

PARAMETROS DE CALIDAD ANALITICA DE UN METODO DE DETERMINACION MULTIRESIDUOS DE PLAGUICIDAS POR HPLC-DAD

MARIA E. BAEZ, JORGE ZINCKER

Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla 233, Santiago 1, Chile.
e-mail: mbaez@ll.ciq.uchile.cl

RESUMEN

Se estableció la linealidad, sensibilidad analítica, límite de detección, límite de identificación y precisión de un método para la determinación simultánea por HPLC-DAD de trece plaguicidas pertenecientes a diferentes clases químicas: metil-carbamatos, triazinas, derivados ureicos, fosforados, un derivado de uracilo, una carbamoyl-oxima, una ftalimida y una acyl alanina, todos potenciales contaminantes de aguas y suelos. Los analitos fueron separados mediante elución en gradiente en un sistema acetonitrilo-agua en una columna C_{18} 60 Å, de 3,9 x 300 mm y 4 µm de tamaño de partícula. Para el establecimiento de los parámetros de calibración del método se empleó el modelo estadístico de regresión lineal y se compararon tres criterios de cálculo del límite de detección. En todos los casos se obtuvo una relación lineal en los intervalos de concentración estudiados, los que variaron entre 0,030 y 0,120 ng µL⁻¹ para carbaril (compuesto que presenta la mayor sensibilidad) y entre 1,5 y 6,0 ng µL⁻¹ para captan (el de menor sensibilidad). La sensibilidad analítica varió entre 0,011 y 2,611 ng y los límites de detección entre 0,04 y 9,2 ng. Los parámetros espectrales utilizados como criterios de identidad y homogeneidad permitieron establecer los límites de identificación de los analitos, los que fluctuaron entre 0,15 y 7,5 ng. De acuerdo a los valores obtenidos, el método desarrollado permite la incorporación de un número importante de otros compuestos con actividad plaguicida para su determinación en aguas, asociado a técnicas como la extracción en fase sólida, debido a su gran poder de resolución y a sus posibilidades como herramienta de identificación y cuantificación a muy bajos niveles de concentración.

PALABRAS CLAVES: Pesticidas, análisis multiresiduos, HPLC-DAD, parámetros analíticos

SUMMARY

A study was done to establish the linearity, analytical sensitivity, limit of detection, limit of identification and precision of a method for the simultaneous determination of thirteen pesticides belonging to different chemical classes: methyl-carbamates, triazines, urea-derived herbicides and insecticides, a carbamoyl oxime, a phthalimide, an acyl alanine, an organophosphorus insecticide and a uracil-derived compound, all of them potential pollutants of natural waters and soils. The analytes

were separated on a C_{18} 60 Å, 4 µm (3,9 mm id x 300 mm) column with an acetonitrile-water based gradient elution program. To this end statistical model of linear regression was used. Limits of detection determined by three different methods were compared. A linear relationship for all compounds was obtained at the concentration levels under study (between 0.030 and 0.120 ng µL⁻¹ for carbaryl and between 1,5 and 6,0 ng µL⁻¹ for captan). Analytical sensitivity ranged between 0,011 and 2,611 ng and limits of detection were in the range 0.04-9.2 ng. Spectral parameters used for identity and purity tests allowed to establish the limits of identification, ranging from 0.15 and 7.5 ng. The developed method would allow a wider number of pesticides to be added for their determination in waters, due to its ability to separate the analytes and its capacity for peak identification and quantification at very low concentration levels.

KEY WORDS: Pesticides, multiresidue analysis, HPLC-DAD, analytical parameters.

INTRODUCCION

En la actualidad, el análisis multiresiduos de plaguicidas en aguas se aborda empleando la cromatografía en fase gaseosa con detectores de alta sensibilidad y/o especificidad, asociada con técnicas con un alto poder de concentración, como es el caso de la extracción en fase sólida¹⁻⁷⁾. Sin embargo, esta vía no puede utilizarse en la determinación de una variedad de compuestos debido a la baja volatilidad o inestabilidad térmica que estos presentan. En otros casos, existen limitaciones en cuanto a sensibilidad, por ejemplo, es el caso de compuestos triazínicos limitados, principalmente, al detector de nitrógeno-fósforo. La cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), debido a su gran potencial como técnica de separación e identificación y a su aplicabilidad en una gran variedad de matrices y compuestos, incluyendo productos no volátiles y termolábiles, representa una técnica alternativa a la cromatografía de gases acoplada a los detectores clásicos o al espectrométrico de masas (GC-MS)⁸⁻¹²⁾. A lo anterior se suma la ventaja de poder abordar mediante técnicas quimiométricas el problema de la separación de mezclas difíciles de resolver^{13,14)}. En el presente trabajo, se discuten las características analíticas de un método de separación por HPLC-DAD de trece compuestos pertenecientes a distintas clases químicas: propoxur, carbaril, carbofurano (metil carbamatos), aldicarb (carbamoil-oxima), diflubenzuron (benzoil-urea) y mevinfos (organofosforado) con acción insecticida; metabenzotiazuron, diuron (derivados ureicos), atrazina, simazina (triazinas) y lenacilo (derivado de uracilo) con acción herbicida y metataxil (acylalanina) y captan (ftalimida) con acción fungicida, todos ellos potenciales contaminantes de aguas y suelos.

Para el desarrollo del método, se estudiaron distintos gradientes en un sistema de elución acetonitrilo-agua, evaluando la homogeneidad de los picos cromatográficos y comprobando su identidad por comparación con los espectros obtenidos para los estándares analíticos. Después de la optimización cromatográfica se estudiaron estadísticamente los parámetros analíticos del método a través de la ecuación de regresión lineal del gráfico de calibración para cada analito. Dicho modelo ha sido empleado como método alternativo para la evaluación de métodos espectrofotométricos, espectrofluorimétricos y cromatográficos^{3,15)}. También se ha utilizado para evaluar sistemas analíticos completos, incluido el método de tratamiento de la muestra^{16,17)}, ya que permite la detección de errores sistemáticos y sirve como criterio de comparación de los parámetros analíticos entre distintos métodos para un mismo analito.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

Los estándares utilizados, en su mayoría de pureza ≥ 99% fueron: aldicarb, atrazina, carbofurano, diuron, simazina y propoxur, de Polyscience™, captan y diflubenzuron de Chem Service (West Chester, PA, US) y lenacilo, mevinfos, metabenzotiazuron, carbaril y metalaxil de Riedel de Hæen (Pestanal®). Las soluciones patrón fueron preparadas por disolución de éstos con acetonitrilo, excepto diflubenzuron, el que fue disuelto en acetona y fueron mantenidas a 4°C. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en acetonitrilo calidad HPLC (J.T Baker). El agua fue purificada con el sistema NANOpure (Barnstead Thermolyne).

Equipos

Se empleó un cromatógrafo Waters constituido por una bomba de gradiente cuaternaria (modelo 600), un muestreador automático (modelo 717 Plus), un detector de arreglo de diodos (modelo 996) y un calefactor de columna (modelo 62079). El control del sistema cromatográfico y la adquisición y procesamiento de datos se realizaron con el software Millennium versión 2.10. Para la separación de los compuestos se utilizó una columna Waters Nova Pack C₁₈ 60 Å de 3,9 x 300 mm y 4 µm de tamaño de partícula, con una precolumna µBondapak™ C₁₈ 120 Å, de 3,9 x 20 mm y 10 µm de tamaño de partícula.

Condiciones cromatográficas

Los parámetros utilizados para la adquisición de datos desde el detector fueron los siguientes: intervalo de longitudes de onda, 200-350 nm; velocidad de adquisición, 1 espectro/segundo; resolución 1,2 nm. El programa de elución óptimo utilizando acetonitrilo-H₂O (expresado como % en volumen de acetonitrilo) fue: 15% los primeros 5 minutos; variación hasta 45% en 15 minutos; variación hasta 100% en los siguientes 5 minutos; mantención por cinco minutos en dicha condición y restitución a la condición inicial en los últimos cinco minutos; en todos los casos se empleó un gradiente lineal. Un tiempo adicional de 10 minutos permite equilibrar la columna en las condiciones iniciales para un siguiente análisis. El volumen de inyección fue 20 µL, la temperatura de columna 20°C y el flujo de fase móvil 1,2 ml/min.

Calibración

Esta se realizó midiendo en triplicado las respuestas correspondientes a cada analito dentro de la mezcla, en 4 niveles de concentración (entre 0,03 y 0,120 ng/µL para carbaril, compuesto que presenta la mayor sensibilidad y entre 1,5 y 6,0 ng/µL para captan, el que presenta la menor sensibilidad, Tabla II). Los parámetros de calidad analítica fueron estimados a partir del set de datos obtenidos de dicha calibración. Se calculó la ecuación $R = a + bC$ (R, corresponde a la señal instrumental y C, a la concentración). Con los datos generados se estableció la linealidad, sensibilidad analítica, precisión y límite de detección del método para cada uno de los analitos.

Para definir los parámetros previos se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$S_r(b) = S_y/b, \text{ para establecer la linealidad } 1-S_r(b)$$

$$S = S_{R/C}/b, \text{ sensibilidad analítica}$$

$$LD = 3 (S_{R/C}/b) [(n-2/n-1)]^{1/2}, \text{ límite de detección.}$$

En éstas, $S_{R/C}$ es la desviación estándar de la regresión, b es la pendiente, S_0 es la desviación estándar de la pendiente y n es el número total de pares de datos para el cálculo de la regresión.

$S_c = [1/N + 1/n + (R_u - \bar{R})^2/b^2 \sum (C_i - \bar{C})^2]^{1/2} S_{R/C}/b$, donde N es el número de determinaciones de R_u (señal instrumental al nivel de concentración de interés) y S_c es la desviación estándar de la concentración^{18,19}.

RESULTADOS Y DISCUSION

Desarrollo del método cromatográfico

El estudio se desarrolló con un número limitado de compuestos teniendo en cuenta que, con fines de identificación, el método podría ser aplicado a un número mucho mayor utilizando los tiempos de retención en la técnica de pre-búsqueda, la que restringe la búsqueda en la biblioteca de espectros a una ventana definida alrededor del tiempo de retención del compuesto desconocido, para, posteriormente, comparar su espectro con todos los productos de referencia comprendidos en dicha ventana. Los compuestos fueron seleccionados complementando el número de plaguicidas previamente estudiados en una evaluación de la técnica de extracción en fase sólida para la determinación multiresiduos en aguas, acoplada a cromatografía de gases con los detectores de nitrógeno-fósforo (GC-NPD) y captura de electrones (GC-ECD)^{20,21}.

El software utiliza la técnica de contraste espectral, tanto para establecer la igualación de espectros como para probar la homogeneidad en la elución de un compuesto. Para ello convierte los espectros en vectores y compara el espectro de un analito con espectros conocidos, detecta la coelución comparando todos los espectros dentro de un pico y determina el número de compuestos espectralmente diferentes dentro de éste. También determina la cuantía de las diferencias espectrales atribuibles a condiciones no ideales inherentes al proceso de detección. Cuatro valores de ángulos cuantifican lo anterior, los que pueden variar entre 0° y 90° : el ángulo de igualación que corresponde al ángulo de contraste espectral entre dos picos, el umbral de igualación que corresponde al mayor ángulo que podría ser atribuido a ruido, error fotométrico o contribución del solvente y no atribuible a una diferencia verdadera entre los espectros, el ángulo de pureza que representa el promedio de todos los ángulos de contraste espectral calculados comparando todos los espectros en el pico integrado con el obtenido en el ápice y, finalmente, el umbral de pureza, que es el mayor ángulo atribuible a coelución, ruido, error fotométrico o contribución del solvente. Para el desarrollo y optimización del método de separación se utilizaron dichos valores, habiéndose estudiado distintos sistemas de elución y la modificación de parámetros como la temperatura de la columna y flujo de la fase móvil.

En la Tabla I se encuentran los ángulos de pureza e igualación junto a los correspondientes valores de umbral para la separación realizada en las condiciones óptimas de elución, inyectando soluciones de trabajo compuestas por los trece plaguicidas, en dos diferentes concentraciones. Un ángulo de igualación igual a 0° significaría una perfecta coincidencia entre el espectro del compuesto desconocido y el espectro de un compuesto de la biblioteca. Por otra parte, un ángulo de igualación inferior al de umbral significa que no se ha detectado ninguna diferencia en la silueta de los espectros comparados; por el contrario, cuando es superior, los espectros no provienen del mismo compuesto o bien existe un compuesto co-eluyente. En la literatura se asigna una gran certeza a la obtención de ángulos inferiores a 4° como resultado de la identificación, mientras que valores superiores a 8° son considerados como de baja certeza²². De acuerdo al criterio anterior, aún a la más baja concentración, se obtienen valores inferiores o muy cercanos a 4, exceptuando el caso de simazina. La magnitud de los ángulos de umbral varía con la altura del pico cromatográfico, sin embargo, en ambas concentraciones se obtiene un ángulo de igualación inferior al correspondiente umbral. Los valores obtenidos pertenecen a la cantidad más baja inyectada de cada compuesto que condujera a una identificación positiva, considerando los criterios anteriores; de acuerdo a esto podrían proponerse dichas cantidades como límite de identificación para cada uno de los analitos. En la Figura 1 se muestran, a modo de ejemplo, los espectros obtenidos para 0,47 y 0,15 ng de metabenzotiazuron y carbaril, comparados con aquéllos de la biblioteca de espectros; a éstos corresponde un valor de absorbancia máxima de 0,43 y 0,44 mAU, respectivamente, resultados similares o inferiores a los obtenidos en la identificación positiva de algunas drogas en sangre total (0,54-3,8 mAU), confirmada por GC-MS o GC-ECD²². El límite más alto corresponde a captan (con un valor de absorbancia máxima de 1,66 mAU para 7,50 ng), que es el que presenta el espectro UV más pobre, entre los compuestos estudiados. Los límites señalados tan solo representan la calidad óptica del equipo empleado, sin embargo, la aplicación de dicho parámetro en el caso de muestras reales también dependerá de la calidad del método de extracción de los analitos. En extracción en fase sólida es común emplear factores de concentración de 1000 para muestras de aguas; de acuerdo a ello, utilizando un volumen de inyección de 20 μ L, sería posible la identificación de la mayoría de los compuestos en estudio, con un buen grado de certeza, a niveles inferiores o muy cercanos a los máximos de aceptación permitidos para aguas por la Unión Europea (100 ng/L).

Los ángulos de pureza y umbral de pureza representan la calidad de la separación. Como se puede observar, siempre el ángulo de umbral es mayor que el de pureza, lo que significa que no hay evidencia espectroscópica de co-elución. Teniendo en cuenta que el ángulo correspondiente al ruido es inversamente proporcional a la concentración del compuesto y que se ha utilizado un sistema de elución en gradiente, se puede decir que los ángulos de umbral alcanzan valores adecuados para realizar una comparación espectral selectiva a los menores valores de concentración.

A pesar de que en cromatografía líquida, no se atribuye a la temperatura de columna un efecto importante en la separación, una variación de ésta puede originar una disminución de la viscosidad de la fase móvil, aumentando la velocidad de transferencia de masa, así como también cambios en la solubilidad de los compuestos²³. Para los compuestos estudiados, el efecto de la temperatura es de diferente

TABLA I. Parámetros para establecer la identidad y homogeneidad espectral.

Pesticida	ng	Tiempo de retención (min)	Angulo de pureza	Umbral de pureza	Angulo de igualación	Umbral de igualación
Mevinfos	1,30	16,39	5,61	7,93	3,55	5,42
	15,6		0,83	1,78	0,64	1,58
Aldicarb	3,60	18,59	3,36	5,72	2,07	4,08
	43,5		0,54	1,46	0,72	1,26
Simazina	0,22	19,81	7,09	10,74	6,12	7,59
	2,70		0,92	1,97	0,68	1,50
Lenacilo	2,92	21,92	5,19	7,33	3,31	4,95
	35,1		0,71	1,60	0,49	1,29
Propoxur	1,44	22,36	5,50	8,00	4,12	5,40
	17,3		0,79	1,74	0,50	1,30
Carbofurano	1,52	22,92	3,78	5,90	2,56	4,06
	18,2		0,47	1,47	0,87	1,24
Metabenzotiazuron	0,47	23,74	4,45	6,32	2,07	3,88
	5,64		0,48	1,42	0,53	1,23
Atrazina	0,29	24,12	6,07	8,65	4,08	5,84
	3,48		1,13	1,66	1,29	1,34
Carbaril	0,15	24,51	6,20	9,09	3,91	5,81
	1,80		0,76	1,76	0,68	1,37
Metalaxil	1,52	25,19	5,06	6,80	2,64	4,28
	18,2		0,45	1,44	0,48	1,26
Diuron	0,73	25,52	2,55	4,68	2,07	3,31
	8,76		0,46	1,34	0,48	1,17
Captan	7,50	28,35	2,84	4,43	1,92	2,75
	90,0		0,31	1,28	0,90	1,15
Diflubenzuron	0,90	29,16	2,39	4,12	1,55	2,66
	10,8		0,34	1,30	0,35	1,12

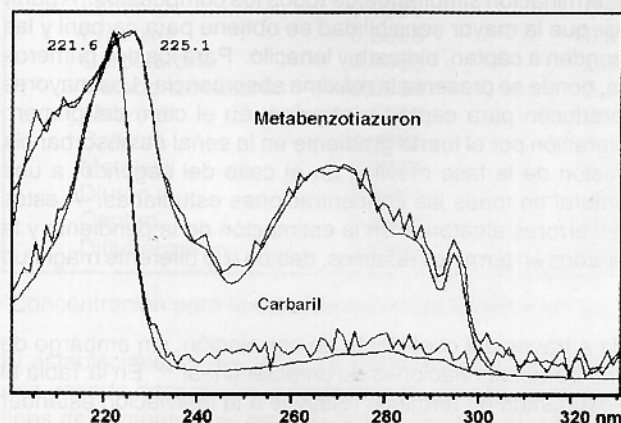


FIG. 1. Superposición de los espectros de referencia con los de 0,47 ng de metabenzotiazuron y 0,15 ng de carbaril.

magnitud; así entre 25 y 30°C tienden a igualarse los tiempos de retención de atrazina, carbaril y metalaxil, mientras que a mayores temperaturas (40-45°C) se invierte el orden de aparición de metalaxil y diurón; de acuerdo a estos resultados, la variación de temperatura puede ser utilizada como una variable operativa en este tipo de separación. La variación de flujo de fase móvil (entre 0,8 y 1,5 ml/min) tuvo un efecto menos significativo; el uso de un flujo menor, con una menor velocidad de transferencia de masa desde la columna al solvente, no permite una adecuada separación de atrazina y carbaril. Los coeficientes de variación de los tiempos de retención de los compuestos en las condiciones óptimas de separación variaron entre 0,13% para el primer eluyente y 0,03% para el último, en una serie de diez inyecciones; por otra parte, los tiempos de retención promedio de mediciones realizadas seis meses después, para los mismos trece compuestos, difieren entre 0,31 y 0,02% respecto de los anteriores, lo que da cuenta de la excelente reproducibilidad de la columna y del sistema cromatográfico total. En la Figura 2 se muestra un cromatograma tipo, obtenido para un nivel de concentración intermedio para cada analito, respecto de los intervalos de concentración empleados para establecer los parámetros de calibración del método cromatográfico (Tabla II).

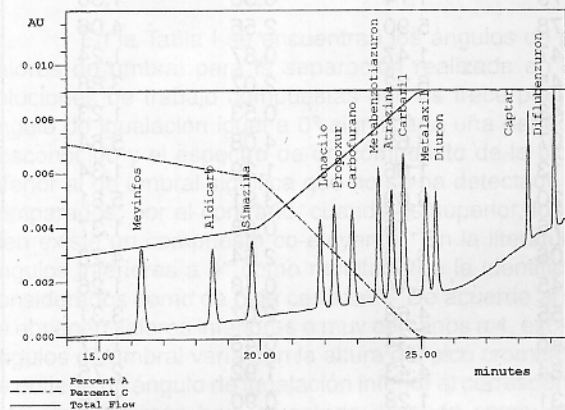


FIG. 2. Cromatograma obtenido de la inyección de 20 μ L de una solución estándar de la mezcla de plaguicidas con un gradiente de acetonitrilo-agua de 35 minutos.

Calibración del método

Los valores que definen las ecuaciones de regresión obtenidas para la evaluación del sistema cromatográfico (pendiente y ordenada en el origen) y los errores aleatorios asociados (desviación estándar de la regresión, pendiente y ordenada en el origen) se presentan en la Tabla II. Los valores corresponden al monitoreo de la señal correspondiente a 220 nm. Se seleccionó dicha longitud de onda tratando de obtener la máxima respuesta posible en una determinación simultánea de todos los compuestos. A partir de los valores de la pendiente se puede concluir que la mayor sensibilidad se obtiene para carbaril y las dos triazinas, en tanto que las menores corresponden a captan, aldicarb y lenacilo. Para los dos primeros una mayor sensibilidad puede lograrse a 200 nm, donde se presenta la máxima absorbancia. Los mayores errores en la estimación de la regresión se producen para captan y atrazina; en el caso del primero debido, probablemente, a dificultades en la integración por el fuerte gradiente en la señal de absorbancia proveniente del propio gradiente de concentración de la fase móvil y, en el caso del segundo, a una mayor cercanía de los ángulos de pureza y umbral en todas las concentraciones estudiadas. A estos mismos compuestos corresponden los mayores errores aleatorios en la estimación de la pendiente y la ordenada en el origen, los que deben ser comparados en términos relativos, debido a la diferente magnitud de las señales cromatográficas.

La linealidad es generalmente medida a través del coeficiente de correlación, sin embargo de valores de r cercanos a 1 pueden deducirse erróneamente relaciones de carácter lineal¹⁹. En la Tabla III se encuentran los valores de r y de linealidad expresada en términos relativos a la desviación estándar de la pendiente, como ha sido propuesto por Cuadros y col.¹⁵, para cada uno de los analitos, para los intervalos de concentración señalados en la Tabla II. De acuerdo a estos valores, se obtienen los menores grados de linealidad para captan y atrazina y a éstos también se asocian las mayores desviaciones estándar establecidas para un determinado nivel de concentración. Sin embargo, en todos los casos el

valor de r^2 es superior a 0,99. Por otra parte, según Cuadros y col.¹⁵⁾, un valor de $S_r(b) = 0,1/t$ es considerado como límite aceptable para calibración utilizando un método instrumental. En este caso, para $n = 12$, el valor límite de linealidad es 0,955, el que es claramente superado para todos los analitos estudiados. En relación con la repetibilidad, exceptuando los casos antes señalados, siempre se obtienen valores inferiores al 3%, los que pueden considerarse como muy bajos, atendiendo a los bajos niveles de concentración en que se ha realizado la experiencia de calibración.

TABLA II. Calibración del método cromatográfico ($R = a + b C$)

Pesticida	intervalo de concentración (ng/ μ L)	a	S_a	b	S_b	$S_{R/C}$
Mevinfos	0,26-1,04	-482	116	45839	162	163
Aldicarb	0,73-2,90	-738	161	12161	81	228
Simazina	0,045-0,180	-788	239	205429	1940	338
Lenacilo	0,59-2,36	-562	160	14620	100	226
Propoxur	0,29-1,16	-490	197	35610	250	279
Carbofurano	0,30-1,20	-335	155	30179	187	220
Metabenzotiazuron	0,093-0,372	-199	125	136686	490	176
Atrazina	0,057-0,285	747	823	203839	4355	1360
Carbaril	0,030-0,120	-171	181	448738	2202	256
Metalaxil	0,30-1,20	-508	175	33297	211	247
Diuron	0,15-0,60	-492	188	64400	471	265
Captan	1,51-6,05	-1180	476	5237	88	684
Diflubenzuron	0,18-0,72	-354	152	42642	294	193

R = señal instrumental; C = concentración; a = ordenada en el origen; S_a = desviación estándar de la ordenada en el origen; b = pendiente; S_b = desviación estándar de la pendiente; $S_{R/C}$ = desviación estándar de la regresión.

TABLA III. Linealidad y repetibilidad de la respuesta cromatográfica.

Pesticida	r	Linealidad ($1 - S_b/b$)	$S_r(c)$ (%)
Mevinfos	0,9999	0,996	1,0 (0,26 ¹)
Aldicarb	0,9998	0,993	1,9 (0,73)
Simazina	0,9996	0,991	2,7 (0,045)
Lenacilo	0,9998	0,993	2,0 (0,59)
Propoxur	0,9998	0,993	2,0 (0,29)
Carbofurano	0,9998	0,994	1,9 (0,30)
Metabenzotiazuron	0,9999	0,996	1,0 (0,093)
Atrazina	0,9970	0,979	8,6 (0,057)
Carbaril	0,9999	0,995	1,4 (0,030)
Metalaxil	0,9998	0,994	1,9 (0,30)
Diuron	0,9997	0,993	2,7 (0,15)
Captan	0,9988	0,983	6,4 (1,51)
Diflubenzuron	0,9998	0,993	2,1 (0,18)

¹Concentración para la cual fue estimada la precisión (ng/ μ L)

El establecimiento del límite de detección de un método resulta frecuentemente controvertido y existe una variada descripción de métodos, tanto empíricos como estadísticos, para su obtención^{18,19,24)}. Con fines de comparación, en este trabajo se han utilizado tres criterios. El primero de ellos, basado en la definición convencional, que lo establece como la concentración de analito que proporciona una señal igual a tres veces la desviación estándar de la señal del blanco, consistió en medir diez réplicas de la señal de una solución que contenía los trece analitos, en una cantidad cercana al límite de detección

esperado. Ello debido a la dificultad para medir señales de un blanco en un método cromatográfico. El segundo criterio empleado, derivado del análisis estadístico de la curva de calibración, tiene en cuenta el error estándar de la regresión, $S_{R/C}$. El tercer criterio consistió en considerar el límite de detección como un test de hipótesis en relación a la presencia de analito en una muestra problema. En éste, la hipótesis nula (H_0) es que no hay analito, el nivel de significación α es la probabilidad de rechazar H_0 cuando H_0 es cierta (α = probabilidad de falso positivo) y β es la probabilidad de aceptar H_0 cuando H_0 es falsa (β = probabilidad de falso negativo). El cálculo del límite de detección se realizó empleando el programa DETARCHI de Ortiz y Sarabia¹⁸⁾, a través del cual se construyen curvas características de detección empleando los datos provenientes de la experiencia de calibración. El límite de detección depende de α y β , de la sensibilidad del calibrado y también de la calidad de la regresión mediante el parámetro $S_{R/C}$. Para todos los analitos, este valor fue calculado para dos repeticiones y un valor de α y β de 0,05.

En la Tabla IV, se encuentran los límites de detección establecidos de acuerdo a los tres criterios, como también se entregan los valores de sensibilidad analítica; estos últimos obtenidos también a partir del análisis de la regresión y corresponden a la menor variación de concentración que el método analítico es capaz de discernir¹⁵⁾. El análisis de los datos permite observar que en la mayoría de los casos, los límites de detección que incorporan el error estándar de la regresión son mayores a los valores establecidos mediante el método convencional y también la contribución adicional al plantear el test de hipótesis de falso positivo y falso negativo. Sin embargo, el grado de las diferencias entre los menores valores y los mayores se encuentra dentro de un factor ≤ 2 , exceptuando captan (15), atrazina (9) y carbofurano (4). En algunos casos, en la literatura se señalan diferencias importantes para valores obtenidos utilizando

TABLA IV. Sensibilidad y comparación de límites de detección calculados por tres métodos diferentes

Pesticida	Sensibilidad ng	Límite de detección ng		
		Método Convencional	Modelo Regresión Lineal	$\alpha = P$ Falso + $\beta = P$ Falso -
Mevinfos	0,071	0,36	0,20	0,26
Aldicarb	0,375	0,85	1,07	1,32
Simazina	0,033	0,05	0,09	0,12
Lenacilo	0,310	0,63	0,88	1,10
Propoxur	0,157	0,26	0,44	0,56
Carbofurano	0,145	0,14	0,42	0,52
Metabenzotiazuron	0,026	0,10	0,07	0,10
Atrazina	0,133	0,05	0,38	0,44
Carbaril	0,011	0,02	0,03	0,04
Metalaxil	0,148	0,20	0,43	0,52
Diuron	0,082	0,15	0,24	0,30
Captan	2,611	0,60	7,5	9,2
Diflubenzuron	0,091	0,17	0,26	0,36

distintos criterios de cálculo del límite de detección. De la Colina y col.¹⁶⁾ comparan el sistema de cálculo convencional, con el modelo estadístico de regresión lineal usando los datos correspondientes a un sistema analítico completo de extracción de distintos analitos en muestras de agua, dando mejor cuenta este último de los valores estimados a partir de las pérdidas producidas en el proceso de extracción. Su²⁴⁾ comparó límites de detección empíricos y estadísticos empleando matrices reales y muestras de agua calidad reactivo, respectivamente. En este último caso, sin embargo, para una lista de 43 analitos se logró una gran concordancia entre los sistemas utilizados, estableciéndose las mayores discrepancias para analitos determinados por GC-ECD. Estas diferencias fueron atribuidas al uso de inadecuados niveles de concentración en el cálculo, en cambio, se consideró que debido a la buena concordancia entre los valores empíricos derivados de muestras reales y los estadísticos, estos últimos darían cuenta adecuadamente de efectos normales de matriz. Por último, si se extrapolan los límites de detección

obtenidos al caso de una muestra de agua concentrada 1000 veces y se inyectan 20 μL del extracto, se puede señalar que solamente en el caso de captan se supera el valor crítico de 100 ng/L, máximo nivel aceptado para cada plaguicida individual en la normativa para agua potable de la Unión Europea, fluctuando en el resto de los casos entre 66 ng/L para aldicarb y 2 ng/L para carbaril, al emplear el criterio más exigente de falso positivo y falso negativo. Por otra parte, si se tiene en cuenta la Norma Chilena Oficial 409/1, Of. 84, que establece los requisitos que debe cumplir el agua potable y que fija, entre otros parámetros, los límites máximos recomendados para algunos plaguicidas, los que abarcan varios órdenes de magnitud (entre 10 y 10.000 ng/L) se desprende que el intervalo de límites de detección obtenido también es adecuado a una norma que, para algunos plaguicidas, puede ser más exigente que la propia normativa europea.

CONCLUSIONES

Los parámetros obtenidos representan la calidad de la calibración del método analítico y son válidos como criterio de comparación entre diferentes técnicas para el mismo analito, diferentes condiciones instrumentales para una misma técnica o bien con los mismos parámetros obtenidos en muestras reales, donde se sumará la complejidad de la matriz y los métodos de tratamiento previo de la muestra. Por último, el método cromatográfico descrito, que incluye a compuestos de muy variada naturaleza química y física, como también a compuestos muy similares, como es el caso de atrazina y simazina, permitiría la incorporación de un número importante de otros compuestos con actividad plaguicida para su determinación en aguas, debido a su elevado poder de resolución y por sus posibilidades como herramienta de identificación y cuantificación a muy bajos niveles de concentración.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen al Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica por el financiamiento de este trabajo a través del Proyecto FONDECYT N° 1940301.

REFERENCIAS

1. C. Crespo, R.M. Marcé, F. Borrull. *J. Chromatogr. A*, **670**, 135 (1994).
2. T.A. Albanis, D. Hela. *J. Chromatogr. A*, **707**, 283 (1995).
3. C. de la Colina, F. Sánchez-Rasero, G. Cancela, E. Romero and A. Peña. *Analyst*, **120**, 1723 (1995).
4. C. Aguilar, F. Borrull, R.M. Marcé. *J. Chromatogr. A*, **771**, 221 (1997).
5. A. McLaughlin, B.S. Johnson. *J. Chromatogr. A*, **790**, 161 (1997).
6. J.L. Jiménez, Bernal, M^a. J. del Nozal, J. M^a. Rivera. *J. Chromatogr. A*, **778**, 289 (1997).
7. P. Bonifazi, E. Pierini, F. Bruner. *Chromatographia*, **44**(11-12), 595 (1997).
8. C. Aguilar, F. Borrull, R.M. Marcé. *J. Chromatogr. A*, **754**, 77 (1996).
9. A. Medvedovici, F. David, P. Sandra. *Talanta*, **44**, 1633 (1997).
10. B. Nouri, B. Fouillet, G. Toussaint, P. Chambon, R. Chambon. *Analyst*, **120**, 1133 (1995).
11. M.J. Sánchez-Martín, R. Delgado-Pascual, E. Iglesia-Jiménez, M. Sánchez-Camazano. *J. Chromatogr. A*, **754**, 295 (1996).
12. F. Sánchez-Rero, M.B. Matallo, G. Dios, E. Romero, A. Peña. *J. Chromatogr. A*, **355**, 799 (1998).
13. A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, P. Parrilla, M. Martínez Galera. *J. Chromatogr. A*, **778**, 183 (1997).
14. M. Martínez Galera, J.L. Martínez Vidal, A. Garrido Frenich, M.D. Gil García. *J. Chromatogr. A*, **778**, 139 (1997).
15. L. Cuadros, A.M. García, C. Jiménez, M. Román. *Anal. Lett.*, **26**, 1243 (1993).
16. C. de la Colina, A. Peña, M. Mingorance and F. Sánchez-Rasero. *J. Chromatogr. A*, **733**, 275 (1996).
17. M. Báez, M. Rodríguez, O. Lastra. *Bol. Soc. Chil. Quím.*, **42**, 457 (1997).
18. R. Cela. *Avances en Quimiometría Práctica*. Ed. Universidad de Santiago de Compostela (1994).

