



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

***Máster en Residuos de Plaguicidas y Contaminantes.
Control Alimentario y Ambiental***

**ESTUDIO DE LOS LÍMITES DE
CONFIRMACIÓN EN
CROMATOGRAFÍA DE GASES-
ESPECTROMETRÍA
DE MASAS EN TÁNDEM**

Adelaida Martínez Casas

TRABAJO FIN DE MÁSTER

La presente memoria ha sido presentada por Adelaida Martínez Casas para la obtención del Título del Máster “Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental”, dentro del Programa de Másteres Universitarios Oficiales, habiendo sido dirigida por el Dr. Francisco Javier Arrebola Liébanas.

Almería, Noviembre de 2011

VºBº del tutor:

La alumna:

Fdo.: **Francisco Javier Arrebola Liébanas**
Profesor Titular del Departamento de
Hidrogeología y Química Analítica
Universidad de Almería

Fdo.: **Adelaida Martínez Casas**

INDICE

I. PRESENTACIÓN.....	4
II. MEMORIA CIENTÍFICA.....	11
1. Objeto y campo de aplicación	12
2. Introducción	13
2.1. Planteamiento del problema	14
2.2. Plaguicidas objeto de estudio	23
2.3. Relación señal-ruido	25
III. EXPERIMENTAL	27
1. Reactivos y disolventes	28
2. Instrumentación	28
3. Condiciones cromatográficas	29
IV. RESULTADO Y DISCUSIÓN	31
1. Caracterización espectrométrica de los compuestos objeto de estudio.....	32
2. Cálculo de los LOC en función de la relación señal-ruido.....	37
3. Cálculo de los LOC en función de las abundancias relativas de los iones de confirmación	46
V. CONCLUSIONES	51
VI. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO	53
VII. REFERENCIAS	55

I. PRESENTACIÓN

El Máster “*Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental*”, organizado por el Área de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Almería, se estructura en cinco módulos. Los tres primeros módulos son de contenido fundamentalmente teórico, el cuarto de carácter teórico-práctico, y finalmente el módulo cinco corresponde al desarrollo, redacción y exposición del Trabajo Fin de Máster.

A continuación se describe brevemente el contenido de dichos módulos durante los cursos académicos en que los cursé (2009-2010 y 2010-2011).

Módulo I: Plaguicidas (curso 2010-2011)

Éste módulo consta de 4 asignaturas:

- Plaguicidas. Aplicaciones y tendencias (3 créditos).
- Políticas de Seguridad Alimentaria (3 créditos).
- Registro de Plaguicidas (3 créditos).
- Formulaciones de plaguicidas. Liberación controlada (3 créditos).

En el desarrollo del mismo hemos adquirido conocimiento de las normas reguladoras del control de residuos y contaminantes en alimentos a nivel internacional, nacional y autonómico. Así mismo, se estudiaron las propiedades físico-químicas de los principales plaguicidas, estructuras y funcionalidad, así como su aplicación como tratamientos fitosanitarios en cultivos intentando en todo caso minimizar los riesgos medioambientales y sobre la salud de las personas.

Por otro lado, se han estudiado los objetivos y procedimientos para el registro de plaguicidas dentro del marco normativo y administrativo español y europeo (propuesta REACH, *Registration Evaluation and Authorization of Chemicals*).

Así mismo, hemos adquirido conocimiento sobre la normativa referente a la prevención de riesgos laborales en la aplicación de fitosanitarios y la evaluación del riesgo por exposición a plaguicidas.

Finalmente, se han abordado aspectos sobre la preparación, caracterización y evaluación de formulaciones de liberación controlada de plaguicidas, como propuesta para la mejora de la efectividad, seguridad y manejo en la aplicación de fitosanitarios.

Módulo II. Contaminantes (curso 2009-2010)

Este módulo constaba de 4 asignaturas:

- Calidad y trazabilidad alimentaria (2 créditos).
- Contaminantes. Significación alimentaria y ambiental (3 créditos).
- Contaminación y remediación de suelos (3 créditos).
- Especiación de metales (2 créditos), opcional.

Se han tratado temas relacionados con sistemas de gestión de la calidad y de seguridad alimentaria, distinguiendo los distintos fraudes alimentarios y las estrategias analíticas para su detección, así como los sistemas de trazabilidad alimentaria y su gestión.

Por otra parte, se ha adquirido conocimientos en toxicología general, profundizando en el campo de la toxicología ambiental y alimentaria.

También estudiamos los principales constituyentes del suelo, procesos de contaminación del mismo (plaguicidas, fertilizantes y metales pesados), y las técnicas de remediación a aplicar con el objetivo de proceder a su descontaminación en caso necesario.

Por último se han tratado aspectos relacionados con la especiación química de elementos, además de incidir en la importancia que tienen en el campo medioambiental y alimentario. También se estudió el control de calidad en especiación.

Módulo III: Gestión de Laboratorios (curso 2009-2010)

Este módulo consta de 3 asignaturas:

- Muestreo. Preparación de muestras (3 créditos).
- Tratamiento de datos analíticos (3 créditos).
- Gestión de la calidad en laboratorios (3 créditos).

En este módulo se ha estudiado la importancia que el muestreo y el tratamiento de la muestra tienen en el proceso de análisis. Se realiza un acercamiento a los tipos de muestreo, la incertidumbre asociada, el diseño de un plan de muestreo, enmarcando estos procesos en la legislación vigente. Se ha mostrado la utilidad de las herramientas estadísticas para asegurar la comparación de las medidas, el diseño de experimentos, validación y control de calidad.

Finalmente, también se ha profundizado en aspectos básicos de la gestión de la calidad en los laboratorios, materia de gran interés en la actualidad debido a que hoy en día, los laboratorios deben estar correctamente organizados y asegurar la fiabilidad de los resultados analíticos a través del control de calidad y la correcta gestión de los recursos materiales y humanos.

Módulo IV. Experimentación en técnicas cromatográficas (curso 2009-2010)

Este módulo consta de 5 asignaturas:

- Espectrometría de masas (3 créditos).
- Exposición a plaguicidas (2 créditos).
- Productos de transformación de plaguicidas (2 créditos).
- Experimentación en cromatografía de gases (4 créditos).
- Experimentación en cromatografía de líquidos (4 créditos).

En este módulo teórico-práctico se ha profundizado en las técnicas de análisis basadas en la cromatografía acoplada a espectrometría de masas (*Mass Spectrometry, MS*). Se han estudiado los fundamentos de la técnica de MS, las diferentes fuentes de ionización y los distintos tipos de analizadores, modos de trabajo, criterios de identificación y modos de cuantificación aplicados en el desarrollo de métodos de análisis de contaminantes orgánicos.

Así mismo se desarrollaron los principios de la evaluación de riesgos para la salud humana derivados del uso de plaguicidas, la diferenciación entre las etapas de

evaluación de riesgos, identificación y caracterización de peligros, y la planificación de los estudios de campo para evaluar la exposición humana y ambiental a plaguicidas.

También, se dio a conocer la importancia de los productos de transformación, así como las técnicas de extracción e identificación de estos compuestos.

Por último, se han estudiado las diferentes técnicas cromatográficas: Cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC) y Cromatografía de líquidos (*Liquid Chromatography*, LC), aplicando en las prácticas de experimentación de análisis de plaguicidas dichas técnicas acopladas a la espectrometría de masas por sus ventajas ante otros detectores: Cromatografía de gases-espectrometría de masas (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) y Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS).

Se abordaron las limitaciones de la cromatografía de gases en el control de residuos de plaguicidas, antibióticos y otros contaminantes, describiéndose los distintos parámetros de GC, así como la optimización de los mismos junto con el acoplamiento con MS, mantenimiento del cromatógrafo de gases, y haciendo una descripción detallada de los componentes del mismo.

En el laboratorio se han llevado a cabo diversos trabajos experimentales dándonos a conocer los diferentes componentes de un cromatógrafo y hemos procedido a optimizar parámetros como la temperatura del sistema de inyección, la influencia del tiempo de purga, la influencia de la temperatura del inyector y la influencia del flujo total. También se han optimizado métodos de MS, incidiendo en aspectos como el modo de ionización y detección o los voltajes de fragmentación. También hemos realizado búsquedas en bibliotecas espectrales.

Módulo V: Trabajo Fin de Máster (curso 2010-2011)

El trabajo fin de máster presentado en esta memoria, “*Estudio de los límites de confirmación en cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem*,” tiene 15 créditos y se encuadra en la línea de investigación titulada “*Métodos analíticos para*

residuos y contaminantes orgánicos en muestras alimentarias, ambientales y biológicas mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas”, que se desarrolla en el Grupo de Investigación “*Química Analítica de Contaminantes*”, perteneciente al Departamento de Hidrogeología y Química Analítica de la Universidad de Almería.

He de indicar que la selección de esta línea de investigación la he realizado en base al interés que me suscitan las repercusiones negativas que tienen la presencia de residuos fitosanitarios en vegetales sobre la salud pública.

Durante el presente máster he aprendido la importancia de correcto uso de las herramientas analíticas y la relevancia de la validación de metodologías analíticas de acuerdo a unos estándares de calidad que aseguren la fiabilidad de los resultados dentro de una tolerancia adecuada al problema analítico. En este caso, nos hemos centrado en el límite de confirmación (*Limit of Confirmation, LOC*) que adquiere especial relevancia cuando las técnicas de espectrometría de masas son empleadas como sistema detector.

Para el desarrollo del presente trabajo han sido fundamentales los conocimientos adquiridos referentes a las siguientes asignaturas:

- Políticas de Seguridad Alimentaria
- Contaminantes. Significación alimentaria y ambiental.
- Tratamientos de datos analíticos.
- Espectrometría de masas.
- Experimentación en cromatografía de gases.

Con el desarrollo del trabajo he alcanzado los objetivos conceptuales, procedimentales y actitudinales siguientes:

- a) Habilidad para la búsqueda de información bibliográfica en la etapa previa al desarrollo del trabajo científico.
- b) Habilidad para la planificación y realización de estudios científicos relacionados con la presencia de residuos de plaguicidas o contaminantes.
- c) Habilidad para el desarrollo y validación de métodos multi-compuesto mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (*Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, GC-MS/MS*).
- d) Habilidad en el tratamiento de datos, algunos aspectos de la etapa de validación del método, para lo que ha sido necesario procesar, evaluar, sintetizar y sacar conclusiones de la información analítica obtenida.

II. MEMORIA CIENTÍFICA

1. Objeto y campo de aplicación

Las características que presenta la MS como técnica analítica la han colocado en una posición relevante dentro del conjunto de herramientas de la Química Analítica [1,2]. Sus aplicaciones son muy amplias y variadas en muy diversos campos [3]. Es una técnica que ha progresado extremadamente rápido en las pasadas décadas con el desarrollo de nuevos instrumentos y aplicaciones. No obstante, e independientemente del potencial de la técnica, su utilización debe llevarse a cabo de acuerdo a unos estándares de calidad que garanticen la fiabilidad de los resultados analíticos que con ella se obtengan [4].

El proceso de validación de un método analítico incluye una serie de parámetros o figuras de mérito que deben ser evaluadas a fin de conocer los márgenes de funcionamiento del método dentro de unos rangos de fiabilidad [5]. Uno de los menos estudiados hasta la fecha es el llamado límite de confirmación o LOC que está adquiriendo mayor relevancia desde que proliferaron los métodos analíticos con capacidad confirmatoria como la MS.

El objeto de este trabajo es la evaluación de los LOC desde un punto de vista práctico para varios plaguicidas tomados como ejemplo de entre los más comúnmente utilizados en la agricultura intensiva de la provincia de Almería. La determinación se ha realizado con un instrumento de GC-MS/MS del tipo triple cuadrupolo y adquiriendo datos en el modo de monitorización de reacciones seleccionadas (*Selected Reaction Monitoring*, SRM). En este modo solo se suele monitorizar dos iones producto característicos del compuesto de interés.

Para el desarrollo del trabajo se han llevado a cabo los siguientes estudios:

1. Se han optimizado las condiciones experimentales para la determinación mediante GC-MS/MS de 5 plaguicidas. Han sido monitorizados mediante el modo de adquisición SRM.
2. Se han evaluado diferentes métodos de cálculo de LOC para los compuestos objeto de estudio.

3. Se han comparado los resultados obtenidos a fin de establecer el criterio más adecuado en las condiciones de trabajo evaluadas.

2. Introducción

La agricultura moderna depende, en gran medida, de la utilización de plaguicidas para controlar las plagas, las enfermedades y las malas hierbas que pueden ocasionar pérdidas en la calidad de las cosechas y disminuir su producción [6] .

El amplio uso de los plaguicidas, unido a su persistencia y distribución medioambiental, origina la contaminación aguas, suelo y alimentos. Además, el carácter lipofílico de muchos plaguicidas puede provocar su acumulación en los seres vivos al consumir los alimentos contaminados. En los últimos años, la contaminación de alimentos y del medio ambiente por plaguicidas se ha convertido en objeto de gran interés y preocupación social debido a posibles efectos adversos de una exposición prolongada [7] .

La presencia de residuos de estas sustancias es una cuestión que no solo afecta a la salud pública, por sus repercusiones de orden toxicológico, sino que también tiene consecuencias económicas y comerciales, por su incidencia en el comercio de alimentos vegetales y su influencia en las estrategias de lucha contra plagas. También puede tener consecuencias sociales por la especial sensibilidad de la opinión pública a todas las cuestiones referentes a la seguridad alimentaria.

Los plaguicidas son sustancias tóxicas, por lo que diversos organismos nacionales e internacionales han establecido límites máximos de residuos (LMR) en los alimentos y el agua con el fin de proteger la salud humana. Para comprobar el cumplimiento de dichos límites se realizan tomas de muestras oficiales cuyo análisis será efectuado exclusivamente por laboratorios autorizados por la autoridad competente para el control oficial de residuos. Dichos controles deben ser fiables para garantizar la calidad de los resultados, en base a los cuales debe tomarse decisiones y actuar incurriendo a veces en infracciones objeto de sanciones administrativas, sin perjuicio de las acciones penales a las que diera lugar [8].

Es necesario garantizar la calidad y comparabilidad de los resultados analíticos, por lo que deben utilizarse sistemas de aseguramiento de la calidad y, específicamente, métodos validados de acuerdo con procedimientos y criterios de funcionamiento comunes. Dentro de estos criterios se encuentra el LOC, cuya evaluación es el objeto de estudio de este trabajo en el que hemos comparado diferentes formas de obtención de dicho límite.

2.1. Planteamiento del problema

Fruto de la reunión que tuvo la Asociación Americana de Espectrometría de Masas (*American Society for Mass Spectrometry*, ASMS) en el año 1996 [9] surge un amplio debate sobre los conceptos de límites de confirmación, cuantificación y detección. Dicha reunión generó diversas prescripciones de algunas agencias reguladoras relevantes en sus procedimientos normalizados de trabajo con respecto a estos conceptos [10].

En general, se puede decir que el diseño de los espectrómetros de masas se lleva a cabo de manera idílica uniendo de manera coherente criterios de confirmación y de sensibilidad adecuados. A veces, los instrumentos se emplean con criterios que dan prioridad a la información cualitativa por encima de otras como la sensibilidad, robustez o el coste. Por el contrario, hoy en día la amplia mayoría de los instrumentos utilizados en análisis rutinario, ofrecen prioridad al incremento de efectividad desde un punto de vista de sensibilidad pero para ello, solamente suelen medir unas pocas relaciones masa carga (m/z) características de los analitos de interés (analitos diana, *target analytes*).

En este último modo de trabajo, el analista puede incrementar la sensibilidad (disminuye los límites de detección y de cuantificación) a expensas de modificar la selectividad del método, registrando solo unos pocos iones característicos del compuesto y evitando el llamado ruido químico o interferencias de una muestra.

Sin embargo, en el Congreso antes mencionado surgió la pregunta crucial sobre cuánta selectividad puede ser sacrificada sin comprometer seriamente el nivel de confianza en la identificación del analito. En aquellos casos en que no se puede trabajar adquiriendo

espectros completos en un rango m/z está recomendado el uso del llamado “criterio de los 3 iones” propuesto por Sphon [11] para los espectros de ionización electrónica (*Electron Ionization*, EI). Dicho criterio dice que se puede identificar un compuesto basándose en los tres iones más característicos del espectro de masas del compuesto. También se especifica que la intensidad relativa de dichos iones debe de estar en el margen de $\pm 10\%$ de error cuando se compara con un espectro de referencia. Dicho criterio expresa que los experimentos en los que se aplica la MS/MS también requieren la presencia en el espectro de la muestra de tres iones producto con los mismos criterios de abundancia relativa.

Se ha producido en algunos casos cierta discordancia fruto de este criterio sobre si la conectividad entre los iones precursores y producto confiere una especificidad adicional comparada con la espectrometría de masas simple (*Selected Ion Monitoring*, SIM). Si tres iones producto no relacionados entre sí estructuralmente son derivados de un ion precursor, algunos espectrometristas argumentan que se están monitorizando en realidad cuatro m/z por lo que solo dos iones producto serían requeridos para satisfacer el antes mencionado criterio de los 3 iones. Alternativamente dos reacciones ion precursor-ion producto son necesarias para satisfacer un criterio de cuatro iones [12].

En cualquier caso está claro que las necesidades analíticas de confirmación mediante espectrometría de masas pueden ser muy diversas. Por ejemplo, no son comparables los requerimientos confirmatorios que se puedan necesitar en un estudio farmacocinético analizando la orina de un individuo al que previamente se le ha administrado una droga con las necesidades confirmatorias de un plaguicida en una fruta o vegetal. En el primer caso no son necesarias evidencias tan robustas para confirmar ya que se sabe ciertamente de la presencia del compuesto del estudio en una matriz bien caracterizada, mientras que en el segundo caso no tiene porqué estar presente el compuesto en la muestra y hacen falta evidencias más contundentes. Puede también existir el caso de que un método solo requiera un estudio de falsos positivos o negativos a la hora de confirmar un compuesto a un nivel de corte (no necesariamente una concentración muy baja), sin importar la capacidad confirmatoria a niveles superiores o inferiores a dicha concentración. Este suele ser el caso del control de calidad en la industria farmacéutica.

En cualquier caso, e independientemente de las necesidades de confirmación del método analítico, el criterio de los 3 iones para la confirmación espectrométrica se convirtió en un referente independientemente de la técnica espectrométrica o modo de adquisición empleado.

No obstante, el LOC puede ser sujeto a un estudio basado en modelos estadísticos que permitan definiciones defendibles teóricamente tales como las análogas a las existentes para los límites de detección y cuantificación. En este sentido el profesor Robert Gibbons expresó sus propuestas bajo la presentación en el mencionado congreso de la ASMS titulada “Algunos aspectos estadísticos y conceptuales en la detección de bajos niveles de contaminantes ambientales” [13]. Sin embargo, quedó claro desde el primer momento que debe de establecerse un enlace entre estas aproximaciones altamente matemáticas y el trabajo diario en un laboratorio analítico con una alta carga de trabajo. En esta otra línea, el doctor David Lewis suponía el contrapunto con su presentación titulada “Hacia la señal-ruido: estableciendo consideraciones cualitativas en la función de detectabilidad”. Esta última aproximación propone el establecimiento de los límites inferiores de un método analítico basándose exclusivamente en medidas fáciles de obtener en un laboratorio basadas en la relación señal-ruido (*signal-to-noise ratio*, S/N).

Existen trabajos que demuestran que el compuesto dietilestilbesterol puede ser perfectamente identificado por comparación con una biblioteca espectral obtenida en modo EI monitorizando solo tres m/z esenciales del espectro cuando fueron comparados con un total de doscientas setenta mil registros en la biblioteca [14]. Es a partir de este momento que adquirió especial relevancia el criterio de los tres iones para la comparación espectral. Sin embargo este estudio demuestra que cuando se trabaja a niveles de concentración próximos al límite de detección, los espectros de masas completos sin modificar pueden contener una respuesta significativa a casi todas las m/z interesantes en un rango de trabajo. Como resultado, monitorizando iones característicos de un compuesto de interés, se puede sufrir un relativamente alto riesgo de falso positivo.

Algunos organismos llegan a establecer el llamado límite de detección del método medido que lo define como una característica del método analítico aplicado para un analito concreto, en una matriz concreta y un día concreto de trabajo en ese laboratorio concreto, concepto que puede ser también extrapolable al LOC [15]. Este concepto reflejaría la realidad del análisis químico instrumental de manera más realista y fácilmente evaluable mediante medidas rutinarias de control de calidad. Por ejemplo, puede incluirse entre las mismas, la evaluación de una muestra fortificada a una concentración muy próxima al supuesto LOC o en su defecto, al nivel de concentración mínimo al que un método analítico debe asegurar su fiabilidad. No obstante, Sphon dijo que se puede aceptar hasta un 50% de falsos negativos al nivel de concentración del límite de detección del método ya que esto está implícito en su definición.

En cualquier caso, se entiende por método de confirmación aquel que proporciona información total o complementaria que permite identificar y, en su caso, cuantificar de manera inequívoca la sustancia al nivel de interés.

Los métodos de confirmación para residuos orgánicos o contaminantes incluyen información sobre la estructura química del analito. En consecuencia, los métodos basados exclusivamente en análisis cromatográficos que prescinden de la detección espectrométrica no convienen por sí solos como métodos de confirmación. No obstante, si una técnica por sí sola carece de la especificidad necesaria, dicha especificidad se puede obtener por medio de procedimientos analíticos consistentes en combinaciones adecuadas de limpieza, separación cromatográfica y detección espectrométrica.

Los métodos o combinaciones de métodos siguientes son considerados por la Decisión de la Comisión 2002/657/CE [16] como adecuados para la identificación de residuos orgánicos o contaminantes en el caso de los grupos de sustancias indicados en la Directiva 96/23/CE [17]:

Tabla 1. Métodos de confirmación adecuados para residuos orgánicos o contaminantes

Técnica de medición	Grupos A y B de la Dir 96/23/CE*	Limitaciones
CL o CG con detección por espectrometría de masas	Grupos A y B	Sólo si sucede a una separación por cromatografía en línea y fuera de línea Sólo si se utilizan técnicas de barrido completo o técnicas que no registran los espectros de masa completos pero incluyen al menos 3 (grupo B) o 4 (grupo A) puntos de identificación
CL o CG con detección espectrométrica de IR	Grupos A y B	Deben cumplirse requisitos específicos de absorción en la espectrometría de IR
CL-DAD barrido completo	Grupo B	Deben cumplirse requisitos específicos de absorción en la espectrometría de UV
CL-fluorescencia	Grupo B	Sólo se aplica a las moléculas que presentan fluorescencia natural y a las que la presentan después de transformación o derivatización
2-D TLC-UV/VIS por barrido completo	Grupo B	Se requieren la HPTLC bidimensional y la cocromatografía
CG-Detección de la captación electrónica	Grupo B	Sólo si se utilizan dos columnas de polaridad diferente
CL-inmunograma	Grupo B	Sólo si se utilizan al menos dos sistemas cromatográficos diferentes o un segundo método de detección independiente
CL-UV/VIS (longitud de onda única)	Grupo B	Sólo si se utilizan al menos dos sistemas cromatográficos diferentes o un segundo método de detección independiente

* Ir al Anexo I para conocer los compuestos que están clasificados en los Grupos A y B.

En este sentido, dicha Decisión de la Comisión define el límite mínimo de funcionamiento exigido (*Minimum Required Performance Limit*, MRPL) como el “contenido mínimo de un analito en una muestra que debe ser detectado y confirmado. Sirve para armonizar el funcionamiento analítico de los métodos aplicables a la sustancia para los que no se ha establecido un límite permitido”. Con esta definición se puede comprobar la relevancia que tiene el proceso de confirmación y el establecimiento del LOC para un método analítico.

Los procedimientos confirmatorios tienen que ser desarrollados y validados por anticipado antes de su aplicación para el análisis de muestras reales. La *Food and Drug*

Administration (FDA) de Estados Unidos de América establece que debe llevarse a cabo mediante alguno de los siguientes modos [18]:

A. Comparación de patrones

La comparación de patrones debe de llevarse a cabo conjuntamente con la misma secuencia de análisis de muestra. La secuencia de análisis debe ser diseñada de tal manera que asegure la fiabilidad del proceso de confirmación de los resultados. Por ejemplo, con alguna inyección de patrones antes o después de las muestras. En el caso de que sea conocido a través del proceso de validación que existe un efecto matriz que altera los espectros o cromatogramas de los patrones puros, los criterios de confirmación deben de considerar dicha circunstancia utilizando extractos de la matriz analizada fortificados con patrones de los compuestos objeto de estudio.

B. Cromatografía/espectrometría de masas

Se puede obtener criterios confirmatorios de los cromatogramas de manera adicional a los datos espectrales obtenidos con el espectrómetro de masas. El uso de cromatograma iónico total (*Total Ion Chromatogram*, TIC), cromatograma iónico reconstruido (*Reconstructed Ion Chromatogram*, RIC), cromatograma iónico, etc. Deben de ser evaluados a fin de garantizar los siguientes aspectos:

- I. El pico cromatográfico debe superar una relación señal ruido (S/N) umbral de al menos 3:1.
- II. El tiempo de retención debe corresponder con el esperado para el compuesto objeto de estudio dentro de un rango de aceptabilidad que en principio no debería de exceder el 0.5% para GC-MS y un 2.5% para LC-MS. Está demostrado que los tiempos de retención relativos, es decir, referenciados con respecto al de una sustancia patrón interno, son más estables que los tiempos de retención en tiempo absoluto incrementando la fiabilidad del método confirmatorio.

C. Ajuste espectral

Los criterios de confirmación varían dependiendo del método de adquisición y técnica utilizados para la adquisición de datos espectrales. En este sentido la Decisión de la Comisión 2002/657/CE, en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados establece que los métodos de confirmación para residuos orgánicos o contaminantes deben incluir información sobre la estructura química del analito. Consecuentemente aquellos métodos exclusivamente cromatográficos que no utilizan como sistema de detección la espectrometría de masas no son recomendables por sí solos como método de confirmación. Igualmente queda bien claro en dicha decisión que los métodos espectrométricos carentes de una separación cromatográfica previa carecen de la especificidad necesaria para una confirmación fiable. Es por ello que los métodos cromatográficos acoplados a algún tipo de espectrometría de masas suponen una combinación muy potente para la confirmación de los resultados.

La detección espectrométrica debe llevarse a cabo mediante alguna técnica que registre espectros de masa completos (barridos completos o *full scan*) o el control de iones específicos (SIM), así como las técnicas de espectrometría de masas en tándem utilizando el modo SRM o espectrometría de masas de alta resolución (*High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS).

Los criterios confirmatorios varían en base al modo de adquisición de datos y son los siguientes:

A. Barrido completo.

Cuando la determinación con espectrometría de masas se lleva a cabo registrando espectros completos, es obligatorio la presencia de todos los iones de diagnóstico medidos con una intensidad relativa superior al 10% en el espectro de referencia del patrón de calibración.

B. SIM

Cuando la determinación con técnicas de espectrometría de masas se realiza monitorizando solo algunos iones característicos del compuesto se debe procurar incluir en dichos iones el ion molecular (mayor valor de m/z) como uno de los iones de diagnóstico siempre que sea posible. También es importante que dichos iones seleccionados no procedan exclusivamente de una misma parte de la molécula. La relación S/N para cada ion de diagnóstico debe ser siempre igual o superior al 3:1.

En cualquier caso, independientemente del modo de adquisición empleado, las intensidades relativas de los iones detectados, expresadas como tanto por ciento (%) corresponderá a las del patrón de calibración medidas en las mismas condiciones con los márgenes de tolerancia indicados en la siguiente tabla.

Tabla 2. Tolerancias máximas permitidas de intensidades relativas de iones en diversas técnicas de espectrometría de masas

Intensidad relativa (% del pico de base)	EI-CG-MS (relativos)	CI-CG-MS, CG-MS ⁿ CL-MS, CL-MS ⁿ (relativos)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % – 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % – 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %	± 50 %

Siempre que se proceda a la corrección del fondo espectral debe hacerse uniformemente en todo el lote e indicarse claramente. De esta manera las intensidades relativas de los iones de diagnóstico serán comparadas entre los espectros de las muestras y los de los patrones de referencia con mayor fiabilidad.

En el caso del modo de adquisición barrido completo es recomendable la presencia de un mínimo de cuatro iones con la intensidad relativa superior o igual del 10 % del pico base y siempre que sea posible se incluirá en dichos iones de diagnóstico el ion molecular. Deberá encontrarse un mínimo de cuatro iones dentro de los límites máximos de tolerancia permitidos que están descritos en la tabla anterior. También puede recurrirse a la comparación espectral asistida por ordenador. En este caso, la comparación de los datos de los espectros de masas de la muestra y patrón deben de

superar un nivel umbral mínimo de correspondencia. Este ajuste límite mínimo debe ser determinado para cada analito durante el proceso de validación teniendo en cuenta los criterios antes descritos y controlando la variabilidad debida a la matriz de la muestra y el funcionamiento del detector.

En el caso de medir fragmentos concretos característicos del analito (SIM) ha de utilizarse un sistema de puntos de identificación para interpretar los datos. La confirmación de las sustancias clasificadas en el grupo A del anexo I de la Directiva 96/23/CE requiere un mínimo de cuatro puntos de identificación. Aquellas sustancias del grupo B de dicho anexo solo requieren un mínimo de tres puntos de identificación. La siguiente tabla presenta el número de puntos de identificación que se puede obtener con cada una de las técnicas espectrométricas más importantes.

Tabla 3. Relación entre diversos tipos de fracciones de masa y puntos de identificación obtenidos

Técnica de MS	Puntos identificación obtenidos por ion
Espectrometría de masas de baja resolución	1,0
Ion precursor LR-MS ⁿ	1,0
Productos de transición LR-MS ⁿ	1,5
HRMS	2,0
Ion precursor HR-MS ⁿ	2,0
Productos de transición HR-MS ⁿ	2,5

Notas:

- (1) Cada ion se contará solo una vez
- (2) La CG-MS mediante ionización por impacto de electrones se considera una técnica distinta de la CG-MS mediante ionización química.
- (3) Sólo podrán utilizarse distintos analitos para aumentar el número de puntos de identificación si en los derivados intervienen tipos distintos de reacción química.
- (4) Para las sustancias del grupo A del anexo I de la Directiva 96/23/CE, si se emplea una de las técnicas HPLC combinada con detección espectrofotométrica por red de diodos mediante barrido completo (DAD), HPLC combinada con detección por fluorescencia, HPLC combinada con un inmunograma, una TLC bidimensional combinada con detección espectrométrica; puede aportarse un máximo de un punto de identificación, siempre que se cumplan los criterios exigidos para dichas técnicas.
- (5) Los productos de transición abarcan productos de segunda y de tercera generación.

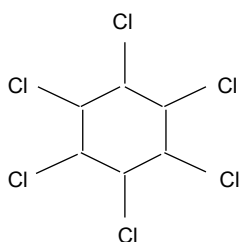
Está recomendado considerarse los siguientes aspectos:

- A. Se medirá como mínimo la abundancia relativa de un ion.
- B. Las abundancias relativas de los iones deben cumplir los criterios de la Tabla 2.
- C. Se combinará un máximo de tres técnicas distintas para alcanzar el número mínimo de puntos de identificación establecidos en la tabla 3.

2.2. Plaguicidas objeto de estudio

Los plaguicidas objeto de estudio han sido seleccionados a modo de ejemplo de entre los más empleados en la agricultura intensiva practicada en la provincia de Almería. La estructura química, nombre IUPAC y familia química a la que pertenecen se describe a continuación:

- **Gamma Lindano**

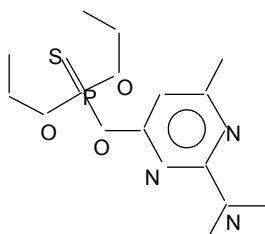


Fórmula química: $C_6H_6Cl_6$

Nombre IUPAC: 1 α ,2 α ,3 β ,4 α ,5 α ,6 β -hexaclorociclohexano

Familia química: Organoclorado

- **Pirimifos etil**

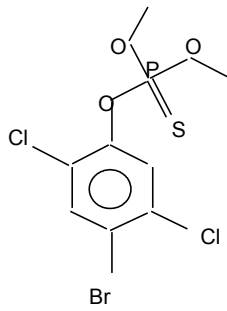


Fórmula química: $C_{13}H_{24}N_3O_3PS$

Nombre IUPAC: O-2-dietilamino-6-metilpirimidin-4-il O,O-dietil fosforotioato

Familia química: Organofosforado

- **Bromofos metil**

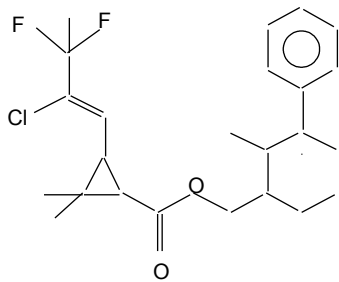


Fórmula química: $C_8H_8BrCl_2O_3PS$

Nombre IUPAC: (4-bromo-2,5-diclorofenoxi)-dimetoxi-sulfanilideno-λ5-fosfano

Familia química: Organofosforado

- **Bifentrín**

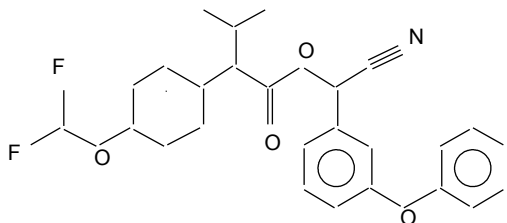


Fórmula química: $C_{23}H_{22}ClF_3O_2$

Nombre IUPAC: 2-metil-3-fenilbencil (1RS)-cis-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato

Familia química: Piretroide sintético

- **Flucitrinato**



Fórmula química: $C_{26}H_{23}F_2NO_4$

Nombre IUPAC: (RS)-α-ciano-3-fenoxibencil(S)-2-(4-difluorometoxifenil)-3-metilbutirato

Familia química: Piretroide sintético

2.3. Relación señal-ruido

La relación señal/ruido (signal-to-noise ratio, S/N) se define como el margen que hay entre la potencia de la señal que se transmite y la potencia del ruido que la corrompe. En cromatografía, ésta sería la relación que hay entre la intensidad del pico cromatográfico del analito de interés y la del ruido cromatográfico que rodea dicho pico.

En la siguiente figura puede observarse la S/N para un pico cromatográfico:

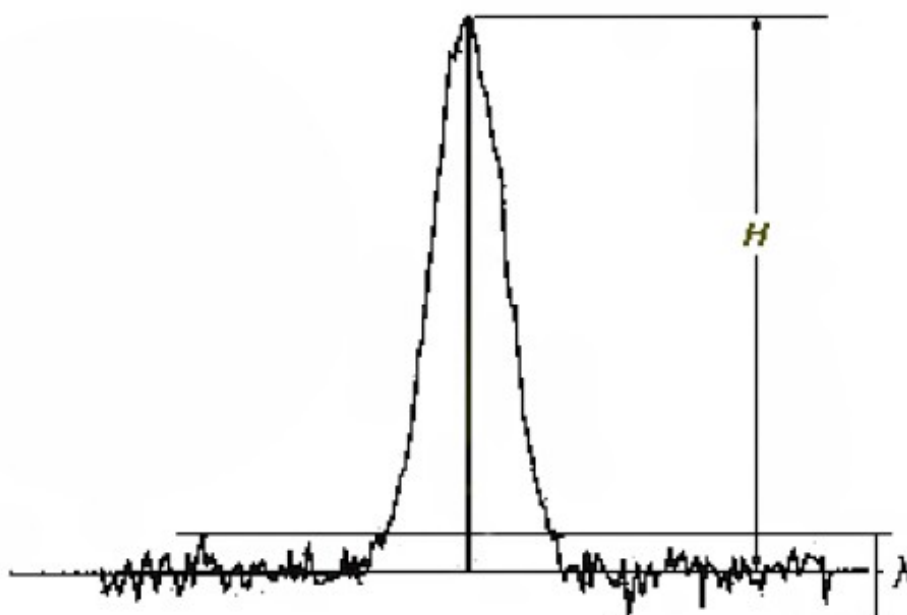


Figura 1. Relación S/N para un pico cromatográfico genérico.

Donde “H” es la altura del pico cromatográfico de interés y “ λ ” es el rango de ruido en un rango de tiempo de retención de 20 veces la anchura del pico cromatográfico a mitad de altura.

Existen varias formas de calcular la relación S/N para un pico cromatográfico. Con frecuencia, el propio software del instrumento calcula dicho parámetro por diferentes métodos. En el caso del instrumento empleado, existe la posibilidad de calcular la relación S/N mediante los dos métodos más habituales, que son:

I. Pico a pico (PP)

En el modo de cálculo de la relación S/N llamado “pico a pico”, se determina una línea de regresión para el ruido alrededor del pico cromatográfico y se calculan los residuales para cada dato o punto del cromatograma. El cálculo del ruido pico a pico es la diferencia entre el mayor y menor residual en la línea de regresión. Este modo de cálculo reduce la influencia de una posible deriva sistemática en el ruido alrededor del pico cromatográfico de interés y se ajusta mejor a la definición de ruido cromatográfico de la Sociedad Americana para pruebas y materiales (*American Society for Testing and Materials, ASTM*).

II. Raíz cuadrada media (RMS).

Esta modalidad está especialmente indicada para medir frecuencias tales como las electromagnéticas o sonidos donde la cantidad de los cambios es predecible estadísticamente. Se calcula como la raíz cuadrada del valor absoluto de la suma de varianzas en la región de ruido estudiada. La expresión matemática se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{RMS noise} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n})^2}{n}}$$

III. EXPERIMENTAL

1. Reactivos y disolventes

Los patrones de plaguicidas se obtuvieron de Riedel-de-Haën (Seelze-Hannover, Alemania) con pureza siempre superiores al 99%. Los disolventes empleados (acetona y ciclohexano) fueron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) y tenían una calidad adecuada para el análisis en gradiente en HPLC (*Chromasolv* grado gradiente para HPLC).

Las disoluciones de los compuestos individuales que se prepararon con concentraciones comprendidas entre 400 y 550 µg/ml fueron preparadas mediante pesada exacta del polvo o líquido y posterior disolución en 100 ml de acetona. Dichas disoluciones son denominadas madre y se almacenaron en un congelador a -30°C. Las disoluciones multicompuesto (patrón de trabajo) fueron preparadas con una concentración de 2 µg/ml de cada compuesto a partir de diluciones madre. Fueron almacenadas bajo refrigeración a 4°C.

2. Instrumentación

El cromatógrafo de gases empleado era un CP-3800 (Varian Instruments, Sunnyvale, CA, USA) y estaba equipado con un dispositivo para control electrónico de flujo. Las muestras se introducían mediante un sistema automático Combi Pal (CTC Analytics, AG, Zwingen, Suiza) en un bloque inyector del tipo mixto 1079 que tenía posibilidad de trabajar en modos con o sin división y con temperatura programable, lo que le permite la inyección de grandes volúmenes de muestra (*Large Volume Injection*, LVI). Se inyectaron alícuotas de las muestras de 10 µl dentro de un inserto de vidrio dotado con un tapón de carbofrit (Resteck, Bellefonte, PA, USA).

El cromatógrafo estaba equipado con una precolumna capilar de sílice fundida sin tratar químicamente de 2 m x 0.25 mm de diámetro interno de Supelco (Bellefonte, PA, USA) y una columna analítica capilar modelo Factor Four VF – 5 ms de 30 m x 0.25mm de diámetro interno x 0.25 µm de espesor de fase de la marca Varian Instruments. El gas portador empleado fue helio suministrado por Praxair (Málaga, España) con pureza superior a 99.9999% y se utilizaba a un flujo constante de 1 ml/min.

El espectrómetro de masas (modelo 1200L) fue utilizado en el modo EI a 70 eV de energía de ionización. También disponía de ionización química (*Chemical Ionization*, CI) positiva y negativa pero no fue necesario su uso en el presente estudio. Los iones generados en la cámara de ionización eran filtrados por un hexapolo lineal. El analizador de triple cuadrupolo constaba con una celda de colisión que trabajaba con Argón de pureza 99.999% como gas de colisión y que generaba trayectorias de los iones de 180°. El equipo contaba con una biblioteca espectral comercial NIST MS Search (versión 2.0) de la NIST/EPA/NIH (*National Institute of Standards and Technology/Environmental Protection Agency/National Institutes of Health*) era calibrado semanalmente con perfluorotributilamina.

3. Condiciones cromatográficas

Diez µl de muestra se introducían con una velocidad de inyección de 10 µl/min en el inyector, el cual estaba inicialmente a 70°C (mantenido 0.5 minutos) y posteriormente se calentaba hasta 310°C (mantenido 10 minutos para limpieza) a una velocidad de 100°C/min. La válvula de división se controlaba de tal modo que permitiera realizar el análisis de grandes volúmenes de muestra. Para ello, se mantenía abierta 0.5 minutos para eliminar el disolvente, cerrándose durante 3 minutos para volatilizar los solutos y transferirlos a la columna y abriendo finalmente para limpiar el inyector.

La programación térmica de la columna cromatográfica se ha realizado de la siguiente forma: inicialmente estaba a 70°C (mantenida 3.5 minutos), luego se calentaba a 35°C/min hasta llegar a 180°C y finalmente se calentaba a 10°C/min hasta los 300°C (mantenida 7 minutos).

El modo de trabajo del espectrómetro de masas fue SRM monitorizando dos iones producto por cada uno de los compuestos. Las temperaturas de trabajo de la línea de transferencia, colector y cámara de ionización fueron respectivamente 280, 40 y 250°C.

El retraso de encendido del filamento de ionización fue de 3.5 minutos a fin de prevenir daños al equipo con el disolvente. El tiempo de medida de cada ion fue 0.008 segundos y el voltaje de amplificación del detector de iones fotomultiplicador se ajustó en 1500 V.

El resto de parámetros MS/MS (*Tandem Mass Spectrometry*) específicos para cada uno de los compuestos objeto de estudio se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Parámetros MS/MS específicos de los compuestos estudiados

Compuesto	ion precursor (m/z)	Iones producto (m/z)	Energía de colisión (V)
Gamma lindano	219	183	10
	219	147	40
Pirimifos etil	318	166	20
	318	182	20
Bromofos metil	331	316	10
	331	285	40
Bifentrín	181	165	20
	181	141	20
Flucitrinato	199	157	10
	199	107	40

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización espectrométrica de los compuestos objeto de estudio

Los compuestos fueron separados cromatográficamente mediante una programación térmica del horno adecuada para separar plaguicidas en un método multicompuesto. Las Figuras 2 a 6 muestran los cromatogramas obtenidos para cada compuesto cuando se monitorizó el ion más característico del mismo (pico base del espectro *full scan*).

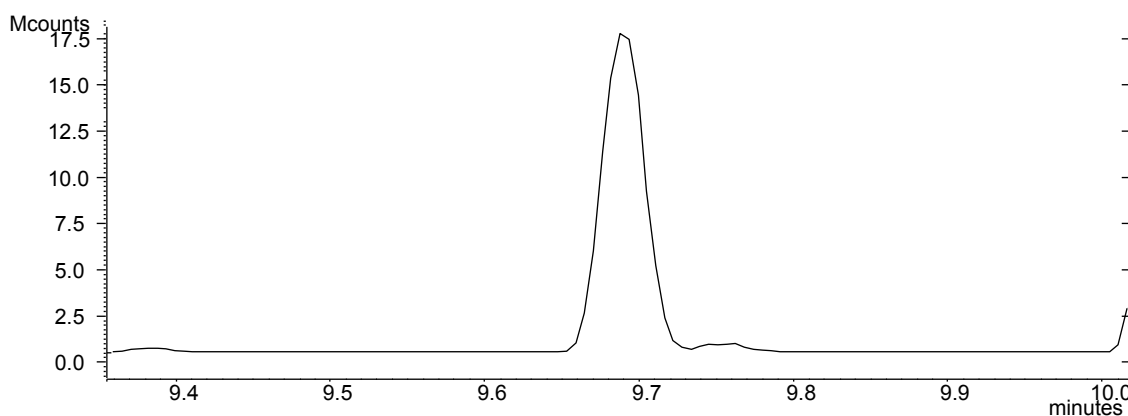


Figura 2. Cromatograma del gamma Lindano (m/z 183)

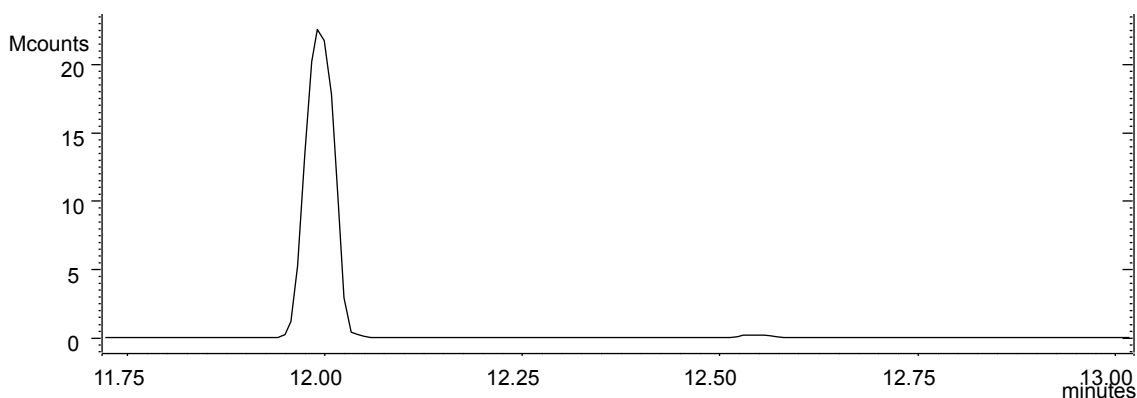


Figura 3. Cromatograma del Pirimifos etil (m/z 166)

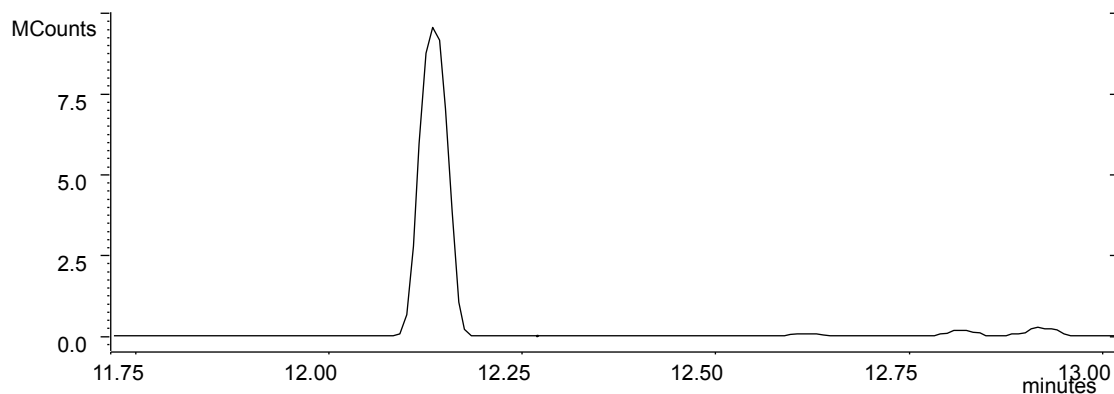


Figura 4. Cromatograma del Bromofos-metil (m/z 316)

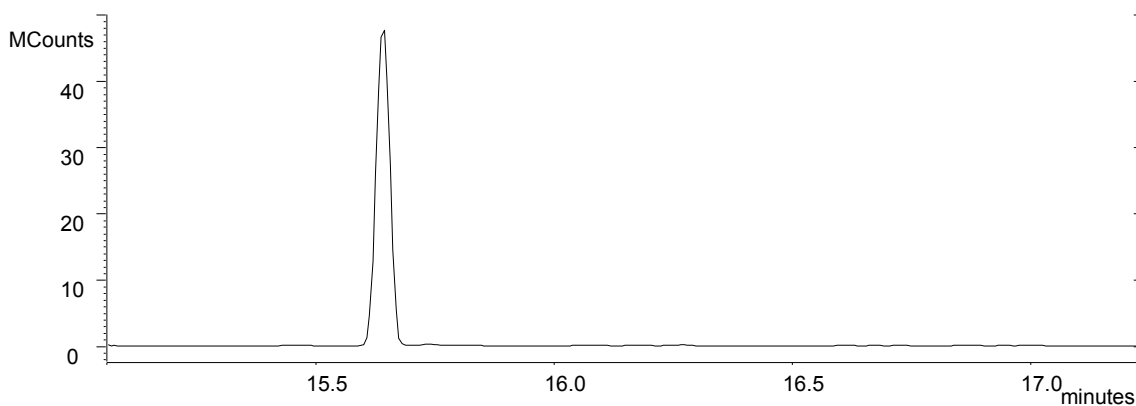


Figura 5. Cromatograma del Bifentrín (m/z 165)

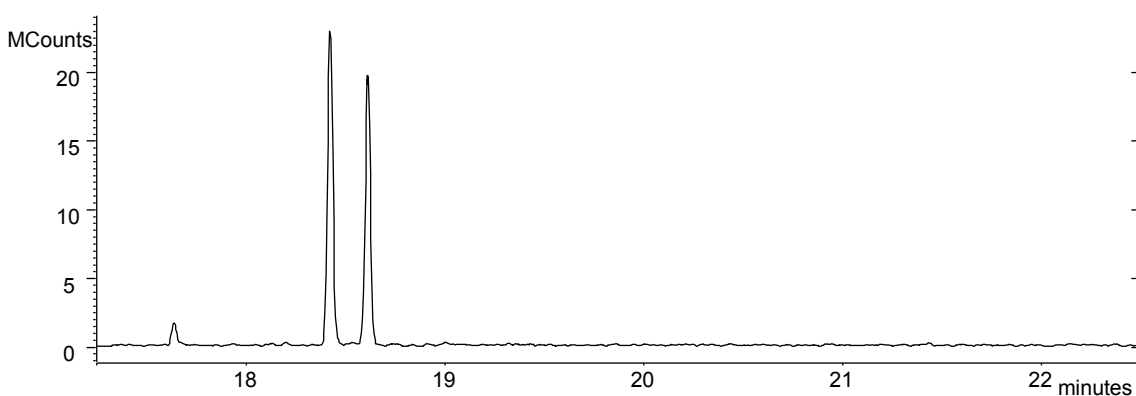


Figura 6. Cromatograma del Flucitrinato (m/z 157)

Todos los compuestos objeto de estudio generaban un único pico cromatográfico excepto el flucitrinato que es comercializado como una mezcla de dos isómeros (*cis*- y *trans*- que eran eluidos en ese orden). El tiempo total de análisis es inferior a los 19 minutos. Los cinco compuestos del estudio podrían ser fácilmente resueltos cromatográficamente en un tiempo total de análisis muy inferior, pero fueron separados entre si con unas condiciones cromatográficas que permitían analizar un número mucho mayor de plaguicidas (método multiresiduo).

Los compuestos objeto de estudio fueron caracterizados espectrométricamente utilizando una EI con una energía cinética de los electrones de 70 eV. De este modo, los espectros de masas experimentalmente obtenidos son comparables con las bibliotecas espectrales comerciales más populares. En este caso, se compararon con la biblioteca espectral NIST/EPA/NIH. Los espectros de masas obtenidos en modo *full scan* son los que se muestran en las siguientes figuras:

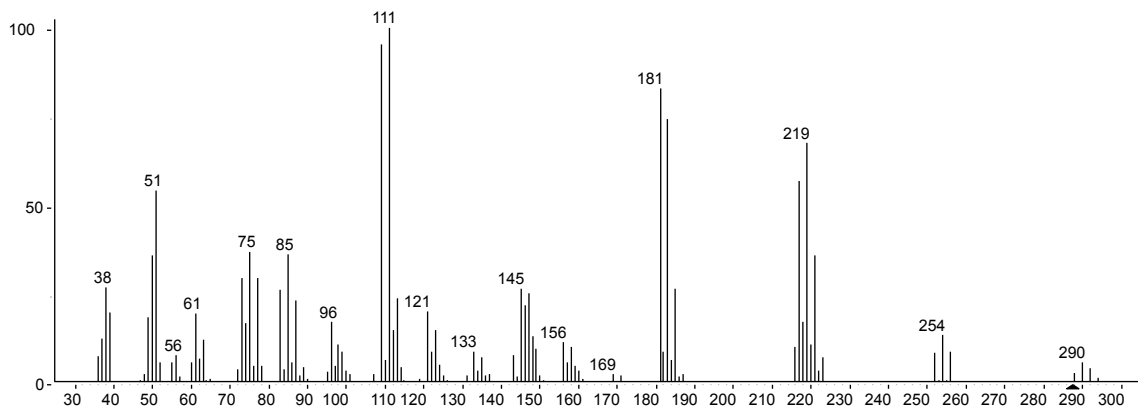


Figura 7. Espectro de Masas en modo barrido completo del gamma Lindano

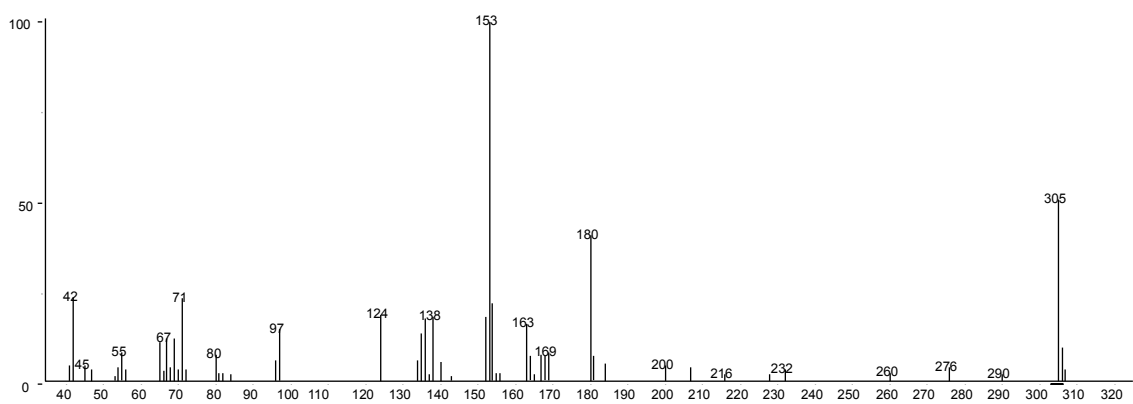


Figura 8. Espectro de Masas en modo barrido completo del Pirimifos etil

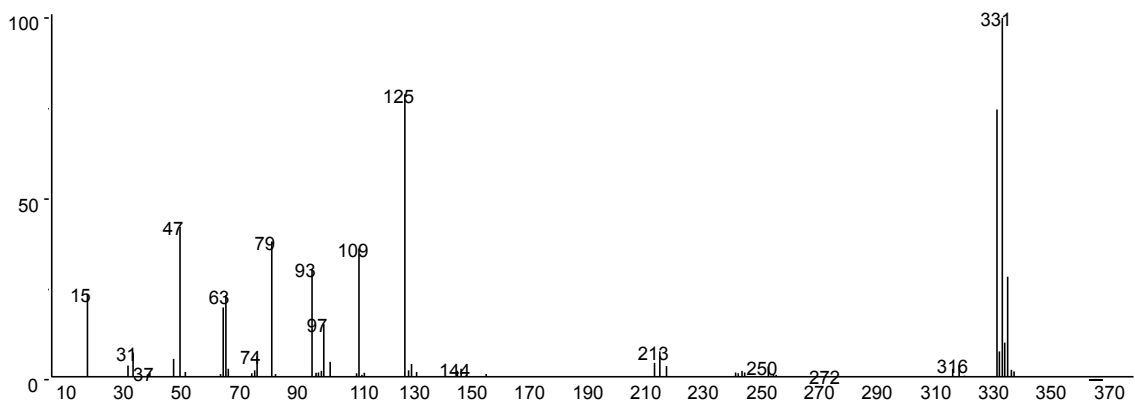


Figura 9. Espectro de Masas en modo barrido completo del Bromofos metil

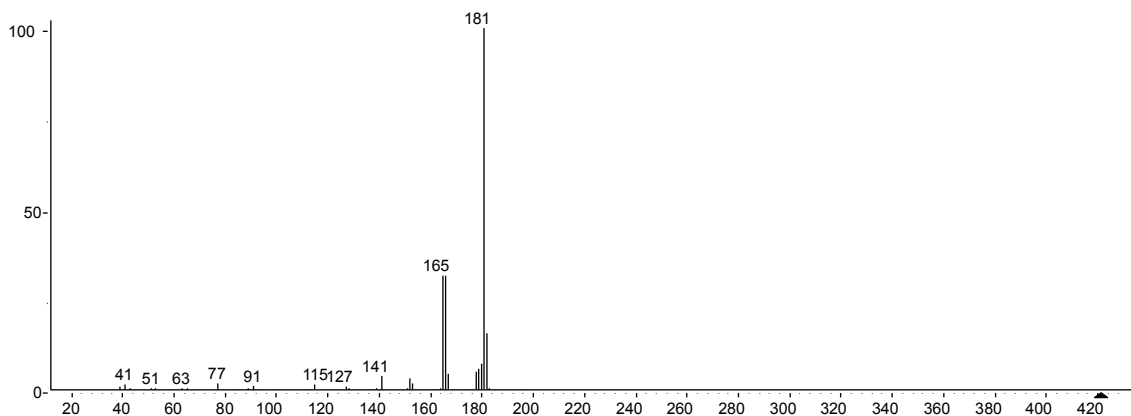


Figura 10. Espectro de Masas en modo barrido completo del Bifenthrín

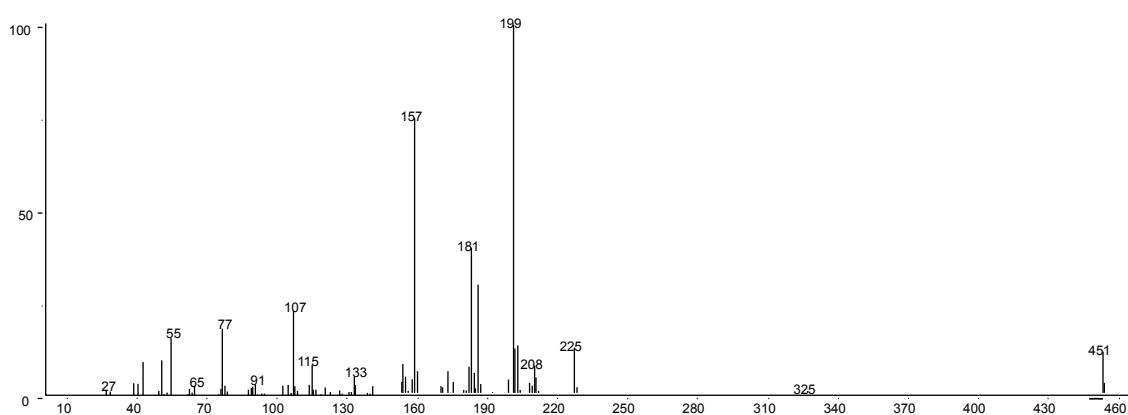


Figura 11. Espectro de Masas en modo barrido completo del Flucitrinato

Una vez caracterizados en modo *full scan* los compuestos, se procedió al estudio de los mismos mediante MS/MS. Las condiciones experimentales MS/MS fueron optimizadas tal y como se describe por el Prof. Martínez Vidal y colaboradores [19]. El instrumento se programó para trabajar en el modo de trabajo SRM. Para cada compuesto, se seleccionaron dos iones producto característicos. La selección de iones precursores se realizó de entre aquellos más representativos en los espectros de barrido completo. Se escogieron aquellos de mayor intensidad (abundancia relativa, *Ar*) y valor *m/z*. El voltaje de excitación del proceso de disociación inducido por colisiones (*Collision-Induced Dissociation*, CID) ha sido optimizado a fin de maximizar la sensibilidad de los iones producto.

Los espectros MS/MS obtenidos para los diferentes compuestos del estudio se muestran en las siguientes figuras:

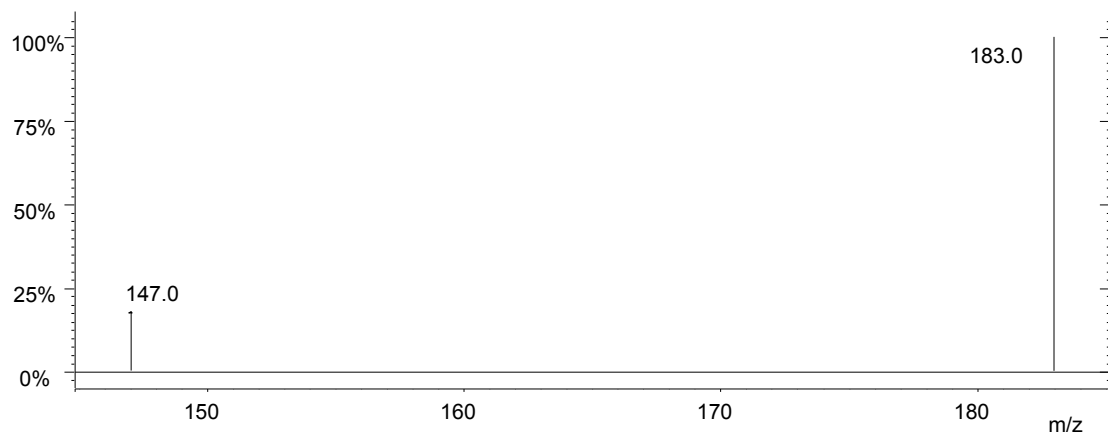


Figura 12. Espectro MS/MS del gamma Lindano.

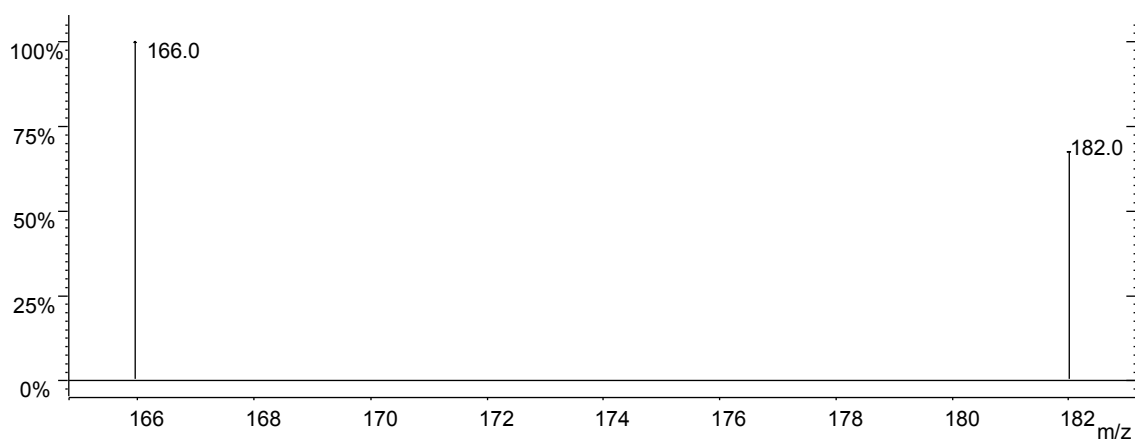


Figura 13. Espectro MS/MS del Pirimifos etil

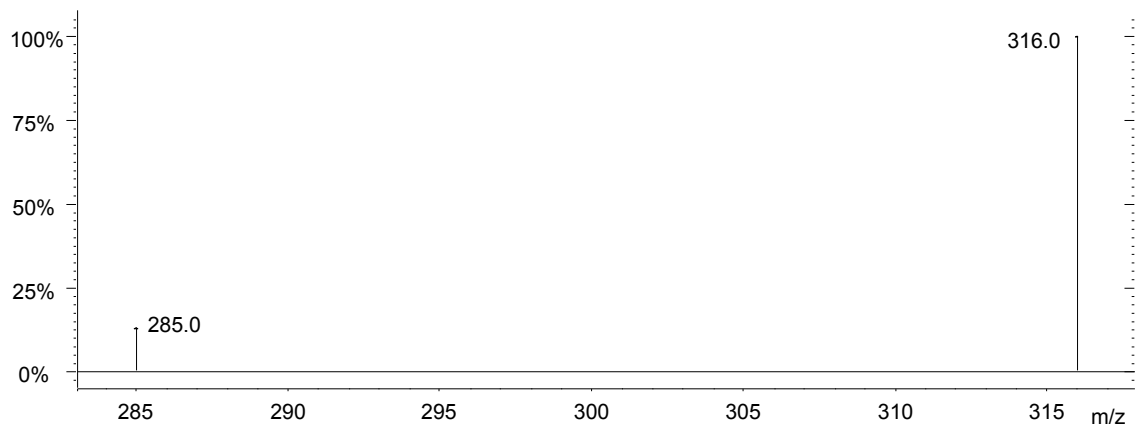


Figura 14. Espectro MS/MS del Bromofos metil

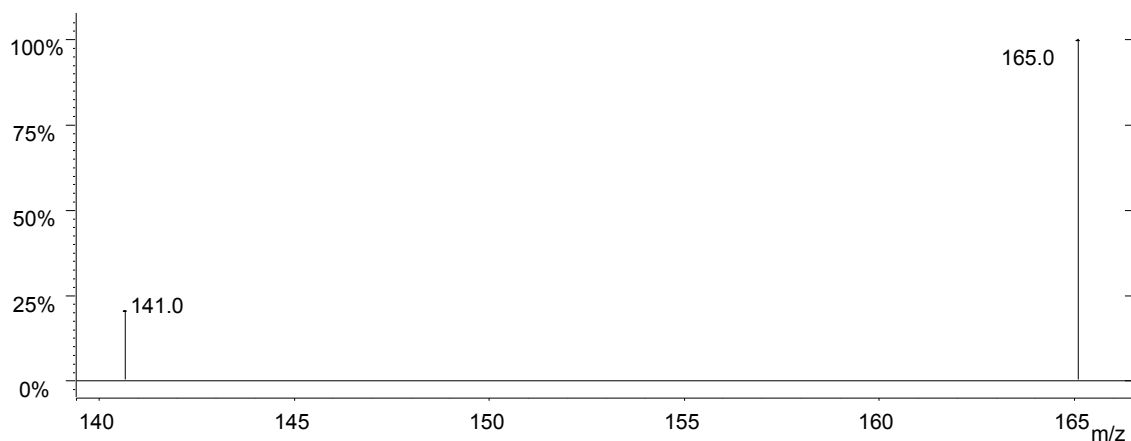


Figura 15. Espectro MS/MS del Bifentrin

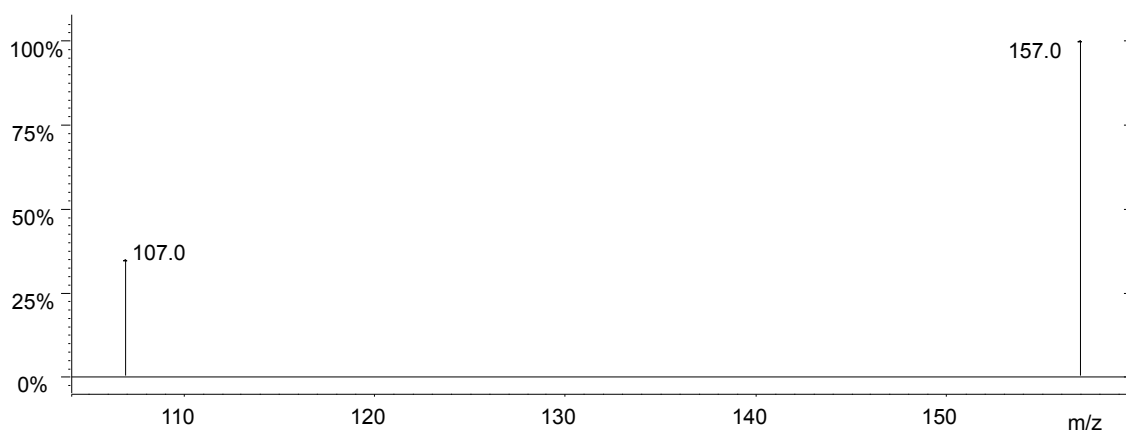


Figura 16. Espectro MS/MS del Flucitrinato

El ion más intenso o pico base se monitoriza para la identificación y cuantificación del compuesto cromatográficamente. Es el ion empleado para el cálculo del límite de detección y límite de cuantificación. El ion menos intenso (*qualifier*) debe ser monitorizado para la confirmación del compuesto espectrométricamente. Es por tanto el ion que se emplea para el cálculo del LOC.

2. Cálculo de los LOC en función de la relación señal-ruido

Para calcular los LOC de los compuestos seleccionados en el estudio se ha procedido a analizar por triplicado patrones preparados en disolvente a las siguientes concentraciones: 50, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,90, 0,80, 0,70, 0,60, 0,50, 0,10 y 0,05 ppb, añadiendo para el bromofos metil las siguientes concentraciones: 14, 13, 12, 11 y 10. Los resultados obtenidos midiendo la relación S/N para el ion de confirmación

menos intenso de cada compuesto se muestra en las siguientes tablas (obviando aquellas concentraciones en las que dicho ion deja de verse):

Tabla 5. Influencia de la concentración sobre los espectros MS/MS del gamma Lindano (m/z 147)

Concentración (ppb)	Abundancia relativa media (%)	SD _{Ar}	S/N media*	SD _{S/N} *
50	12,0	0,8	1407595	970980
25	12,0	0,6	1091751	178902
20	12,7	2,1	731964	487391
15	16,7	2,0	488327	258496
10	17,8	2,9	280007	82922
5	18,7	3,4	169622	167437
4	13,0	3,8	139475	171048
3	26,6	8,9	122368	23570
2	15,7	9,7	106239	42590
1	8,6	9,3	73253	67602
0,9	6,7	15,9	72189	72316
0,8	6,9	21,8	72491	90643

N=3; *, S/N calculada mediante el método pico a pico

Tabla 6. Influencia de la concentración sobre los espectros MS/MS del Pirimifos etil (m/z 182)

Concentración (ppb)	Abundancia relativa media (%)	SD _{Ar}	S/N media*	SD _{S/N} *
50	69,3	3,8	5630000	4044416
25	70,3	1,3	3963333	176730
20	70,0	1,1	2436617	1577617
15	67,6	2,4	1264168	598289
10	63,7	3,0	1286211	1053071
5	71,8	2,9	454391	40019
4	72,3	1,9	267748	160026
3	72,0	16,0	233320	148652
2	67,9	29,5	198970	152633
1	81,5	32,1	154642	137901
0,9	87,1	37,8	148790	126548

N=3; *, S/N calculada mediante el método pico a pico

Tabla 7. Influencia de la concentración sobre los espectros MS/MS del Bromofos metil (m/z 285)

Concentración (ppb)	Abundancia relativa media (%)	SD _{Ar}	S/N media*	SD _{S/N} *
50	13,4	3,0	656637	07635
25	13,4	0,8	457356	246423
20	20,4	8,8	406995	308298
15	23,2	14,6	359741	230013
14	27,6	17,5	340983	254387
13	21,8	15,9	354190	236570
12	29,0	19,4	334521	256780
11	34,7	23,5	309810	289712

N=3; *, S/N calculada mediante el método pico a pico

Tabla 8. Influencia de la concentración sobre los espectros MS/MS del Bifentrín (m/z 141)

Concentración (ppb)	Abundancia relativa media (%)	SD _{Ar}	S/N media*	SD _{S/N} *
50	14,3	0,8	5326667	3061772
25	12,8	0,7	2640000	293087
20	13,1	0,4	1450389	594970
15	15,0	0,8	859219	322532
10	11,7	0,7	552929	191415
5	14,5	3,7	334124	694901
4	15,7	2,8	264763	68314
3	11,7	0,3	194112	110363
2	12,4	3,9	147326	45794
1	16,0	4,2	69367	33921
0,9	17,4	5,2	52764	26376
0,8	18,9	7,1	52690	23898
0,7	20,2	5,8	41487	17865
0,6	19,6	6,3	30821	16789

N=3; *, S/N calculada mediante el método pico a pico

Tabla 9. Influencia de la concentración sobre los espectros MS/MS del flucitricinato (m/z 107)

Concentración (ppb)	Abundancia relativa media (%)	SD _{Ar}	S/N media*	SD _{S/N} *
50	30,8	2,8	4890000	2623147
25	27,2	0,7	2083333	228546
20	26,3	3,0	1086623	355786
15	29,3	2,7	593466	139438
10	32,4	1,1	430209	137176
5	23,4	2,9	223097	58538
4	26,7	2,1	203014	139653
3	34,3	12,1	163321	19422
2	43,2	8,2	110976	35241
1	37,2	12,4	79148	32140
0,9	39,0	14,8	79986	32445
0,8	45,1	18,7	77154	43210
0,7	42,8	21,6	70121	54318

N=3; *, S/N calculada mediante el método pico a pico

Los datos arriba representados son valores promedio obtenidos para las diferentes réplicas de cada concentración del estudio. En el caso del cálculo de la relación S/N, se ha procedido a emplear el método de cálculo de pico a pico (*peak to peak*).

Puede observarse, tal y como se muestran en las figuras 17 y 21, que la relación S/N media medida al pico cromatográfico (generado por el ion característico menos intenso) disminuye de manera progresiva con la concentración.

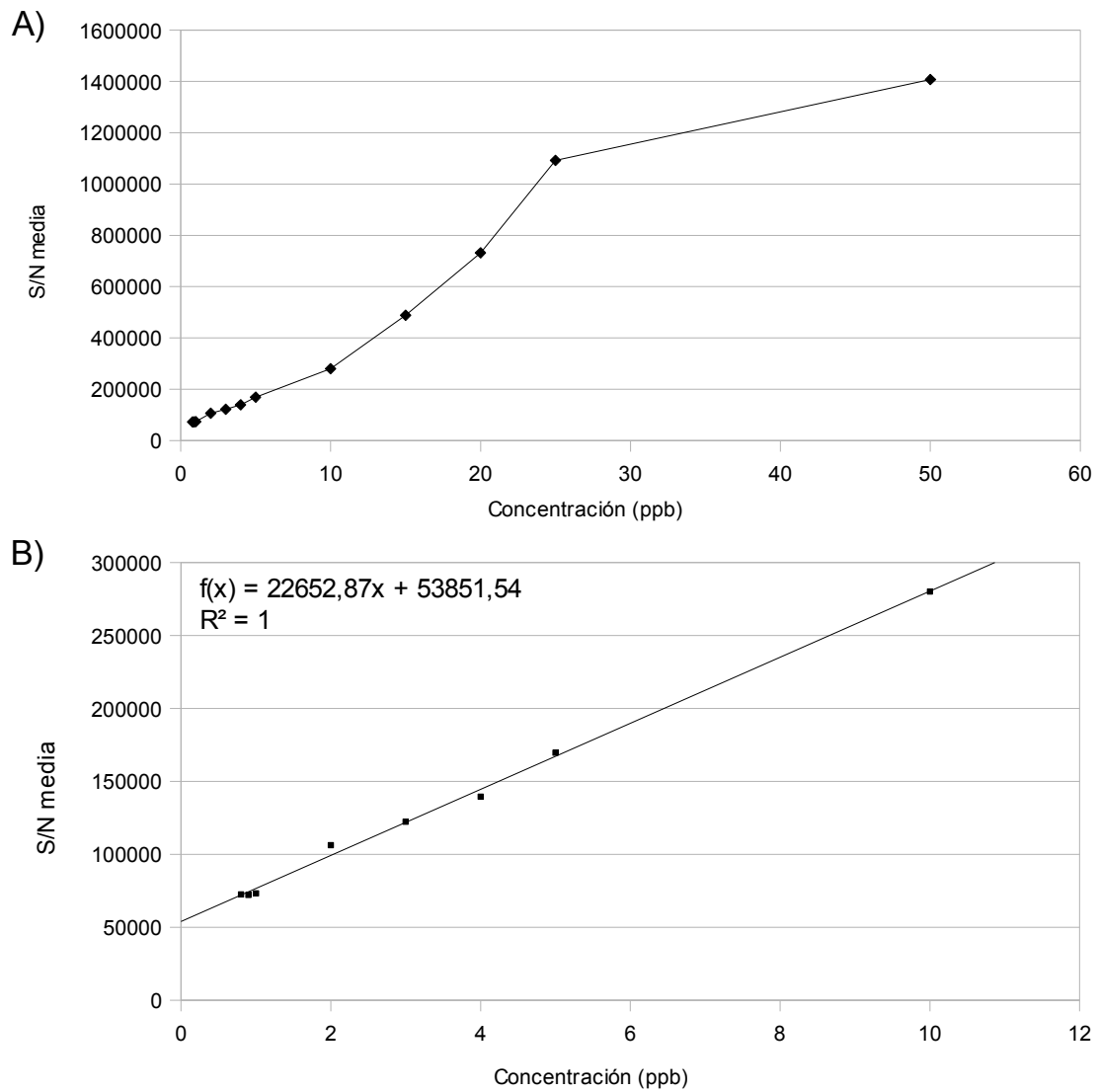


Figura 17. A) Evolución de la relación S/N media del gamma Lindano con la concentración en todo el rango estudiado; B) Correlación lineal de los datos a bajas concentraciones

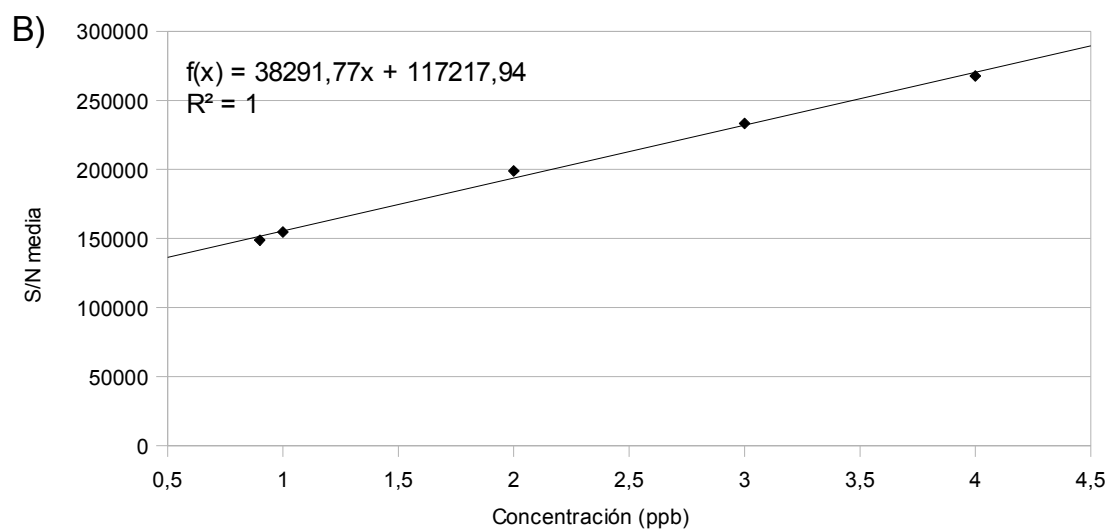
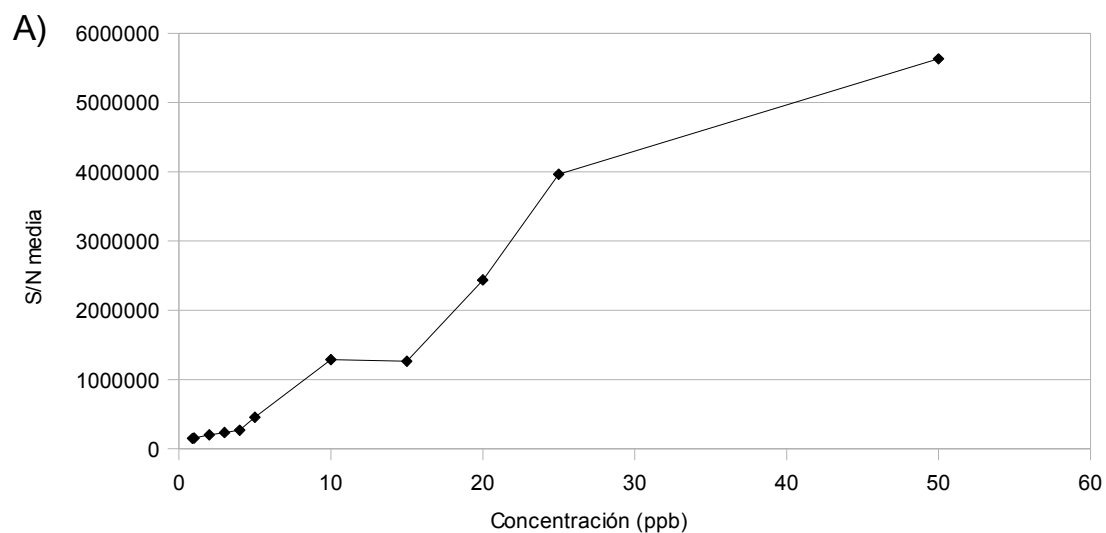


Figura 18. A) Evolución de la relación S/N media del Pirimifos etil con la concentración en todo el rango estudiado; B) Correlación lineal de los datos a bajas concentraciones

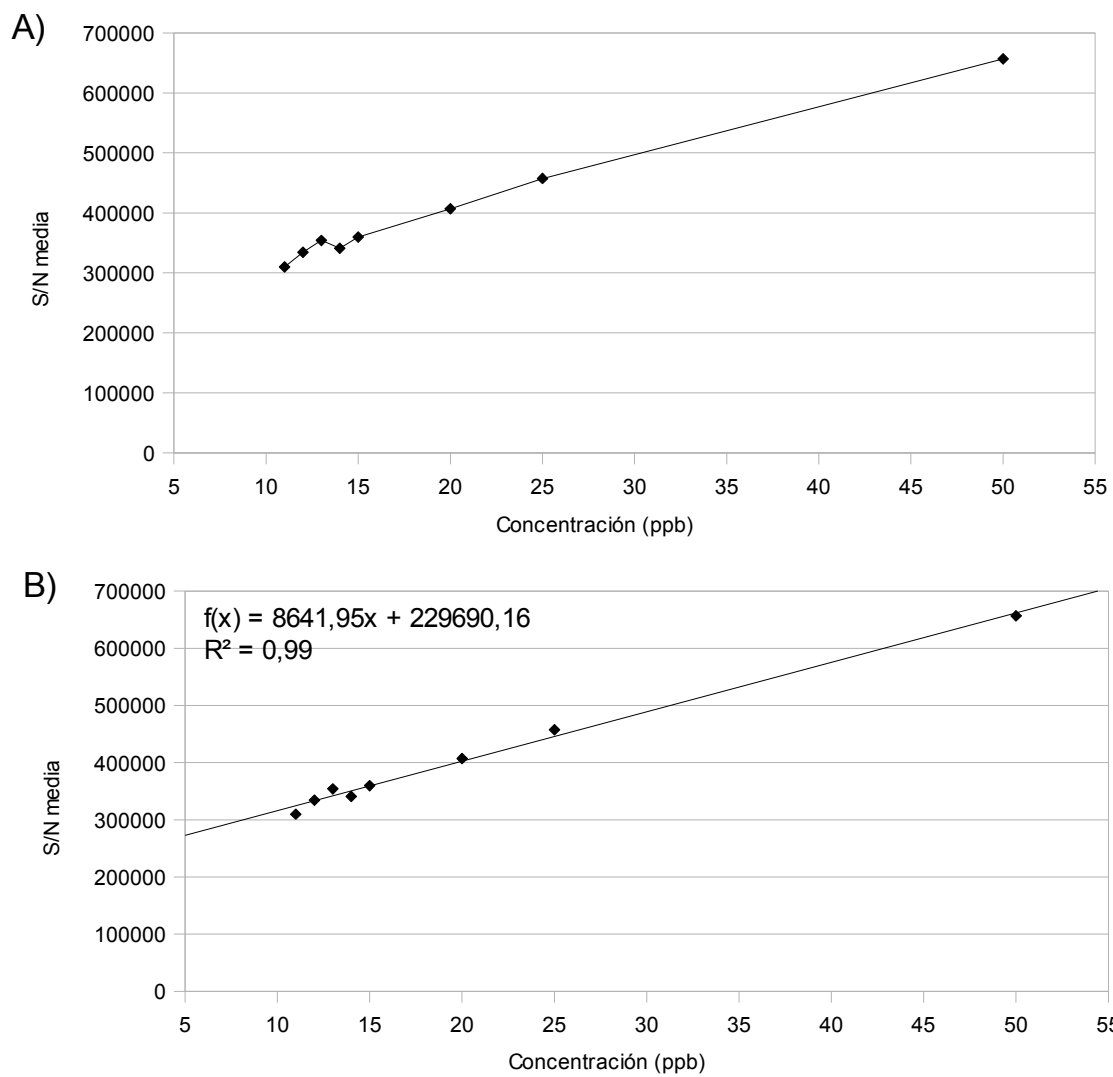


Figura 19. A) Evolución de la relación S/N media del Bromofos metil con la concentración en todo el rango estudiado; B) Correlación lineal de los datos

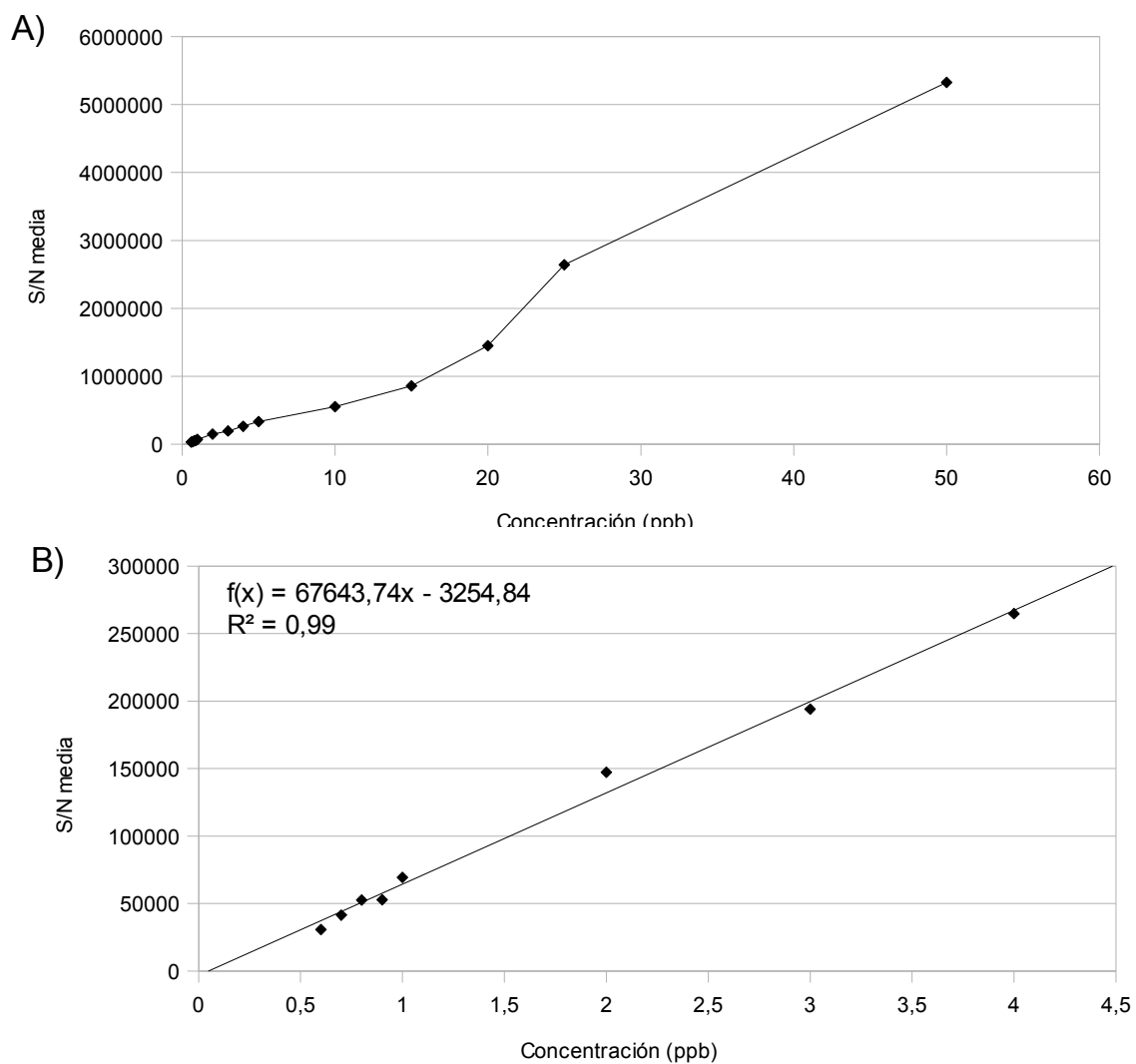


Figura 20. A) Evolución de la relación S/N media del Bifentrín con la concentración en todo el rango estudiado; B) Correlación lineal de los datos a bajas concentraciones

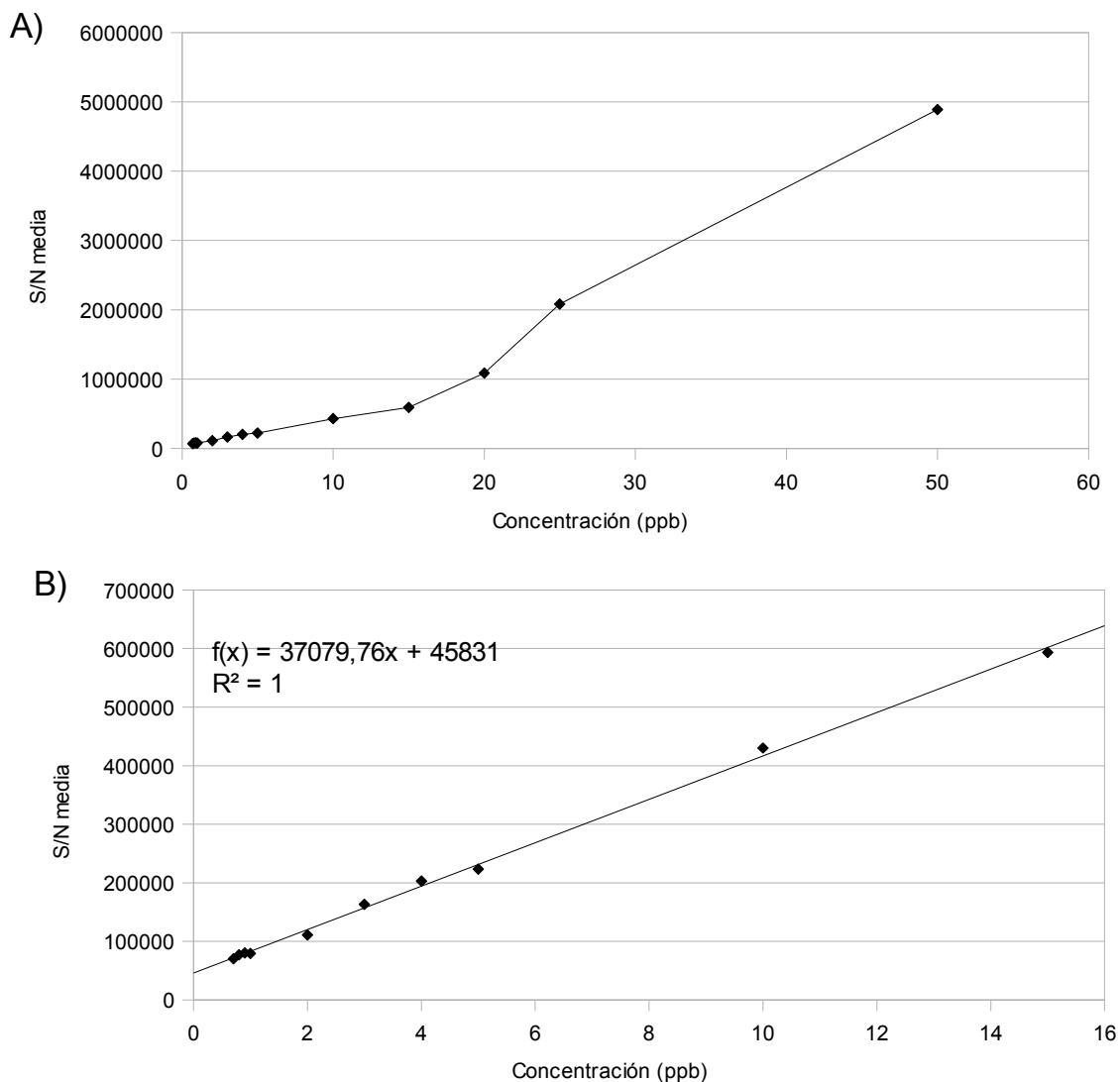


Figura 21. A) Evolución de la relación S/N media del Flucitrinato con la concentración en todo el rango estudiado; B) Correlación lineal de los datos a bajas concentraciones

Como puede observarse en las gráficas, en el rango bajo de las concentraciones estudiadas los datos de relación S/N media se correlacionan de manera lineal con la concentración. Todas las rectas de regresión presentan una acusada ordenada en el origen que no hace posible extrapolar la concentración que generaría una relación S/N de 3. Dicha concentración correspondería con el LOC por definición. Este fenómeno suele observarse en los instrumentos de MS más recientes y potentes (típicamente en los de baja resolución trabajando en MS/MS o los de alta resolución). Alternativamente, podemos considerar el LOC como aquella concentración mínima experimentalmente medible a la que se puede observar el ion menos intenso sea cual sea su relación S/N

(siempre que sea superior a 3). Según esto, los LOC calculados para los compuestos serían los representados en la siguiente tabla:

Tabla 10. LOC calculados en función de la relación S/N medida experimentalmente para el ion menos intenso

Compuesto	LOC (ppb)
Gamma lindano	0,8
Pirimifos etil	0,9
Bromofos metil	11
Bifentrín	0,6
Flucitrinato	0,7

Se ha procedido a repetir el estudio calculando la relación S/N mediante el método de la raíz cuadrada media (*Square Root Mean*) para evaluar si hay o no diferencias significativas entre los dos métodos de cálculo. No se han encontrado diferencias significativas entre ambos modos por lo que los estudios seguirán siendo realizados mediante el método de cálculo pico a pico.

Si tenemos en cuenta las abundancias relativas medias obtenidas para los compuestos del estudio podemos observar que hay concentraciones por encima del LOC calculado que no cumplirían con los criterios de confirmación de la Decisión 2002/657/CE. Por lo tanto, existe un rango de concentraciones en el que podemos observar en el espectro todos los iones de confirmación pero en los que no se cumple la proporción correcta entre ellos.

3. Cálculo de los LOC en función de las abundancias relativas de los iones de confirmación

Dados los resultados experimentales anteriores, se ve conveniente buscar criterios alternativos al exclusivamente basado en la relación S/N para el cálculo de los LOC de un método analítico. En este sentido, se propone establecer una correlación entre los criterios de confirmación de la Decisión de la Comisión 2002/657/CE y las abundancias relativas experimentalmente obtenidas para los compuestos objeto de estudio.

Para ello, se evalúa la abundancia relativa media obtenida en todo el rango de concentraciones estudiado que se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 11. Abundancias relativas medias del ion menos intenso de cada compuesto y tolerancia permitida por la Decisión de la Comisión 2002/657/CE

Compuesto (<i>m/z</i> menos intenso)	Media total Ar del ion menos intenso	Tolerancia permitida
Gamma lindano (147)	14,7	± 30 % (10,3 - 19,1)
Pirimifos etil (182)	69,3	± 20 % (55,4 - 83,1)
Bromofos metil (285)	13,4	± 30 % (9,4 - 17,4)
Bifentrín (141)	13,5	± 30 % (9,4 - 17,5)
Flucitrinato (107)	28,0	± 25 % (21,0 - 35,0)

Para el cálculo de la abundancia relativa media del ion se han considerado solo aquellos datos cuya SD_{Ar} es inferior a 5.

En las siguientes gráficas, se representa dicho intervalo de tolerancia aceptado para cada compuesto y las abundancias relativas obtenidas en el rango de concentraciones estudiado (50-0,05 ppb) para el ion confirmatorio menos intenso.

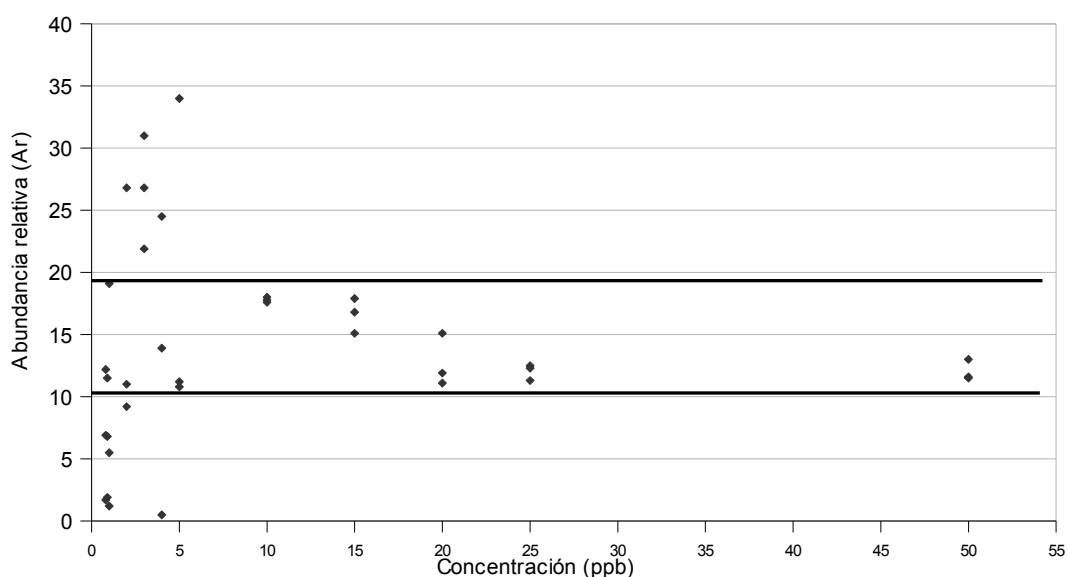


Figura 22. Influencia de la concentración sobre la Ar del ion 147 del gamma Lindano con indicación de las tolerancias permitidas según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE para un confirmación positiva

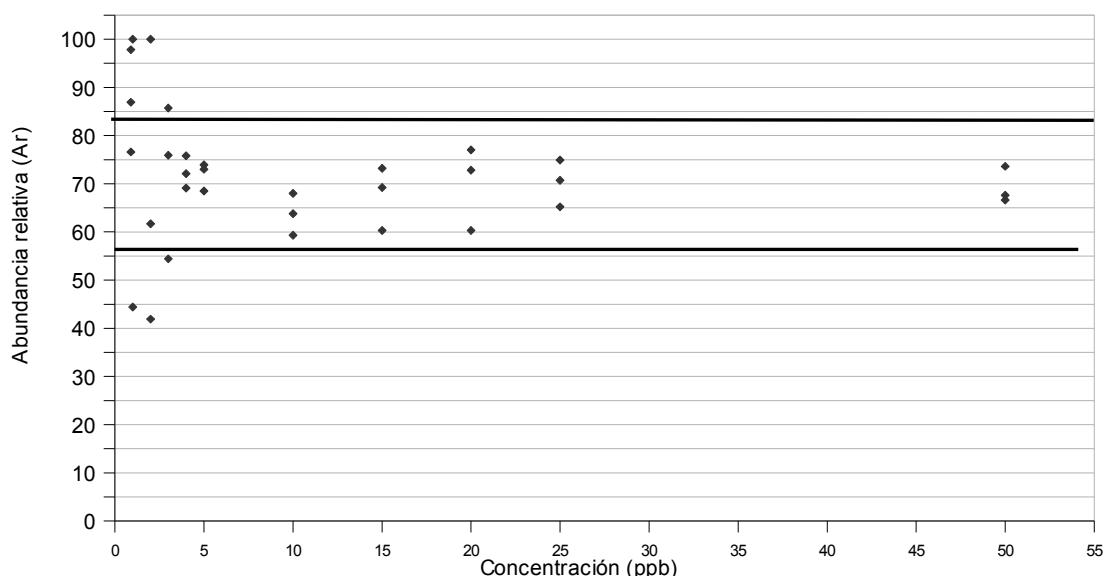


Figura 23. Influencia de la concentración sobre la Ar del ion 182 del Pirimifos etil con indicación de las tolerancias permitidas según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE para un confirmación positiva

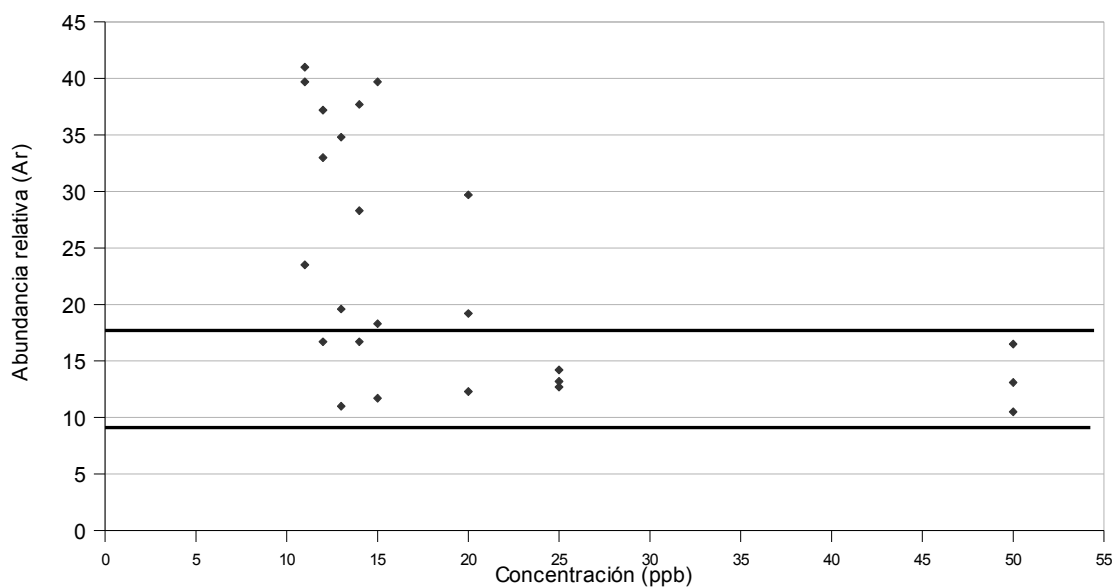


Figura 24. Influencia de la concentración sobre la Ar del ion 285 del Bromofos metil con indicación de las tolerancias permitidas según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE para un confirmación positiva

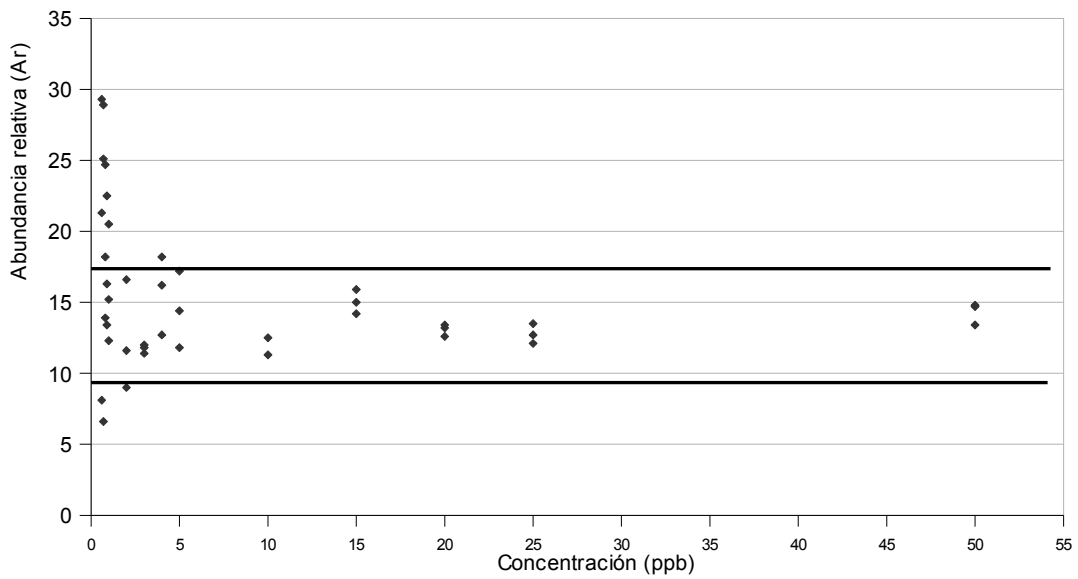


Figura 25. Influencia de la concentración sobre la Ar del ion 141 del Bifentrín con indicación de las tolerancias permitidas según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE para un confirmación positiva

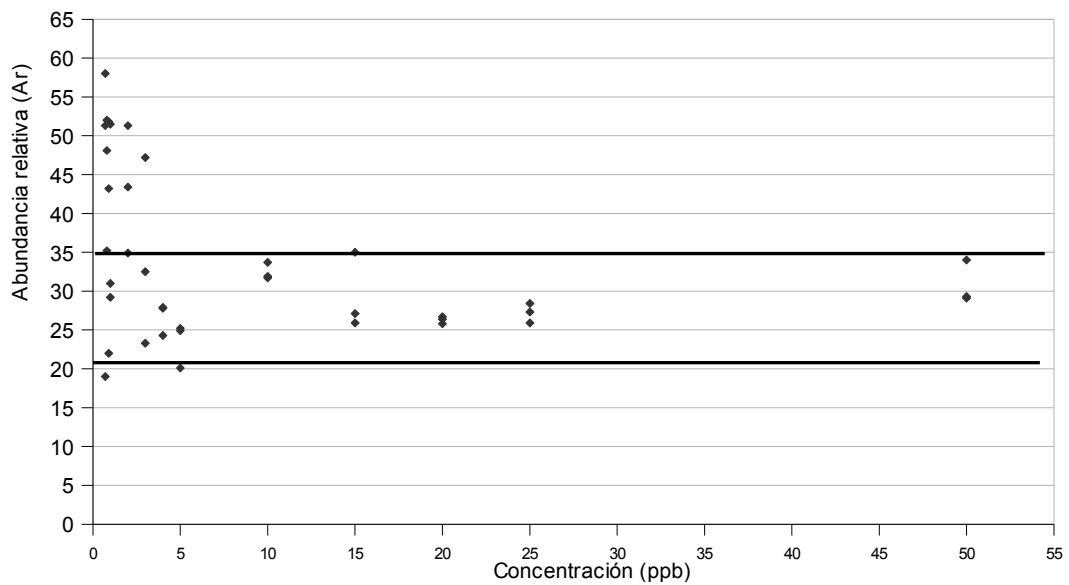


Figura 26. Influencia de la concentración sobre la Ar del ion 107 del Flucitrinato con indicación de las tolerancias permitidas según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE para un confirmación positiva

La siguiente tabla muestra las concentraciones a las cuales se cumplen los criterios de la Decisión de la Comisión 2002/657/CE, es decir, que el ion menos intenso tenga una proporción con el pico base dentro de las tolerancias aceptables.

Tabla 12. LOC calculados en función de que cumplan los criterios de la Decisión de la Comisión 2002/657/CE

Compuesto	LOC (ppb)
Gamma lindano	5
Pirimifos etil	4
Bromofos metil	25
Bifentrín	1
Flucitrinato	5

Como puede observarse, existe una significativa diferencia con los LOC calculados exclusivamente teniendo en cuenta la relación S/N. Puede observarse que este criterio es más restrictivo que el anteriormente evaluado.

Si adicionalmente se tiene en cuenta el error con que se mide dicha abundancia relativa, podemos observar en los datos expuestos en las tablas 5 a 9, que el instrumento puede medir la abundancia relativa del ion menos intenso con un error aceptable hasta las siguientes concentraciones:

Tabla 13. Concentraciones a las que el error de la abundancia relativa es inferior al 5%

Compuesto	LOC (ppb)
Gamma lindano	4
Pirimifos etil	4
Bromofos metil	25
Bifentrín	1
Flucitrinato	4

Los datos obtenidos son significativamente parecidos a los mostrados en la Tabla 12. Parece lógico pensar que el instrumento es capaz de medir los iones de confirmación con unas abundancias relativas correctas hasta una concentración mínima, por debajo de la cual o no se mantiene dentro de los márgenes de tolerancia aceptables según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE o se miden con un error elevado (superior al 5%).

V. CONCLUSIONES

A continuación se destacan las conclusiones más importantes derivadas del presente Trabajo Fin de Máster:

1. Que no existen diferencias significativas en la medida de la relación S/N cuando se utilizan los métodos de cálculo pico a pico o raíz cuadrada media (ambos métodos se pueden utilizar en el instrumento empleado).
2. Existen discrepancias entre los diversos criterios de cálculo de LOC evaluados que son:
 - a) El LOC es aquella concentración mínima a la que se puede medir el ion de confirmación menos intenso con una relación S/N de al menos 3.
 - b) El LOC es aquella concentración mínima a la que se puede medir los iones de confirmación con un error menor a la tolerancia máxima aceptable según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE.
 - c) El LOC es aquella concentración mínima a la que se puede medir la abundancia relativa del ion de confirmación menos intenso con un error inferior al 5%
3. Dadas las discrepancias entre los diferentes métodos evaluados para el cálculo del LOC, se propone establecer dicho límite como aquella concentración mínima a la que se puede obtener un espectro de masas en el que el ion de confirmación menos intenso es medido con una relación S/N de al menos 3 y cuya abundancia relativa está dentro de los márgenes de tolerancia aceptados por la Decisión de la Comisión 2002/657/CE. A las concentraciones establecidas como LOC bajo este criterio se puede asegurar un nivel de confianza adecuado a la hora de establecer la naturaleza de la sustancia determinada.

VI. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO

Una vez concluido el trabajo, se proponen como estudios de continuación del mismo:

1. Realizar un estudio estadístico más avanzado y específico del LOC de manera análoga al cálculo del límite de decisión ($CC\alpha$) y capacidad de detección ($CC\beta$) establecidos para los límites de detección y cuantificación ya que este trabajo ha sido eminentemente práctico, siguiendo las recomendaciones de los espectrometristas de la ASMS.
2. Realizar el estudio incluyendo el posible efecto matriz de la muestra.
3. Ampliar el número de compuestos objeto de estudio incluyendo plaguicidas pertenecientes a otras familias químicas diferentes a las ya estudiadas u otro tipo de compuestos.
4. Evaluar el cálculo de los LOC utilizando otros modos de adquisición espectrométrica diferentes a SRM.
5. Extender el estudio a cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

VII. REFERENCIAS

- [1] E. Hofman, V. Stoobant, *Mass Spectrometry. Principles and Applications*, John Wiley & Sond (Third Edition 2007), Chichester.
- [2] R. Romanathan, *Mass Spectrometry in Drug. Metabolism and pharmacokinetics*, John-Wiley&Sond (2009), New Yersey.
- [3] R. Willoughby, E. Sheehan, S. Mitrovich, *A global view of LC/S. How to solve your most challenging analytical problems*, Global view Publishig (2008), Pittsburg.
- [4] B.M. Simonet, *Quality control in qualitative analysis*, Trends Anal. Chem 24 (2005) 525-531.
- [5] M. Valcárcel, A. Rios, *Quality assurance in analytical laboratories engaged in research and development activities*, Accred Qual Assur 8 (2003) 78-81.
- [6] http://apps.fao.org/CodexSystem/pestdes/pest_ref/pest_s.htm
- [7] Guía de Buenas Practicas de Higiene Agrícola y de Manufactura para la producción primaria (cultivo-cosecha), acondicionamiento, empaque, almacenamiento y transporte de frutas frescas. Resolución SENASA 5/10/02. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO 151 (2003) ISSN 1020-4334.
- [8] Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites mínimos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo (DO L70 de 16.3.2005, p.1).
- [9] R. A. Bethem, R. K. Boyd, *Mass Spectrometry in Trace Analysis*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 9 (1998) 643-648.
- [10] R. Baldwin, R.A. Bethem, R.K. Boyd, W.L. Budde, T. Cairns, R.D. Gibbons, J.D. Henion, M.A. Kaiser, D.L.Lewis, J.E. Matusik, J.A. Sphon, R. Stephany, R.K. Trubey,

1996 ASM FALL WORKSHOP: *Limits to Confirmation, Quantitation, and Detection*, J.Am. Soc. Mass Spectrom. 8 (1997) 1180-1190.

[11] R.A. Bethem, R.K. Boyd, *Mass Spectrometry in Trace Analysis*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 9 (1998) 643-648.

[12] R. Causon, *J. Chromatogr.B.* 689 (1997) 175.

[13] R.D. Gibbons, *Enf. Ecol. Stat* 2 (1995) 125.

[14] J.A. Sphon, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61 (1978) 1247.

[15] L. van Ginkel, R.W. Stephany, *Proc. EuroResidue II, Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food*, Veldhoven 303 (1993), The Netherlands.

[16] Decisión de la Comisión 2002/657/CE, de 14 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (DO L221 de 17.8.2008, p.8).

Versión consolidada disponible en http://eur-lex.europa.eu/Result.do?T1=V4&T2=2002&T3=657&RechType=RECH_consolidated&Submit=Buscar

[17] Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/157/CEE y 91/664/CEE (DO L125 de 23.5.1996, p.10).

Versión consolidada disponible en http://eur-lex.europa.eu/Result.do?T1=V3&T2=1996&T3=23&RechType=RECH_consolidated&Submit=Buscar

[18] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, *Mass Spectrometry of Confirmation of the Identity of Animal Drug Residues*, <http://www.fda.gov/cum> (2003).

[19] J.L. Martínez Vidal, F.J. Arrebola, M. Mateu-Sánchez, *Application to routine analysis of a method to determine multiclass pesticide residues in fresh vegetables by gas chromatography/tandem mass spectrometry*, Rapid Comm. Mass Spectrom, 16 (2002) 1106-1115.

[20] J.P. Antignae, B. Le Bizee, F. Mteau, F. Andre, *Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the « 2002/657/EC » European decision: guideline and application*, Analytica Chimica Acta, 483 (2003) 325-334.

ANEXO I

GRUPO A. Sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas

1. Estilbenos, derivados de los estilbenos, sus sales y ésteres.
2. Agentes antitiroidianos.
3. Esteroides
4. Resorcylic Acid Lactones, incluido el Zeranol.
5. B- agonistas.
6. Sustancias incluidas en el Anexo I del Reglamento (CEE) 2377/90 del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los LMR de medicamentos veterinarios en los los alimentos de origen animal: Lista de sustancias farmacológicamente activas para las que no puede establecerse límite máximo alguno.
 - Aristolochia spp. y sus formulaciones
 - Cloranfenicol
 - Cloroformo
 - Clorpromacina
 - Colchicina
 - Dapsona
 - Dimetridazol
 - Metronidazol
 - Nitrofuranos (incluida furazolidona)
 - Ronidazol

GRUPO B. Medicamentos Veterinarios y contaminantes.

1. Sustancias antibacterianas, incluidas las sulfamidas y quinolonas.
2. Otros medicamentos veterinarios:
 - a. Antihelmínticos.
 - b. Anticoccidianos, incluidos los nitroimidazoles.
 - c. Carbamatos y piretroides.
 - d. Tranquilizantes.
 - e. Antiinflamatorios no esteroideos (AINS).
 - f. Otras sustancias que ejerzan una actividad farmacológica.

3. Otras sustancias y contaminantes medioambientales:
 - a. Compuestos organoclorados incluidos los PCB.
 - b. Compuestos organofosforados.
 - c. Elementos químicos.
 - d. Micotoxinas.
 - e. Colorantes.
 - f. Otros.