

DETERMINACIÓN DE ATRAZINA Y ALGUNOS DE SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN SUELOS Y AGUA POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Israel Olarte, Jairo Arturo Guerrero, Cilia Fuentes***

Recibido Agosto 18/99 – Aprobado Diciembre 21/99

Keywords: Atrazine, deetilatrazine, deisopropilatrazine, Solid phase extraction (SPE).

RESUMEN

En este estudio se describe la validación de un método analítico para la determinación simultánea de atrazina (AT) y sus metabolitos deetilatrazine (DEA) y deisopropilatrazina (DIA) en agua de irrigación y suelo de uso agrícola. Las muestras de campo fueron tomadas de un ensayo realizado en el municipio de Saldaña, Tolima (Colombia), en una parcela de 330 m² cultivada comercialmente con maíz, a la cual se le aplicó atrazina en una dosis de 2,9 kg. i.a/ha. Estas muestras fueron recolectadas durante un tiempo de 90 días después de la aplicación del herbicida.

La determinación cuantitativa se llevó a cabo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), con detección ultravioleta usando como fase móvil un gradiente compuesto por acetonitrilo-agua y una columna Licrospher RP-18 de 125 x 4 mm, 5 µm.

En agua, los compuestos fueron aislados y concentrados por extracción en fase sólida; en suelo se hizo extracción con metanol y limpieza con diclorometano – buffer de Fosfato pH 10,0 y concentración 0,01M.

Las curvas de calibración fueron lineales en el rango de concentración de 6 – 30 µg/L en agua para deetilatrazine, deisopropilatrazina y atrazina y de 30 - 200 µg/kg en suelo. El método es específico y sensible con unos límites de detección de 0,6 µg/L para DEA y 0,7 µg/L para DIA y AT en agua, y 2,0 µg/kg para DIA, 2,3 µg/kg para DEA y AT en suelo. La recuperación fue determinada tanto en las muestras de agua como de suelo, obteniéndose porcentajes de recuperación entre 80 – 100 % en agua y entre 45 – 65 % en suelo. La DIA y la DEA no fueron detectados en las muestras de agua ni de suelo en ninguno de los muestreos. La atrazina fue detectada en el agua de drenaje hasta los 33 días (5,8 µg/L), después de la aplicación del herbicida; en el suelo fue detectada hasta por dos meses después del tratamiento con el herbicida en el campo en concentraciones de 97 µg/kg y 42 µg/kg en el primer y segundo mes respectivamente.

* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. AA 14490, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.

** Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Santafé de Bogotá D.C., Colombia.

ABSTRACT

This study describes the validation of the analytical method for the simultaneous determination of atrazine (AT) and its metabolites deisopropylatrazine (DIA) and deethylatrazine (DEA) in irrigation water and agricultural soil. Field samples were collected in a corn field located in Saldaña, (Tolima, Colombia) and treated with 2.9 kg. a.i /ha of atrazine. Samples were collected for three months starting after herbicide treatment.

The quantitative determination of the compounds of interest was carried out by HPLC with UV detection in a Lichrospher RP-18 column of 125 x 4 mm, 5 µm, using a gradient of acetonitrile-water as mobile phase.

The compounds were extracted from the water matrix and concentrated using Solid Phase Extraction (SPE). From the soil matrix the compounds were extracted with methanol followed by a clean-up with dichloromethane and buffer phosphate 0.01 M, pH 10.0.

Calibration curves were linear over a concentration range of 6 µg/L- 30 µg/L in water and 30 µg/kg - 200 µg/kg in soil. The method is specific and sensitive with a detection limit of 0.6 µg/L for DEA, 0.7 µg/L for DIA and AT in water, 2.0 µg/kg for DIA, 2.3 µg/kg for DEA and AT in soil.

Recovery experiments were performed with irrigation water samples yielding average recoveries between 80-100% and performed on soil samples yielding average recoveries between 45-65%. DIA and DEA were not detected in neither water nor soil field samples, but atrazine was

found in water after the first month following herbicide application at a concentration level of 5,8 µg/L, and in soil at a concentration level of 97 µg/kg. At the second month, no atrazine was found in water but 42 µg/kg were detected in soil.

INTRODUCCIÓN

La atrazina (2-cloro - 4 - etilamino - 6 -isopropilamino - S- triazina) es un herbicida s- triazinico de uso pre y posemergencia, para el control de malezas dicotiledoneas y algunas gramíneas en cultivos de maíz, caña de azúcar y sorgo (1). Se empezó a comercializar desde la década de los años 60 aplicándose muchas veces en altas dosis e indiscriminadamente, lo que ha causado contaminación de suelos y aguas, particularmente de aguas potables en otros países (2, 3).

Una vez el compuesto se encuentra libre en el ambiente, sufre reacciones de tipo biológico y químico; así, las reacciones de tipo biológico llevan a la formación de deisopropilatrazina y deetilatrazina, y las de tipo químico a la formación de hidroxiatrazina, siendo estos los principales productos en la primera etapa de degradación (2,3,4).

Los compuestos deisopropilatrazina y deetilatrazina conservan en algún grado, las propiedades fitotóxicas del compuesto parental, por tanto se hace necesario su determinación en suelos y aguas de uso agrícola, para así, planear correctamente la rotación de cultivos sensibles sin que estos puedan sufrir sus efectos nocivos.

En Colombia, no existe una legislación específica que regule las concentraciones de los plaguicidas (Máxima Con-

centración Permisible) en el suelo. En agua potable, la máxima cantidad permisible de plaguicidas esta regulada por el decreto 475 de 1998 (artículos 11-15) dictada por el Ministerio de Salud.

Por tanto, los objetivos del presente trabajo fueron: Evaluar los residuos del herbicida atrazina y algunos de sus principales productos de degradación en suelos y aguas de uso agrícola, por medio de cromatografía líquida de alta resolución.

Validar la metodología que incluye extracción, limpieza, y determinación por cromatografía líquida de alta resolución, con detección ultravioleta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Instrumentación y reactivos. Para la realización de este trabajo se utilizó el siguiente instrumental: equipo para cromatografía líquida de alta resolución compuesto por: bomba cuaternaria LC-250 PERKIN-ELMER, un inyector manual compuesto por una válvula Rheodyne de seis puertos con un loop de 20 μ L; detector ultravioleta-visible LC-295 PERKIN-ELMER, software Turbochrom versión 4.0 1994. sistema desionizador de agua, milli-Q, Millipore, solventes calidad HPLC, Mallinckrodt, estándares certificados de alta pureza de cada uno de los compuestos en estudio. (British Greyhound Chromatography and allied chemicals, England); reactivos grado analítico.

Condiciones cromatográficas. Fase móvil: Se usó un Gradiente con una mezcla de acetonitrilo-agua, el cual inició con 30% de acetonitrilo durante 1,5 minutos e incrementó al 60% en acetonitrilo en 4 minutos, manteniendo estas condiciones por

dos minutos y regresando luego a las condiciones iniciales en tres minutos. Flujo de la fase móvil 1 mL/min. Columna Lichrospher RP-18, 125 x 4 mm., 5 μ m. Tiempo de análisis 11 minutos. Longitud de onda 218 nm. Volumen de inyección 20 μ L. Temperatura ambiente.

Toma de las muestras de campo. Las muestras se tomaron en una parcela de 330 m² cultivada comercialmente con maíz localizada en la sede de usuarios del distrito de riego del río Saldaña (USO-SALDAÑA). Este muestreo se llevo a cabo de acuerdo con un modelo sistemático al azar en cuadrados permanentes, teniendo en cuenta el sitio, tamaño de la parcela y tiempo de muestreo.

La aplicación del herbicida se realizó después de la siembra del maíz, pero antes de su emergencia, en una dosis de 2,9 Kg. i.a/ha. Las muestras de agua se tomaron en cuatro sitios equidistantes a lo largo de un canal que recoge las aguas de drenaje luego del riego de la parcela, se mezclaron para obtener dos muestras finales a las cuales se les hizo el proceso de extracción y determinación cromatográfica. Las muestras de suelo se tomaron en cuatro sitios dentro de la parcela a una profundidad de 0-20 cm del perfil del suelo.

El muestreo se llevó a cabo según el siguiente cronograma:

Muestreo

- 1 Toma de muestra blanco Día 1
- Aplicación de atrazina al suelo
- 2 3 días después del tratamiento con el herbicida

- 3 33 días después del tratamiento con el herbicida
- 4 66 días después del tratamiento con el herbicida
- 5 96 días después del tratamiento con el herbicida

Procedimientos de extracción y limpieza. La metodología se realizó con base en algunos trabajos diseñados previamente (2,4,5,6).

AGUA

Consistió en extracción en fase sólida en la siguiente forma: Se prepararon en el laboratorio cartuchos con 500 mg de fase estacionaria RP-18; cada cartucho se acondicionó con 2 mL de metanol seguido por 2 mL de agua desionizada, se tomó 50 mL de las muestras de agua de campo previamente filtrada y regulada a pH 5,8 y se pasó a través del cartucho. El proceso de lavado se realizó con 1 mL de solución agua: acetonitrilo: metanol (6:1:1). El proceso de elución se llevó a cabo con 1 mL de metanol; de este volumen se tomaron 20 μ L para inyectar en el sistema cromatográfico.

SUELO

La metodología comprendió dos etapas: extracción y limpieza. El proceso de extracción se llevó a cabo a partir de 10 g de suelo al cual se le adicionó 20 mL de metanol, se agitó durante una hora y luego se filtró lavando con 10 mL de metanol, se recogió el filtrado para realizar el proceso de limpieza de la siguiente forma: Se evaporó hasta sequedad en un rotaevaporador a una temperatura de 35°C,

luego se disolvió el residuo con 5 mL de diclorometano y se realizó una partición líquido-líquido con 5 mL de buffer de fosfato pH 10,0 y concentración 0,01M; se tomó la fase orgánica y se llevó a sequedad en una atmósfera de nitrógeno; finalmente se redisolvió el residuo en 1 mL de metanol; de este volumen se tomaron 20 μ L para inyectar en el sistema cromatográfico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Separación cromatográfica. Mediante la inyección de patrones de cada uno de los compuestos se encontró una adecuada separación para los tres compuestos con tiempos de retención de 1,8 min, 2,3 min y 5,6 min para deisopropilatrizona, deetilatrizona y atrizona respectivamente. La Figura 1 muestra el cromatograma correspondiente a la separación de los tres compuestos.

Validación del método analítico. Una vez se determinaron las condiciones cromatográficas, procedimientos de extracción adecuados, se validaron los diferentes parámetros del método (CLAR): selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación (7,8,9).

Selectividad: Se inyectaron soluciones obtenidas a partir del tratamiento de las muestras blanco de cada una de las matrices, no se encontraron señales que interfirieran en los tiempos de retención de los compuestos de interés.

Linealidad: Mediante la adición de patrones de cada uno de los compuestos a los blancos de suelo y agua y de su posterior extracción y determinación cromatográfica

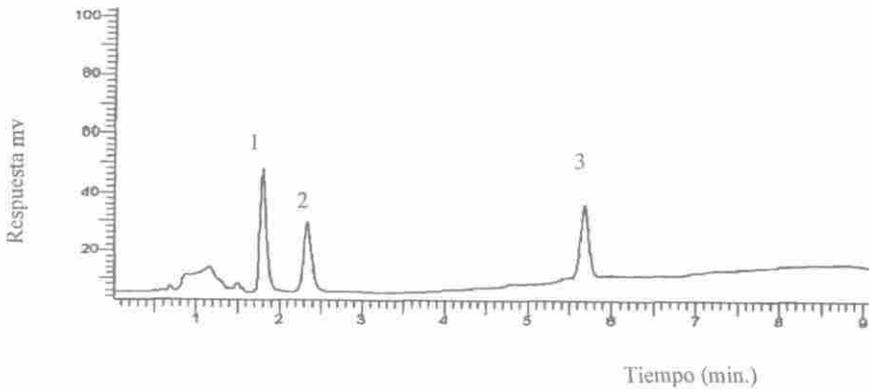


Figura 1. Cromatograma de los compuestos deisopropilatrizona (1), deetilatrizona (2), atrazina (3).

se construyeron curvas de calibración en el rango de 6,0 $\mu\text{g/L}$ - 30 $\mu\text{g/L}$ para agua y 30 $\mu\text{g/kg}$ -200 $\mu\text{g/kg}$ para suelo.

En los dos casos se encontró una alta correlación entre la concentración de los compuestos y la respuesta del método con coeficientes de correlación lineal (r) mayores de 0,998 con un límite de confianza del 95%.

La Figura 2 muestra una curva de calibración para atrazina en agua.

Precisión: Se evaluó para dos concentraciones, una a un nivel bajo y otra a un nivel alto dentro de la curva de calibración. Se realizó el proceso de extracción, limpieza y determinación cromatográfica para cada concentración y cada compuesto (5 réplicas), el mismo día (repetibilidad); ésta se expresó matemáticamente como el coeficiente de variación. Se encontró que el coeficiente de variación fue mayor al trabajar con las muestras de suelo, lo cual es normal ya que ésta es una matriz más compleja y además, involucra más

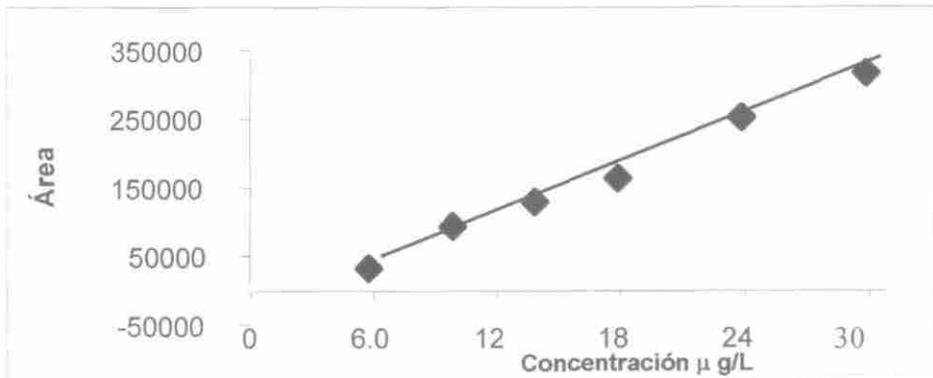


Figura 2. Curva de calibración para atrazina en agua.

pasos en el proceso de extracción y limpieza. El coeficiente de variación fue del orden de 4-9% para agua y de 7-13% para suelo. La Tabla 1 contiene los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión del método, en las dos matrices.

que considera extracción y limpieza líquido-líquido, los porcentajes de recuperación fueron 51,2% para deisopropilatrizona, 50,5% para deetilatrizona y 61,5% para atrazina. Por medio de la prueba de Cochran se determinó la no influencia de

Tabla 1. Evaluación de la precisión del método, para la determinación de deetilatrizona, deisopropilatrizona y atrazina en agua y suelo de uso agrícola.

AGUA DE DRENAJE						
	Deisopropilatrizona		Deetilatrizona		Atrazina	
	4 µg/L	18 µg/L	4 µg/L	18 µg/L	6 µg/L	30 µg/L
\bar{X} (área)	52465	31931	37269	171962	66879	282780
S	4679	8579	3119	5877	4351	7513
CV	9%	4%	8%	3%	7%	3%
n	5	5	5	5	5	5
SUELO DE USO AGRÍCOLA						
	Deisopropilatrizona		Deetilatrizona		Atrazina	
	50 µg/kg	140 µg/kg	50 µg/kg	140 µg/kg	50 µg/kg	140 µg/kg
\bar{X} (área)	91784	207347	32503	125195	56652	130730
S	9248	26280	2999	8543	7413	8863
CV	10	13	9	7	13	7
n	5	5	5	5	5	5

\bar{X} promedio; S desviación estándar; CV. Coeficiente de variación; n número de replicas.

Exactitud: Este parámetro fue evaluado como el porcentaje de recuperación a tres niveles de concentración distintos dentro del rango de la curva de calibración. La Figura 3 ilustra los porcentajes de recuperación para cada uno de los compuestos en las dos matrices. Como puede verse, éstos son menores para el suelo, lo cual es normal si se tiene en cuenta la complejidad de la matriz, las interacciones entre los compuestos y la matriz, y los pasos involucrados en el procedimiento de extracción y limpieza.

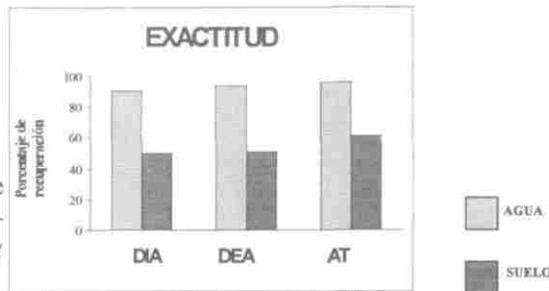
En agua los porcentajes de recuperación fueron 89% para deisopropilatrizona, 98,6% para deetilatrizona y 101% para atrazina. Para suelo, procedimiento

la concentración en el porcentaje de recuperación en las dos matrices. La figura 3 muestra los porcentajes de recuperación de cada uno de los compuestos en cada una de las matrices.

Límites de detección y cuantificación:

Se calcularon a partir de las definiciones dadas por la IUPAC (10); los valores obtenidos fueron menores en el agua que en el suelo. Los límites de detección determinados en agua fueron 0,7 µg/L para deisopropilatrizona y atrazina y 0,6 µg/L para deetilatrizona. Los valores que se encontraron en suelo fueron 4, 13, y 11 µg/kg para deisopropilatrizona, deetilatrizona y atrazina respectivamente.

Figura 3. Porcentaje de recuperación de los compuestos en agua de drenaje y suelo cultivado con maíz.



Los límites de cuantificación en agua fueron 2,3 $\mu\text{g/L}$ para deisopropilatrazina y atrazina y 2,0 $\mu\text{g/L}$ para deetilatrastazina; en el caso del suelo fueron 12, 43, 37 $\mu\text{g/kg}$ para deisopropilatrazina, deetilatrastazina y atrazina respectivamente. De acuerdo con estos valores se puede decir que el método presenta unos límites de detección adecuados, ya que permite detectar cantidades bastante bajas, incluso menores que la cantidad máxima permitida estipulada por la EPA (Environmental Protection Agency), para atrazina en agua potable, la cual es de 20 $\mu\text{g/L}$.

Análisis de las muestras de campo.

En las muestras de agua de drenaje se encontró el compuesto parental (atrazina) hasta un mes después de la aplicación, en una concentración de 5,8 $\mu\text{g/L}$. En las muestras de suelo se encontró durante dos meses después de la aplicación en una concentración de 97 $\mu\text{g/kg}$ en el primer mes y de 42 $\mu\text{g/kg}$ en el segundo mes. Los valores correspondientes a el sitio 4 (Sm4), no se tuvieron en cuenta para encontrar el promedio puesto que presenta una desviación muy alta que es atribuida a un traslape ocurrido

Tabla 2. Resultados del análisis de atrazina en las muestras de campo.

AGUA DE DRENAJE ($\mu\text{g/L}$)												
	3 d.d.t.		33 d.d.t.		66 d.d.t.							
	Sitio1-2	Sitio3-4	Sitio 1-2	Sitio3-4	Sitio1-2	Sitio3-4						
\bar{X} (área)	8,3	8,3	5,9	5,8	n.d	n.d						
S	0,54	0,54	0,68	0,21								
CV %	6,5	6,5	11,5	3,6								
n	9	9	9	9								
SUELO CON CULTIVO DE MAIZ ($\mu\text{g/kg}$)												
	3 d.d.t.				33 d.d.t.				66 d.d.t.			
	Sm1	Sm2	Sm3	Sm4	Sm1	Sm2	Sm3	Sm4	Sm1	Sm2	Sm3	Sm4
\bar{X} (área)	155	184	137	470	86	107	98	251	42	42	n.d	47
S	17,3	10,5	41,8	65,3	12,2	14,4	15,3	90,2	2,66	---		7,7
CV %	11,0	5,7	30,0	14,0	14,0	13,0	16,0	36,0	6,3	---		16
n	4	6	4	5	6	5	5	6	6	2		5

\bar{X} : Promedio; S: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; n Número de réplicas; d.d.t días después del tratamiento; Sm Sitio de muestreo.

al hacer la aplicación del herbicida en campo. Los productos de degradación deisopropilatrizona y deetilatrizona no se detectaron en ninguna de las muestras de campo, tanto de agua como de suelo a ninguno de los tiempos de muestreo. La Tabla 2 contiene los resultados del análisis de las muestras de campo con sus respectivos coeficientes de variación.

En la Figura 4 se presenta uno de los cromatogramas obtenidos en el análisis de las muestras de campo y a la vez se compara con un cromatograma obtenido a partir de una muestra blanco de cada una de las matrices.

La metodología realizada comprende dos formas de extracción: extracción

en fase sólida para la atrazina y sus productos de degradación deetilatrizona y deisopropilatrizona, a partir de muestras de agua de drenaje y extracción y limpieza basada en partición líquido-líquido para los mismos compuestos a partir de muestras de suelo. Los dos procesos de extracción permiten obtener soluciones libres de interferentes en la determinación de dichos compuestos. Dicha metodología es simple y además requiere poco tiempo para su ejecución (1 hora para agua y 2 horas para suelo aproximadamente) y mínimas cantidades de solventes. La reproducibilidad de los resultados, expresada matemáticamente por los bajos valores en los coeficiente de variación, muestra que la metodología es adecuada para la determinación cuantitativa

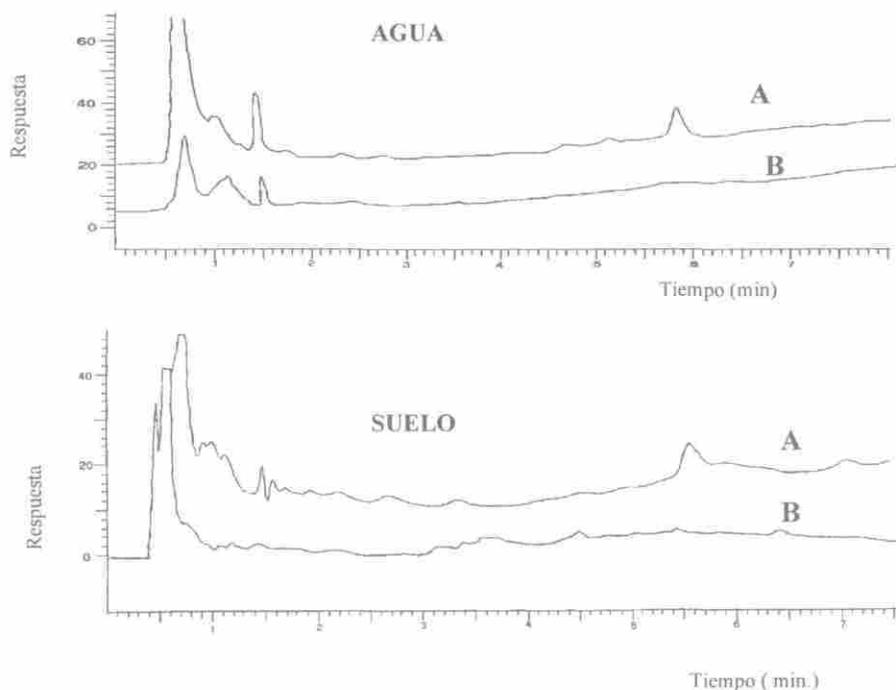


Figura 4. Cromatogramas obtenidos en el análisis de las muestras de campo. A) muestras obtenidas después del tratamiento con el herbicida. B) muestra blanco.

y simultánea de atrazina y sus productos de degradación, a partir de muestras de suelo y agua de drenaje.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia, sede Santafé de Bogotá y a la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA Viena, Austria) por la colaboración y financiación suministrada para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Quintanilla, F.C., Torres G.L., *Fundamentos de malas hierbas y herbicidas*, 1991, ediciones mundiprensa: Madrid, p 27, 120.
2. Vera P., Stulik, K. And Prihoda, M.(1998), High- performance liquid chromatography of s-triazines and their degradadation products using ultravioletphotometric and amperometric detection. *J. Chromatogr.* **442** 147.
3. Siron, J.G., Frank, R., and Sawyer, T. (1973), Residues of atrazine, Cyanazine and their phytotoxic metabolites in clay loam. *J. Agric. Food Chem.* **21** (6) 10.
4. Steinheimer, T.R. (1993), HPLC Determination of atrazine and principal degradates in agricultural soils and associated surface and ground water. *J. Agric. Food. Chem.* **41** (41) 588.
5. Pácáková, V.; Stulik, K.; Jiskra, J. (1996), High - performance separation in determination of triazine herbicides and their residues. *J. Chromatogr.* **754** 17.
6. Mersie, W.; Seybold, C. (1996), Adsorption and Desorption of Atrazine, Deethylatrazine, Deisopropylatrazine, and Hydroxyatrazine on Levy Wetland Soil. *J. Agric. Food Chem.* **44** 1925.
7. Quattrocchi, O., Abelaira de Andrizzi, S. y Laba, R. F. *Introducción a la HPLC: Aplicación practica*. 1992, Artes gráficas Farro: Buenos Aires, p 211.
8. Ospina de Nigrinis, L.S. (1994), El método de análisis para los estudios de estabilidad y de biodisponibilidad de medicamentos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - farmacéuticas*, **22** 7.
9. SP XXIII 1225 Validation of compendial methods , 1993.
10. Long, G.; Winefordner, J. 1983, Limit of Detection a closer look at the UPAC Definition. *Anal. Chem.* **55** (7) 712 A.