

DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE COMPUESTOS ÓRGANO CLORADOS POR HRGC

Autor: Especialista Juan J. García Fernández

Coautor: Técnico Alejandro R. Hernández

Centro de Investigaciones Apícolas

Cuba

TEL. 2020890

E-Mail juanj@eeapi.cu

Introducción

La cromatografía es un método físico de análisis que permite la separación de los componentes de mezclas complejas de compuestos para su posterior identificación utilizando diversos medios de detección, los cuales han sido perfeccionados en grado sumo permitiendo la detección de cantidades menores que 10^{-9} g. En la actualidad esta técnica es sumamente utilizada en diferentes ramas de la ciencia y la producción como una muy eficaz herramienta de trabajo.

La determinación de Residuos de Plaguicidas (RP) es de vital importancia pues estos constituyen el medio más común de protección contra las plagas que atacan los cultivos. La determinación de los mismos en los alimentos, constituye una prioridad mundial por el peligro que encierran para la salud del hombre por esto es de estricto cumplimiento acatar los Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas (LMRP), los que constituyen uno de los parámetros más exigidos internacionalmente.

Por otra parte la producción de miel de abejas ha experimentado un aumento progresivo ya que el hombre se ha percatado cada vez más de los beneficios de la miel y los derivados de la colmena como alimento, también desde el punto de vista terapéutico lo cual ha provocado un aumento gradual de la producción mundial de miel de abejas, que en estos momentos se encuentra alrededor de 1.2 millones de toneladas, de las que se comercializan aproximadamente 300,000 toneladas. Este hecho, unido al empleo masivo de plaguicidas y pesticidas en el combate de plagas y epidemias que azotan a los cultivos, ha estimulado el reforzamiento en el control de algunos índices tales como los Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas y otros que apuntan a la supresión de estos compuestos dañinos en todo aquello que sea consumido por los humanos.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo, es elaborar un método más sencillo, acorde a nuestras condiciones que permita tratar una muestra de miel de abejas, logrando un extracto que pueda ser sometido al análisis cromatográfico por HRGC. De esta forma podríamos determinar cualitativa y cuantitativamente las trazas de compuestos Órgano Clorados y así lograr detectar, sin lugar a dudas, la presencia de trazas de algunos de ellos en los lotes de muestras de miel de abeja que habitualmente se analizan en nuestros laboratorios. Además sería muy conveniente ya que la Norma Cubana para el análisis de Miel de Abejas no contempla este examen. A través de la utilización de esta metodología propuesta podrán incrementarse los controles que se realizan con el fin de certificar la calidad de la miel para el consumo humano y la exportación.

Materiales y métodos

En el CIAPI se viene trabajando con la intención de lograr un método preparativo y de análisis que nos permita obtener un extracto a partir del cual detectar y cuantificar los posibles residuos de plaguicidas existentes en la miel de abejas utilizando para este fin la técnica de Cromatografía Gaseosa de Alta Resolución (HRGC). En tal sentido se han realizado un número de tareas para lograr dicho fin, entre las mismas podemos mencionar:

- ✓ Puesta en marcha de los equipos periféricos de apoyo que requiere el cromatógrafo **KoniK 4000 B** para su funcionamiento.
- ✓ Puesta en marcha del cromatógrafo **KoniK 4000 B**.
- ✓ Ajuste de los diferentes parámetros de configuración del **KoniK 4000 B**.
- ✓ Determinación de la columna y fase estacionaria adecuada para la separación de los compuestos que se estudian utilizando un compósito de patrones de referencia (PR).
- ✓ Determinación de las condiciones separativas cromatográficas idóneas empleando el compósito anteriormente mencionado.
- ✓ Identificación de los tiempos de retención y posición de salida de los diferentes compuestos de forma independiente e integrada en forma de compósito.
- ✓ Elaboración de un método preparativo a partir de la matriz a utilizar con nuestras condiciones a partir de la experiencia en el trabajo miel de abejas en otras determinaciones así como de la revisión bibliográfica.

Para la ejecución de los puntos 1, 2, 3 se trabajó con un Cromatógrafo de Gases **KONIK 4000 B**, un Generador de hidrógeno **PG-H₂ 100** y un Generador de aire **ZERO 75-80** comercializado por la firma Konixbert Hi-Tech, S.A.

Se prepararon disoluciones de siete patrones de referencia (PR), Lindano, Heptachlor, Aldrín, Endosulfan, Dieldrin, Endrin y DDT, en normal hexano con una concentración de $1 \cdot 10^{-4}$ g/ml de las cuales fueron tomadas alícuotas hasta obtener soluciones con la concentración necesaria para inyectar en el cromatógrafo cantidades inferiores a 10 ng de estos (PR).

A partir de estas disoluciones fueron preparados compósitos conteniendo los siete (PR)

Utilizando estos se estudiaron diferentes columnas y fases estacionarias, valores de flujo, presión, temperatura, radios de splitter, make – up así como diferentes programas de temperatura hasta alcanzar las condiciones separativas cromatográficas idóneas para la identificación cualitativa de cada uno de los (PR) por separado.

Se determinó con precisión el tiempo de retención de cada uno de ellos así como la posición exacta en sus cromatogramas independientes con idénticas condiciones (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7). Una vez lograda la identificación de los (PR) por separado, se procedió a obtener una representación artificial

(8) (9) superponiendo los cromatogramas de los (PR) ya que los mismos fueron realizados con idénticas condiciones cromatográficas obteniendo de esta manera el cromatograma empírico de los (PR) formando compósito.

Ya en posesión de este cromatograma aparente conteniendo los (PR) se procedió al estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la identificación de los siete (PR) formando parte del compósito, con una muestra real del mismo obtenida a partir de la preparación de este con los (PR) de cada uno de los compuestos, consiguiendo un cromatograma (10) en el cual se logró la separación total ($R > 1$) y la identificación de todos los componentes. Como referencia incluimos un cromatograma (11) de la revista Chromatography Research Supplies, 2000, en la cual se puede apreciar el resultado de un análisis pesticidas órgano clorados obtenido con una columna capilar de alta eficiencia similar a la utilizada en este trabajo con otras condiciones cromatográficas.

Es importante señalar que el orden de salida de los grupos de picos de los compuestos y las posiciones de los mismos obtenidas en el cromatograma real del compósito de patrones, coincidieron totalmente con el cromatograma artificial logrado anteriormente por superposición a partir de los cromatogramas individuales de los compuestos de cada uno de los (PR), lo cual puede comprobarse en una comparación entre los dos cromatogramas antes mencionados (12) aunque puede señalarse que se observa un ligero corrimiento, fenómeno que usualmente se presenta como consecuencia de la interacción de todos los componentes con la fase estacionaria, lo cual no ocurre de igual forma cuando tenemos en la columna solamente un componente. Grafico (1)

Después de lograr las condiciones cromatográficas para ejecutar el análisis cualitativo de los siete patrones Órgano Clorados por separado o formando parte de un compósito procedimos a elegir el método que a nuestro juicio resultaría más conveniente teniendo en cuenta nuestras condiciones de trabajo y nuestros objetivos específicos, decidimos que el procedimiento más eficiente en nuestro caso es el de Calibración Absoluta, también conocido como Patrón Externo. A partir de las soluciones antes utilizadas fueron analizadas muestras con diferentes concentraciones a partir de las cuales fueron creadas la curva de calibración. El procesamiento matemático fue desarrollado con el software EZchrom. suministrado por la firma Konixbert Hi-Tech, S.A.

Fue obtenido un método de tratamiento de la muestra de miel que permite conseguir un extracto a partir del cual se realiza la determinación cualitativa y cuantitativa mediante el empleo de la HRGC (13).

El extracto es obtenido a partir del tratamiento que a continuación se describe de manera somera:

La muestra de miel de abejas es disuelta en agua después de lo cual se añade acetona y celite, se filtra a. embudo separador donde se añade cloruro de sodio. La parte no polar es tratada convenientemente con cloruro de calcio, después de lo cual se filtra hacia un balón. Los embudos y papeles de filtro así como el o los recipientes utilizados posteriormente a la separación en el embudo separador deben ser lavados con diclorometano, el resultado de este lavado debe unirse a la parte no polar que se había recuperado en el balón. Todas estas fracciones unidas son concentradas en un roto evaporador, después de lo cual se evaporan los restos de solvente.

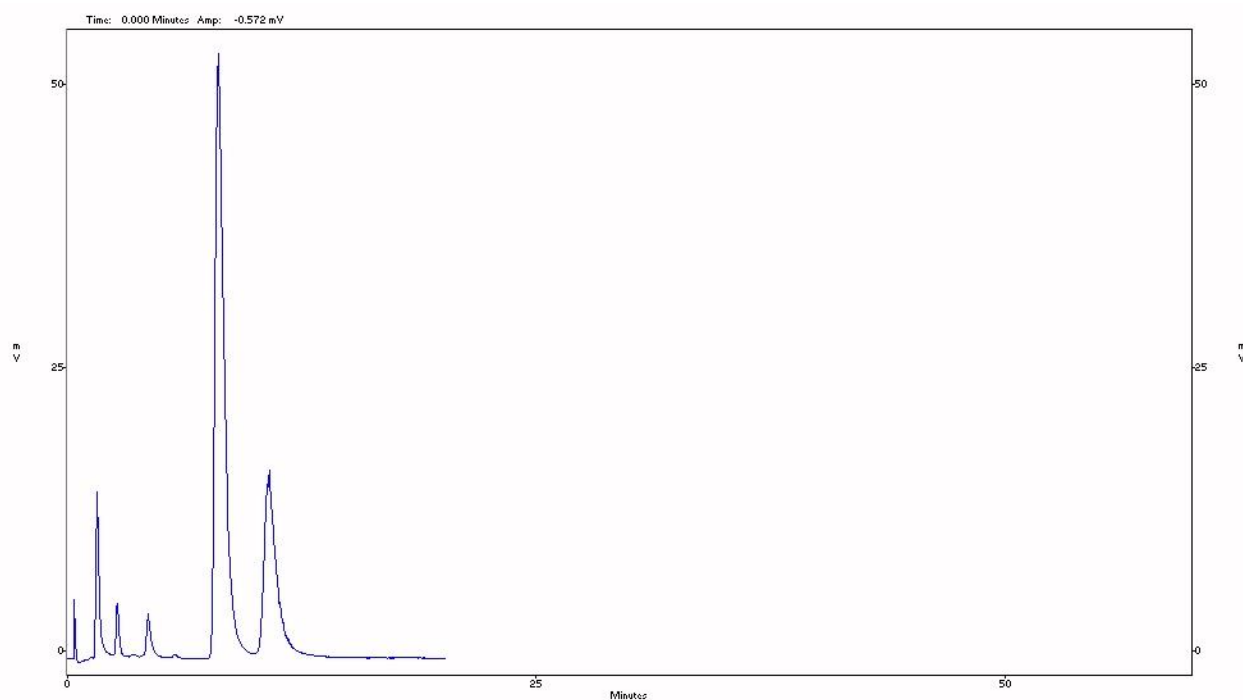
El extracto resultante se disuelve en normal hexano y se hace pasar a través de una columna rellena con frorisil. Se debe lavar sucesivamente de forma cuantitativa el recipiente que contenía el extracto con normal hexano y diclorometano los cuales serán pasados por la columna. Posteriormente se eluye con normal hexano y diclorometano, recogiendo en un recipiente adecuado el resultante del lavado y la elusión con los dos solventes.

Todos los fluidos que pasaron a través de la columna se concentran en roto evaporador hasta 1 ml, continuando entonces la evaporación hasta sequedad en flujo de nitrógeno. Disolver entonces en normal hexano hasta 1 ml y analizar por HRGC.

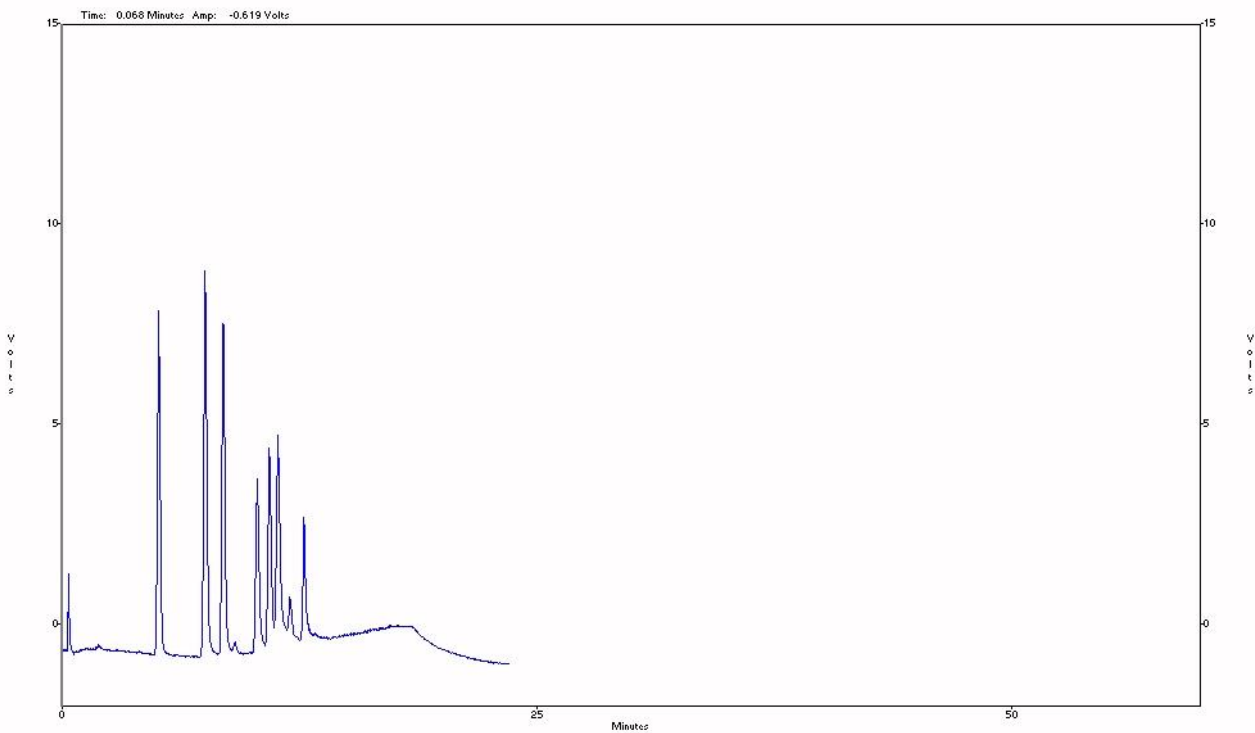
Resultados

A continuación mostramos los cromatogramas de algunos de los estadios alcanzados en la tarea de lograr las condiciones cromatográficas idóneas para la identificación de los compuestos:

Cromatograma con una columna inadecuada y régimen Isotérmico.

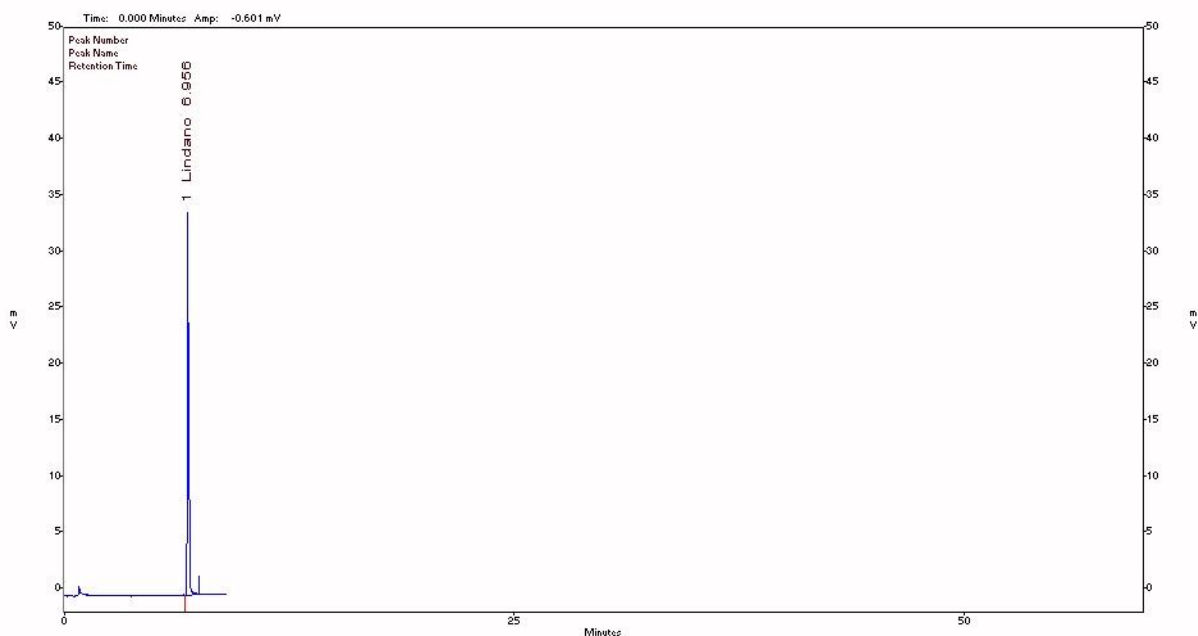


Cromatograma con C.C. adecuada y programación de temperatura no idónea

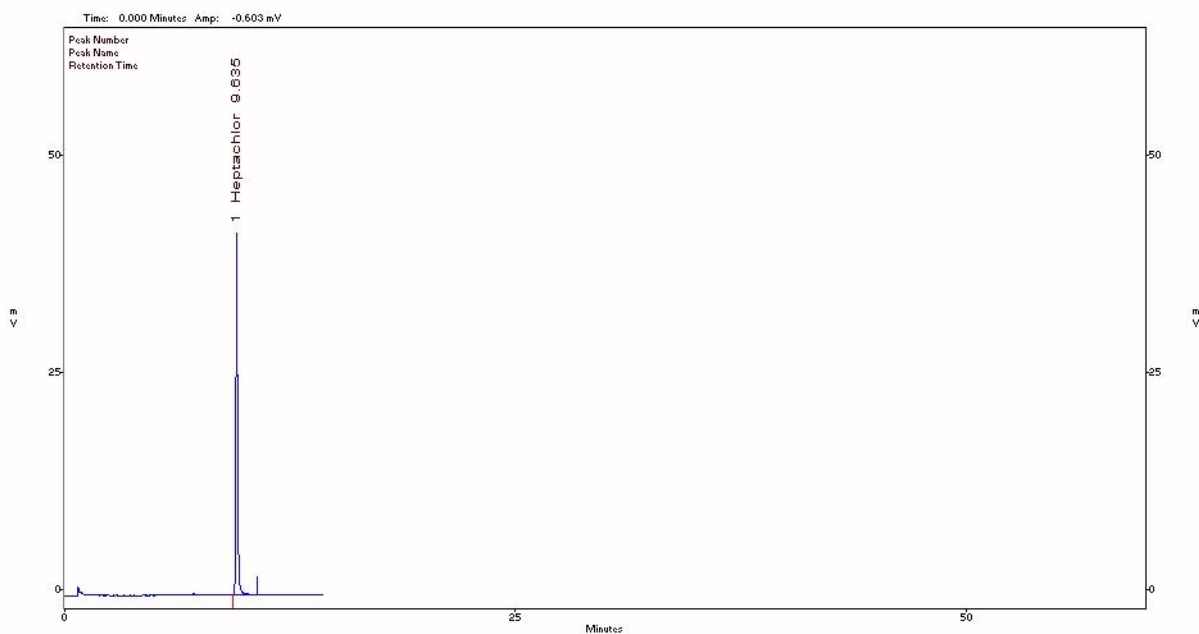


Cromatogramas obtenidos para lograr la identificación de los siete compuestos Órgano Clorados por separado:

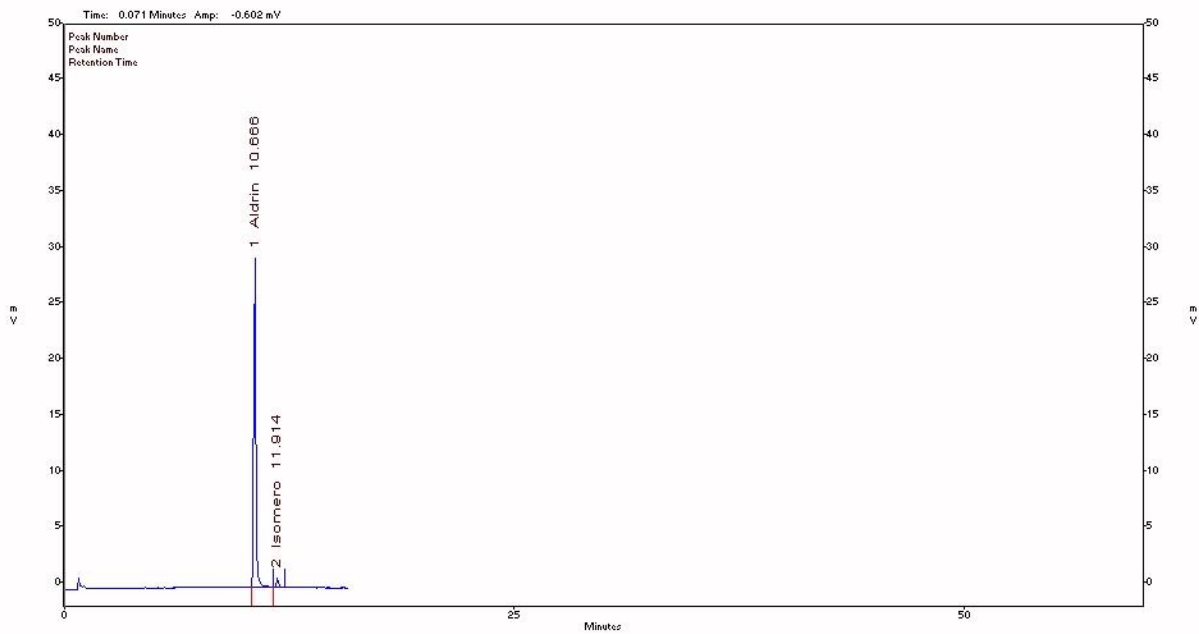
(1) Lindano



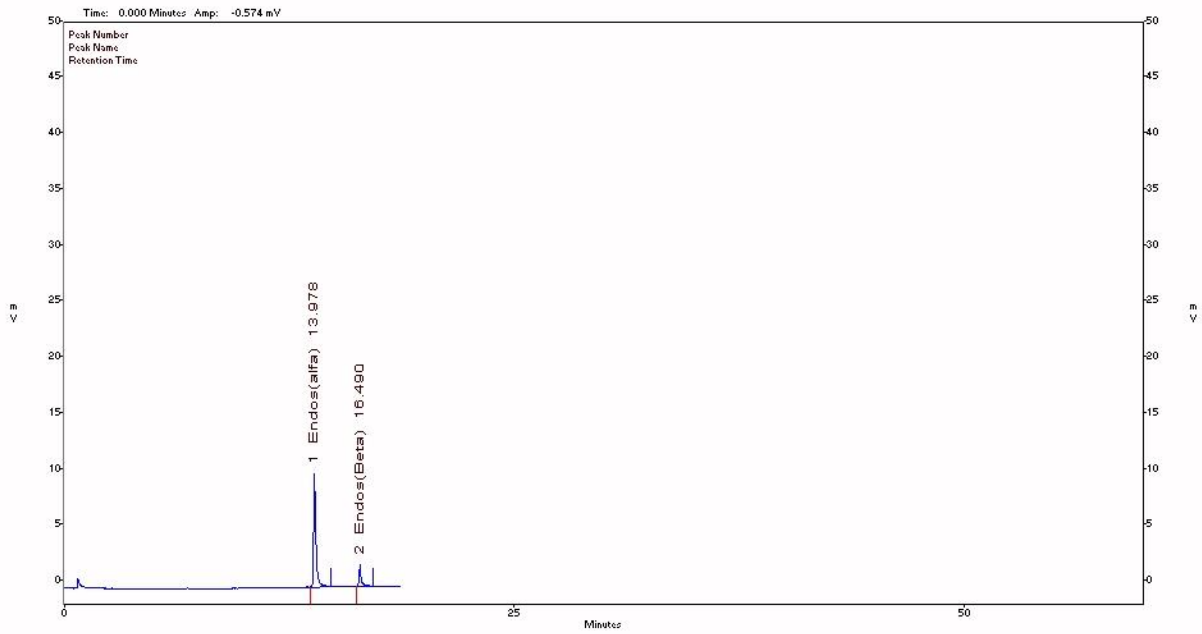
(2)Heptachlor



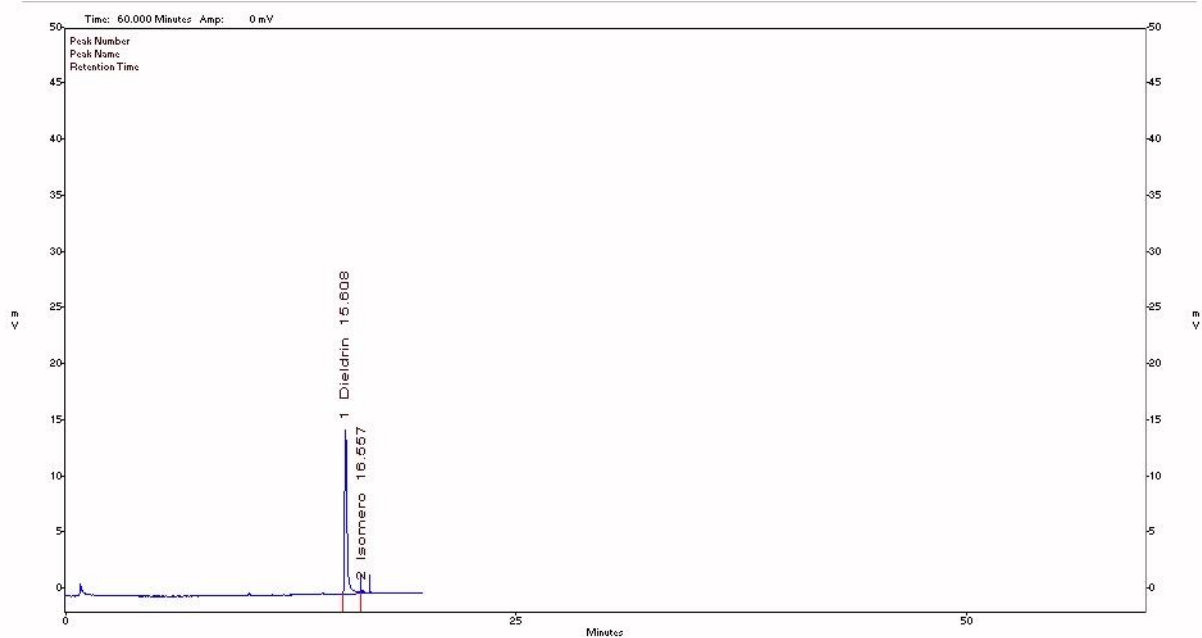
(3)Aldrin



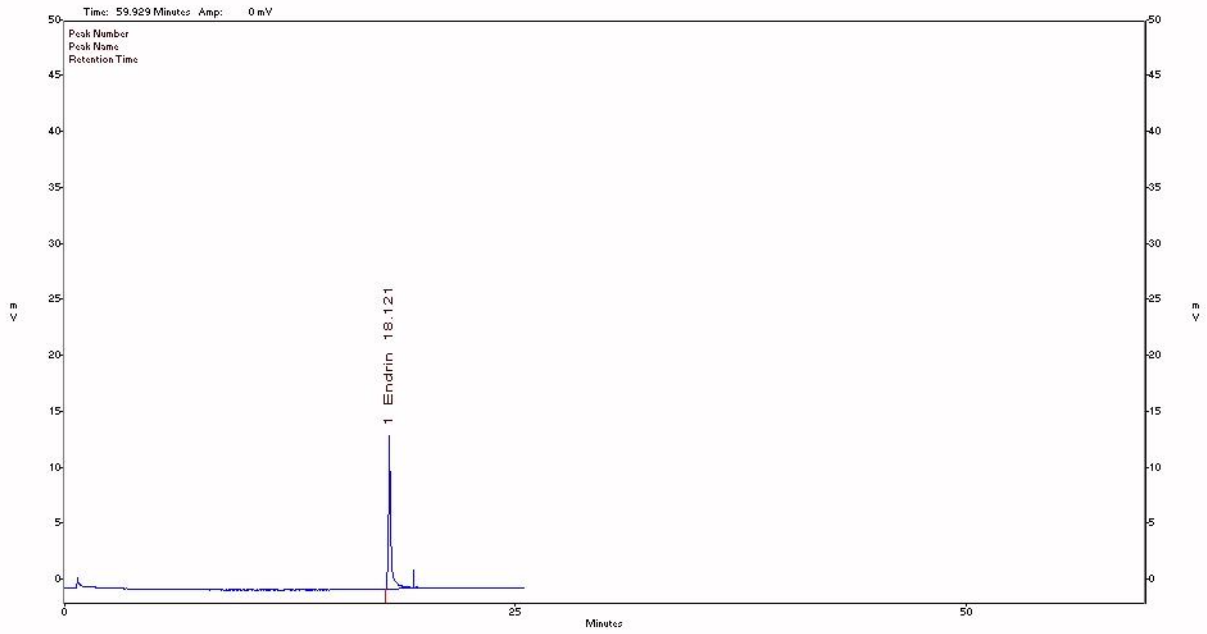
(4) Endosulfan($\alpha\beta$)



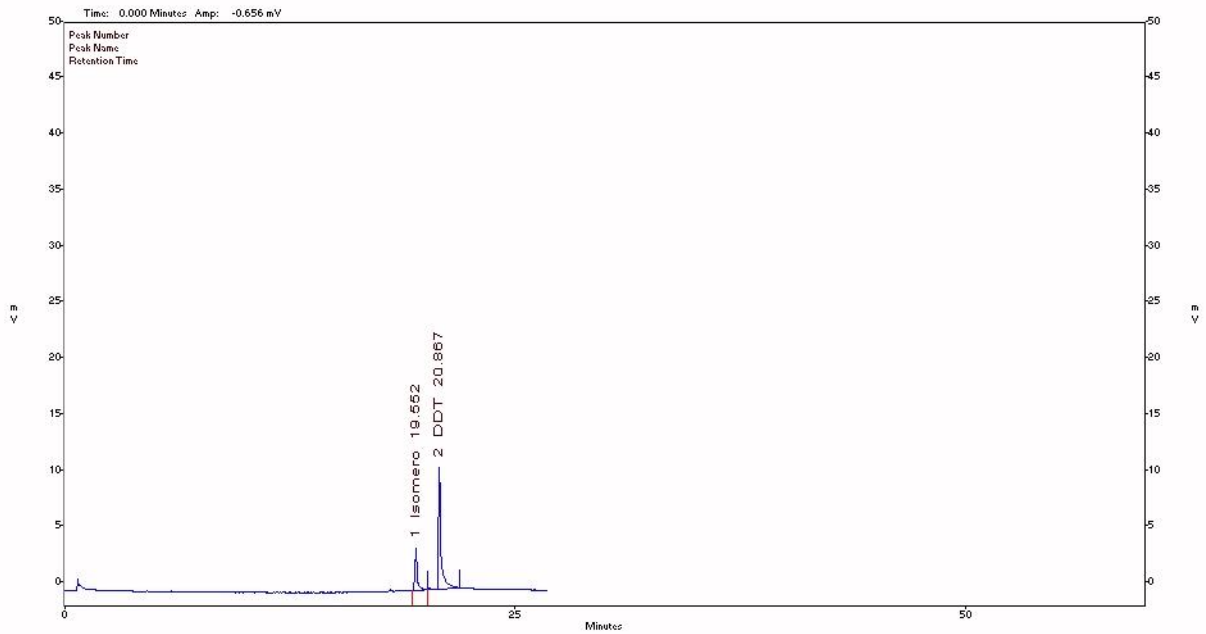
(5) Dieldrin



(6)Endrin

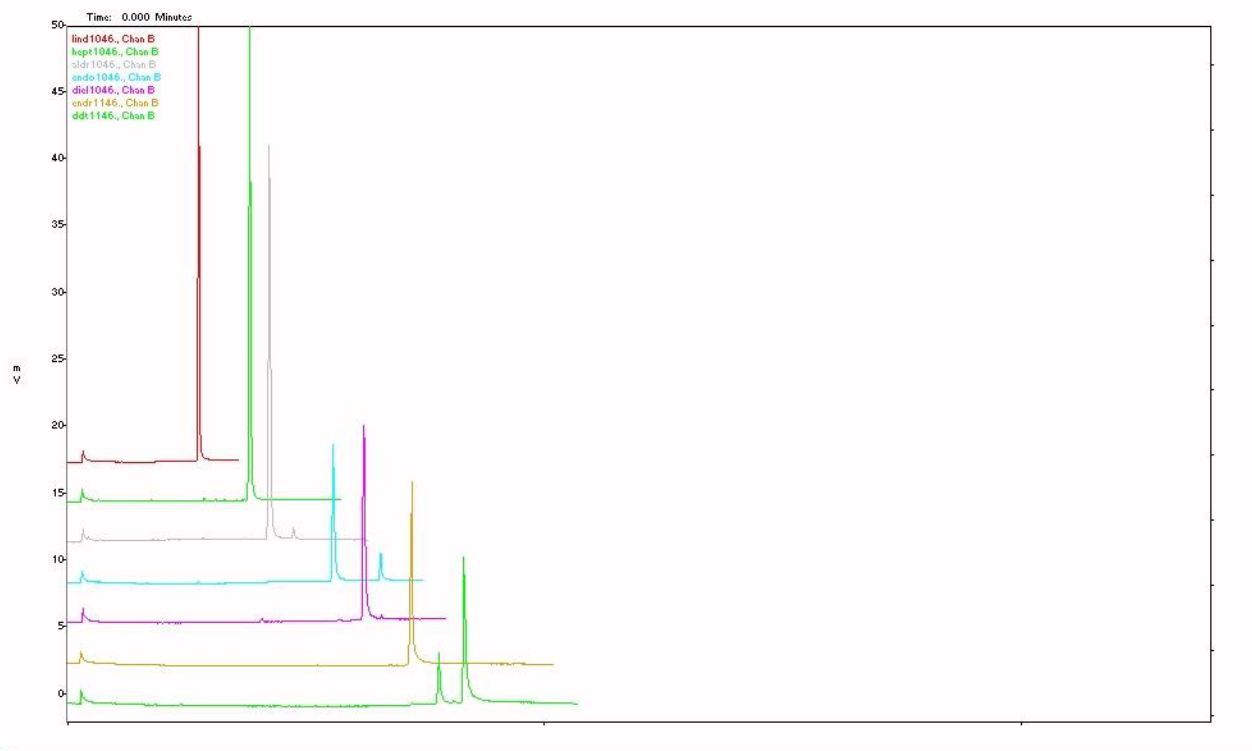


(7)DDT(tec.)

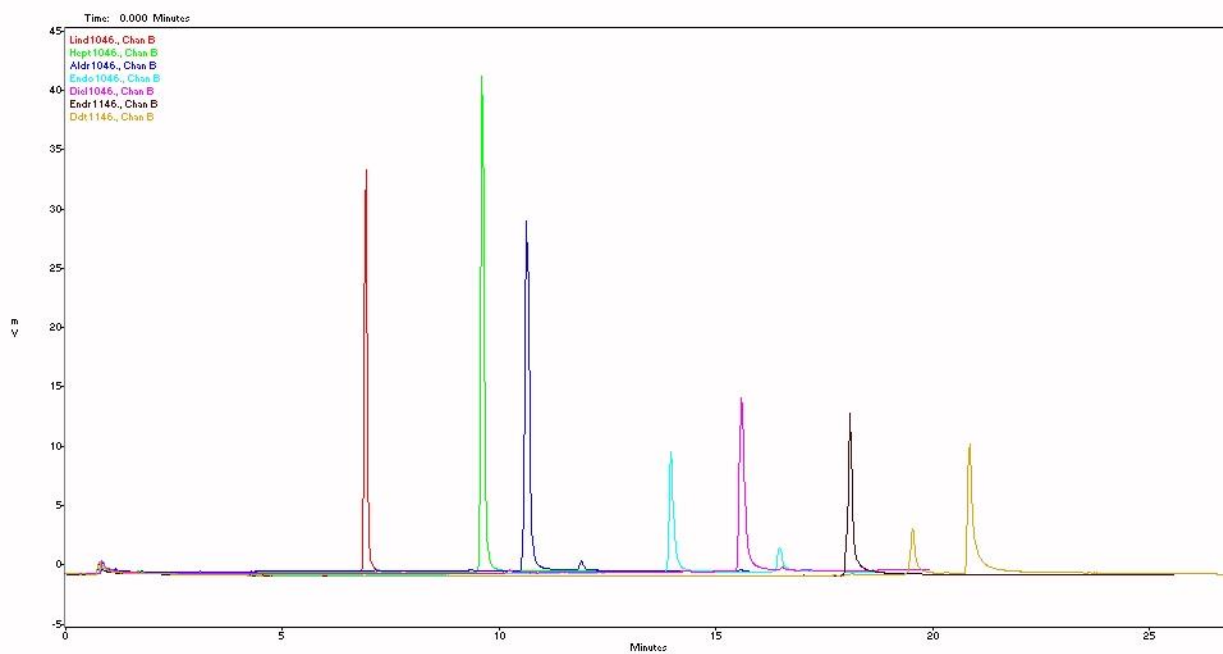


Representaciones artificiales obtenidas por superposición a partir de los cromatogramas de cada uno de los compuestos independientemente:

(8) Cromatograma de PR por Súper Compare sin integrar

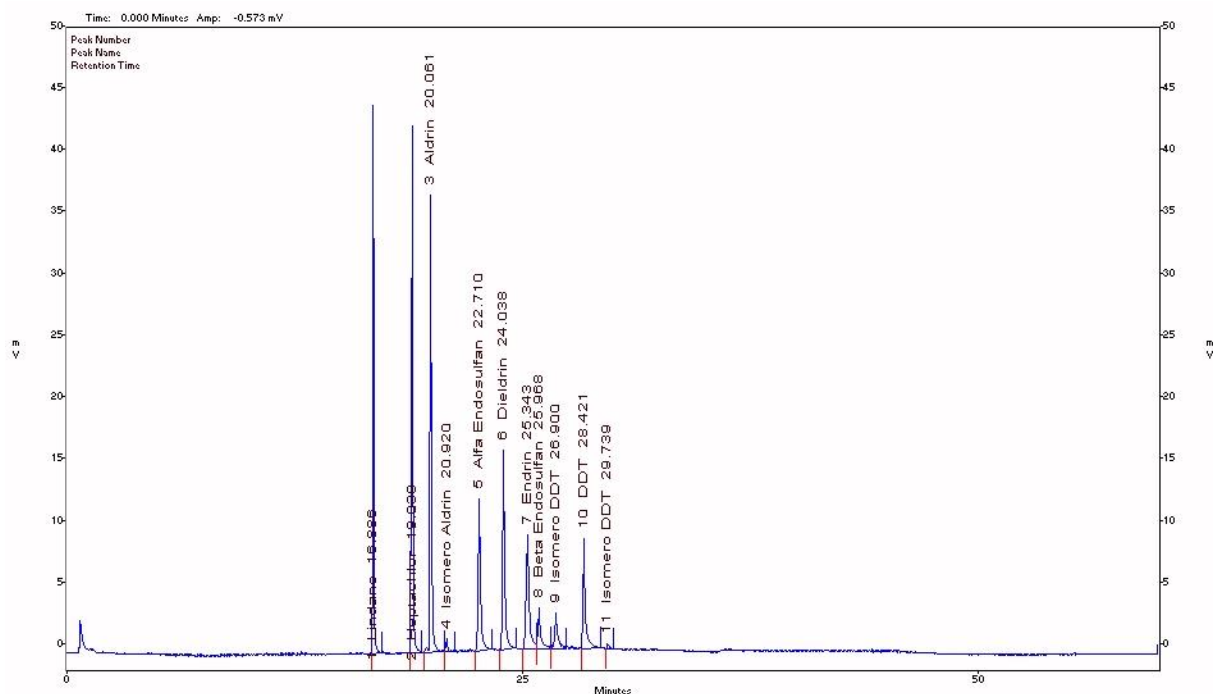


(9) Cromatograma de PR por Súper Compare Integrados



Cromatograma del compósito real de los siete patrones preparado a partir de los (PR):

(10) Compósito de Órgano Clorados C.C. adecuada y programación idónea.



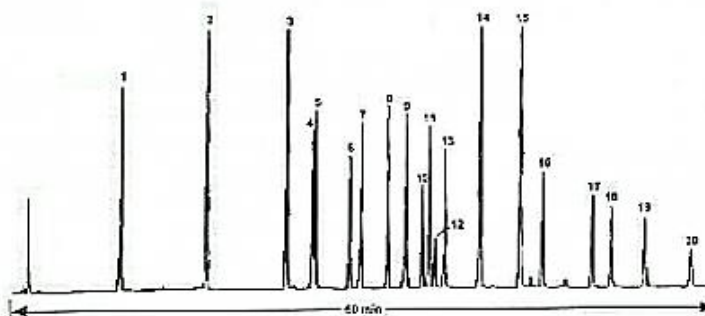
(11) Resultado que se muestra en una aplicación de la revista Chromatography Research Supplies obtenido con una columna capilar de alta eficiencia similar a la utilizada en este trabajo con otras condiciones cromatográficas.

Organophosphorus Insecticides (EPA 1618)—Column: DB™-1

30 m x 0.53 mm ID, 1.5 µm

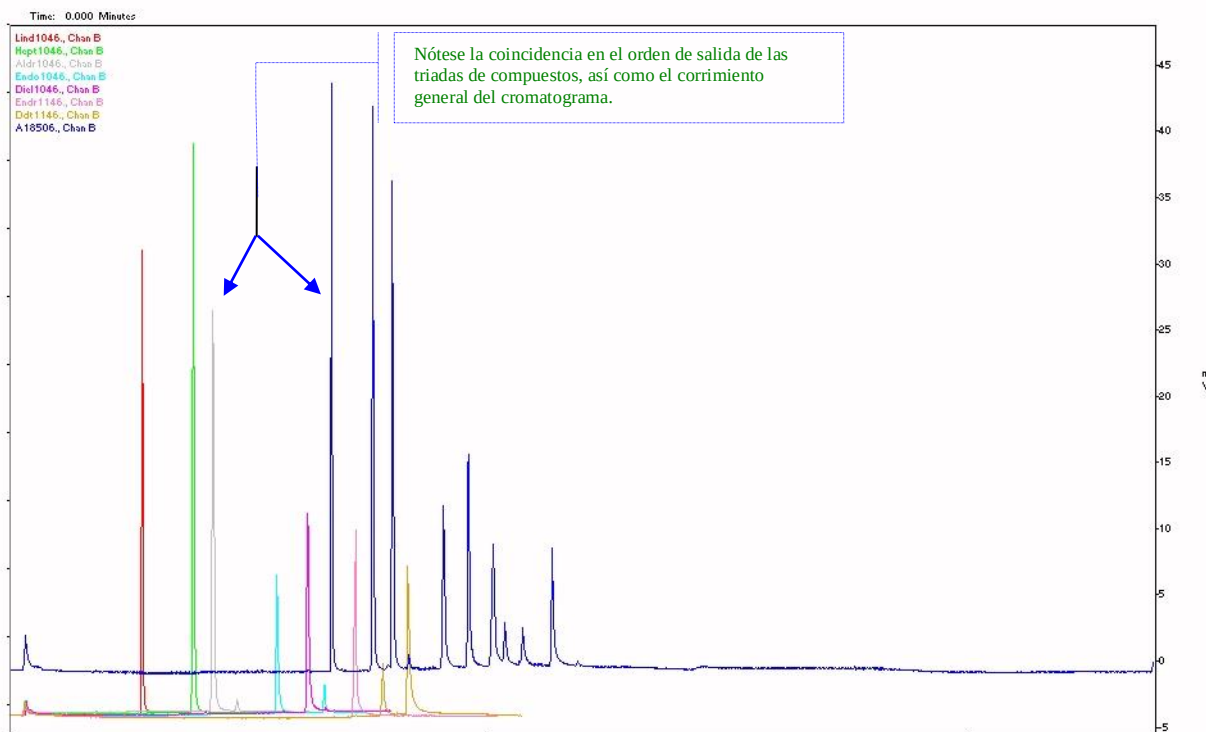
Cat. No.: 125-1032
Carrier: Helium at 7 mL/min
Oven: 100–250°C at 3°/min
250°C for 10 min
Injector: Megabore® direct,
250°C, 1 µL
Detector: FPD (with 52B nm
phosphorus filter),
250°C

1. Dichlorvos
2. Trichlorfon
3. Ethion
4. Phorate
5. Dimethoate
6. Terbufos
7. Diazinon
8. Methyl Parathion
9. Ronnel
10. Malathion
11. Ethyl Parathion
12. Trichloronat
13. Merphos A
14. Tetraclorvinphos
15. Fenitrothion
16. Sulprofos
17. EPN
18. Methyl Azinphos
19. Ethyl Azinphos
20. Coumaphos



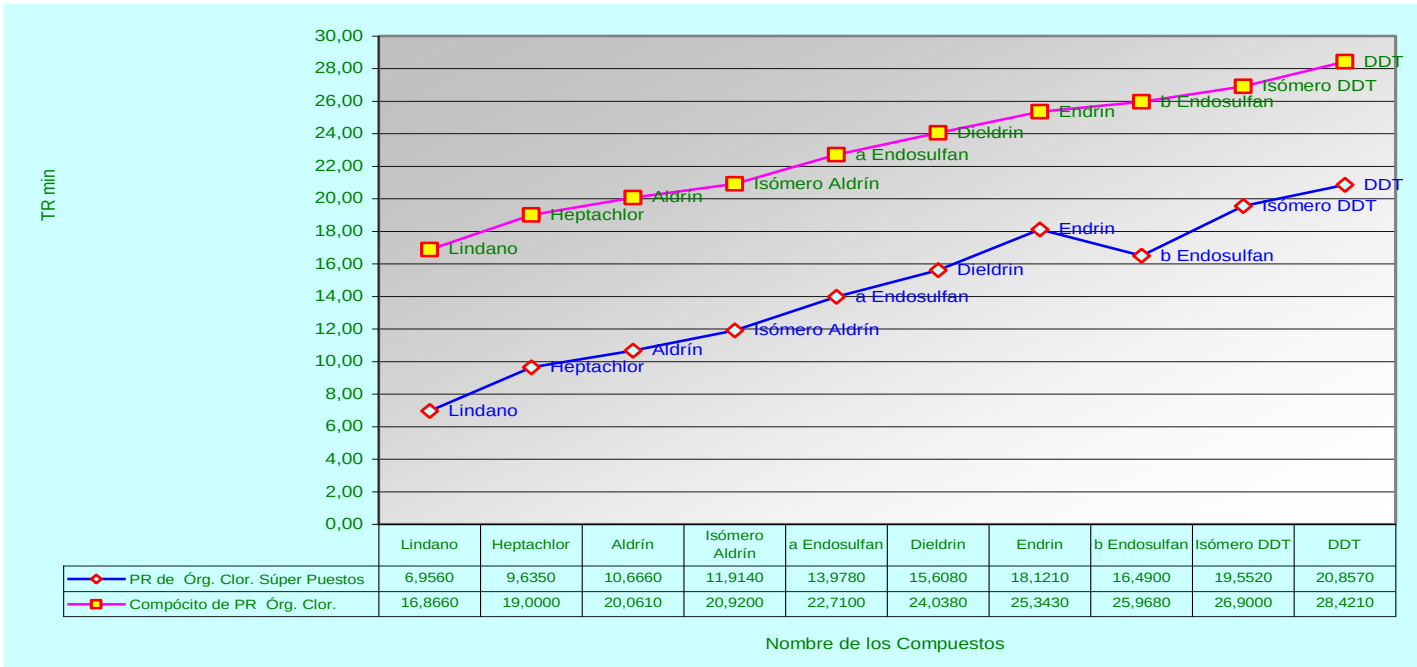
Comparación entre el cromatograma obtenido de manera artificial por superposición y el cromatograma real del compuesto:

(12) Comparación entre el cromatograma integrado (11b) y el compuesto (3)

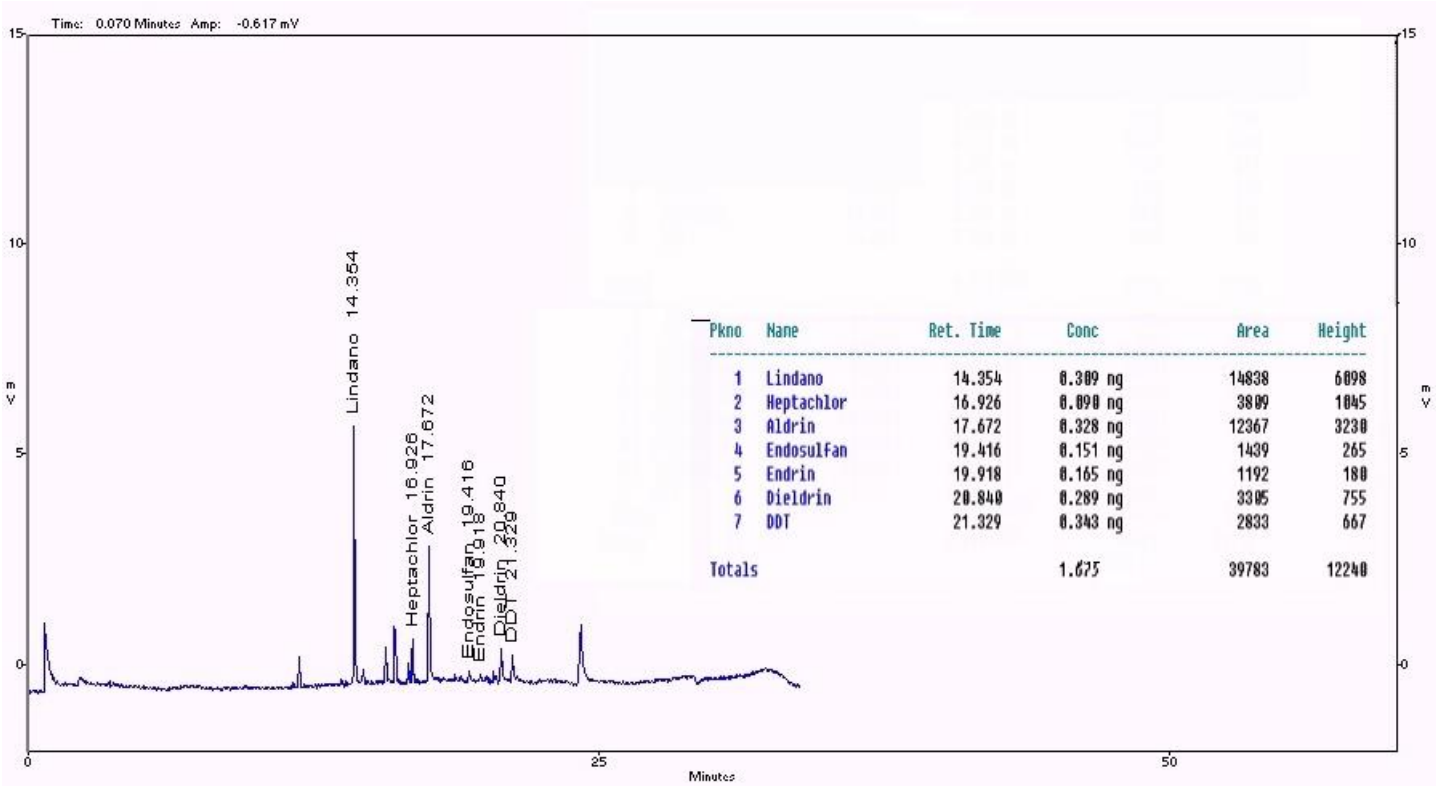


En el Gráfico (1) se muestra el ejemplo del corrimiento el los TR de los diferentes compuestos entre el cromatograma artificial y el real del compuesto:

Gráfico(1) -Tabla comparativo de los TR en el compósito y el cromatograma integrado por Súper Compare



(13)Resultados obtenidos de un análisis de una muestra de miel contaminada con (PR)



Conclusiones

- ♣ Fue elaborado un método más sencillo de tratamiento para obtener un extracto a partir de una muestra de miel de abejas que permite realizar el análisis cualitativo y cuantitativo para la determinación de trazas de siete compuestos órgano clorados por HRGC.
- ♣ Fueron fijadas las condiciones separativas cromatográficas idóneas para el análisis por HRGC de siete compuestos órgano clorados independientes a partir de patrones de referencia (PR) de estos compuestos.
- ♣ Fueron fijadas las condiciones separativas cromatográficas idóneas para el análisis por HRGC de un compuesto conteniendo los siete compuestos órgano clorados a partir de (PR) de estos compuestos.
- ♣ Se logró la identificación de cada uno de los compuestos antes mencionados de manera independiente y formando parte del compuesto.
- ♣ Se aplicó el método de cálculo por Normalización Absoluta o Normalización por Patrón Externo.
- ♣ Fue aplicado el método completo a muestras de miel de abejas contaminadas logrando la detección de la presencia de estos compuestos en la misma, su identificación cualitativa y cuantitativa en el orden de los nanogramos.

Referencias bibliográficas

1. Jennings Walter, Mittlefehldt Eric, Stremple Philip, *Analytical Gas Chromatography*, Segunda edición, United States of America, Academic Press, 1997.
2. Ricardo Mariño Caridad, *Métodos de Análisis de Residuos de Plaguicidas*, Primera edición, Cuba, INISAV, 2000.
3. Unión Europea, *Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo*, 23 de febrero del 2005, Relativo a los límites máximos de plaguicidas en piensos y alimentos de origen vegetal y animal.
4. *Chromatography Research Supplies Inc.*, Konixbert Hi-Tech, S.A.
5. Farmacopea Europea *“Insecticidas Órgano Clorados, Órgano Fosforados y Piretroides” 2002*