer GMBH (Alemania) en acetonitrilo (Fisher Scientific, USA). Las soluciones de los estándares se obtuvieron por dilución de la solución patrón concentrada con agua desionizada (TKA, Millipore, USA) y se mantuvieron estables por dos semanas almacenadas a 4°C , protegidas de la luz para evitar su degradación. Se empleó una solución reguladora Britton-Robinson, pH 11,8, preparada

concentrated pattern solution of imidacloprid was prepared (1000 mg.L^{-1}) after the highly pureness standard, 99% (Dr Ehrenstorfer GMBH (Germany) in acetonitrile (Fisher Scientific, USA). The standard solutions were obtained diluting the concentrated pattern solution with deionised water (TKA, Millipore, USA) and kept steady for two weeks and stored at 4°C , protected from the light to avoid its degradation. A regulator solution Britton-Robinson was employed, pH 11.8, prepared with ortho-phosphoric acid 0.04 mol.L^{-1} , acetic acid 0.04 mol.L^{-1} , boric acid 0.04 mol.L^{-1} and sodium hydroxide 0.2 mol.L^{-1} . The reactive were Merck, Germany. NaOH solutions were prepared

con ácido orto fosfórico $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, ácido acético $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, ácido bórico $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ e hidróxido de sodio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$. Los reactivos fueron de la marca Merck, Alemania. Se prepararon soluciones de NaOH $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ y $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ y $0,03 \text{ mol.L}^{-1}$.

Equipos

Se diseñó un sistema de un solo canal (figura 2) con una bomba HPLC (Alltech, 626), tuberías de acero inoxidable y de teflón, válvula de inyección Rehodyne acoplada con un detector de fluorescencia (Shimadzu, RF-10AXL), operado a una longitud de onda de emisión de 377 nm y de excitación de 334 nm . La irradiación de luz ultravioleta (UV) se llevó a cabo con una lámpara de baja presión de mercurio (Heraeus Noble Light). Se construyeron 3 reactores (1, 2 y 3 m) empleando conectores y tuberías de TEFLON de $0,8 \text{ mm}$ de diámetro interno alrededor de un tubo

of 0.01 mol.L^{-1} and 0.02 mol.L^{-1} and 0.03 mol.L^{-1} .

Equipments

A one-channel system with a bomb HPLC (figure 2) was designed (Alltech 626), stainless steel and teflon pipes, injection valves Rehodyne with a fluorescence detector (Shimadzu, RF-10AXL), operated at an emission wave longitude of 377 nm and fastness of 334 nm . The UV irradiation was carried out with a low-pressure mercury lamp (Heraeus Noble Light). 3 reactors were built (1, 2 and 3 m) using connectors and Teflon pipes of 0.8 mm of internal diameter around a quartz tube pencil-type that protected the UV irradiation lamp.

Treatment of water samples

Samples of drinking water were filtered with a Millipore system using the cellulose acetate filters ($0.45 \mu\text{m}$) and stored in vials covered with folder paper at 4°C until the analysis.

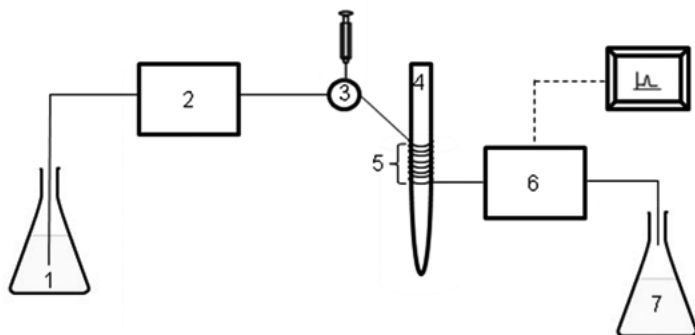


Figura 2. Sistema en línea para la determinación de imidacloprid. 1: Solución portadora, 2: bomba HPLC, 3: válvula de inyección, 4: lámpara de mercurio "estilo lápiz", 5: reactor; 6: detección espectrofluorimétrica, 7: desechos.

Figure 2. Lineal system for determining imidacloprid. 1: portable solution, 2: bomb HPLC, 3: injection valve, 4: pencil-type mercury lamp, 5: reactor; 6: spectro-fluometry detection, 7: residue.

de cuarzo "estilo lápiz" que protegió la lámpara de irradiación UV.

Tratamiento de las muestras de agua

Las muestras de agua potable se filtraron con un sistema Millipore utilizando filtros de acetato de celulosa (0,45 μm) y se almacenaron en viales cubiertos de papel aluminio a 4°C hasta el momento del análisis.

Procedimiento analítico

Se optimizó las siguientes variables: composición y pH de la solución portadora (Buffer Britton-Robinson pH 11,8, NaOH 0,01 mol.L⁻¹ pH11,80, NaOH 0,01 mol.L⁻¹ pH11,70 y NaOH 0,03 mol.L⁻¹ pH 11,97), los volúmenes de muestra (12, 50 y 100 μL), las longitudes de reactor (1, 2 y 3 m) y los caudales de la solución portadora (0,5, 0,8 y 1 mL.min⁻¹). Se realizaron siete réplicas de cada condición empleando el análisis univariado (se modifica una variable). La selección de los intervalos de pH, concentración y longitudes del reactor se realizó en función a experiencias previas realizadas por los autores y por Vilchez *et al.*, 2001.

Se inyectaron tres veces en el sistema las soluciones de calibración de imidacloprid en el intervalo de concentración entre 10 y 500 ng.mL⁻¹, diluidas con la solución portadora (NaOH 0,01 mol.L⁻¹ pH11,70) a un flujo de 0,5 mL.min⁻¹, después de recircular continuamente a través del reactor fotoquímico de 2 m de longitud, la intensidad de fluorescencia de las soluciones se midió a una longitud de onda de emisión de 377 nm y de excitación de 334 nm (Vilchez, *et al.*, 1998). Para el estudio de recuperación se prepararon muestras de agua potable fortificadas con imidacloprid a dos niveles

Analytical Procedure

The following variables were optimized: composition and pH of the portable solution (Buffer Britton-Robinson pH 11.8, NaOH 0.01 mol.L⁻¹ pH11.80, NaOH 0.01 mol.L⁻¹ pH11.70 and NaOH 0.03 mol.L⁻¹ pH 11.97), the sample volumes (12, 50 and 100 μL), the reactor's longitudes (1, 2 and 3 m) and the flows of the portable solution (0.5, 0.8 and 1 mL.min⁻¹). Seven replications of each condition were done employing the univariate analysis (a variable is modified). The selection of pH intervals, concentration and longitudes of the reactor were done in function of the previous experiences carried out by the authors and by Vilchez *et al.*, 2001.

The calibration solutions of imidacloprid were injected three times in the concentration interval from 10 and 500 ng.mL⁻¹, diluted with the portable solution (NaOH 0.01 mol.L⁻¹ pH11.70) at a flow of 0.5 mL.min⁻¹, after recirculating continuously using the photochemical reactor of 2 m of longitude, the fluorescence intensity of the solutions was measured at a wave longitude of 377 nm and fastness of 334 nm (Vilchez *et al.*, 1998). For the recovery research were prepared samples of drinking water fortified with imidacloprid at two concentration levels (30 and 200 ng.mL⁻¹), doing six replications, which were injected in the system the same way of the patterns of the calibration curve.

Statistical analysis

The data obtained in the research was evaluated with descriptive statistical analysis (mean, standard deviation, relative standar deviation), lineal correlation analysis and regression analysis.

de concentración (30 y 200 ng.mL⁻¹), realizando seis réplicas, las cuales se inyectaron en el sistema de la misma manera que los patrones de la curva de calibración.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en la investigación se evaluaron con análisis estadísticas descriptivas (media, desviación estándar, desviación estándar relativa), análisis de correlación lineal y análisis de regresión.

Resultados y discusión

Optimización de las variables fisicoquímicas

Los resultados obtenidos en relación al pH y composición de la solución portadora se presentan en la figura 3. Se puede observar, que se alcanzó la máxima intensidad de fluorescencia con la solución de NaOH más di-

Results and discussion

Optimization of the physico-chemical variables

The results obtained in relation to the pH and compositions of the portable solution are presented in figure 3. It can be observed that the maximum intensity of fluorescence was reached with the most diluted NaOH solution (0.01 mol.L⁻¹) at a pH 11.77; significantly over passing the intensity of the obtained signal with the regulator solution Britton-Robinson. This might indicate that the hydroxide ion has an important role in the reaction of photo-reduction, since this can also reduce and transform into a free radical (Cáceres, 2002).

In relation to the pH, this is a key variable that does not only affect the photochemical conversion of the imidacloprid but also the fluorescent

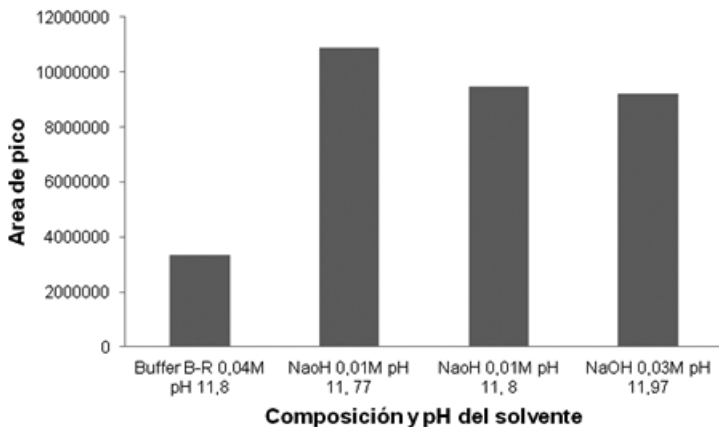


Figura 3. Efecto de la composición y pH de la solución portadora sobre la intensidad de la señal fluorescente.

Figure 3. Effect of the composition and pH of the portable solution on the intensity of the fluorescent sign.

luida ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$) a pH 11,77; superando significativamente la intensidad de la señal obtenida con la solución reguladora Britton-Robinson. Esto puede indicar que el ión hidróxido juega un papel fundamental en la reacción de fotoreducción, ya que éste también puede reducirse y transformarse en un radical libre (Cáceres, 2002).

En relación al pH, este es una variable clave que afecta no solo la conversión fotoquímica del imidacloprid sino también las propiedades fluorescentes del fotoproducto. Se observó que ligeros cambios en el pH del medio ejercen gran influencia sobre la intensidad de la señal. López *et al.*, 2007, y Vilchez *et al.*, 2001, obtuvieron la máxima intensidad de fluorescencia para la detección del imidacloprid, empleando la solución Buffer-Robinson a pH de 11,5 ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$) y pH de 11,8 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$) respectivamente.

Optimización de las variables del sistema

En la figura 4 se observa la influencia del tamaño de muestra sobre la señal de fluorescencia. Se evaluaron tres volúmenes de muestra: 20, 50 y $100 \mu\text{L}$. Se observó un incremento prácticamente lineal de la señal analítica conforme aumenta el tamaño de muestra. Este comportamiento puede deberse a que volúmenes de inyección pequeños incrementan la dilución de la muestra disminuyendo la altura de la señal. Por tal razón, se seleccionó $100 \mu\text{L}$ como volumen de muestra. Sin embargo, no se consideró conveniente trabajar con volúmenes de muestra superiores debido a que el imidacloprid es un insecticida moderadamente tóxico de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) ([properties of the photoproduct. It was observed that slightly changes in the media pH have great influence on the intensity of the signal. López *et al.*, 2007, and Vilchez *et al.*, 2001, obtained the maximum fluorescence for detecting the imidacloprid, employing the Buffer-Robinson solution at a pH of 11.5 \(\$0.01 \text{ mol.L}^{-1}\$ \) and pH de 11.8 \(\$0.04 \text{ mol.L}^{-1}\$ \) respectively.](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

Optimisation of the system variables

In figure 4 is observed the influence of the sample's size on the fluorescence sign. Three volumes of the sample were evaluated : 20, 50 and $100 \mu\text{L}$. A practically lineal increment of the analytical sign was observed at the time that increases the size of the sample. This behavior can be due to small injection volumes increment the dilution of the sample reducing the height of the sign. For this reason, $100 \mu\text{L}$ was selected as the sample's volume. However, it was not considered convenient to work with superior sample's volumes since imidacloprid is a mild toxic pesticide according to the Worldwide Health Organization (OMS) (<http://www.who.int/es/>) and the Agency of Environmental Protection EPA (<http://www.epa.gov/espanol>). The allowed maximum limit if imidacloprid for drinking water is of 20 ng.mL^{-1} (Codex alimentarius, 2007) and the toxicity levels for the aquatic invertebrates of sweet water and estuaries oscillate fro, 0.037 and 0.115 ppm (Desneux *et al.*, 2007). Also, having small volumes of the sample is precisely one of the adantages of having line systems (Christian D, 2003).

The global dispersion of the lineal system can be considered as the total of

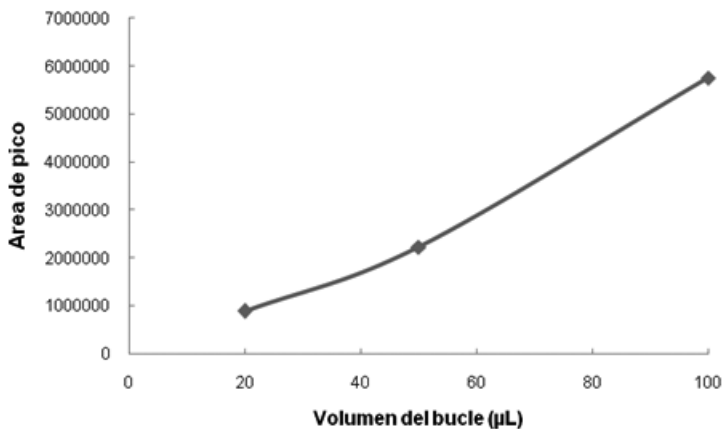


Figura 4. Efecto del volumen de muestra sobre la intensidad de la señal fluorescente.

Figure 4. Effect of the sample's volume on the intensity of the fluorescent volume.

www.who.int/es/) y a la Agencia de Protección Ambiental EPA (<http://www.epa.gov/espanol>). El límite máximo permisible de imidacloprid para agua potable es de 20 ng.mL⁻¹ (Codex alimentarius, 2007) y los niveles de toxicidad para los invertebrados acuáticos de agua dulce y de estuarios oscilan entre 0,037 y 0,115 ppm (Desneux *et al.*, 2007). Además, manejar pequeños volúmenes de muestra es precisamente una de las principales ventajas que poseen los sistemas en línea. (Christian, 2003).

La dispersión global del sistema en línea puede considerarse como la sumatoria de las dispersiones originadas no solo por el volumen de muestra, sino también por la geometría y tamaño del reactor (Cañizares, 2002). Por tal motivo, se estudió el efecto de la longitud del reactor y del caudal de la solución de arrastre so-

the dispersions originated not only from the sample's volume but also from the geometry and size of the reactor (Cañizares, 2002). For this reason, was studied the effect of the reactor's longitude and the solution's flow on the intensity of the analytical sign (figure 5).

It can be observed that at the time that the flow increases for each longitude of the reactor employed (1 and 2 m) decreases the fluorescent sign, due to the reduction of the exposure time of the analyte in the UV radiation. The maximum sign was obtained with the photochemical reactor of 2 m of longitude. Additionally, a 3m-reactor was observed, however, the highest obtained was inferior than the one obtained with the reactor of 1m. This might be to a balance between the photo conversion and dilution phenomena typical of the continuous and lineal systems, that is, at the time

bre la intensidad de la señal analítica (figura 5).

Puede observarse que a medida que el caudal aumenta, para cada longitud de reactor empleada (1 y 2 m), decrece la señal fluorescente, debido a una disminución del tiempo de exposición del analito a la irradiación UV. La máxima señal se obtuvo con el reactor fotoquímico de 2 m de longitud. Cabe destacar, que adicionalmente, se evaluó un reactor de 3 m, sin embargo, la más alta señal que se logró fue muy inferior a la obtenida con el reactor de 1 m. Esto puede deberse, posiblemente a un balance entre los fenómenos de fotoconversión y dilución típicos de los sistemas continuos o en línea, es decir; a medida que se aumenta el tamaño del reactor, ocurre un incremento de la

that increases the size of the reactor, occurs an increment of the dispersion (Cañizares, 2002). This fact was evidenced when was employed the 3 m longitud reactor, since the obtained signs resulted to be wide and without any significant increment.

In function of the results obtained, were selected the 2 m reactor and a flow of $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Under these analysis conditions, the residence time of imidacloprid in the photochemical reactor was of 70s. The sampling frequency is approximately 40 samples per hour; thus, the proposed lineal method shows a significant reduction in the number of samples that can be analyzed daily, due to the simplicity and fastness, which constitutes an advantage

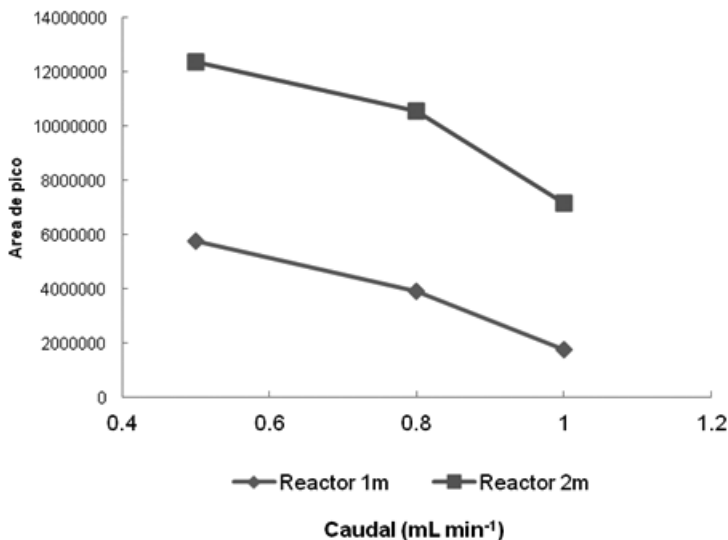


Figura 5. Efecto de la longitud del reactor y caudal de la solución portadora sobre la intensidad de la señal fluorescente.

Figure 5. Effect of the reactor's longitude and flow of the portable solution on the intensity of the fluorescent sign.

dispersión (Cañizares, 2002). Este hecho se evidenció cuando se empleó el reactor de 3 m de longitud debido a que las señales obtenidas resultaron ensanchadas y sin algún incremento significativo.

En función de los resultados obtenidos, se seleccionó, el reactor de 2 m y un caudal de 0,5 mL.min⁻¹. Bajo estas condiciones de análisis, el tiempo de residencia de imidacloprid en el reactor fotoquímico fue de 70s. La frecuencia de muestro es aproximadamente 40 muestras por hora, por lo que el método en línea propuesto arroja una disminución significativa en el número de muestras que pueden analizarse por día, debido a su simplicidad y rapidez, lo que constituye una ventaja frente a otros métodos de análisis de residuos de imidacloprid en muestras de agua.

Parámetros analíticos

En el cuadro 1 se muestran los parámetros analíticos del método propuesto. La curva de calibración obtenida resultó lineal en el intervalo de

towards the other residual analysis of imidacloprid in water samples.

Analytical parameters

In table 1 are shown the analytical parameters of the proposed method. The calibration curve obtained resulted to be linear in the evaluated concentration interval and considering the area of the peak as an analytical parameter. The correlation coefficient obtained ($r=0.997$) indicates the linearity that exist among the variables.

The accuracy of the proposed method was evaluated in terms of replications ($DER_r < 0.57$) and reproduction ($DER_R < 4,76$). It was determined injecting 10 solution replications of 500 ng.mL⁻¹ of imidacloprid, employing the peak's area as analytical sign. The detection and quantification limits were stimated according to the IUPAC criteria, that is, is the concentration of the analyte that produces a 3DE and 10DE sign of the target sign. The standar deviation

Cuadro 1. Figuras analíticas de mérito.

Table 1. Analytical figure of merit.

Parámetros Analíticos	
Curva de Calibración	A = 55507C + 38089
Coefficiente de correlación (r^2)	0,997
Rango dinámico lineal (ng.mL ⁻¹)	10 – 500
Presición	
DER _r repetibilidad (%)	0,57
DER _R reproducibilidad (%)	4,76
Límite de detección (ng.mL ⁻¹)	5,32
Límite de cuantificación (ng.mL ⁻¹)	7,43

A, señal fluorescente (mV)

C, conc. (ng.mL⁻¹)

concentración evaluado y considerando el área del pico como parámetro analítico. El coeficiente de correlación obtenido ($r=0,997$), indica la linealidad que existe entre las variables.

La precisión del método propuesto se evaluó en términos de repetibilidad ($DER_r < 0,57$) y de reproducibilidad ($DER_R < 4,76$). Se determinó inyectando 10 réplicas de soluciones de $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de imidacloprid, empleando el área de pico como señal analítica. Los límites de detección y cuantificación fueron estimados de acuerdo al criterio IUPAC, es decir; es la concentración del analito que produce una señal de 3DE y 10DE de la señal del blanco. La desviación estandar fue determinada inyectando un blanco 10 veces.

El método propuesto presenta límites de detección por debajo de los valores máximos permitidos para agua potable de acuerdo al codex alimentarius y los resultados son comparables con otros reportados en la literatura, los cuales utilizan la metodología convencional cromatográfica. Langalente y Greenbacker, 2007; Flores *et al.*, 2007; Ding y Lavine, 20011, reportan límites de detección inferior

was determined injecting the target 10 times.

The proposed method has detection limits under the allowed maximum values for drinking water according to the codex alimentarius and the results are compared to the others reported in the literature, which used the conventional chromatographic methodology. Langalente and Greenbacker, 2007; Flores *et al.*, 2007; Ding and Lavine, 20011, reported inferior detection limits to the ones obtained in this research, however, it is important to mention the feasibility of the method to be applied as a projection, due to its simplicity and high number of samples that are possible to perform per hour.

Conclusions

The lineal analysis system developed for determining imidacloprid with spectro-fluorimetric detection photo-chemically induced in samples of drinking water showed comparable results to the methods employed traditionally as gaseous chromatography and HPLC. The method employed has as main

Cuadro 2. Porcentajes de recuperación obtenidos con el método propuesto para agua potable.

Table 2. Recovery percentages obtained with the proposed method for drinking water.

Añadido ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Encontrado ^a \pm DE ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Recuperación ^a (%)
30	31,38 \pm 0,96	104,60
200	197,79 \pm 0,88	98,89

^aPromedio de seis repeticiones

res a los obtenidos en este trabajo, sin embargo es importante señalar la factibilidad del método para aplicarlo como proyección debido a su simplicidad y al elevado número de muestras que es posible analizar por hora.

Conclusiones

El sistema de análisis en línea desarrollado para la determinación de imidacloprid con detección espectrofluorimétrica inducido fotoquímicamente en muestras de agua potable arrojó resultados comparables con los métodos empleados tradicionalmente como cromatografía gaseosa y HPLC. El método propuesto tiene como principales ventajas la simplicidad del sistema de flujo, la poca cantidad de reactivos (solventes orgánicos) y equipos necesarios y la ausencia de reacciones de derivatización. El elevado número de muestras que es posible analizar por hora representa una alternativa frente a los métodos inmunoanalíticos y cromatográficos.

Literatura citada

Bastidas L., Y. Sánchez, F. Geraud-Pouey y D. Chirinos D. 2004. Efecto de diferentes insecticidas en el control de la Mota Blanca (*Capulnia* sp.) del cultivo del Guayabo (*Psidium guajava* L.). Cátedra: Investigación Agropecuaria. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia.

Birks, J.W. y R.W. Frei. 1982. Photochemical Reaction Detection in HPLC. *TrAC*. 1:361-367

Brunet, J., M. Maresca, J. Fantini, L.P. Belzunca. 2004. Human intestinal absorption of imidacloprid with Caco-2 cell as enterocyte model. *Toxicol. Appl Pharmacol*, 194 (1):1-9.

advantages the simplicity of the flow system, the small quantity of the reactive (organic solvents) and necessary equipments and the lack of derivatisation reactions. The elevated number of samples possible to analyze per hour represents an alternative towards the immune-analytical and chromatographic methods.

End of english version

Cáceres A. 2002. The development of methods for the determination of selenium using spectrofluorimetric and ICP-MS techniques. Tesis de Doctorado. Universidad Sheffield Hallam.

Canadian Council of Ministers of the Environment. 2007. Canadian water quality guideline: imidacloprid scientific supporting document. ISBN 978-1-896997-71-1.

Cañazares M. 2002. Análisis por inyección de flujo: herramienta clave para la automatización analítica. *J of Mexican Chem Society*.

Chirinos-Torres L., F. Geraud-Pouey, D.T. Chirinos, C. Fernández, M.J. Guerrero, G. Fernández, R. Fuenmayor. 2000. Efecto de insecticidas sobre *Capulnia* cercana a *jaboticabae* von ihering (Hemiptera: Ericoccidea) y sus enemigos naturales en el Municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. *Bol. Entomo. Venez.*, 15(1):1-16.

Comisión del Codex Alimentarius. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. 2005. www.codexalimentarius.net. Consultado Febrero 2012.

Christian G. 2003. Flow analysis and its role and importance in the analytical science. *Anal Chim Acta*, 499 (1-2):5-8.

Desneux N., A. Decourtye y J-M. Delpuech. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52:81-106.

- Ding T., B. Lavine. 2011. Separation of imidacloprid and its degradation products using reversed phase liquid chromatography with water rich mobile phase. *J. of Chrom. A*, 1218 (51):9221-9226.
- Ding T., D. Jacobs y B. Lavine. 2011. Liquid Chromatographic-mass spectrometry identification of imidacloprid photolysis products. *Microchem. J.*, 99:535-541.
- EL Khattabi R. Estudio de la fotodegradación y determinación del insecticida imidacloprid. 1997. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada.
- Environment Protection Agency (EPA). 2007. Label Review Manual. US. Office of prevention. Pesticides and toxic substances. Office of pesticide programs. www.epa.gov/oppfead1/labeling/lrm/chap-07.htm. Consultado marzo 2011
- Fernández-Alba, A., A. Valverde, N. Aguera y S. Contreras. 1999. Problemas fitosanitarios relevantes en la fruticultura venezolana. Lecciones para aprender de las experiencias. VII Congreso Nacional de Frutales. Conferencia invited, Memorias (Adedum), 23-26.
- Hirota O., M. Okihashi., K. Akutsu., Y. Kitagawa and S. Hori. 2005. Determination of neonicotinoid pesticide residues in vegetables and fruits with solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem*, 51:2501-2505.
- Insulandi S. y H. Kumar Supharama. 2000. Evaluation of imidacloprid (17,8% SL Confidor 200 SI) again scale insect infesting coffee seedling. *J. of Coffee Research*, 28 (1-2):57-65.
- Kitsiou V., N. Filippidis, D. Mantzavinos y J. Poullos. 2009. Heterogeneous and homogeneous photocatalytic degradation of the insecticide imidacloprid in aqueous solutions. *Applied Cat. B: Environm*, 86 (1-2):27-35.
- Lagalante A. y P. Greenbacker. 2007. Flow injection analysis of imidacloprid in natural waters and agricultural matrixes by photochemical dissociation, chemical reduction, and nitric oxide chemiluminescence detection. *Anal Chim Acta*, 590:151-158.
- López J., A. Molina y M.L. Fernández de Córdoba. 2007. Development of photochemically induced fluorescence-based optosensor for the determination of imidacloprid in peppers and environmental waters, *Talanta*, 72 (3):991-997.
- Marcano R. y E. González. 2000. Evaluación de insecticidas para el control de la Mosca
- Blanca Bemisia tabaci (GENNADIUS), en tomates. *Bol. Entomol. Venez. N. S* 8(2):123-132.
- Navalón A., A. González, R. El-Khattabi, J.L. Vilchez y A. Fernández. 1997. Determination of imidacloprid in vegetables samples by gas chromatography-mass spectrometry, *Analyst* 122:579.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2004. Toxicological Evaluation: Imidacloprid. International Programme on chemical safety. www.inchem.org/jmpr/jmprmono/2001pr07.ht. (consultado marzo 2011).
- Readman JW, T. Albanis, D. Barcelo, S. Gallassi, J. Tronczynsky y G. Gabriellides. 1993. Herbicide contamination of mediterranean estuarine waters: Results a MED pilot survey. *Mar. Pollut. Bul.*, 26:613-619.
- Tatjana T, A. Jemec, B. Mozetic y P. Trebse. 2009. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, 7 (7):907-914.
- Tomlin, C.D.S. 2000. The Pesticide Manual. Twelfth Edition. British Crop Protection Council. Surrey, U.K.
- Valcárcel, M. y M.D. Luque de Castro. 1984. Análisis por Inyección de Flujo. Univ. De Córdoba/Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba, Córdoba.
- Valcárcel, M. y M.D. Luque de Castro. 1988. Automatic methods of analysis. Elsevier. pp.158-160, 162-163, 166-171.

- Vilchez J.L., R. El-Khattabi, J. Fernández, A. González y A. Navalón. 1996. Determination of imidacloprid in water and soil samples by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr A* 746 (2):289-294.
- Vilchez J.L., R. El-Khattabi, R. Blanc y A. Navalón. 1998. Photochemical-fluorimetric method for the determination of the insecticide imidacloprid in water samples. *Anal. Chim. Acta*, 371 (2-3):247-253.
- Vilchez J.L., M.C. Valencia, A. Navalón, B. Molinero-Morales y L.F. Capitán-Vallvey. 2001. Flow injection analysis of the insecticide imidacloprid in water samples with photochemically induced fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*, 439:299-305.
- Ying G.G. y R. Kookana. 2004. Simultaneous determination of imidacloprid, thiacloprid, and thiamethoxan in soil and water by high-performance liquid Chromatography with diode-array detection. *J. of Environm. Sci. And Health*, 39 (5-6):737-746.