

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

Trabajo Fin de Máster:

**ESTUDIO DEL AJUSTE ESPECTRAL EN LA CONFIRMACIÓN DE
RESULTADOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE
MASAS EN TÁNDEM**



UNIVERSIDAD DE ALMERIA
Departamento de Hidrogeología y Química Analítica
Facultad de Ciencias Experimentales

Belén Ramos Fernández

Noviembre 2011

TRABAJO FIN DE MÁSTER

El presente trabajo ha sido realizado por Belén Ramos Fernández para la obtención del Título de Máster "Residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental", dentro del Programa de Másteres Universitarios Oficiales.

Fdo. Belén Ramos Fernández

Tutor: Francisco Javier Arrebola Liébanas

Fdo. Francisco Javier Arrebola Liebánas

INDICE

I.	PRESENTACIÓN.....	4
II.	MEMORIA CIENTIFICA.....	11
1.	Objeto y campo de aplicación.....	11
2.	Introducción.....	12
2.1.	Planteamiento del problema.....	12
2.2.	Ajuste espectral.....	20
2.3.	Plaguicidas a analizar.....	21
III.	EXPERIMENTAL.....	23
1.	Reactivos y disolventes.....	23
2.	Instrumentación.....	23
3.	Condiciones Cromatográficas.....	25
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
1.	Caracterización espectrométrica de los compuestos objeto de estudio.....	27
2.	Ajuste espectral expresado como FIT en SRM.....	33
2.1.	Estudio del ajuste espectral expresado como FIT en SRM..	34
2.2.	Relación entre los ajustes espectrales FIT y los criterios de confirmación de la Decisión de la Comisión 2002/657/CE..	37
2.4.	Estabilidad de los ajustes espectrales FIT con el tiempo.....	42
V.	CONCLUSIONES.....	47
VI.	PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO.....	48
VII.	REFERENCIAS.....	49

I. PRESENTACIÓN

El “Máster en residuos de plaguicidas y contaminantes. Control alimentario y ambiental”, de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Almería, consta de 60 créditos ECTS y se estructura en cinco módulos (3 teóricos, 1 experimental y 1 destinado al Trabajo Fin de Máster), cuyo contenido se detalla a continuación.

Módulo I. Plaguicidas

Proporciona la formación general necesaria, acerca de distintas disciplinas científicas que soportan el control alimentario y ambiental de residuos de plaguicidas, atendiendo a aspectos tales como legislación, registro o mejoras en prácticas agrícolas. Consta de las siguientes asignaturas:

Plaguicidas. Aplicaciones y tendencias (3 créditos)

En esta asignatura se han adquirido conocimientos de los diferentes tipos de plaguicidas en función de su estructura química, así como la relación de ésta con la actividad biológica. En la misma se han estudiado aspectos básicos del funcionamiento de las técnicas de aplicación de los fitosanitarios con vistas a minimizar los riesgos sobre el medio ambiente y la salud de las personas.

Políticas de seguridad alimentaria (3 créditos)

Se han analizado las diferentes estrategias y políticas sobre seguridad alimentaria, así como el marco normativo, nacional y autonómico, regulador del control de los residuos de plaguicidas y de contaminantes en alimentos. Se estudiaron también las medidas de gestión más adecuadas para lograr una minimización de residuos y contaminantes, y el conocimiento de las actuaciones ante situaciones de alerta sanitaria, la responsabilidad del operador de la cadena alimentaria y la función que desempeñan las administraciones.

Registro de plaguicidas (3 créditos)

Se abordaron los objetivos y el procedimiento de registro de plaguicidas, así como los documentos y normas de la FAO, OCD, y la UE. Los conocimientos asimilados en este curso capacitan al alumnado para aplicar procedimientos de evaluación de riesgo sobre la salud humana, evaluación de riesgo ocupacional y evaluación de riesgo ambiental.

Formulaciones de plaguicidas. Liberación controlada (3 créditos)

Se da información sobre la formulación de plaguicidas centrándose en la liberación controlada, así como en la preparación y evaluación de estas formulaciones. Por otra parte, se dieron a conocer la aplicación de estas formulaciones en la prevención de la contaminación por plaguicidas y sus aplicaciones agronómicas. La asignatura culmina poniendo en práctica la teoría, con la elaboración de un plaguicida de liberación controlada.

Módulo II. Contaminantes

Estudio de contaminantes alimentarios y ambientales, abordando, entre otros, procesos de remediación de suelos. Consta de las siguientes asignaturas:

Contaminante. Significación Alimentaria y Ambiental (3 créditos)

Se han adquirido conocimientos básicos en toxicología alimentaria y ambiental, así como sobre normativa en relación a la presencia de contaminantes ambientales en agua, suelos y aire. También se han desarrollado las habilidades necesarias para la evaluación de la contaminación de distintas muestras biológicas.

Contaminación y remediación de suelos (3 créditos)

Se abordaron las propiedades de los principales contaminantes del suelo, así como los factores que controlan su destino en el medio ambiente. Igualmente, se llevó a cabo el estudio de los diferentes métodos y técnicas para la prevención y remediación de suelos contaminados, siendo uno de los

objetivos de este curso el determinar, en función de las condiciones del suelo contaminado, la técnica más apropiada para proceder a su descontaminación.

Especiación de metales (3 créditos)

Optativa en la que se estudian aspectos generales relacionados con la especiación química de elementos, además de incidir en la importancia que tienen en el campo medioambiental y alimentario. También se abordan aspectos generales del control de calidad en especiación.

Calidad y trazabilidad alimentaria (3 créditos)

Se estudia la seguridad y calidad alimentaria, los distintos tipos de fraudes alimentarios que existen, así como el control oficial de productos alimenticios. Además de conocer el Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC). Finalmente se estudió la trazabilidad, sistema de nueva implantación para la seguridad alimentaria con el cual se facilita el seguimiento de alimentos "de la granja a la mesa".

Módulo III. Gestión de Laboratorios

Se aprenden las herramientas cognitivas y estratégicas precisas para el control analítico en el campo alimentario y ambiental, así como la gestión de la calidad en laboratorios. Consta de las siguientes asignaturas:

Muestreo. Preparación de muestras (3 créditos)

Se explican los procedimientos de toma de muestras y su importancia dentro del problema analítico. Se dieron a conocer las principales técnicas para la separación y/o pre-concentración de trazas, destacando los distintos aspectos relacionados con la reducción de tiempo y coste de dicha etapa. Como un objetivo de esta asignatura se encuentra el saber elegir el tratamiento y modo de preparación de la muestra en función del tipo de análisis requerido, del método seleccionado y de la naturaleza de la matriz.

Tratamiento de datos analíticos y control de calidad (3 créditos)

Se estudian los métodos químico-métricos utilizados en el proceso analítico para el tratamiento de datos y evaluación de su calidad, es decir, las herramientas estadísticas para asegurar que las medidas son comparables. También se abordó la validación de métodos cuantitativos, cualitativos y el control de calidad interno y externo.

Gestión de la calidad en laboratorios de ensayo (3 créditos)

Se estudian las normas de gestión y de acreditación de laboratorios, además de conocerse las buenas prácticas de laboratorio, y los documentos necesarios para la implantación de estos sistemas de gestión, incluyendo el proceso de auditorías en los mismos.

Módulo IV. Experimentación en Técnicas Cromatográficas

Tiene un contenido fundamentalmente práctico para facilitar el manejo de técnicas analíticas avanzadas en el control de plaguicidas y contaminantes orgánicos, así como en la caracterización de metabolitos y/o productos de degradación.

Espectrometría de masas (3 créditos)

La base teórica de la espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*, MS), las diferentes técnicas de ionización, los distintos tipos de analizadores, modos de operación, resolución, criterios de identificación y cuantificación han sido objeto de estudio de este curso .

Productos de transformación de plaguicidas (2 créditos)

Se dieron a conocer la importancia de los productos de transformación, la aplicación de las principales técnicas analíticas: cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, CG) y cromatografía de líquidos (*Liquid Chromatography*, LC) acopladas a MS. Igualmente se estudiaron las distintas rutas de degradación de los plaguicidas. También se realizó una aproximación a la técnica de resonancia magnética nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR).

Exposición a plaguicidas (2 créditos)

Se abordaron los principios de la evaluación de riesgos para la salud humana derivados del uso de plaguicidas. Adquirimos la habilidad de diferenciar entre las etapas de evaluación de riesgos, identificación y caracterización de peligros, y la planificación de los estudios de campo para lograr evaluar la exposición humana y ambiental a plaguicidas.

Experimentación en Cromatografía de Gases (4 créditos)

Se estudia la técnica de GC, su acoplamiento con MS y las ventajas ante otros detectores. Es una asignatura experimental principalmente, en la que a través de diferentes prácticas, y utilizando dos equipos diferentes de GC, uno con analizador de trampa de iones y otro de triple cuadrupolo, se abordan diferentes aspectos en el desarrollo de métodos como son: caracterización espectrométrica de analitos, separación cromatográfica, cuantificación así como otros aspectos relacionados con la verificación y el mantenimiento de equipos de GC.

Experimentación en Cromatografía de Líquidos (4 créditos)

Se estudia el acoplamiento de la LC con detectores de MS y las ventajas frente a los detectores convencionales, como el de fluorescencia. Al igual que la anterior, se trata de una asignatura de carácter fundamentalmente práctico, en la que se ha abordado el desarrollo de métodos, incluyendo caracterización espectrométrica y optimización de condiciones cromatográficas en métodos multianalito de residuos y contaminantes, validación de métodos, así como aspectos básicos derivados del mantenimiento de los equipos de LC.

Modulo V. Trabajo Fin de Máster

El Trabajo Fin de Máster titulado "Estudio del ajuste espectral en la confirmación de resultados por Cromatografía de Gases-Espectrofotometría de Masas en tándem" se ha realizado en el Grupo de Investigación *Química Analítica de Contaminantes* (código PAI FQM-170) perteneciente al

Departamento de Hidrología y Química Analítica, de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Almería.

El trabajo 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.*

Para poder llevar a cabo este trabajo de investigación han sido fundamentales los conocimientos tanto previos como adquiridos, referentes a las asignaturas:

- Políticas de Seguridad Alimentaria.
- Contaminantes. Significación alimentaria y ambiental.
- Tratamiento de datos analíticos.
- Espectrometría de masas.
- Experimentación en técnicas cromatográficas.

En el desarrollo de dicho trabajo he adquirido habilidades y conocimientos para:

- Buscar información bibliográfica y legislación relacionada con la temática del trabajo científico a desarrollar.
- Planificar y llevar a cabo estudios científicos relacionados con la presencia de residuos de plaguicidas en alimentos.
- Evaluar los resultados analíticos obtenidos tras la etapa de análisis mediante CG-MS/MS y obtener conclusiones sobre la eficacia del método.
- Llevar a cabo un tratamiento de datos, tanto en la etapa de análisis como en el posterior estudio, donde ha sido necesario procesar, evaluar, sintetizar y obtener conclusiones de la información obtenida.

Cabe también destacar que el cursar todas estas asignaturas en el Máster, así como el desarrollo del Trabajo Fin de Máster, me han permitido adquirir una serie de competencias tan importantes como son la capacidad de planificación y organización basadas en criterios de calidad y eficacia. Estas competencias son fundamentales para mi desarrollo profesional y personal.

II. MEMORIA CIENTIFICA

1. Objeto y campo de aplicación

La presencia de plaguicidas en alimentos de origen animal es consecuencia de la administración de alimentos que los contienen a los animales de explotación, pasando éstos a la cadena alimentaria [1]. También pueden tener contacto con estas sustancias a través de los tratamientos veterinarios que se apliquen para atender posibles patologías en los animales. Por este motivo es tan importante llevar a cabo un control analítico fiable y robusto para garantizar la seguridad alimentaria (de la granja a la mesa), que hoy en día es demandada en nuestra sociedad moderna. Para ello, las técnicas analíticas basadas en cromatografía acoplada a MS son unas de las principales herramientas de los laboratorios de control. Su alta fiabilidad a la hora de identificar, confirmar y cuantificar la presencia de residuos de plaguicidas y/o metabolitos debe ser asegurada a través de una validación y control de calidad adecuado. Este trabajo fin de máster se centra en el proceso de confirmación de la metodología analítica.

El objetivo de este trabajo se puede resumir en los siguientes puntos:

1. Evaluación del ajuste espectral expresado como FIT (*ajuste* en inglés) como criterio de confirmación en GC-MS/MS utilizando la monitorización de reacciones seleccionadas (*Selected-Reaction Monitoring*, SRM). El FIT es utilizado con cierta frecuencia en laboratorios de control rutinario cuando se monitoriza en el modo de trabajo llamado monitorización de iones producto.
2. Comprobar si este parámetro confirmatorio es válido para el modo MS/MS (SRM) donde sólo contamos con 2 iones producto para confirmar la presencia del analito en la muestra.
3. Evaluar la influencia de la concentración del analito sobre el FIT medido, especialmente a bajas concentraciones (próximas a los límites inferiores, límite de detección, confirmación y cuantificación).
4. Evaluar la estabilidad del FIT a lo largo del tiempo en un análisis rutinario.

5. Establecer la correlación entre criterios de confirmación basados en el uso de FIT y los establecidos en la Decisión 2002/657/CE, sobre el funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados respecto a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos reguladas en la Directiva 96/23/CE.
6. Calcular cómo se definiría entonces el Límite de Confirmación en aquellos casos en los que se utiliza el FIT para medir el ajuste espectral.

2. Introducción

2.1. Planteamiento del problema

Debido al uso de sustancias ilegales en los productos de origen animal, que pueden resultar peligrosas para el consumidor final a causa de sus residuos, se tuvo que reforzar la vigilancia de estas sustancias [2]. Por esto, se han establecido **Planes de vigilancia** de un determinado número de residuos de sustancias de acción farmacológica o de contaminantes del medio natural en los animales de explotación y en los productos procedentes de estos animales, así como la fijación de unos **límites máximos de residuos** (LMR) de medicamentos veterinarios y de otras sustancias en los alimentos de origen animal y la prohibición de uso de otros tantos [3, 4]. Es fundamental para el consumidor que dichos sistemas ofrezcan garantías suficientes sobre la ausencia de tales productos y debemos procurar conservar y fomentar dichas herramientas. La vigilancia se realiza en los animales vivos, sus excrementos y líquidos biológicos, así como los tejidos, productos animales, pienso y agua para beber, regulado en el Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos (BOE 188, de 7/8/1998) [5].

La presencia de plaguicidas en los alimentos, como ya hemos comentado antes, constituye un serio problema para la salud, debido a la elevada toxicidad de algunos de ellos y efectos negativos sobre seres humanos. Una

de las características más importantes de estos compuestos es su persistencia y su incorporación a la cadena trófica, pudiendo producir efectos muy graves a largo plazo, como puede ser trastornos hormonales, reproductivos, nerviosos, efectos carcinogénicos, mutagénicos, etc.

Tiene una gran importancia que los productores y todas aquellas personas que intervengan en el sector agrícola y ganadero asuman una mayor responsabilidad en lo que respecta a la calidad e inocuidad de los productos de origen animal (carne de vacuno, ovino, caprino, aves de corral, cerdo, caza silvestre y de cría, conejo, peces, huevos y ovoproductos, leche y sus productos lácteos, miel...)

El Real Decreto 1749/1998 establece un Plan de Vigilancia (Plan Nacional de Investigación de Residuos, PNIR) que debe detectar estos grupos de residuos y precisar las medidas de detección de la presencia de sustancias en animales, agua de beber y todos los lugares donde se críen o mantengan los animales e igualmente detectar la presencia de residuos de las sustancias anteriores en animales vivos, excrementos y líquidos biológicos, tejidos y productos de origen animal como carne, leche, huevos, miel..., respetando las normas y los niveles y frecuencias de muestreo definidas en la normativa (Anexos III y IV de la Directiva 96/23/CE).

También debe existir un sistema de autocontrol, para garantizar que todas las explotaciones y/o personas que comercialicen animales de explotación cumplen las normativas comunitarias y nacionales aplicables, garantizando que se aceptan sólo animales con la seguridad de que han respetado los tiempos de espera, que no presentan residuos que rebasen los LMR, ni indicios de sustancias o productos prohibidos [6].

Por último, para garantizar esta vigilancia, se deben realizar controles oficiales por muestreo en las distintas fases de producción de alimentos de consumo humano (fabricación, manipulación, almacenamiento, transporte,

distribución y venta o adquisición) y en la producción y distribución de alimentos (piensos) para animales, para detectar la presencia o posesión de sustancias o productos prohibidos que puedan estar destinados a ser administrados a los animales con fines de engorde o al tratamiento ilegal [7].

Las medidas de control afectaran a las siguientes sustancias y grupos de residuos, establecidas el Anexo I de la Directiva 96/23/CE y en el PNIR:

GRUPO A: SUSTANCIAS CON EFETO ANABOLIZANTE Y SUSTANCIAS NO AUTORIZADAS:

- A.1. Estilbenos, derivados de los estilbenos, sus sales y ésteres.
- A.2. Agentes antitiroidianos.
- A.3. Esteroides
- A.4. Resorcylic Acid Lactones, incluido el Zeranol.
- A.5. - agonistas.
- A.6. Sustancias incluidas en el Anexo I del Reglamento (CE) 2377/90 del Consejo, de 26 de junio de 1990: Lista de sustancias farmacológicamente activas para las que no pueden establecerse límite máximo alguno.

GRUPO B: MEDICAMENTOS VETERINARIOS Y CONTAMINANTES:

- B.1. Sustancias antibacterianas, incluidas las sulfamidas y quinolonas.
- B.2. Otros medicamentos veterinarios:
 - B.2.a. Antihelmínticos.
 - B.2.b. Anticoccidianos, incluidos los nitroimidazoles.
 - B.2.c. Carbamatos y piretroides.
 - B.2.d. Tranquilizantes.
 - B.2.e. Antiinflamatorios no esteroideos (AINS).
 - B.2.f. Otras sustancias que ejerzan una actividad farmacológica.
- B.3. Otras sustancias y contaminantes medioambientales:
 - B.3.a. Compuestos organoclorados incluidos los PCB.
 - B.3.b. Compuestos organofosforados.
 - B.3.c. Elementos químicos.
 - B.3.d. Micotoxinas.

B.3.e. Colorantes.

B.3.f. Otros.

Para las sustancias del Grupo A, todos los resultados positivos constatados en caso de aplicación de un método de cribado en lugar de un método de confirmación deberán ser confirmados por un método de confirmación establecido por un laboratorio autorizado.

Cuando de los resultados revelen existencia de un tratamiento ilegal y/o presencia de residuos de sustancias autorizadas o contaminantes que sobrepasen los niveles fijados en la normativa, se aplicarán medidas correctoras y/o sancionadoras, según el caso. En principio esas sustancias/ productos no autorizados o sustancias de los Grupos A y B.1 y 2 en personas no autorizadas, deberán quedar bajo control oficial hasta que la autoridad competente adopte disposiciones apropiadas.

Las sustancias o grupos de residuos que deben determinarse, dependerán del tipo de animales, sus piensos y agua de beber y por tipos de productos de animales de origen primario, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 1. Grupo de residuos o sustancias que han de detectarse según el tipo de animales y productos de origen animal, reguladas en la Directiva 96/23/CE y PNIR.

Tipos de animales y productos animales - Grupo de sustancias	Bovino, ovino, caprino, porcino y solípedos domésticos	Aves de corral	Animales de acuicultura	Leche	Huevos	Carne de conejo y de caza de cría. Caza silvestre (*)	Miel
A1	X	X	X			X	
A2	X	X				X	
A3	X	X	X			X	
A4	X	X				X	
A5	X	X	X			X	
A6	X	X	X	X	X	X	

B1	X	X	X	X	X	X	X
B2a	X	X	X	X		X	
B2b	X	X			X	X	
B2c	X	X				X	X
B2d	X						
B2e	X	X		X		X	
B2f							
B3a	X	X	X	X		X	X
B3b	X			X			X
B3c	X	X	X	X		X	X
B3d	X	X	X	X			
B3e			X				
B3f							

(*) A la caza silvestre sólo le afectan los elementos químicos.

En cualquier caso, desde un punto de vista químico-analítico, 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 2002/657/CE de la Comisión [8] 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 y PNIR:

Tabla 2. 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.

Los procedimientos confirmatorios tienen que ser desarrollados y validados por anticipado antes de su aplicación para el análisis de muestras reales. En este sentido, la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos de América establece diversos protocolos [9]. No obstante, en la Unión Europea,

la Decisión 2002/657/CE establece que los métodos de confirmación para residuos orgánicos o contaminantes deben incluir información sobre la estructura química del analito. Por ello, los métodos cromatográficos deben de utilizar como método de confirmación la espectrometría de masas.

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 (*Selected-Ion Monitoring*, 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:

1. 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.
2. 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 ión molecular 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 señal ruido para cada ión 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 3. 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-MSⁿ CL-MS, CL-MSⁿ (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 ión 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 (modo 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 4. Relación entre diversos tipos de fracciones de masa y puntos de identificación obtenidos

Técnica de MS	Puntos identificación obtenidos por ión
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 ión 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.

2.2. Ajuste espectral

Una de las principales herramientas para identificación de compuestos orgánicos en mezclas complejas mediante MS de baja resolución es aquella que emplea la comparación con bibliotecas espectrales comerciales [11]. El caso de la bibliotecas comerciales para EI es el más conocido aunque existen numerosas otras [12-19]. Para las búsquedas espectrales, resulta muy cómodo la utilización de software de búsqueda automatizados. Hoy en día la mayoría de las bibliotecas espectrales comerciales incluyen esta posibilidad. Estos software de búsqueda espectral ofrecen listas de ajuste ordenadas de acuerdo aun índice numérico de similitud generado por un algoritmo de

búsqueda. Los detalles de dichos algoritmos pueden determinar la efectividad de la búsqueda [20] y aunque todos suelen ser bastante complejos, existe más de un algoritmo propuesto para dichos fines [21,22]. Este índice numérico de similitud expresa cuánta de la información del espectro experimental se encuentra en los espectros almacenados en la biblioteca. Un ajuste perfecto entre un espectro de una sustancia desconocida y otro de referencia difícilmente pueden ser idénticos debido a la variabilidad experimental, pero si pueden ser muy similares facilitando la elucidación de la estructura del compuesto desconocido.

El índice numérico que expresa el ajuste espectral suele llamarse "FIT" o "match" del término inglés *ajuste*. Con frecuencia, el software de manejo de los equipos utiliza estos algoritmos de búsqueda para comparar los espectros de sustancias desconocidas y los de una biblioteca comercial o casera elaborada por el analista. La facilidad de obtener automáticamente dicho índice de comparación ha movido a numerosos laboratorios de control rutinario a su utilización para confirmar la presencia de analitos en las muestras [23-25].

2.3. Plaguicidas a analizar:

Los plaguicidas o compuestos químicos que van a ser estudiados durante esta investigación son:

- **Malatión:** Insecticida organofosforado sintético. Se utiliza para eliminar la mosca del Mediterráneo de las frutas propias del verano. El nombre químico es S-[1,2-bis-(etoxi-carbonil)-etil]-O,O-dimetil-ditiofosfato. Su estructura química es la siguiente:

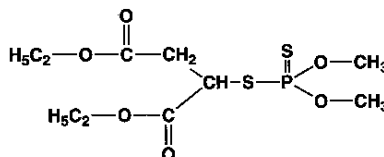


Figura 1. Estructura química del malatión

- **α - endosulfán:** grupo de los organoclorados. Se usa en cultivos de vegetales, frutas, arroz, algodón, nueces de la India, té, café, tabaco y árboles para madera. También se usa como conservante de la madera y para controlar la mosca tsé-tse y las termitas. Su nombre químico es 3-Oxido 6,7,8,9,10,10- hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepina. Su estructura química se corresponde con:

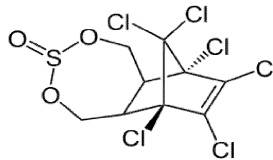


Figura 2. Estructura química del α -endosulfán

- **Pirimicarb:** Insecticida (carbamato) contra los purgones, con actividad aficida por contacto, ingestión e inhalación. Es sistémico y de actividad traslaminar. Su nombre químico es (2-Dimetilamino-5,6-dimetilpirimidinil)N,N-dimetilcarbamato. Su estructura química es:

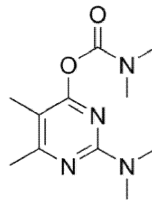


Figura 3. Estructura química del pirimicarb

- **Procimidona:** Es un pesticida que se usa como disruptor endocrino. Su nombre químico es 3-(3,5-diclorofenil)-1,5-dimetilazabicyclo(3.1.0)hexano-2,4-diona y su estructura química:

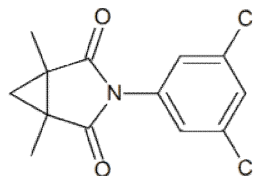


Figura 4. Estructura química de la procimidona

- **Piridabén:** Es una piridazona, insecticida acaricida, usado contra la lucha de la araña roja, trips, ácaros, pulgones. Su nombre químico es 4-

cloro-2(1,1-dimetietil)-5-(((4-(1,1-dimetiletíl)fenil)metil)tio)-3(2H)-piridazona. Su estructura química es:

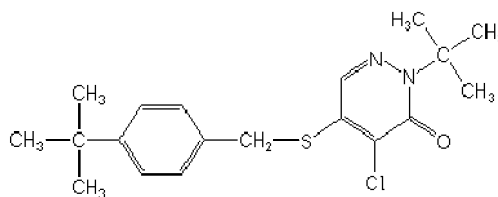


Figura 5. Estructura química del piridabén

Los plaguicidas seleccionados para el estudio pertenecen a diferentes grupos o familias químicas [10] y son o han sido ampliamente utilizados en la agricultura y de manera indirecta también en la ganadería (por consumo de alimentos de origen vegetal) de la provincia de Almería. Se pueden considerar como representativos de los métodos multiresiduo que habitualmente se emplean en los laboratorios de control analítico rutinario de la zona.

III. EXPERIMENTAL

1. Reactivos y disolventes

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

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

2. Instrumentación

Se utilizó un instrumento de GC-MS/MS modelo CP-3800 (*Varian Instruments, Sunnyvale, CA*) que estaba equipado con control electrónico de flujo. Las muestras se inyectaban en el equipo mediante un sistema automático Combi Pal (*CTC Analytics, AG, Zwingen, Suiza*) en un bloque inyector del tipo mixto 1079 con posibilidad de trabajar en modos con o sin división y con temperatura programable, lo que 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*).

El cromatógrafo constaba de una precolumna capilar de sílice fundida sin tratar químicamente de 2 m x 0.25 mm de diámetro interno de Supelco (*Bellefonte, PA*) y de una columna analítica capilar modelo Factor Four VF – 5 ms de 30 m x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm de espesor de fase de la

marca *Varian Instruments*. El Helio empleado como gas portador fue 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 operado en el modo de ionización electrónica (*Electron Ionization, 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 pasaban al analizador 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*) y era calibrado semanalmente con perfluorotributilamina.

3. Condiciones cromatográficas

Alícuotas de 10 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, permaneciendo 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 columna cromatográfica se programaba térmicamente como sigue: inicialmente estaba a 70°C (mantenida 3.5 minutos), posteriormente se calentaba a 35°C/min hasta 180°C y finalmente se calentaba a 10°C/min hasta 300°C (mantenida 7 minutos).

El espectrómetro de masas trabajó en el modo SRM monitorizando dos iones producto por cada compuesto. 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 evitar daños al equipo con el disolvente. El tiempo de medida de cada ión 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 de cada uno de los compuestos objeto de estudio, se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5: Parámetros MS/MS específicos de los compuestos estudiados

Compuesto	Ión precursor (m/z)	Iones producto (m/z)	Energía de colisión (V)
Pirimicarb	238	96	30
	238	166	20
Malatión	173	127	10
	173	99	20
Procimidona	283	96	10
	283	255	10
-endosulfán	241	170	30
	241	206	25
Piridabén	309	132	50
	309	147	20

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización espectrométrica de los compuestos objeto de estudio

Los compuestos objeto de estudio han sido caracterizados espectrométricamente mediante GC-MS. El detector empleado utiliza un sistema de triple cuadrupolo como analizador de masas. El modo de ionización seleccionado fue EI con una energía cinética de los electrones ionizantes de 70 eV.

A continuación se muestran los cromatogramas para los distintos iones característicos:

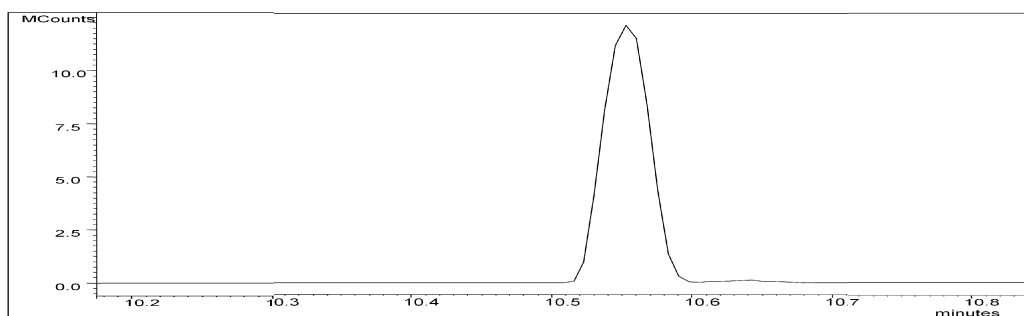


Figura 6: Cromatograma del ión característico (m/z 238) del pirimicarb

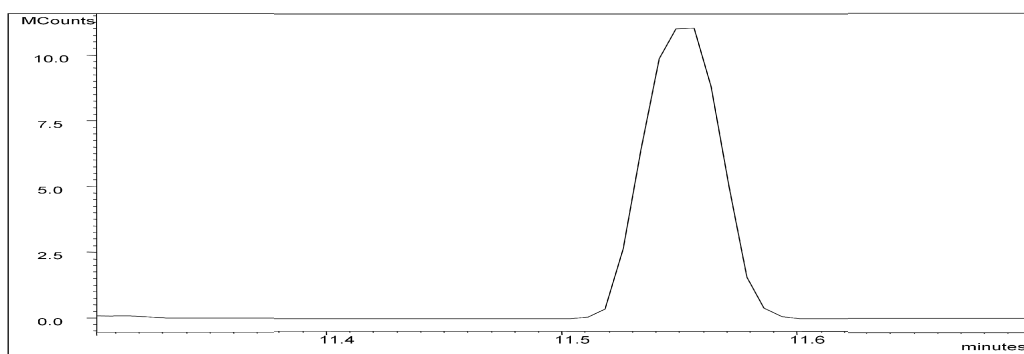


Figura 7: Cromatograma del ión característico (m/z 173) del malatión

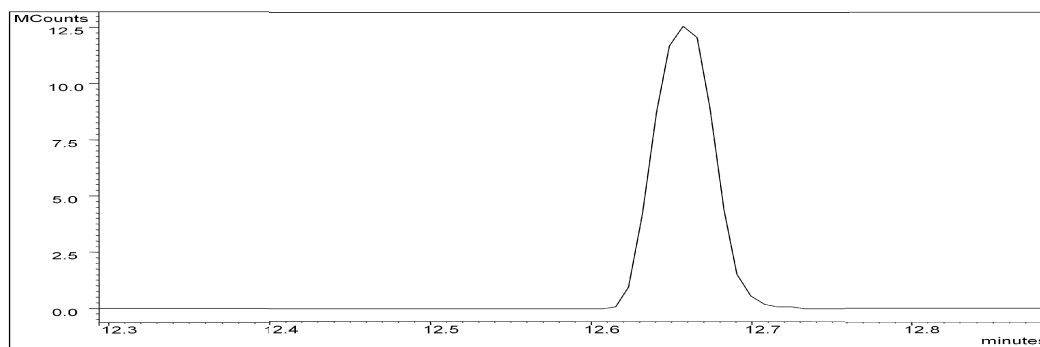


Figura 8: Cromatograma del ión característico (283) de la procimidona

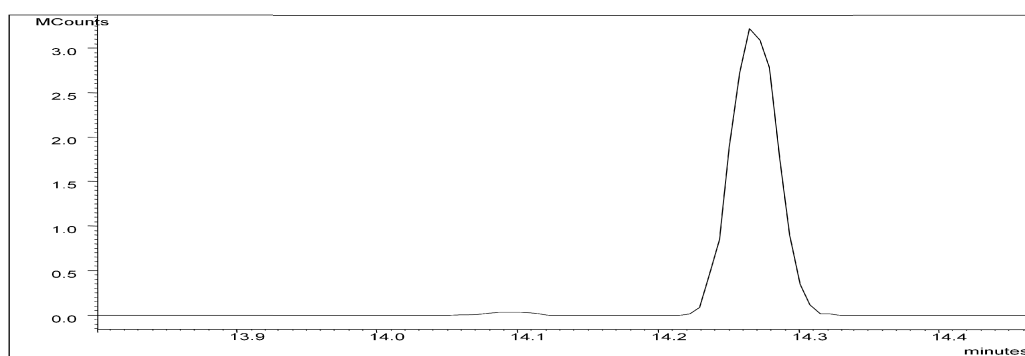


Figura 9: Cromatograma del ión característico (m/z 241) del α -endosulfán

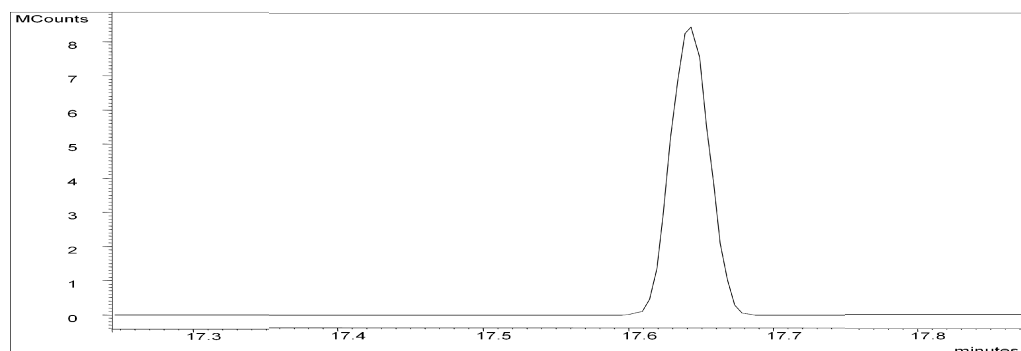
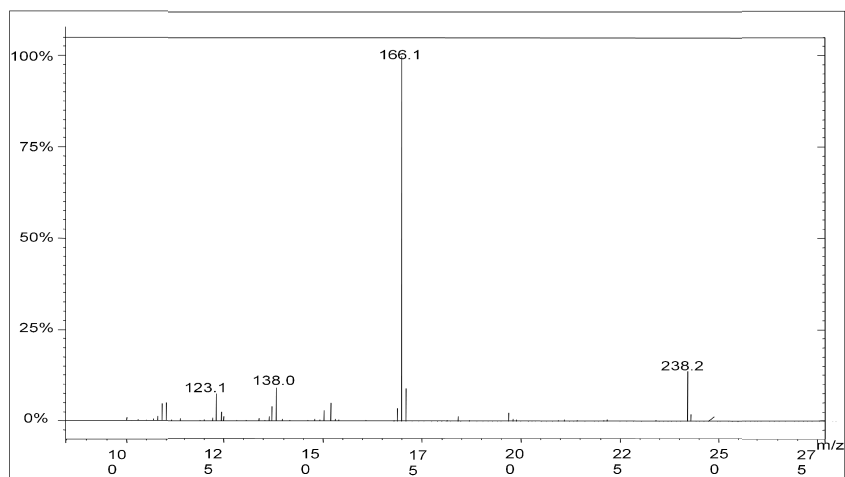
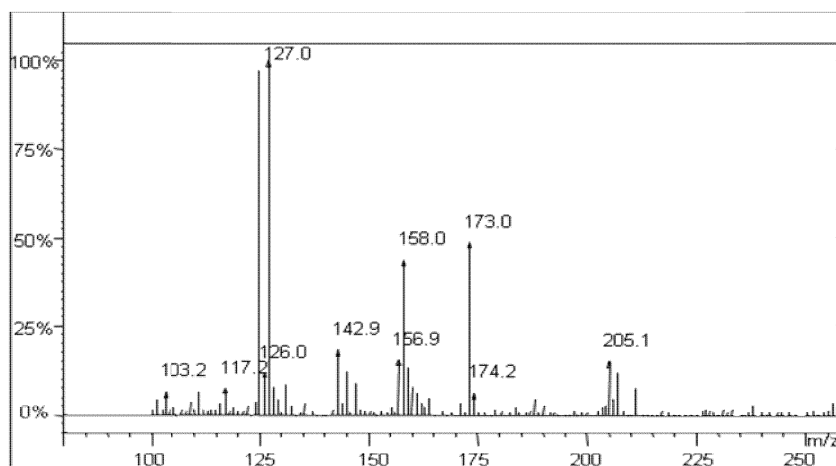
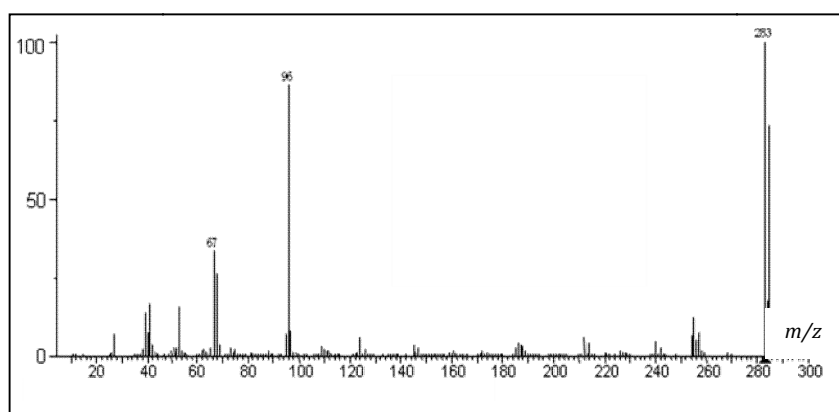
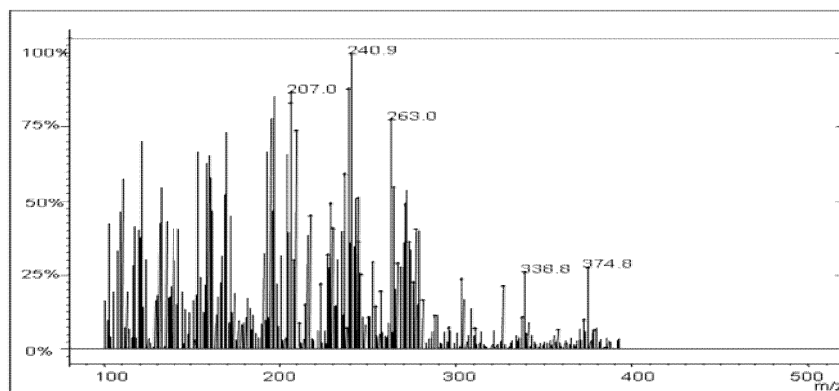
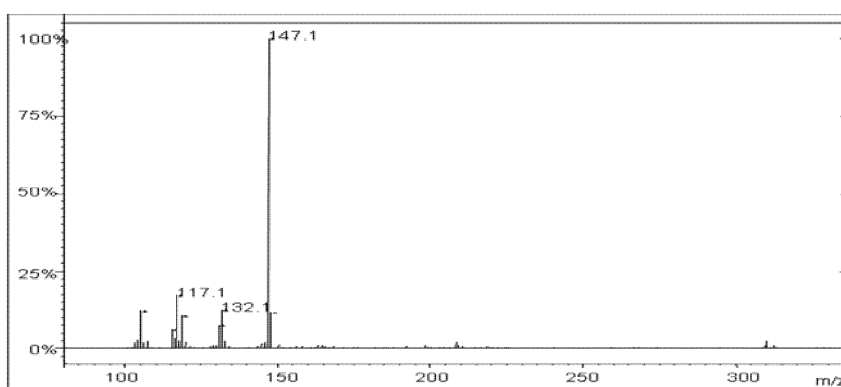


Figura 10: Cromatograma del ión característico (m/z 309) del piridaben

Los espectros de masas obtenidos en modo barrido completo (*full scan*) mediante GC-EI-MS son los que se muestran en las siguientes figuras:

Figura 11: Espectro de masas del pirimicarb en modo *full scan*.Figura 12: Espectro de masas del malatión en modo *full scan*.Figura 13: Espectro de masas de la procimidona en modo *full scan*.

Figura 14: Espectro de masas del α -endosulfán en modo *full scan*.Figura 15: Espectro de masas del piridabén en modo *full scan*.

Los espectros obtenidos fueron comparados con la colección espectral NIST para la confirmación cualitativa de los resultados.

Los compuestos también han sido caracterizados mediante MS/MS. Las condiciones experimentales utilizadas están descritas en la sección IV de experimental. Los criterios de optimización de las condiciones MS/MS siguieron las recomendaciones del Prof. Martínez Vidal y colaboradores [26] adaptadas al modo de trabajo SRM que fue el empleado finalmente. Para cada compuesto, se seleccionaron con fines confirmatorios dos iones producto característicos del espectro MS/MS. La selección de iones precursores se realizó de entre aquellos más representativos en los espectros de barrido completo. Se escogieron considerando en la medida de lo posible que tuvieran la mayor intensidad (abundancia relativa) y valor m/z posible. 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 utilizando las condiciones experimentales descritas en la sección de experimental se muestran en las siguientes figuras:

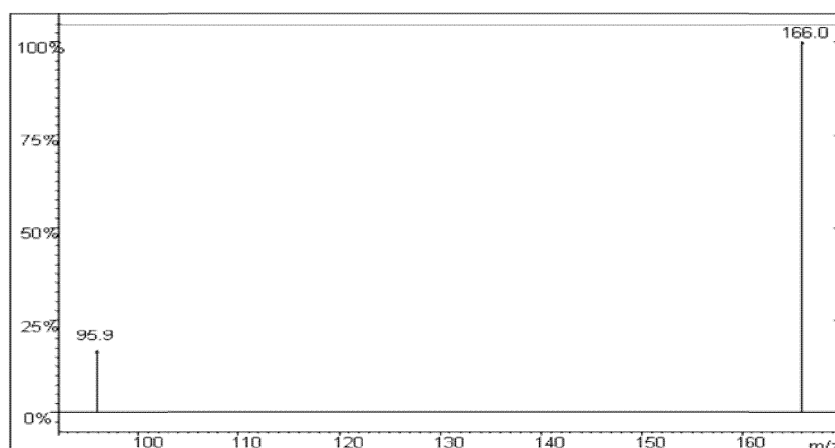


Figura 16: Espectro MS/MS obtenido para el pirimicarb en el modo SRM. Las transiciones monitorizadas son 238>96 y 238>166.

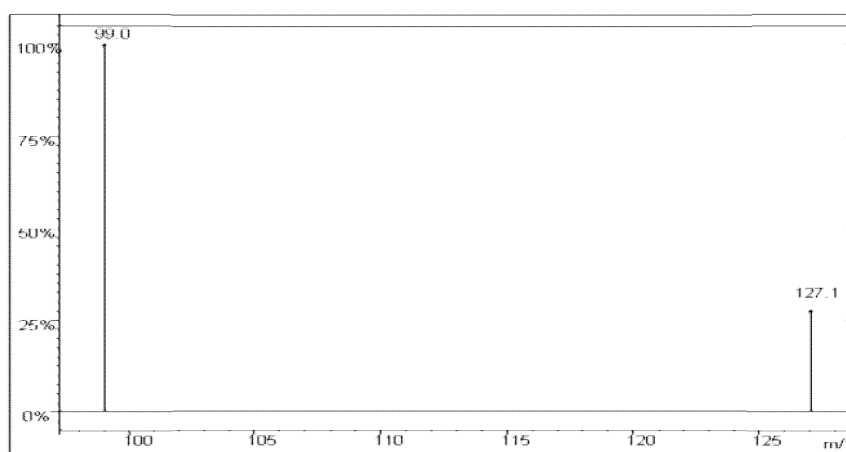


Figura 17: Espectro MS/MS obtenido para el malatión en el modo SRM. Las transiciones monitorizadas son 173> 127 y 173> 99.

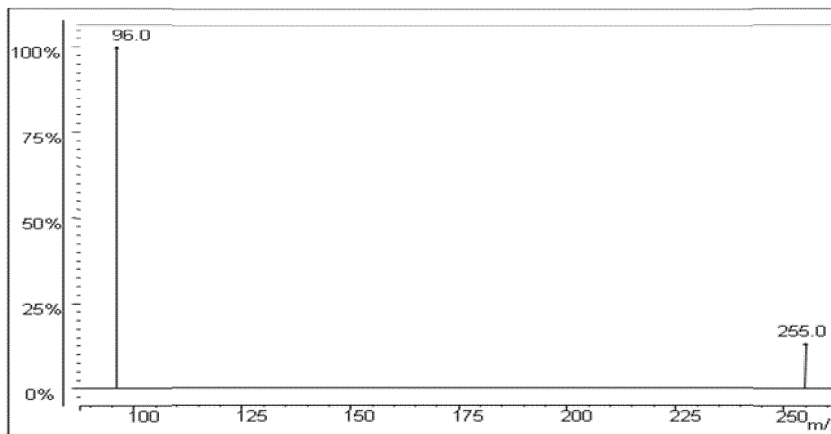


Figura 18: Espectro MS/MS obtenido para el procimidona en el modo SRM. Las transiciones monitorizadas son 283 > 96 y 283 > 255.

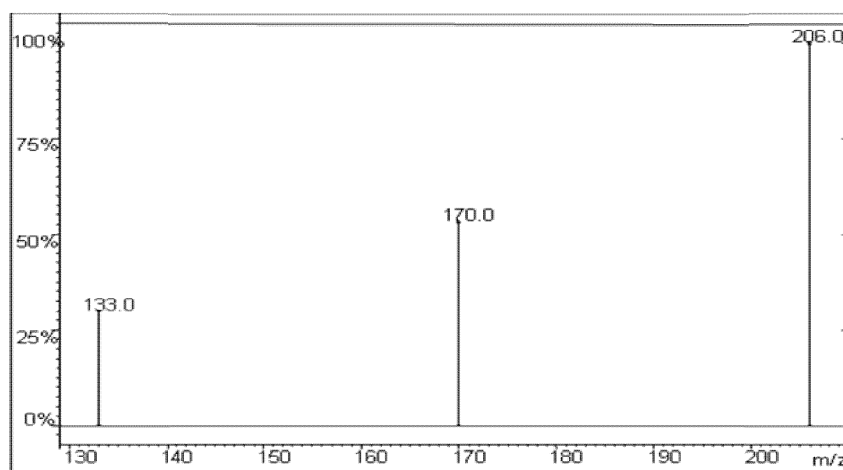


Figura 19: Espectro MS/MS obtenido para el -endosulfán en el modo SRM. Las transiciones monitorizadas son 241 > 133 y 241 > 170.

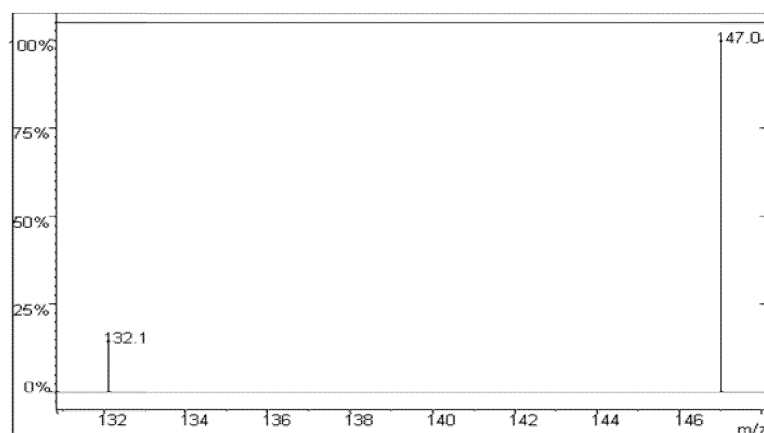


Figura 20: Espectro MS/MS obtenido para el piridabén en el modo SRM. Las transiciones monitorizadas son 309 > 132 y 309 > 147.

2. Ajuste espectral expresado como FIT en SRM

Como ya se ha descrito en la introducción de la presente memoria, en algunas ocasiones los laboratorios de control rutinario establecen los criterios de ajuste espectral en función del FIT que proporciona el software del instrumento. Normalmente, el FIT se utiliza para medir el ajuste espectral durante la confirmación cuando se trabaja en el modo MS simple de barrido completo o en el modo MS/MS monitorizando iones producto. En ambos casos, pero en especial en el modo barrido completo, el analista cuenta con espectros de masas completos en un rango m/z determinado lo que suele ser una cantidad de información espectral significativa. Sin embargo, cuando se adquieren los datos espectrales en el modo SRM, según la Decisión 2002/657/CE, solo es necesario un total de tres puntos de identificación para confirmar un compuesto del grupo B del anexo [27]. Estos se obtienen monitorizando dos iones producto del espectro obtenido en el modo SRM lo cual supone que cualitativamente se cuenta con un número sustancialmente menor de iones para comparar que en los modos de adquisición de datos mencionados anteriormente.

Una de las dudas que puede surgir a la hora de aplicar este modo de confirmación espectral es si el procedimiento es suficientemente robusto y fiable cuando se cuenta con espectros que solo tienen dos iones para confirmar la naturaleza del compuesto diana. Otra gran duda es cómo afecta la concentración en el FIT, especialmente a concentraciones próximas a los límites de detección, confirmación y cuantificación.

En el presente estudio, se evalúa la adecuación de los criterios de ajuste espectral utilizando el FIT y cómo éste se relaciona con los límites de confirmación de un método analítico.

2.1. Estudio del ajuste espectral FIT en función de la concentración

Se ha realizado un estudio del ajuste espectral (expresado como FIT) de los compuestos en el rango de concentraciones comprendido entre 50,00 y 0,05 ppb. Los patrones fueron preparados en disolvente y se analizaron por triplicado.

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 5 a 9.

Tabla 6. Evolución del ajuste espectral (FIT medio) y desviación estándar (SD) del pirimicarb en función de la concentración.

Concentración (ppb)	FIT 1	FIT 2	FIT 3	SD*	FIT medio*
50	996	998	994	2,00	996,0
25	998	994	996	2,00	996,0
20	988	1000	999	6,66	995,7
15	999	995	996	2,08	996,7
10	999	982	999	9,81	993,3
5	930	945	999	36,29	958,0
4	904	901	907	3,00	904,0
3	975	884	901	48,38	920,0
2	889	996	998	62,36	961,0
1	854	845	884	20,42	861,0
0,5	901	884	897	8,89	894,0
0,1	887	883	915	17,44	895,0
0,05	884	900	870	15,01	884,7

* n=3

Tabla 7. Evolución del ajuste espectral (FIT medio) y desviación estándar (SD) del malatión en función de la concentración.

Concentración (ppb)	FIT 1	FIT 2	FIT 3	SD*	FIT medio*
50	991	999	994	4,04	994,7
25	999	967	994	17,21	986,7
20	998	998	994	2,31	996,7
15	999	998	999	0,58	998,7
10	999	998	983	8,96	993,3
5	983	949	942	21,93	958,0
4	998	999	716	163,10	904,3
3	832	782	979	102,40	864,3
2	999	716	811	144,02	842,0
1	987	910	716	139,65	871,0
0,5	977	716	852	130,54	848,3
0,1	716	997	799	144,37	837,3
0,05	977	642	812	167,51	810,3

* n=3

Tabla 8. Evolución del ajuste espectral (FIT medio) y desviación estándar (SD) de la procimidona en función de la concentración.

Concentración (ppb)	FIT 1	FIT 2	FIT 3	SD*	FIT medio*
50	999	999	993	3,46	997,0
25	999	878	998	69,57	958,3
20	996	983	995	7,23	991,3
15	991	989	995	3,06	991,7
10	999	998	998	0,58	998,3
5	879	908	998	62,05	928,3
4	994	878	983	64,03	951,7
3	923	878	999	61,16	933,3
2	987	979	878	60,75	948,0
1	959	993	878	59,08	943,3
0,5	878	878	878	0,00	878,0
0,1	878	934	988	55,00	933,3
0,05	878	934	878	32,33	896,7

* n=3

Tabla 9. Evolución del ajuste espectral (FIT medio) y desviación estándar (SD) del -endosulfán en función de la concentración.

Concentración (ppb)	FIT 1	FIT 2	FIT 3	SD*	FIT medio*
50	972	973	967	3,21	970,67
25	973	974	961	7,23	969,33
20	977	995	932	32,45	968,00
15	933	976	984	27,43	964,33
10	908	928	997	46,69	944,33
5	998	998	839	91,80	945,00
4	938	879	723	111,09	846,67
3	875	830	857	22,65	854,00
2	885	986	995	61,08	955,33
1	516	880	873	208,16	756,33
0,5	868	481	481	223,43	610,00
0,1	481	481	869	224,01	610,33
0,05	868	979	481	261,44	776,00

* n=3

Tabla 10. Evolución del ajuste espectral (FIT medio) y desviación estándar (SD) del piridabén en función de la concentración.

Concentración (ppb)	FIT 1	FIT 2	FIT 3	SD*	FIT medio*
50	972	973	967	3,21	970,7
25	973	974	961	7,23	969,3
20	977	995	932	32,45	968,0
15	933	976	984	27,43	964,3
10	908	928	997	46,69	944,3
5	998	998	839	91,80	945,0
4	938	879	723	111,09	846,7
3	875	830	857	22,65	854,0
2	885	986	995	61,08	955,3
1	516	880	873	208,16	756,3
0,5	868	562	800	160,68	743,3
0,1	618	723	869	126,06	736,7
0,05	868	760	569	151,41	732,3

*n=3

Como puede observarse en los datos experimentales, el FIT medio obtenido se mantiene aproximadamente constante con la concentración hasta llegar a una concentración por debajo de la cual dicho parámetro disminuye significativamente. Se puede por tanto considerar que por debajo de dicha

concentración el FIT medio pierde fiabilidad. Pero, desde un punto de vista crítico, ¿sigue siendo fiable la confirmación a esas concentraciones?

2.2. Relación entre los ajustes espectrales FIT y los criterios de confirmación de la Decisión de la Comisión 2002/657/CE

A la hora de establecer el margen de seguridad que nos garantice resultados confirmatorios fiables, debemos considerar la dispersión de los datos y cotejar los resultados obtenidos mediante el FIT con los criterios confirmatorios de la Decisión 2002/657/CE.

Se estableció como espectro de referencia el obtenido a la mayor de las concentraciones del estudio, esto es, 50 ppb. En la siguiente tabla, se recoge la tolerancia permitida según la Decisión 2002/657/CE, para los iones confirmatorios menos intensos:

Tabla 11. Tolerancias máximas permitidas para las abundancias relativas de los iones confirmatorios menos intensos

Compuesto	Abundancia relativa media (%)	Tolerancia máxima permitida según la Dc 2002/657/CE
Pirimicarb	27 %	± 25%
Malatión	71.7 %	± 20%
Procimidona	18.4 %	± 20%
-endosulfán	19 %	± 20%
Piridabén	9.4 %	± 50%

La siguiente tabla muestra los resultados de ajuste espectral expresados como FIT que cumplen con los criterios de confirmación según la Decisión 2002/657/CE a las diferentes concentraciones del estudio:

Tabla 12. Cumplimiento (S) o no cumplimiento (N) de los criterios de confirmación según la Decisión 2002/657/CE para los compuestos objeto de estudio.

Concentración (ppb)	pirimicarb	Malatión	Procimidona	α-Endosulfán	Piridabén
50	S	S	S	S	S
25	S	S	S	S	S
20	S	S	S	S	S
15	S	S	S	S	S
10	S	S	S	S	S
5	S	N	N	S	S
4	N	N	N	N	S
3	N	N	N	N	S
2	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N
0,5	N	N	N	N	N
0,1	N	N	N	N	N
0,05	N	N	N	N	N

Teniendo en cuenta los criterios de la Decisión, los límites de confirmación (LOC) se podrían establecer para estos compuestos en los valores que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 13. LOC según la Decisión 2002/657/CE.

Compuesto	LOC (ppb)	FIT concordante Dc*
Pirimicarb	5	958
Malatión	10	993
Procimidona	10	989
-endosulfán	5	934
Piridabén	3	978

*Dc, Decisión de la Comisión 2002/657/CE

Como puede comprobarse, el criterio de confirmación de la Decisión resulta bastante garantista con los resultados de confirmación de los resultados experimentales obtenidos para los plaguicidas. Los FIT límite resultantes se pueden considerar bastante altos, todos ellos significativamente por encima de 950 (excepto el α -endosulfán).

El FIT umbral es el valor mínimo de FIT aceptable para considerar como confirmada la presencia de una sustancia en una muestra. Habitualmente es calculado en los laboratorios de control como:

$$\text{FIT umbral} = \text{FIT medio} - 3\text{SD}$$

Si consideramos todas las concentraciones estudiadas (50-0.05 ppb) se obtendrían los siguientes valores de FIT umbral para los compuestos objeto de estudio:

Tabla 14. Valores de FIT umbral calculados para los compuestos objeto de estudio utilizando todos los datos de FIT obtenidos.

Compuesto	FIT umbral
Pirimicarb	785,5
Malatión	685,5
Procimidona	841,1
-endosulfán	577,7
Piridabén	774,6

Como puede comprobarse, los valores obtenidos como FIT umbral son muy bajos y por tanto este criterio se podría considerar como demasiado permisivo ya que según los FIT umbrales calculados, el detector podría confirmar todas las concentraciones ensayadas (excepto procimidona a 0,05 y 0,1 ppb). Es importante seleccionar una concentración de corte que se ajuste mejor a la realidad y que ofrezca mayores garantías de confirmación. Por ejemplo, se propone considerar para el cálculo del FIT umbral solo

aquellos FIT obtenidos previamente a concentraciones superiores a los LOC calculados de acuerdo con la Decisión 2002/675/CE (valores de FIT obtenidos a las concentraciones de la Tabla 12 o superiores). Los FIT umbral calculados de esta manera se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 15. Valores de FIT umbral calculados para los compuestos objeto de estudio utilizando solo los datos por encima del LOC calculado.

Compuesto	FIT umbral
Pirimicarb	943,2
Malatión	990,4
Procimidona	982,3
-endosulfán	912,2
Piridabén	966,6

Todos los FIT umbrales calculados de esta manera coinciden aproximadamente con los que se obtienen a las concentraciones calculadas para los LOC. Esto confirma que es posible definir el FIT umbral con un factor de tres resultando coherente con los criterios de la Decisión 2002/657/CE.

Los resultados se pueden confirmar visualmente en las siguientes gráficas, donde se representa la evolución del FIT de ajuste con la concentración.

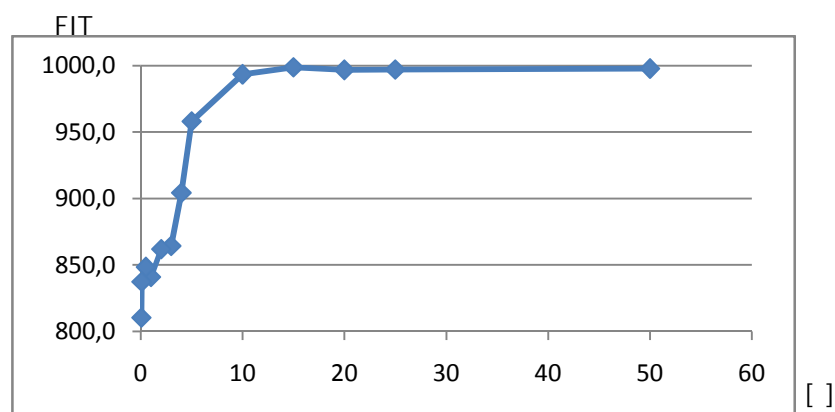


Figura 21. Influencia de la concentración sobre el FIT de ajuste del pirimicarb.

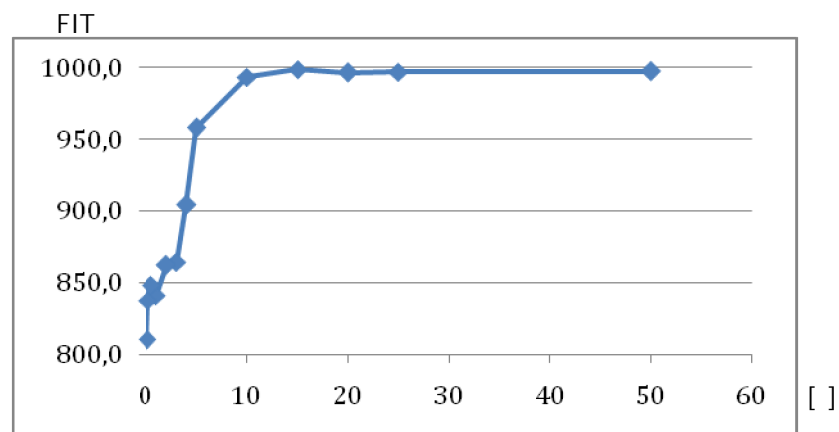


Figura 22. Influencia de la concentración sobre el FIT de ajuste del malatión.

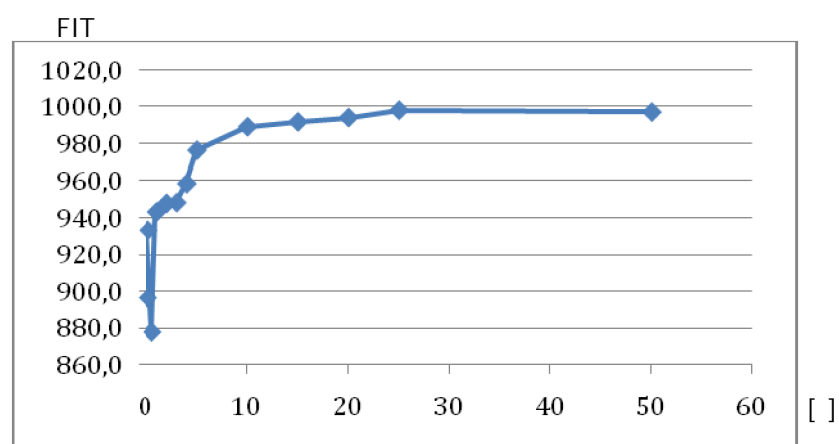


Figura 23. Influencia de la concentración sobre el FIT de ajuste de la procimidona.

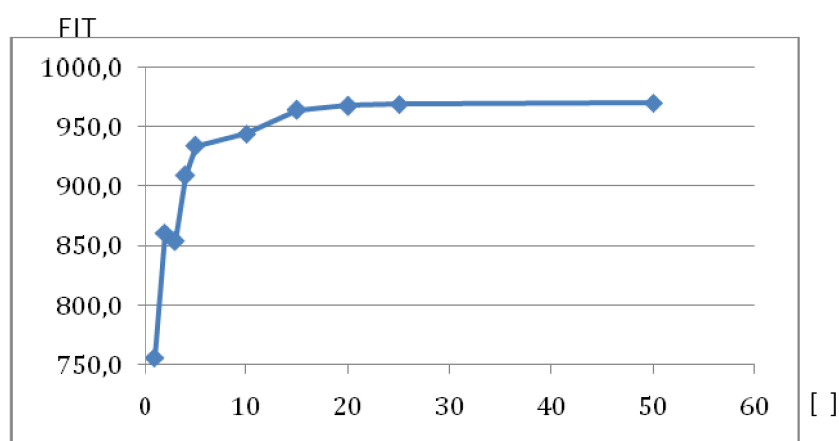


Figura 24. Influencia de la concentración sobre el FIT de ajuste del α -endosulfán.

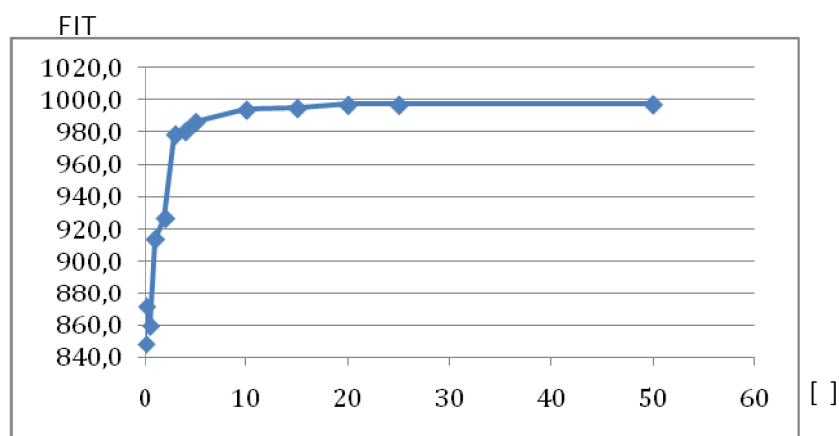


Figura 25. Influencia de la concentración sobre el FIT de ajuste del piridabén.

Se puede observar claramente que cuando se utilizan espectros MS/MS obtenidos mediante SRM, el FIT de ajuste se mantiene bastante elevado y aproximadamente constante hasta una concentración límite por debajo de la cual disminuye significativamente, zona que coincide con aquella que no cumple los criterios de la Decisión 2002/657/CE.

2.3. Estabilidad de los ajustes espectrales FIT con el tiempo

Se ha realizado un estudio de la estabilidad del FIT como indicador del ajuste espectral a lo largo del tiempo. El periodo de tiempo estudiado ha sido desde el 25/06/2010 hasta el 30/12/2010. Como espectros de referencia se emplearon los obtenidos a la concentración mayor del estudio, es decir, 50 ppb. Las disoluciones que se evaluaron fueron inyectadas en el equipo a la concentración del LOC calculado para los diferentes compuestos. Los resultados pueden observarse en las siguientes figuras:

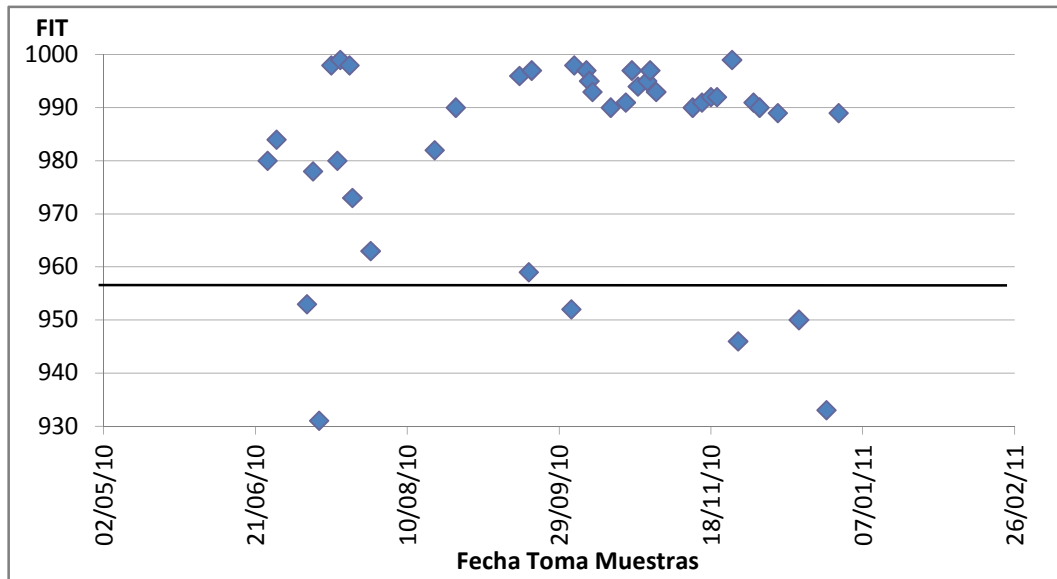


Figura 26. Evolución del FIT medido para una disolución de 5 ppb de Pirimicarb.

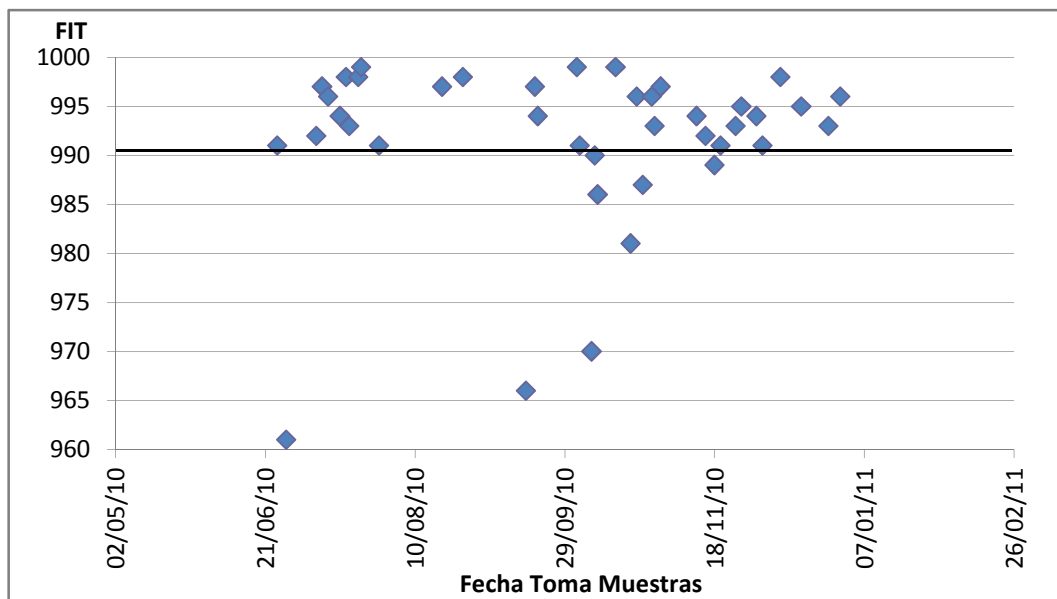


Figura 27. Evolución del FIT medido para una disolución de 10 ppb de Malatión.

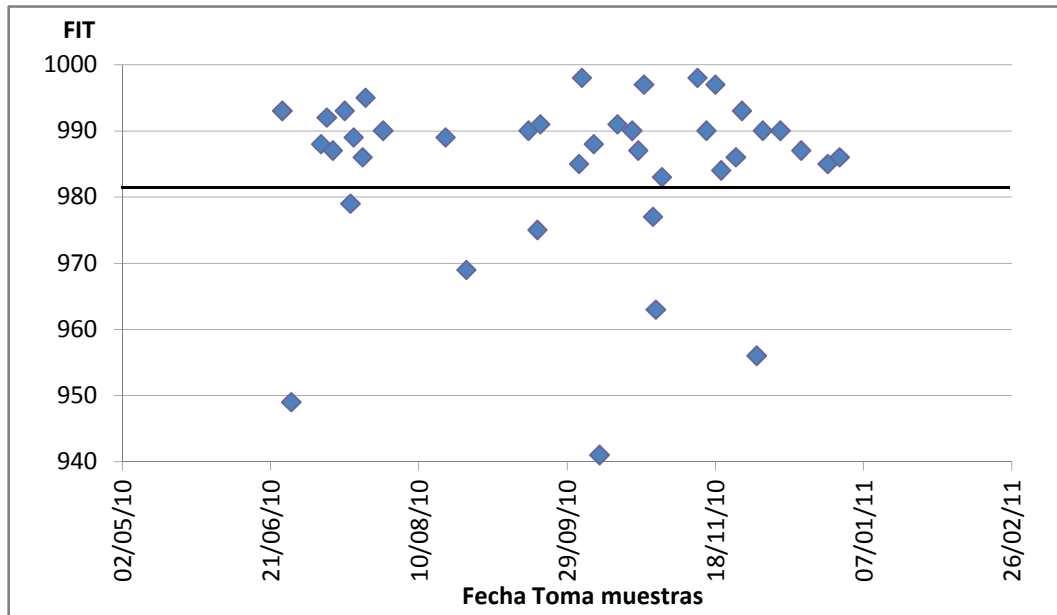


Figura 28. Evolución del FIT medido para una disolución de 10 ppb de Procididona.

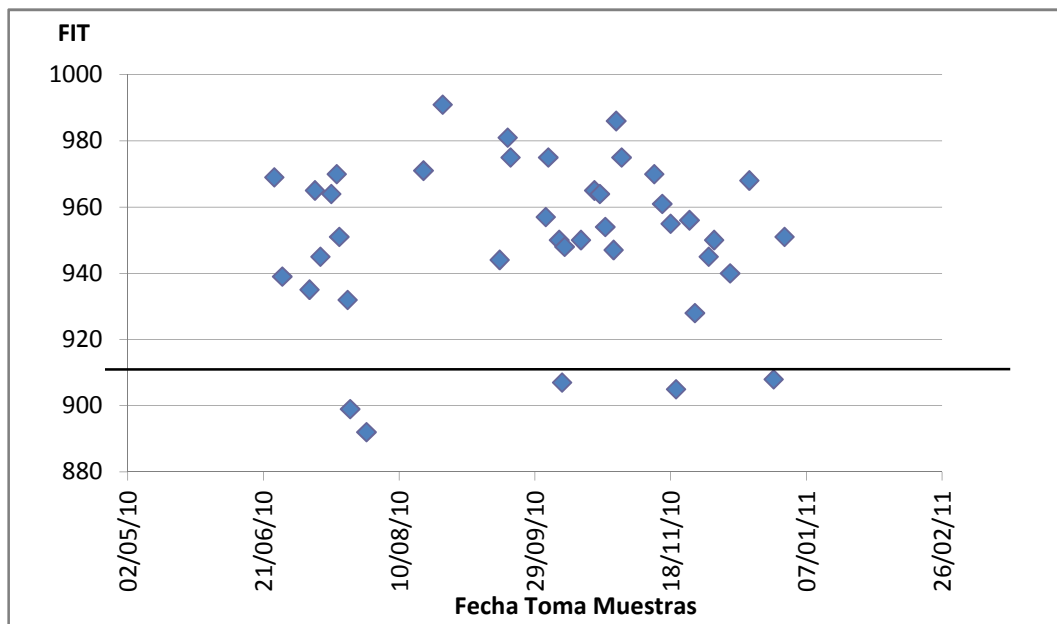


Figura 29. Evolución del FIT medido para una disolución de 5 ppb de α -Endosulfán.

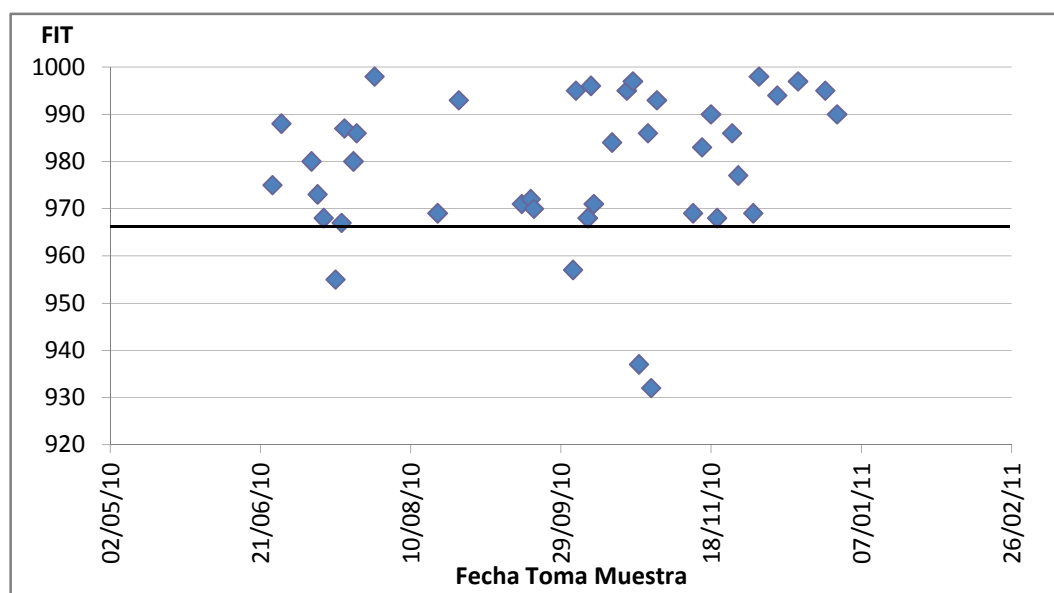


Figura 30. Evolución del FIT medido para una disolución de 3 ppb de Piridabén.

En ellas puede observarse como existe un porcentaje relativamente bajo de resultados que se considerarían falsos negativos, es decir, resultados considerados como negativos a la concentración del LOC por quedar por debajo del FIT umbral calculado para los compuestos del estudio. Por lo tanto, los datos experimentalmente obtenidos confirman una razonable fiabilidad de los criterios de confirmación basados en el FIT umbral calculado incluso a niveles de concentración tan bajos como los estudiados (LOC).

Tabla 16. Porcentaje de falsos negativos obtenidos durante el estudio a la concentración del LOC.

Compuesto	% de falsos negativos al LOC calculado
Pirimicarb	15%
Malatión	20%
Procimidona	18%
-endosulfán	12%
Piridabén	15%

Se puede observar que aquellos que tenían una SD menor y por tanto un FIT umbral más alto presentan un porcentaje algo mayor de falsos negativos que aquellos en los que el FIT umbral fue algo más bajo.

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones más importantes obtenidas con el presente estudio se pueden resumir como:

1. Que los espectros MS/MS que se obtienen para plaguicidas mediante SRM suelen contener un número sustancialmente menor de iones que los equivalentes en el modo de monitorización de iones producto. Por lo tanto, el ajuste espectral (expresado como FIT) puede generar valores diferentes a los habitualmente obtenidos en los laboratorios de control que usan como criterio de confirmación dicho parámetro.
2. Los valores de FIT que se obtienen varían con la concentración del analito. Suelen permanecer aproximadamente constantes hasta alcanzar una concentración por debajo de la cual su valor disminuye significativamente.
3. El criterio para el cálculo de FIT umbral habitualmente utilizado ($\text{FIT umbral} = \text{FIT medio} - 3 \text{ SD}$) no es aplicable cuando se trabaja a concentraciones muy bajas (próximas al LOC del método) si para su cálculo utilizamos valores de FIT obtenidos a esas concentraciones tan bajas. Esto se debe a que las concentraciones próximas al LOC generan una elevada dispersión de los datos lo que redundaría en el valor final del FIT umbral excesivamente bajo.
4. Se puede utilizar la definición de FIT umbral del punto anterior cuando los FIT considerados son a concentraciones suficientemente altas (cuyos datos suelen presentar una SD inferior a la habitual a concentraciones extremadamente bajas).
5. Es posible establecer una relación entre un valor de FIT umbral y los LOC según la Decisión 2002/657/CE.
6. El parámetro FIT es válido para su uso en GC-MS/MS cuando se utiliza el modo de adquisición SRM y presenta una robustez adecuada cuando se evalúa a los niveles de concentración de los LOC durante un periodo de tiempo de 6 meses. El porcentaje de falsos negativos para los cinco compuestos del estudio osciló a esa concentración entre el 12 y 20%.

VI. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO

Una vez ha sido concluido el presente trabajo, se abren diferentes posibilidades de continuación en los siguientes campos:

1. Incluir en el estudio el posible efecto matriz de la muestra.
2. Realizar el estudio de ajuste espectral con otras familias de compuestos diferentes a las ya estudiada (plaguicidas).
3. Realizar un estudio más detallado desde un punto de vista más estadístico y no tan aplicado como el que se ha realizado calculando los llamados límites de decisión ($CC\alpha$) y capacidad de decisión ($CC\beta$) [26].

VII.REFERENCIAS

[1] Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/cadena_alimentaria.shtml

[2] 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 L 125 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

[3] 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).

[4] Reglamento (UE) N° 915/2010 de la Comisión, de 12 de octubre de 2010, relativo a un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2011, 2012 y 2013 destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal y animal o sobre los mismos y a evaluar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos. (DO L296 de 13.10.2010, p.8).

[5] Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. (BOE n° 188, 7-Agosto-1998).

[6] Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los

requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. (DO L31 de 1.2.2002, p.1).

[7] Real Decreto 290/2003, de 7 de marzo, por el que se establecen los métodos de muestreo para el control de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal. (BOE nº 58, 8-marzo-2003).

[8] 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

[9] J.P. Antignae, B. Le Bizee, F. Mteau, F. Andre. *Analytica Chimica Acta*, 483 (2003) 325-334.

[10] Maryadele J. O'Neil (ed). *The Merck Index*. 14th edition. Merck & Co. 2006. Whitehouse Station N.J.

[11] S.E. Stein, D.R. Scott. *J. AM Soc. Mass Spectrom.* 1994, 5. 859-866.

[12] P.G.M. Kienhuis, Rb. Geerdink. *J. Chromatogr. A.* 2002, 974. 161-168.

[13] O.D. Sparkman. *J. Soc. Mass Spectrom.* 1996, 7. 313-318.

[14] C. Rosal, D. Betowski, J. Romano, J. Neukom, D. Wesolowski. *L. Zintek Talanta.* 2009, 15. 810-817.

[15] P. Weis, M. Dücking, P. Watzke, S. Menges, S. Becker. *J. Anal. At. Spectrom.* 2011, 26. 1273-1284.

- [16] D. Martin, I. Nett, F. Vandermoere, J. Barber, N. Morrice, M. Ferguson. *Bioinformatics*. 2010, 26. 2153-2159.
- [17] N. Padliya, T. Wood. *Analytica Chimica Acta*. 2008, 627. 162-168.
- [18] H. Xie, T. Griffin. *Journal of Proteome Research*. 2006, 5. 1003-1009.
- [19] N. Farmer, W. Meier-Augenstein, R. Kalin. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2005, 19. 3182-3186.
- [20] M. Zurcher, J. Clerc, M. Farkas, E. Pretsch. *Anal. Chim. Acta*. 1988, 206. 161-172.
- [21] D. Martinsen. *Appl. Spectrosc*. 1981, 35. 255-266.
- [22] D. Martinsen, B. Song. *Mass Spectrom Rev*. 1985, 4. 461-490.
- [23] J. L. Martinez Vidal, F. J. Arrebola, M. Mateu-Sánchez. *J. Chromatogr. A*. 2002, 959. 203-213.
- [24] J. L. Martinez Vidal, J.L. Fernández Moreno, F. J. Arrebola, A. Garrido Frenich. *J. AOAC Int*. 2007, 90. 1146-1164.
- [25] F. J. Arrebola, J. L. Martinez Vidal, M. J. González Rodríguez, A. Garrido Frenich, N. Sánchez Morito. *J. Chromatogr. A*. 2003, 1005. 131-141.
- [26] J. L. Martinez Vidal, F. J. Arrebola, M. Mateu-Sánchez. *Mass Spectrom*, 16. 2002. 1106-1115.
- [27] J. P. Antignae, B. Le Bizet, F. Mteau, F. Andre. *Analytica Chimica Acta*, 483. 2003. 325-334.