

OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISIS DE PESTICIDAS UTILIZANDO EL PROGRAMA DE SIMULACIÓN DRYLAB[®]GC

Margarita M. Hincapié y
Mauren Zapata Niño.

Departamento de Química Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Antioquia, A. A. 1226, Medellín, Colombia

RESUMEN

El software DRYLAB[®]GC es un simulador que optimiza las separaciones por cromatografía gaseosa. El software predice las separaciones en función de las condiciones experimentales. Las separaciones cromatográficas pueden ser predichas isotérmicas o con temperatura programada. Con el software se optimizó la separación de una mezcla de pesticidas organofosforados y una piretrina (diazinon, dimetoato, metil paration, paration, malation, sulprofos y lambda cihalotrina)

ABSTRACT

The DRYLAB[®]GC Software is an optimizing simulator for gas chromatographic separation. The software foretells separations in function of experimental conditions. Chromatographic separations can be predicted with isothermic or programmed temperature.

By using the software, organophosphorus pesticides mixture and one pyrethrin have been optimized. (dimethoate, diazinon, malathion, methyl parathion, parathion, malathion, sulphrofos and lamnda cyhalotrine).

Palabras claves: pesticidas organofosforados, leche, cromatografía gaseosa

INTRODUCCIÓN

El uso cada vez más frecuente de pesticidas para el control de plagas en la agricultura ha creado la necesidad de realizar un estricto control sobre los residuos de estas sustancias, ya que estos pueden acumularse y alcanzar niveles tóxicos en el organismo.

Fisicoquímicamente los pesticidas se clasifican en organoclorados, organofosforados, carbamatos y un grupo misceláneo el cual incluye compuestos de diversos tipos químicos.

El análisis de pesticidas cubre distintas etapas (1): preparación de la muestra, extracción, limpieza o cleanup y por último identificación y cuantificación.

La identificación y cuantificación se realiza principalmente por medio de la cromatografía gaseosa (GC), ya que esta técnica cuenta con detectores selectivos y sensibles y con columnas que proveen alta eficacia en la separación de los pesticidas.

Cuando se aplica un método cromatográfico se selecciona la mejor columna, el detector más sensible y selectivo y las condiciones operacionales apropiadas para obtener la mejor separación o resolución de los compuestos a analizar. No obstante, es posible detectar contaminantes que pueden interferir en el análisis, estos pueden ser metabolitos y compuestos co-extraídos de la muestra, los cuales hacen compleja la cualificación de los analitos de interés. El resultado puede ser un cromatograma con un gran número de picos y posible solapamiento de los mismos.

El análisis de una muestra se inicia, tomando como punto de partida referencias citadas en los catálogos publicados por las casas fabricantes de columnas cromatográficas. Las condiciones raramente dan la resolución adecuada y el tiempo de análisis apropiado. Con frecuencia se deben ensayar varios programas de temperatura antes de lograr una buena separación; en el peor de los casos la separación de todos los picos no es posible.

PROGRAMA DE SIMULACION DRYLAB[®]G

Todo cromatografista sabe que la resolución (R_s), la cual se relaciona con la separación óptima de dos picos consecutivos, es el lazo de unión entre la teoría y la práctica; desde el punto de vista experimental es simplemente un número que caracteriza el grado de eficiencia de separación de picos; teóricamente es una ecuación (ec. 1) que implica parámetros del sistema cromatográfico:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{1+K}{K} \right) \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right) \quad \text{ec 1}$$

donde:

N = Número de platos teóricos

K = Factor de retención o factor de capacidad

α = selectividad de la columna.

Al analizar la ec.1 se podría pensar que aumentando la longitud de la columna se aumenta el número de platos teóricos de la misma. Sin embargo si se dobla la longitud de la columna el tiempo de corrido también se duplica y la resolución, R_s , únicamente mejora un 40%, lo cual podría no ser suficiente para separar todos los picos (2,3); por otra parte este cambio hace necesario ajustar parámetros tales como el flujo por columna y rata de programación, sin que en definitiva se mejore la separación.

Otra forma de aumentar la resolución es cambiando la selectividad (α), lo cual se logra cambiando la fase estacionaria. Esta estrategia puede mejorar la resolución, sin embargo, puede darse el caso que mejore la resolución de algunos picos y la de otros empeore.

El modo más eficiente de mejorar la resolución es variando la selectividad por ajuste de los factores de retención. Esto se logra seleccionando un programa de temperatura multirampas. Desafortunadamente estos ensayos consumen tiempo, debido a que el proceso implica varias

inyecciones y la respectiva evaluación de los efectos del cambio sobre la separación.

El software DRYLAB[®]GC (2,3) fue desarrollado para ayudar a la optimización de las separaciones por cromatografía gaseosa, utilizando la simulación por computadora. Permite predecir las separaciones cromatográficas de manera isotérmica o con temperatura programada como función de las condiciones experimentales. La aplicación del simulador requiere un conocimiento inicial de la dependencia de la retención de la muestra con la temperatura. Esta información se obtiene de dos corridos experimentales, los cuales deben ser programas lineales de temperatura, que difieran por un factor de tres o mas en la rata de programación. El tiempo de retención y el área de cada compuesto se importan al software DRYLAB[®] GC. Se requieren además otros datos:

1. Número de platos de la columna
2. Tiempo muerto de la columna en minutos
3. Temperatura inicial y final de la columna en grados centígrados(°C).
4. Rata de programación en grados centígrados por minuto (°C/min), para los dos corridos experimentales.
5. Número de picos que se esperan obtener.

Una vez importados los datos obtenidos, la separación puede ser predicha para otras temperaturas, ya sea en modo isotérmico o con temperatura programada.

En cromatografía gaseosa la retención isotérmica (factor de retención, k) se relaciona con la temperatura a través de la ec.2 (5):

$$\log k_i = A + \frac{B}{T} \quad \text{ec. 2}$$

donde A y B son constantes para un soluto dado.

T es la temperatura absoluta en grados kelvin.

El tiempo de retención, t_R , en un programa lineal de temperatura puede predecirse por medio de la ec. 3:

$$t = \int_{t_0}^{t_R} \frac{dt}{(1 + k_i)} \quad \text{ec. 3}$$

donde:

t: Tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra y el inicio del programa de temperatura.

t_0 : Es el tiempo muerto de la columna.

Las ec.2 y 3 permiten predecir la separación exacta en cromatografía gaseosa partiendo de condiciones experimentales, no obstante los cálculos pueden resultar bastante complejos y lentos. Con el fin de agilizar los cálculos se desarrolló un tratamiento aproximado para temperatura programada llamado LES (Linear-Strenght-Elution), el cual puede representarse por medio de la ec.4:

$$\log k = A' - B' T \quad \text{ec. 4}$$

Donde A' y B' son constantes para una combinación componente - columna. El software DRYLAB[®]GC se basa en las ec.3 y 4. Una vez entrados los datos de los corridos experimentales, el software predice la separación como una función de la temperatura isotérmica (ec.4) o de la temperatura programada (ec.3). El simulador también permite predecir cambios significativos en el espaciamiento de los picos cuando las tasas de programación son variadas. Esta información se detecta a partir de un mapa de resolución relativa (MRR), en el que se muestra la variación de la resolución del par de picos peor resueltos (picos críticos) en función de la tasa de programación o el tiempo de corrido.

El objetivo del presente trabajo es mostrar los resultados obtenidos al utilizar el software DRYLAB[®]GC en la optimización de la separación de una mezcla de pesticidas: paration, metilparation, diazinon, dimetoato, malation, lambda cihalotrina (cis y trans) y sulprofos. Estos pesticidas son algunos de los mas utilizados en los hatos lecheros del norte del departamento de Antioquia (4).

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentación

El cromatógrafo de gases utilizado en este estudio fue un Hewlett-Packard 5890 A, serie II Plus, equipado con controlador electrónico de presión (EPC), inyector split-splitless y detector de captura de electrones (ECD). Se utilizó el modo de inyección splitless. El puerto de inyección y

el detector se mantuvieron a temperaturas de 270°C y 300°C respectivamente. Se utilizó una columna cromatográfica RTX-35 (35% difenil-65% dimetilpolisiloxano) de 30 m x 0.53 mm ID y 0.5 m de espesor. El gas portador fue helio y nitrógeno como gas auxiliar. El flujo por columna fue de 5 ml/min. Se empleó como base de datos el software HP3365 Serie II Chemstation.

Reactivos

Se utilizaron solventes grado pesticida: hexano, metanol y acetona. Los estándares de pesticidas de alta pureza se adquirieron de ChemService.

Software

El software de computadora DRYLAB[®] GC (LC Resources) se empleó para la predicción de parámetros cromatográficos y las separaciones en la columna capilar.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se efectuaron dos corridos experimentales a temperatura de columna de 100°C a 300°C y tasas de programación de 5°C/min y 20°C/min.

En la figura 1 aparece el cromatograma obtenido a una tasa de 5°C/min. Las bandas esperadas son siete, no obstante, sólo se detectan seis picos; el etilparation y el malation presentan los mismos tiempos de retención (bandas 4 y 5) convirtiéndose de esta manera en el par de picos críticos. Por otra parte se observa que el tiempo de análisis es relativamente largo, 32 minutos.

El aspecto del cromatograma cambia cuando la rata de programación es de 20°C/min, figura 2. El par crítico mejora en forma apreciable su resolución y el tiempo de análisis se reduce a aproximadamente la mitad.

El mapa de resolución relativa (MRR), figura 3, permite observar mas de cerca la variación de la resolución del par crítico en función de la rata de programación. La resolución varia desde cero ($R_s=0$) para ratas de programación menores de 3°C/min hasta dos con seis ($R_s=2.6$) a 18°C/min.

Teniendo en cuenta que la abscisa está en escala logarítmica y que la lectura puede estar sujeta a errores, el software permite obtener una tabla de rata de programación y resolución mínima del par crítico y el tiempo de retención del último pico, tabla 1. La resolución óptima se alcanza a 18°C/min, notándose una leve disminución de la misma con un aumento en la rata de programación, sin embargo esta disminución no es significativa frente a la mejora que se obtiene en el tiempo de análisis.

Margarita M. Hincapiá, Maurin Zapata Niño.

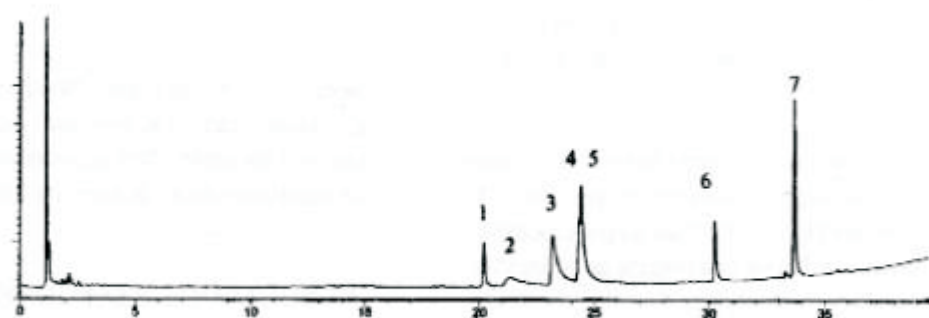


Figura 1. Cromatograma del estándar a concentración 0.5 ppm corrido a 5°C/min 1-diazinon, 2-dimetoato, 3-metilparation, 4-malation, 5-etilparation, 6- Sulprofos Estándar Interno, 7-lambda cihalotrina..

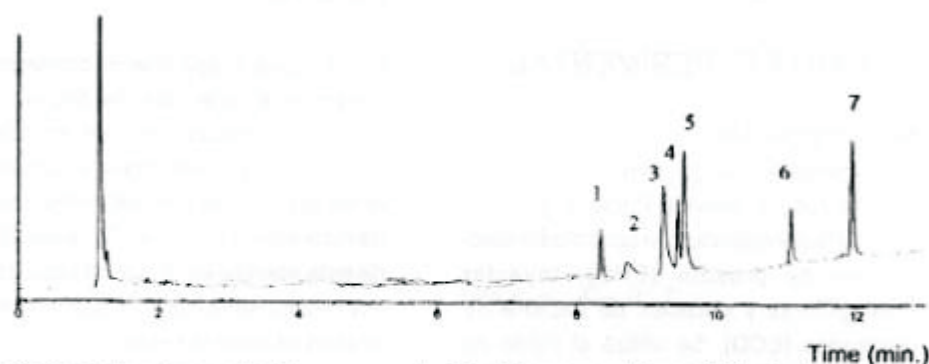


Figura 2. Cromatograma estándar a concentración 0.5 ppm corrido a 20°C/min

A partir de los datos brindados por el simulador, se escogió el siguiente programa de temperatura para el análisis de la mezcla de pesticidas:

$T_1 = 45^\circ\text{C}$ $t_1 = 2 \text{ min}$ $r_1 = 35^\circ\text{C}/\text{min}$
 $T_2 = 200^\circ\text{C}$ $t_2 = 0 \text{ min}$ $r_2 = 10^\circ\text{C}/\text{min}$
 $T_3 = 240^\circ\text{C}$ $t_3 = 0 \text{ min}$ $r_3 = 25^\circ\text{C}/\text{min}$
 $T_4 = 290^\circ\text{C}$ $t_4 = 2 \text{ min}$

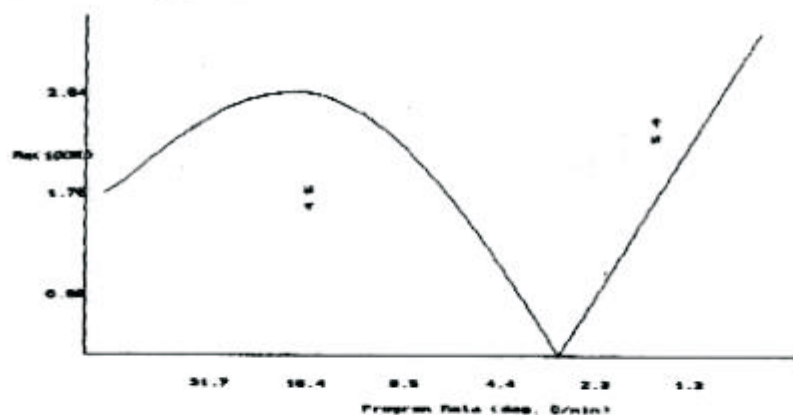


Figura 3. Mapa de resolución relativa (MRR)

Tabla 1. Resolución y tiempo de retención en función de la velocidad de calentamiento de la columna

Rata de programación $^\circ\text{C}/\text{min}$	Resolución mínima R_s	Tiempo de retención del último pico, min
18.0	2.63	11.2
18.5	2.62	11.0
19.0	2.61	10.7
19.5	2.6	10.5
20.0	2.59	10.3
20.5	2.58	10.1
21.0	2.56	10.0
21.5	2.55	10.0
22.0	2.54	10.0
22.5	2.52	9.00

La temperatura inicial de 45°C se relaciona con el efecto solvente que debe producirse cuando se utiliza el modo de inyección splitless (sin división de flujo). Este mecanismo de reconcentración permite que los picos obtenidos sean estrechos manteniéndose así la alta eficiencia de las columnas capilares. La rata de calentamiento, r_1 , se ejecuta con el fin de llevar los componentes de la muestra rápidamente al estado gaseoso y de esta manera iniciar el proceso de separación cromatográfico. La optimización en la separación se refleja en el segmento de temperatura de 200 a 240°C. A temperatura de 290°C (T_2), eluye rápidamente la cihalotrina (cis y trans) y de

esta manera se acorta el tiempo de análisis.

La tabla 2 muestra los tiempos de análisis predichos por el simulador y los tiempos obtenidos experimentalmente. Debe hacerse notar que los dos minutos de diferencia en los tiempos experimentales corresponden al tiempo que permanece cerrada la válvula de división de flujo para el efecto solvente.

Las figuras 4 y 5 muestran los cromatogramas simulado y experimental, teniendo en cuenta la programación de temperatura.

Margarita M. Hincapié, Maureen Zapata Niño.

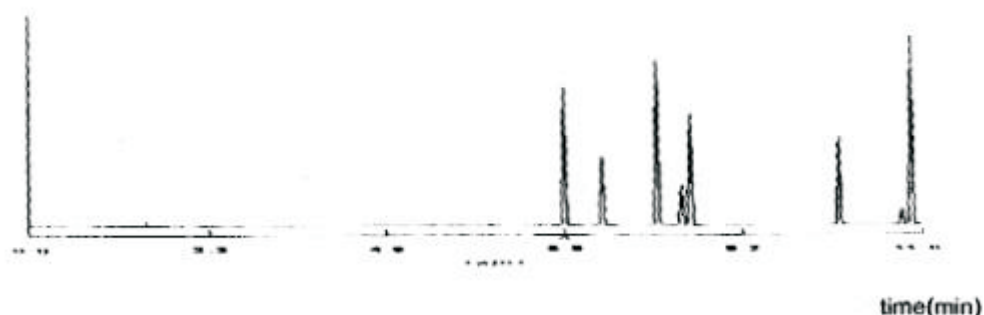


Figura 4. Cromatograma del estándar a concentración 0.5 ppm corrido simulado

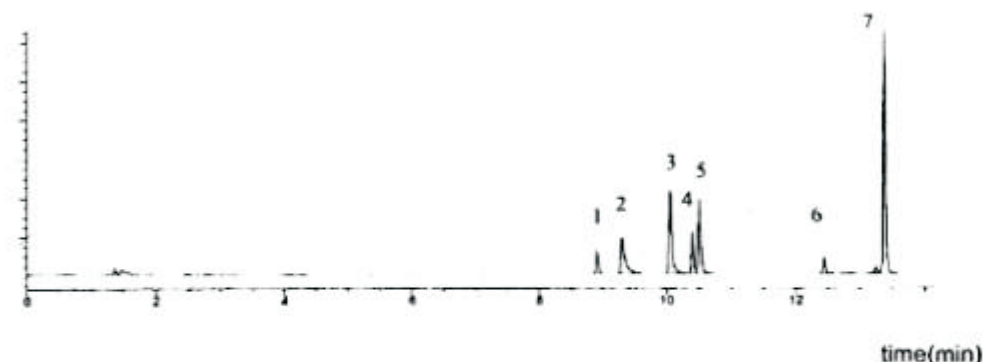


Figura 5. Cromatograma de estándar a concentración 0.5 ppm corrido experimental

Tabla 2 Tiempos de retención teóricos y experimentales.

Compuesto	T _R simulado (min)	T _R experimental(min)	%Error
Diazinon	6.93	8.88	0.73
Dimetoato	7.42	9.27	2.06
Metilparation	8.13	10.03	1.25
Malation	8.45	10.37	0.96
Etilparation	8.57	10.48	1.06
Sulprofos	10.48	12.43	0.48
Cis-Cialotrina	11.29	13.24	0.44
Trans-cialotrina	11.42	13.36	0.53
			promedio=0.94

De la tabla 2 se observa que el porcentaje de error promedio es menor del 1%. En el caso del dimetoato que presenta un porcentaje de error relativo del 2%, se considera que la naturaleza química de esta sustancia da lugar a un pico ancho y distorsionado lo cual influye decididamente en la medición exacta y precisa del tiempo de retención del mismo.

CONCLUSIONES

El uso del simulador DRYLABRGC permitió encontrar el programa de

temperatura apropiado para separar una mezcla de siete pesticidas. El porcentaje de error en los tiempos de retención es menor del 1%.

El software es relativamente fácil de usar pues sólo se requieren dos corridos experimentales; por otra parte cada simulación requiere sólo unos segundos y de la misma manera se obtiene el mapa de resolución. La rápida velocidad de procesamiento permite realizar una cuidadosa exploración de todas las opciones de separación y selecciona la mas adecuada para el problema propuesto.

BIBLIOGRAFIA

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food analysis general techniques, additives, contaminants and composition. Manual of food quality control. Rome 1986.
2. Bautz D.E and Dolan J.W. Computer Assisted Optimization of Temperature-Programmed Gas Chromatographic separations. LC Resources Inc., 2930 Camino Diablo #110, Walnut Creek, CA 94596, 1990
3. Bautz D.E., Dolan J.W and Snyder L.R. Computer simulation as an aid in method development for gas chromatography. I. The accurate prediction of separation as a function of experimental conditions. LC Resources Inc. Walnut Creek, CA 94596, 1990
4. Yepes, F. C. Contribución al conocimiento de la situación actual del manejo de los pastos de clima frío del Departamento de Antioquia. Medellín, 1993.

Fecha de Recepción: Agosto de 1998

Fecha de Aceptación: Junio de 1999