



# Determinación de fosetyl- aluminio y su metabolito en tomate mediante LC-MS/MS

Trabajo Fin de Máster. Ana Romera Torres





## MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN QUÍMICA

# MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO ACADÉMICO:

2015-2016

CONVOCATORIA:

1<sup>a</sup>

2<sup>a</sup>

UNIVERSIDAD:

Almería

TÍTULO DEL TRABAJO:

Determinación de fosetyl-aluminio y su metabolito en tomate mediante LC-MS/MS

ESTUDIANTE:

Ana Romera Torres

TUTOR(es):

José Luis Martínez Vidal // Antonia Garrido Frenich

Fecha:

VºBº Tutor(es)

J.L. Martínez Vidal//Antonia Garrido Frenich

El Estudiante

Ana Romera Torres

## RESUMEN

Durante toda la historia han ocurrido grandes crisis humanitarias provocadas por hambrunas, muchas de ellas debido a enfermedades fúngicas. Las enfermedades causadas por los hongos del género *Phytophthora* constituyen un gran problema fitosanitario que provoca anualmente gastos económicos a escala internacional debido a pérdidas de cultivo y, al mismo tiempo, producen un gasto económico por el consumo de productos fitosanitarios utilizados para prevenirlas y controlarlas.

Fosetyl-Al es un fungicida sintético organofosforado, perteneciente al grupo de sales inorgánicas, usado para controlar plagas como *Phytophthora*, *Pythium*, *Plasmopara*, *Bremia spp.*, entre otras. El ácido fosfónico es el principal metabolito del Fosetyl-Al. Estos dos compuestos tienen una alta polaridad, lo que hace que no puedan ser analizados por los comunes métodos multiresiduo.

En este Trabajo Fin de Máster se ha desarrollado un método de análisis para la determinación de fosetyl-aluminio y su metabolito ácido fosfónico en tomate mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem con analizador de triple cuadrupolo (LC-QqQ-MS/MS). Asimismo se ha optimizado la extracción de los compuestos de tomate mediante una extracción con acetonitrilo y limpieza con carbón negro grafitizado (GBC). El método desarrollado ha proporcionado unos valores adecuados de los parámetros de validación exigidos por la Guía SANTE, demostrando ser válido para el objetivo planteado.

## ABSTRACT

During the whole history, great humanitarian crises provoked by famines have happened, many of them due to fungi diseases. The diseases caused by the fungi of the kind *Phytophthora* constitute a great phytosanitary problem that provokes annually economic expenses at international scale due to the farming losses and, at the same time, they produce an economic expense because of the consumption of the phytosanitary products that are used to prepare and control them.

Fosetyl-aluminum is an organophosphate synthetic fungicide, belonging to the inorganic salts group, used to the control of the plagues like *Phytophthora*, *Pythium*, *Plasmopara*, *Bremia spp*, amongst others. The phosphonic acid is the main metabolite of the fosetyl-al. These two compounds have a high polarity, which makes them unable to be analyzed by the mutiresidue common methods.

In this work, an analytical method has been developed for the determination of fosetyl-Al and its metabolite, the phosphonic acid, in tomato by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, with triple quadrupole analyzer (LC-QqQ-MS/MS). Additionally, the extraction of the compound of tomato has been optimized by using acetonitrile and a clean-up step with GBC. The developed method has provided adequate values of validation parameters demanded by the Guide SANTE, demonstrating being valid for the raised aim.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Estado del arte: plaguicidas.....	1
1.2. Identidad y propiedades físico-químicas de los compuestos objeto de estudio .	7
1.3. La técnica de LC-MS .....	9
1.4. Métodos de análisis publicados para fosetyl y ácido fosfónico .....	12
1.4.1. <i>Métodos de extracción</i> .....	12
1.4.2. <i>Métodos de determinación</i> .....	13
1.5. Validación de métodos analíticos .....	15
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. Patrones, reactivos y materiales.....	20
3.2. Equipos .....	20
3.3. Método de extracción .....	21
3.4. Método cromatográfico .....	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	23
4.1. Optimización de los parámetros espectrométricos.....	23
4.2. Optimización de las condiciones cromatográficas .....	24
4.2.1. <i>Optimización de la fase estacionaria</i> .....	24
4.2.2. <i>Optimización de la composición de la fase móvil</i> .....	26
4.3. Optimización del proceso de extracción.....	27
4.3.1. <i>Optimización del disolvente de extracción</i> .....	27
4.3.2. <i>Optimización de la etapa de limpieza</i> .....	28
4.4. Validación del método .....	30
4.4.1. <i>Linealidad y rango de trabajo</i> .....	31
4.4.2. <i>Efecto matriz</i> .....	32
4.4.3. <i>Veracidad (% recuperación)</i> .....	33
4.4.4. <i>Precisión</i> .....	34

4.4.5.	Límites de detección y límites de cuantificación .....	35
4.4.6.	<i>Especificidad</i> .....	35
5.	CONCLUSIONES.....	36
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	37

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Estado del arte: plaguicidas

Durante toda la historia han ocurrido grandes crisis humanitarias provocadas por hambrunas, muchas de ellas debido a enfermedades fúngicas. Algunas de las más destacadas fueron la hambruna irlandesa ocurrida entre 1845 y 1849 causada por el microorganismo *Phytophthora infestans* de Bary<sup>1</sup> o el de Bengala<sup>2</sup> de 1942 causado por *Cochliobolus miyabeanus*. Aunque es improbable que algo así se repita hoy en día, resulta de una gran importancia el uso de agentes efectivos para evitar o en su caso acabar con dichas plagas.<sup>3</sup>

Desde el siglo XVII se reconocían diversas enfermedades que afectaban a los cultivos y ya se conocían algunas soluciones,<sup>4</sup> como el tratamiento de las semillas de cereales con salmuera, arsénico o sulfato de cobre. Ya a principios del siglo XIX se utilizaba polvo y cal de azufre para la eliminación de ciertos patógenos o posteriormente algunas sales ya de forma más específica. Pero no fue hasta 1940 cuando se comenzaron a sintetizar plaguicidas con diversos grupos químicos, tales como tiocarbamato (tiram, mancozeb), ftalamida (captan, folpet), triazinas (anilazina) o bezimidazol (tiabendazol, benomil), entre otros.

La Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization, WHO*)<sup>5</sup> define plaguicida como *cualquier compuesto químico usado para eliminar parásitos, incluyendo insectos, roedores, hongos y plantas no deseadas*. También se conocen como sustancias o ingredientes activos,<sup>6</sup> así como las formulaciones o preparados que contengan uno o varios de ellos, destinados a cualquiera de los fines siguientes:

- Combatir los agentes nocivos para los vegetales o prevenir su acción.
- Favorecer o regular la producción vegetal, excepto nutrientes y los destinados a enmienda de suelos.
- Conservar los productos vegetales.
- Destruir los vegetales indeseables.
- Destruir parte de los vegetales o prevenir un crecimiento indeseable de los mismos.
- Hacer inofensivos, destruir o prevenir la acción de otros organismos nocivos o

indeseables distintos de los que atacan a los vegetales.

Si bien es cierto que el uso de los fungicidas sintéticos plantea grandes beneficios, los riesgos para el operador, los consumidores y el medio ambiente, así como para los ecosistemas del cultivo, han provocado una disminución de la disponibilidad de dichos principios activos aprobados.<sup>1</sup>

Como alternativa a los fungicidas sintéticos se presentan los bioplaguicidas,<sup>7,8</sup> término que engloba sustancias de origen natural, microorganismos y sustancias plaguicidas procedentes de plantas que contienen material genético añadido que controlan las plagas. La utilización de dichos compuestos supone grandes ventajas como: una menor toxicidad que los sintéticos, ya que actúan solamente sobre la plaga diana y no sobre otros organismos como aves, insectos o mamíferos; una mayor eficacia con cantidades muy pequeñas que generalmente se descomponen de forma rápida disminuyendo el tiempo de exposición y los problemas de contaminación, y su utilización puede disminuir en gran medida la utilización de plaguicidas manteniendo un alto rendimiento en el cultivo. Es por ello que la Agencia de Protección de Medio Ambiente de los Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency, EPA*) creó en 1992 la División de Prevención de la Contaminación y Bioplaguicidas en la Oficina de Programas de Plaguicidas. Sin embargo, el uso de bioplaguicidas ha tenido una baja aceptación y en la actualidad sólo constituye un 1% del mercado total de plaguicidas.<sup>4</sup>

Con el objetivo de introducir un nuevo grupo de fungicidas con menor coste, de baja toxicidad para las personas y animales y comprometido con el medio ambiente, se investigaron los fungicidas constituidos por sales inorgánicas,<sup>1</sup> tales como cloruros, fosfatos, silicatos, bicarbonatos y fosfitos entre otros.

La variedad de sales inorgánicas con propiedades fúngicas (bicarbonatos, fosfatos, silicatos, cloruros o fosfitos) es tan grande como la gama de cultivos (cereales, vegetales, frutas, tubérculos, plantas ornamentales y plantas nativas), condiciones y zonas donde han sido probadas, dando como resultado una severa reducción de la gravedad de plagas causadas por microorganismos como *Sphaerotheca fuliginea*, *Erysiphe cichoracearum*, *Blumeria graminis*, *Uncinula necator*, *Magnaporthe grisea* o *Phytophthora infestans* entre otros. Se conocen aplicaciones para reducir infecciones fúngicas en el follaje, tallo, frutos, tubérculos, semillas y raíces.

Las sales de bicarbonato<sup>3,9</sup> han sido usadas para el tratamiento de diversos patógenos, como *Venturia inaequalis* en manzana, *Botrytis cinérea* en uva o *Phytophthora infestans* en patata. También se ha demostrado la eficacia de las sales de fosfato<sup>3</sup> en un amplio rango de cosechas y plagas, como *Podosphaera leucotricha* en manzana, *Colletotrichum lagenarium* en pepino o *Magnaporthe grisea* en arroz. Del mismo modo se han empleado silicatos, cloruros y fosfitos.

Las sales de fosfitos<sup>3,10</sup> han sido profundamente estudiadas y se encuentran en bibliografía nombradas como fosfitos, hidrogenofosfonatos, ortofosfitos, compuestos del ácido fosfónico o compuestos del ácido fosforoso. Cuando se habla de fosfonato queda de manifiesto la presencia de un grupo orgánico que presenta un enlace carbono-fósforo, presente en fungicidas convencionales tales como fosetyl-Al. La aplicación de fosfitos se centra en la reducción de la susceptibilidad de las plantas a enfermedades causadas por pseudo-hongos del grupo Oomycetes, atacando plagas como *Phytophthora spp.*, *Plasmopara* y *Alternaria spp.* Se ha investigado el modo de acción y se han observado tanto efectos directos de inhibición de esporulación fúngica como indirectos, estimulando los mecanismos de defensa de las plantas. Debido a su complejidad, la aparición de resistencia a sales de fosfitos en los patógenos se ha visto limitada.

De los diversos microorganismos fitopatógenos que atacan a las plantas, los hongos son el grupo que más enfermedades ocasionan, habiendo más de 8000 especies de hongos que enferman a las plantas.<sup>11</sup> Las enfermedades causadas por los hongos del género *Phytophthora* constituyen un gran problema fitosanitario que provoca anualmente gastos económicos a escala internacional debido a pérdidas de cultivos.<sup>12,13</sup> Al mismo tiempo producen un gasto económico por el consumo de productos fitosanitarios utilizados para prevenirlas y controlarlas. Este patógeno afecta a una gran variedad de cultivos causando un gran número de enfermedades diversas.

Los grandes beneficios que suponen para la producción agrícola los productos fitosanitarios se deben a su capacidad de prevenir o combatir enfermedades causadas por patógenos en cosechas. Además, su uso<sup>14</sup> se extiende a diversos sectores, tanto en el sector agrícola, que constituye el 85% de su consumo total, como en salud pública, con el 10%. Su utilización está enfocada al control de plagas, de vectores de enfermedades y al control de la potabilización del agua. Por todo lo anterior, su consumo en los últimos años

en España ha ido en aumento, como se muestra en el Figura 1. Si bien este consumo durante los tres últimos años ha disminuido a causa de las características climáticas, alcanzando en 2013 un consumo de 2,7 kilogramos de ingrediente activo por hectárea, que supone un 3,1% menos que el año anterior.

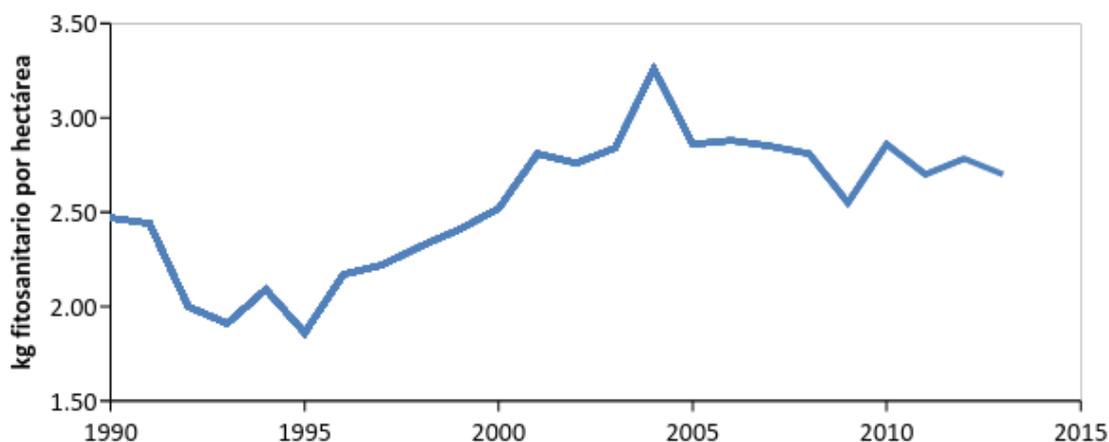


Figura 1: Consumo de productos fitosanitarios en España,<sup>15</sup> entre 1990 y 2013. Datos obtenidos de AEPLA y MAGRAMA.

Los plaguicidas,<sup>16</sup> atendiendo a su acción específica, se pueden clasificar en insecticidas, acaricidas, fungicidas, nematocidas, desinfectantes y fumigantes en general; herbicidas, fitoreguladores y productos afines; molusquicidas y rodenticidas; específicos post-cosecha y para simientes; protectores de maderas, fibras y derivados y plaguicidas específicos varios. El consumo en España de todos ellos es bastante desigual como se muestra en la Figura 2, observándose que en 2014 los fungicidas y bactericidas fueron las sustancias activas más utilizadas, representando el 48% del total de sustancias comercializadas, seguidas de reguladores de crecimiento y otros (23%), herbicidas (19%) y los insecticidas y acaricidas las de menor uso con un 10%. Los fungicidas inorgánicos son los más utilizados, representando el 84,9% del total de fungicidas y bactericidas, lo que representa el 41,3% del total de sustancias químicas fitosanitarias comercializadas.

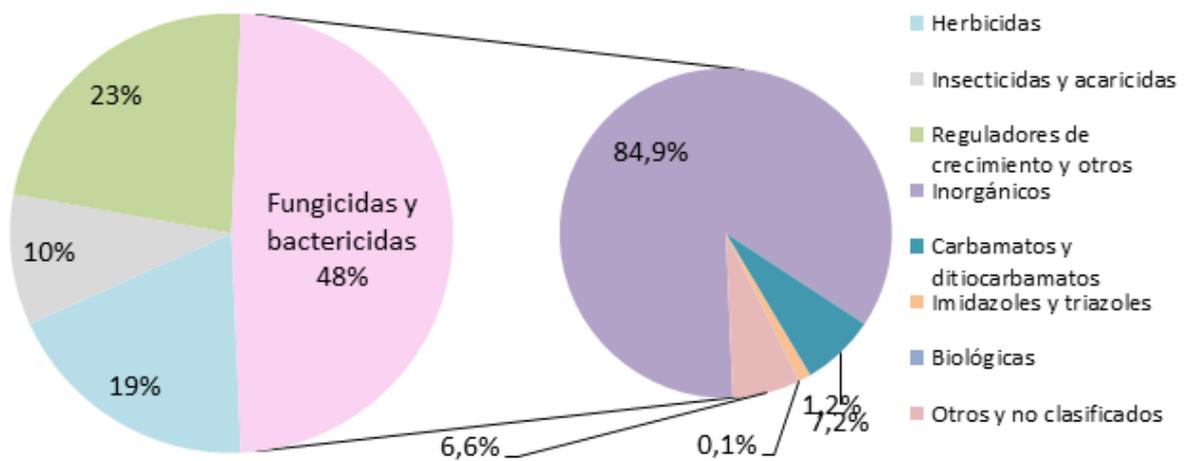


Figura 2: Principales grupos de sustancias químicas fitosanitarias comercializadas en el 2014 en España. Datos obtenidos de AEPLA y MAGRAMA.<sup>12,13</sup>

El consumo de fitosanitarios en España entre los años 2012, 2013 y 2014 (Figura 3) muestra un incremento para fungicidas y bactericidas del 18,5%, respecto al año 2013, y de un 43,3% con respecto al año 2012.

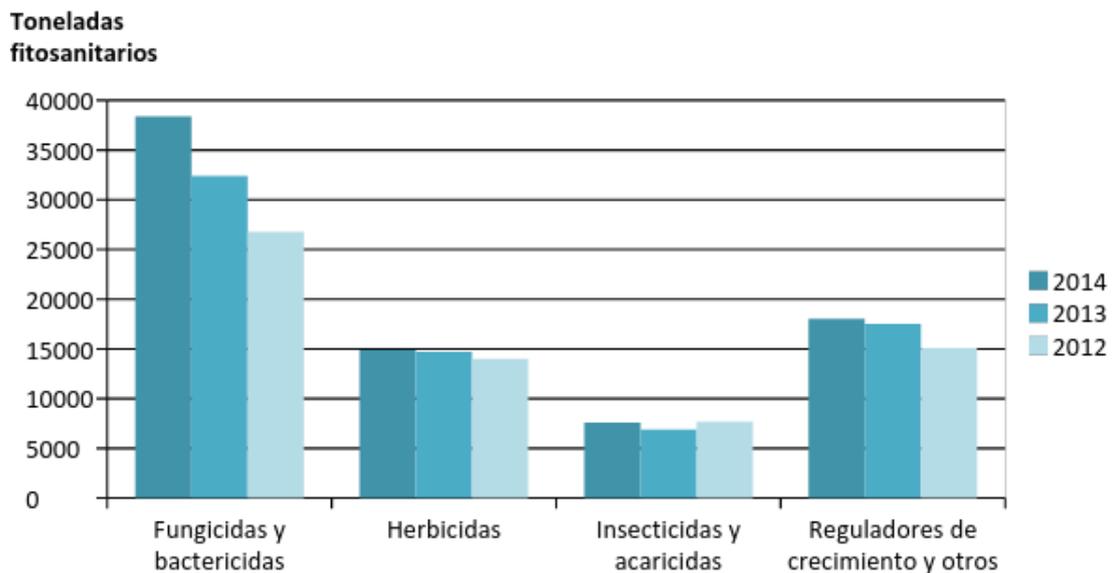


Figura 3: Comparativa de los principales grupos de fitosanitarios consumidos entre 2012, 2013 y 2014 en España, expresado en toneladas. Datos obtenidos de AEPLA y MAGRAMA.<sup>12,13</sup>

Teniendo en cuenta que los plaguicidas son potencialmente tóxicos para otros organismos, incluidos los humanos, y deben ser utilizados de manera segura y se

desechan adecuadamente, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (*Food and Agriculture Organization of the United States*, FAO) formuló las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)<sup>17</sup> con el objetivo de garantizar la inocuidad y calidad alimentarias orientadas a la sostenibilidad ambiental, económica y social para los procesos productivos de la explotación agrícola. Sin embargo, un incumplimiento de las BPA puede causar una alerta sanitaria. Diversos estudios han relacionado problemas en la salud con la exposición e ingesta de plaguicidas.<sup>18,19</sup>

Es aquí donde juega un papel clave el desarrollo de técnicas de análisis de plaguicidas rápidas y efectivas para asegurar que los niveles de residuos estén dentro de los límites de tolerancia para un consumo seguro, los cuales son determinados por los organismos correspondientes; en nuestro caso la Comisión Europea.

La Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios, establece en la Directiva 91/414/CEE<sup>20</sup> la definición de residuo de producto fitosanitario como *cualquier sustancia en o sobre vegetales o productos de origen vegetal, productos animales comestibles, o componentes del medio ambiente, que constituyan los restos de la utilización de un producto fitosanitario, incluidos sus metabolitos y los productos resultantes de su degradación o reacción.*

Se define el Límite Máximo de Residuo (MRL) como *la máxima concentración de un residuo (expresado en mg/kg, mg de analito por Kg de muestra o ppm) que es legalmente permitido o reconocido como aceptable en, o sobre un alimento, un producto agrícola o parte comestible de animales* tal como establece el CODEX ALIMENTARIUS o una autoridad regulatoria nacional.<sup>21</sup>

El marco actual en los países de la Unión Europea es el Reglamento (CE) nº 396/2005<sup>22</sup> del Parlamento Europeo y del Consejo, del 23 de febrero de 2005, relativo a los LMRs de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. La Unión Europea establece MRLs por defecto para alimentos en 0,01mg/kg, es decir, en todos los casos en los que no se haya definido un MRL. En el caso de los compuestos objeto de estudio, se establece un MRL para fosetyl, expresado como suma de fosetyl, ácido fosfónico y sus sales, de 100 mg/kg en matriz de tomate.

Por todo ello, los planes de seguridad deben ser capaces de garantizar la inocuidad de los alimentos, así como incorporar elementos de control en toda la cadena alimentaria, lo que se consigue con una red de laboratorios de análisis acreditados que cubran todas estas determinaciones analíticas. Para el control de los residuos de plaguicidas en alimentos es necesario disponer de metodologías analíticas contrastadas que puedan identificar y cuantificar dichos analitos en cantidades del orden de  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en matrices complejas. La Unión Europea establece en la Guía SANTE, Documento No. SANTE/11945/2015,<sup>23</sup> que la cromatografía acoplada con espectrometría de masas (MS) es una poderosa herramienta de determinación y confirmación de analitos, además de establecer otras directrices sobre las características que deben de cumplir los métodos de análisis aplicados para el control de residuos de plaguicidas.

En este Trabajo Fin de Máster se ha estudiado el fungicida fosetyl-Al, así como su principal metabolito el ácido fosfónico, ampliamente utilizado en un gran número de frutas y hortalizas para la prevención de enfermedades fúngicas, en concreto debido a su efectividad frente al ataque por plagas como *Phytophthora spp.*, *Plasmopara* y *Alternaria spp.* En concreto se ha desarrollado un método de análisis para ambos compuestos mediante cromatografía de líquidos acoplada a MS en tándem (LC-MS/MS), así como el estudio de las condiciones de extracción óptimas en tomate.

## **1.2. Identidad y propiedades físico-químicas de los compuestos objeto de estudio**

Fosetyl-Al es un fungicida sintético organofosforado, perteneciente al grupo de sales inorgánicas. Se trata de un fungicida sistémico que se desplaza de las hojas a las raíces y viceversa, el cual es aplicado al control de patógenos foliares y de la raíz. Fue comercializado por primera vez en 1977 para el control de enfermedades fúngicas en más de 100 cosechas, utilizado en el control de la humectación, así como de la putrefacción de las raíces, tallos y frutas de las plantas. Ha sido usado para controlar plagas como *Phytophthora*, *Pythium*, *Plasmopara*, *Bremia spp.*, entre otras. Es aplicado como tratamiento por aplicación foliar o por incorporación a través del suelo. Su uso está registrado en la EPA<sup>24</sup> y en la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).<sup>25</sup>

El ácido fosfónico o ácido fosforoso es el principal metabolito del fosetyl-Al y se

forma al hidrolizarse este en medio acuoso. El ácido fosforoso es un compuesto inorgánico utilizado como fungicida y microbiocida. No presenta toxicidad aguda para las personas, pero es mortal para los peces.<sup>26</sup> Puesto que es un metabolito, no está registrado su uso del mismo modo que para el fosetyl-Al.

En la Tabla 1 se presentan algunas propiedades físico-químicas<sup>27,28</sup> de los compuestos objeto de estudio.

Tabla 1: Propiedades físico-químicas del fosetyl-Al y del ácido fosfónico.

Analitos	Fosetyl-Al	Ácido fosfónico
Fórmula química	$C_6H_{18}AlO_9P_3$	$H_3O_3P$
Estructura química		
Masa molecular	354,104 u	81,996 u
Nombre IUPAC	Aluminio de tris(etilfosfonato)	Ácido fosforoso
Tipo de plaguicida	Fungicida sintético	Metabolito
Estado físico	Sólido en polvo incoloro	Sólido en escamas blancas o incoloras
Temperatura de descomposición	277 °C	200 °C
Grupo químico	Organofosfonato	Ácido
Solubilidad a 20 °C	Agua: 110000 mg/l n-heptano: 1 mg/l Acetona: 6 mg/l Metanol: 805 mg/l	Agua: Totalmente soluble
Constante de disociación a 25 °C	pKa=4,7 Ácido débil	pKa=1,8 Ácido fuerte
Presión de vapor a 25 °C	10 <sup>-4</sup> mPa	ND*

\*ND: no descrito

Fosetyl-Al tiene una baja persistencia en suelos pero es muy estable y persistente en sistemas acuosos, donde se considera un contaminante potencial ya que es altamente tóxico e incluso mortal para diversos organismos acuáticos. Tiene un bajo potencial de bioacumulación y en general una toxicidad baja-moderada en animales no acuáticos. Es

un grave irritante ocular, pero no tiene peligro cutáneo ni de inhalación. La EPA lo cataloga como un posible agente cancerígeno para las personas.<sup>26,27</sup>

### 1.3. La técnica de LC-MS

A partir del descubrimiento de la cromatografía en 1952 por A.J. Porter Martin y R.L. Millington Synge, por lo que se les concedió el Premio Nobel de Química de 1952, y su posterior desarrollo para gases y líquidos, con uso de detectores clásicos hasta el empleo de los detectores de MS, esta técnica se ha convertido en la más usada para la determinación de residuos de plaguicidas en matrices complejas. Esta es la técnica que recomienda la Guía SANTE<sup>23</sup> por ser una herramienta poderosa de determinación y confirmación de analitos.

En concreto, para la separación de fosetyl-al y ácido fosfónico, la técnica más utilizada ha sido LC, ya que es idónea para la separación de compuestos polares y termolábiles. LC es una técnica de separación en la que una muestra líquida se introduce directamente en una columna cromatográfica, a diferencia de la GC donde es necesario volatilizar la muestra. La muestra circula a través de la columna empujada por una fase móvil, que puede ser de naturaleza apolar (cromatografía en fase normal, FN) o polar (cromatografía en fase reversa, FR). En FN la fase móvil es apolar y en FR, es polar. En la columna cromatográfica se produce la interacción entre los analitos y la fase estacionaria, la cual determina la separación de los compuestos de la muestra. En este estudio se utilizó LC en fase reversa. En la Figura 4 se muestra el esquema general de un cromatógrafo de líquidos.

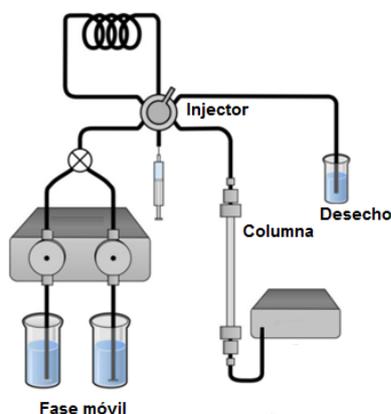


Figura 4: Esquema de un cromatógrafo de líquidos (LC).<sup>29</sup>

Una vez se han separado los analitos, estos llegan al detector. En 1898 Wilhelm Wiense desarrolló el primer espectrómetro de masas. Esta técnica es utilizada para identificar compuestos conocidos, desconocidos y para elucidar estructuras químicas. Es una técnica muy sensible que precisa de cantidades muy pequeñas de muestra (1µg-1mg) y proporciona una gran información que incluye masa molecular y características estructurales proporcionadas por los fragmentos. La muestra se introduce en el espectrómetro de masas y se ioniza, los iones se separan en base a su relación masa/carga ( $m/z$ ) y la abundancia de cada  $m/z$  es registrada, obteniéndose un espectro de masas. En la Figura 5 se muestra un esquema general de un espectrómetro de masas.



Figura 5: Diagrama en bloques de un espectrómetro de masas.

En el caso de LC-MS, la muestra pasa por la columna, se ioniza y llega al analizador. Existen diversos métodos de ionización, pudiendo ser en fase gaseosa, por desorción o por evaporación. Dentro de la ionización por evaporación encontramos la técnica de ionización por electrospray (ESI) y la técnica de ionización a presión atmosférica (API) (Figura 6). En este método, la muestra es introducida en la cámara de ionización ESI a través de un capilar el cual está rodeado de un flujo axial de nitrógeno, llamado gas nebulizador. Al llegar la muestra a la cámara de ionización se forma un aerosol de microgotas con carga que son empujadas hacia el MS por el gas nebulizador. En el trayecto, el disolvente se evapora y las gotas pasan a ser iones.

La técnica ESI es una de las más utilizadas para la determinación de plaguicidas mediante LC y ha sido la utilizada en este trabajo.

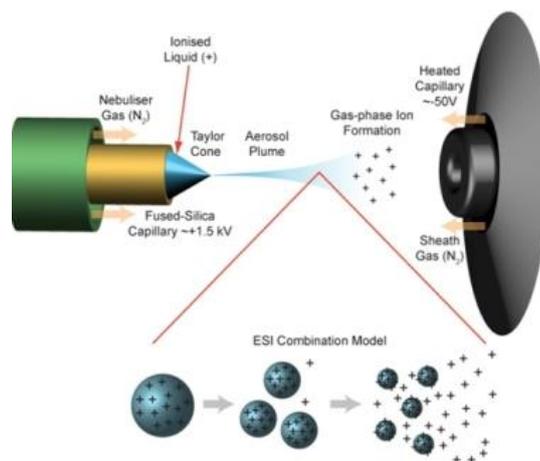


Figura 6: Esquema (ESI). Fuente: Universidad Autónoma de Madrid.<sup>30</sup>

En cuanto a los analizadores en MS se pueden diferenciar diversos tipos. Estos se encargan de separar los fragmentos producidos en la fuente en base a su relación  $m/z$ . Algunos de ellos son sector magnético, trampa de iones, tiempo de vuelo o de cuadrupolo.

Los analizadores de cuadrupolo fueron introducidos en 1953. Se basan en someter a los iones a un campo electrostático hiperbólico, producido al aplicar potenciales mediante cuatro barras alrededor de la trayectoria de los iones, dos de ellos con carga positiva y dos con negativa. Cuando los iones atraviesan este campo electrostático, sufren una desviación de la trayectoria que depende de su  $m/z$ . De este modo, llegarán al detector en orden creciente de  $m/z$ . Además, el software que incluye este tipo de analizadores permite realizar una selección de iones. Estos analizadores se fueron desarrollando para aumentar la sensibilidad. Así, hoy en día el analizador más utilizado para la determinación de plaguicidas es el de triple cuadrupolo (QqQ) (Figura 7), que se compone de tres cuadrupolos en línea. De este modo, en el primer cuadrupolo y el tercer cuadrupolo (Q1 y Q3) se seleccionan los iones de interés y el segundo (q) actúa como una celda de colisión, donde las masas seleccionadas en Q1 sufren una fragmentación mediante un gas, inerte o de colisión. Los fragmentos resultantes son analizados en Q3.

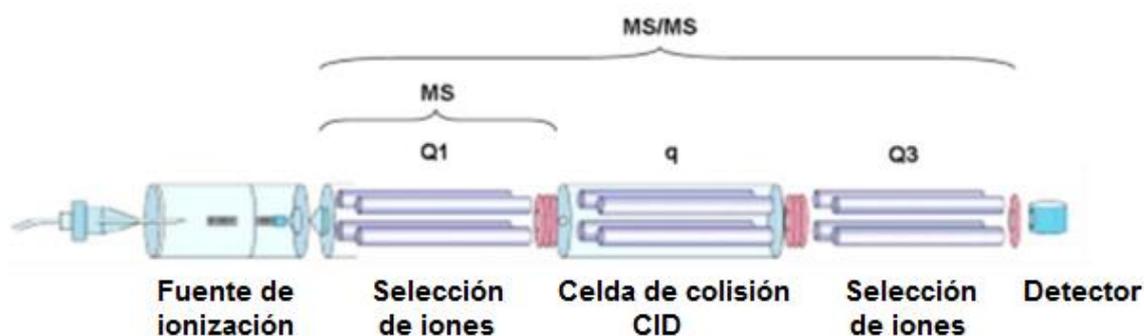


Figura 7: Esquema de un analizador de triple cuadrupolo (QqQ).

En este trabajo la determinación de los compuestos de interés se ha realizado por LC-MS-QqQ en modo ESI positivo, debido a las características físico químicas de los analitos.

#### 1.4. Métodos de análisis publicados para fosetyl y ácido fosfónico

Fosetyl-aluminio y su principal metabolito ácido fosfónico son fungicidas de una alta polaridad cuya determinación ha supuesto una gran dificultad. Los métodos existentes por tanto han sido tediosos y antiguamente implicaban el uso de agentes derivatizantes para su posterior análisis por cromatografía de gases (GC).<sup>31</sup>

Estos analitos han sido analizados en una gran variedad de matrices, entre ellas fruta, verdura, agua, leche, cereales, tejidos y formulaciones comerciales de plaguicidas, entre otros.<sup>32-38</sup>

##### 1.4.1. Métodos de extracción

Desde su desarrollo, el método de extracción QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe*; rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro)<sup>39</sup> ha sido el más usado para la extracción multiresiduo de plaguicidas. Sin embargo, debido a la alta polaridad de los compuestos objeto de estudio, este método no es adecuado para la extracción.

En la literatura, la mayoría de métodos de extracción para los compuestos objeto de estudio utilizan una extracción similar, usando como disolvente de extracción agua

MilliQ, filtrando a continuación y posteriormente sometiendo la muestra al análisis cromatográfico, o realizando dilución en caso de que sea necesario, tal como proceden Hooijschuur et al.<sup>32</sup> y Mol et al.<sup>37</sup>

Otros autores (Hernández et al.<sup>33</sup> y Poutska et al.<sup>34</sup>), para una mejor homogenización, utilizan Ultra Turrax® y ultrasonidos, respectivamente; además adicionan un agente formador de pares iónicos, como acetato de tetrabutilamonio (TBA) en el caso de Hernández et al.,<sup>33</sup> y realizando una extracción en fase sólida (SPE) en el caso de Poutska et al.<sup>34</sup> Karasali et al.<sup>38</sup> llevan a cabo la extracción con una disolución acuosa de hidróxido potásico 1M, mediante ultrasonidos y también añaden TBA.

Otros métodos de extracción encontrados en bibliografía utilizan metanol (MeOH) al 1% de ácido fórmico (v/v), como Anastassiades et al.,<sup>35</sup> o una mezcla de acetona y agua (50:50, v/v) seguido de ultrasonidos en el caso de Ishibashi et al.<sup>36</sup>

#### **1.4.2. Métodos de determinación**

En la bibliografía revisada, en general, los analitos objeto de estudio son separados mediante LC,<sup>32,33,35,38</sup> con cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC),<sup>34</sup> y en otros casos con cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)<sup>36</sup> o con técnicas de inyección en flujo sin columna.<sup>37</sup>

Además del uso de analizadores de MS,<sup>33-37</sup> se han utilizado otro tipo de detectores, como son detector de diodos array ultravioleta (UV-DAD)<sup>38</sup> y detector fotométrico de llama (FPD)<sup>32</sup> en modo selectivo de fósforo acoplados a LC y detector de ionización de llama (FID)<sup>31</sup> acoplado a GC.

A modo resumen se muestra un cuadro con la bibliografía consultada para la extracción, separación y determinación de los analitos objeto de estudio en la Tabla 2.

Tabla 2: Metodologías de análisis anteriores para los analitos objeto de estudio.

Matriz	Técnica	Columna	Fase móvil	Detector	% recup.	% DER	LODs*	Ref.
Tomate, judía	HPLC+GC	Ionospher <sup>TM</sup> A+Cp <sup>TM</sup> Sil 5	Buffer 10 mM de biphthalato	FID	85	ND	0,05M	29
Puerro	µLC	PRP-X100	AcNH <sub>4</sub> 80mM	FPD	ND	4,5-8,5	75 ng/ml	30
Lechuga	LC-ESI	Supelco C18	A: Agua B: ACN	MS/MS	98-106	<10	0,05 mg/kg	31
Lúpulo	HPLC-APCI	GROM SAX	MeOH/AcNH <sub>4</sub> 100mM en agua (v/v, 50:50)	MS/MS	76	9	1 mg/kg	32
Fruta, verdura, cereales	LC-ESI	Hypercarb	1% AcH 5% MeOH en agua 1% AcH en MeOH	MS/MS	ND	ND	ND	33
Arroz, cebolla, espinaca	SFC	ODS-EP	A: SCCO <sub>2</sub> B: 0,1% FNH <sub>4</sub> en MeOH	MS/MS	ND	<5	1,659 µg/l	34
Manzana, lechuga, trigo	Inyección en flujo	Sin columna	1% NH <sub>3</sub> en MeOH/ Agua (v/v, 90:10)	MS/MS	51-214	<20	0,2 mg/kg	35
Producto plaguicidas	LC-ESI	Luna 5u C-18 100A	A: Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,08M B: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,1M	UV-DAD	96,7-100,6	0,53	0,035mg/ml	36

## 1.5. Validación de métodos analíticos

Las normas UNE-EN ISO (*International Organization for Standardization*) 8401 e ISO 17025<sup>40</sup> establecen la definición de validación como *la confirmación mediante examen y aporte de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico previsto*. Además, indican que la validación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de la aplicación en cuestión y que puede incluir procedimientos de muestreo, manejo y transporte de muestras. La validación es necesaria para:

- Minimizar los errores.
- Conseguir resultados reproducibles y fiables de acuerdo con las especificaciones establecidas.
- Asegurar la calidad de los resultados.
- Conseguir la acreditación.
- Estar seguro de la exactitud de los resultados.

En el caso de la validación de métodos analíticos, existen normas y guías que establecen el procedimiento a seguir. Las más importantes son la norma ISO/IEC 17025 y las guías EURACHEM<sup>41</sup> y SANTE.<sup>23</sup> En ellas se presentan unos parámetros utilizados que determinan la calidad y validez del método, pero no existe un acuerdo entre ellas. En la Tabla 3 se representa a modo de resumen los parámetros de validación que exige o recomiendan las normas y guías anteriormente mencionadas.

Tabla 3: Parámetros de validación de métodos analíticos.

Parámetros	ISO/IEC 17025	EURACHEM	SANTE
Límite de detección	✓	✓	
Límite de cuantificación		✓	✓
Selectividad	✓	✓	
Especificidad		✓	✓
Efecto matriz			✓
Linealidad/rango lineal	✓	✓	✓
Rango de trabajo		✓	
Veracidad		✓	✓
Repetibilidad (intra día)	✓	✓	✓
Interdía, intermedia		✓	✓
Reproducibilidad (inter laboratorio)	✓	✓	
Incertidumbre	✓	✓	✓
Robustez	✓	✓	✓

A continuación se definen los parámetros establecidos anteriormente:

- Rango lineal o linealidad: capacidad de un método de proporcionar resultados o señales analíticas directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un rango determinado de concentración. Puede ser de forma directa o mediante una transformación matemática.

En los métodos analíticos de control de residuos de plaguicidas se determina mediante el análisis de una recta de calibrado, que debe contener al menos tres niveles de concentración y deben incluir el valor LMR del plaguicida de estudio. La Guía SANTE exige como criterio de aceptación la inspección visual mediante representación gráfica (señal analítica frente a concentración de analito) y una desviación de los puntos  $\leq \pm 20\%$ .

- Rango de trabajo: rango de concentración dentro del intervalo de linealidad que tiene una adecuada exactitud y precisión.

- Efecto matriz (EM): influencia de los componentes de la muestra diferentes al analito en la medida del mismo. En caso de haberlo, produce una variación de la sensibilidad, proporcionando señales analíticas diferentes al analizar una recta de calibrado en disolvente frente a una preparada en extracto de matriz. Para su determinación se procede realizando una comparación de las pendientes de ambas rectas (ecuación), de este modo un valor negativo representa una supresión de la señal de analito en la matriz respecto en disolvente y un valor positivo representa un enriquecimiento. Valores del cociente de las pendientes entre  $\pm 20\%$  indica que no hay efecto matriz, valores inferiores a  $-20\%$  indica supresión y superiores a  $+20\%$  indica que hay aumento de la señal en matriz.

$$EM(\%) = \left( \frac{\text{Pendiente matriz}}{\text{Pendiente disolvente}} - 1 \right) * 100$$

- Límite de detección (*Limit Of Detection*, LOD): concentración más baja de analito en una muestra que puede detectarse pero no necesariamente se puede cuantificar. También puede ser definido como la concentración mínima de analito que proporciona una señal con una relación señal/ruido  $\geq 3$ .
- Límite de cuantificación (*Limit Of Quantitation*, LOQ): Concentración más baja de analito en una muestra que puede cuantificarse con una adecuada precisión y exactitud. Puede considerarse el límite inferior del rango lineal, debe ser menor o igual al LMR y debe proporcionar una señal con una relación señal/ruido  $\geq 10$ .
- Veracidad: grado de concordancia entre el valor medido obtenido de una serie de resultados de un ensayo y el valor verdadero, se expresa en términos de recuperación (%). Puede determinarse mediante el uso de materiales de referencia, certificados o no, o mediante la medida de blancos de muestra fortificados, que es lo más común. Según la guía SANTE los valores de recuperación aceptables están entre 70-120%.

$$\text{Recuperación}(\%) = \frac{\bar{C}_{\text{real}}}{C_{\text{teórica}}} * 100$$

- Precisión: grado de concordancia entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar repetitivamente el mismo método analítico a alícuotas distintas de la misma muestra. Se expresa en términos de desviación estándar relativa (DER, %). Se puede diferenciar la precisión intradía o repetibilidad, la precisión interdía o

precisión intermedia y la reproducibilidad, que es la medida de precisión mediante estudios comparativos entre laboratorios.

- Especificidad: parámetro que permite asegurar que la señal proporcionada por el método no está influenciada por especies interferentes. Se evalúa mediante la comprobación de la ausencia de señales interferentes en los tiempos de retención de los analitos mediante el análisis de blancos.
- Selectividad: Método que origina respuestas diferenciadas para varios analitos.
- Robustez: medida de la capacidad de un método de análisis para que no sea afectado en su respuesta por pequeños cambios en los valores de sus parámetros o condiciones de trabajo (temperatura, concentración de reactivos....).
- Incertidumbre: parámetro asociado con el resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando. A partir de la definición, puede considerarse que dicho parámetro queda representado por la anchura media de un intervalo de probabilidad (95 %).

## 2. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio ha sido la optimización de un método de análisis para la determinación de fosetyl, como suma de fosetyl, ácido fosfónico y sus sales, en tomate, mediante cromatografía de líquidos de alta presión acoplada a espectrometría de masas en tándem utilizando un analizador de triple cuadrupolo (LC-QqQ-MS/MS).

Para conseguir dicho objetivo general se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollo de un método instrumental para determinar fosetyl-Al y ácido fosfónico mediante LC-MS/MS, utilizando un triple cuadrupolo (QqQ) como analizador.
- Optimización de las condiciones para la extracción de los analitos de la matriz de tomate basado en una extracción sólido-líquido.
- Validación del método desarrollado mediante la evaluación de los siguientes parámetros analíticos: linealidad, veracidad, efecto matriz, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación y precisión.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Patrones, reactivos y materiales

Los patrones utilizados fueron fosetyl-aluminio y fosetyl-aluminio D<sup>15</sup> (Dr Ehrenstorfer, Augsburg, Alemania), con una pureza del 98%, ácido fosfónico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU), con una pureza del 99,5% y ácido fosfónico O<sup>18</sup> (EURL-SRM, CVUA Stuttgart, Alemania) con una pureza superior al 98%. A partir de ellos se prepararon disoluciones intermedias mediante pesada exacta del patrón y posteriormente se diluyeron usando una disolución de MeOH acidificada al 1% con ácido fórmico. De estas disoluciones primarias, se prepararon disoluciones a 1 y 5 mg/l mediante dilución de las primarias usando el mismo disolvente. Se mantuvieron almacenadas en frigorífico a una temperatura  $\leq 4^{\circ}\text{C}$ .

Como reactivos líquidos se usaron MeOH (Fluka analytical, St. Louis, EE.UU), ácido fórmico (Fisher Scientific, Erembodegem, Bélgica), acetonitrilo (ACN), ácido acético glacial (AcH), (J.T. Baker, Deventer, Holanda), todos ellos de calidad HPLC e hidróxido amónico al 30% (Sigma-Aldrich).

Como reactivos sólidos se utilizaron acetato de tetrabutilamonio (TBA) con una pureza del 97%, Z-Sep+ y C18 con una pureza  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich), amina primaria secundaria (PSA) y carbón negro grafitizado (GBC) ambos con una pureza  $\geq 98\%$  (Scharlab, Barcelona, España) y florisil con una pureza  $\geq 98\%$  (J.T. Baker).

El agua ultrapura fue obtenida mediante un sistema de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Se utilizaron filtros de tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  Captiva Premium Syringe Filter (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) para filtrar los extractos de las muestras antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

#### 3.2. Equipos

Para la homogenización y tratamiento de las muestras se usó una batidora Braun turbo de 600 W (Barcelona, España), un vórtex IKA 4 basic (Staufen, Alemania), un Polytron® PT-MR 2100 (Kinematica AG, Suiza), una balanza analítica AB204-S (Mettler Toledo, Greifensee, Suiza) y una centrífuga (J.P Selecta Centronic-BL-II, Abrera,

Barcelona).

El análisis cromatográfico fue llevado a cabo con un cromatógrafo de líquidos Agilent de la serie 1290 RRLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con un inyector automático (G4226A), una bomba binaria (G4220A), un compartimento termostatzado para la columna (G1316C) y un inyector automático termostatzado (G1330B). El software utilizado Masshunter Workstation fue proporcionado por Agilent y estaba compuesto por distintos módulos: Data acquisition, Quantitative Analysis y Qualitative Analysis.

La separación cromatográfica fue realizada con una columna ODS Hypersil (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm tamaño de partícula) de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Asimismo se utilizaron otras columnas, Hypercarb™, ZORBAX Eclipse Plus C18 y Hypersil GOLD® aQ.

El sistema está acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo de Agilent (6460A), con una sonda de iones tipo Jet Stream™ ESI (G1958-65138) en modo negativo, como fuente de ionización. El gas nebulizador y de secado fue nitrógeno, obtenido de un generador de nitrógeno NitroFlow Lab (Parker, Kaarst, Germany).

### **3.3. Método de extracción**

Pesar una porción de  $10 \pm 0,1$  gramos de muestra triturada en un tubo de centrifuga de 50 ml y adicionar 10 ml de ACN. Agitar durante 10 minutos y centrifugar durante 5 minutos a 5000 rpm. Filtrar el extracto obtenido. Por último, realizar una dilución 1:1 (v/v) del extracto con una mezcla 1:1 (v/v) de la fase móvil A (ACN 1% ácido acético) y la fase móvil B (agua al 1% de ácido fórmico y 5% ACN).

### **3.4. Método cromatográfico**

Inyectar 20 µl de muestra en el sistema LC-MS/MS. Realizar la elución en modo gradiente (Tabla 4) utilizando una fase móvil binaria compuesta por ACN acidificado al 1% con ácido acético (eluyente A) y una disolución acuosa al 5% de ACN y 1% de ácido acético. Mantener una velocidad de flujo de la fase móvil de 0,4 ml/min. El tiempo total

de análisis es de 13 minutos, con una temperatura de columna constante de 25<sup>0</sup>C. Llevar a cabo la detección aplicando los valores paramétricos que se reúnen en la Tabla 5.

Tabla 4: Gradiente de elución de la fase móvil.

Tiempo (min)	Eluyente B(%)
0,0	95
3,0	95
7,0	0
10,0	0
11,0	95
12,0	95

Tabla 5: Parámetros MS/MS.

Parámetro	Nitrógeno
Temperatura del gas de secado	325 °C
Temperatura del gas de cortina	400 °C
Flujo del gas de secado	5 L/min
Flujo del gas de cortina	11 L/min
Presión del nebulizador	45 psi
Voltaje del capilar	3500V

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Optimización de los parámetros espectrométricos

En primer lugar se procedió a realizar la caracterización de los compuestos. Para ello, se prepararon disoluciones intermedias a 20 mg/l de cada uno de los compuestos, usando como disolvente una mezcla de MeOH y agua acidificada al 0,1% con ácido fórmico (50:50, v/v).

Las disoluciones se infundieron sin columna, en modo ESI + y – seleccionando FULL SCAN como modo de trabajo. Se seleccionó el modo ESI – porque se obtuvieron las mejores fragmentaciones y se eligió el ion precursor para cada analito. A continuación, se trabajó en como SIM (Single Ion Monitoring) con el ion precursor y se hizo un barrido del voltaje del fragmentor desde 40 a 60 V para optimizar un voltaje óptimo para cada ion precursor. El siguiente paso fue trabajar en modo ION PRODUCT o MRM (Multiple Reaction Monitoring), con el ion precursor seleccionado y su correspondiente voltaje de fragmentor, y se barrió la energía de colisión entre 10 y 30 eV. De este modo se seleccionaron los iones fragmentos con la correspondiente energía de colisión optimizada. Los datos de optimización espectrométrica se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Parámetros espectrométricos optimizados para los compuestos en estudio.

Compuesto	Fragmentor (V)	Ión precursor (m/z)	Iones fragmento (eV)		
			Transición cuantificación (m/z)	Transición confirmación (m/z)	
Fosetyl	55	109,0	80,9(10)	79,0(20)	63,0(20)
Fosetyl D <sub>15</sub>	55	114,0	81,9(10)	79,0(25)	63,0(25)
Ác. fosforoso	45	81,0	78,8(15)	62,8(20)	ND*
Ác. fosforoso O <sub>16</sub>	60	87,0	85,1(20)	66,9(25)	ND

\* No detectada

## 4.2. Optimización de las condiciones cromatográficas

Tras la caracterización espectrométrica de los compuestos en estudio se llevó a cabo la optimización de las condiciones cromatográficas. Para ello se realizó un estudio de los diversos parámetros implicados en la separación cromatográfica, estudiando fundamentalmente en la fase estacionaria y móvil, como se describe a continuación.

### 4.2.1. Optimización de la fase estacionaria

En primer lugar se probaron diversos tipos de columnas, modificando tanto la naturaleza de la fase estacionaria como las dimensiones, en base a su compatibilidad con fosetyl-al y ácido fosfónico, con el fin de obtener aquella que proporcionara un mejor tiempo de retención, ya que la alta polaridad de los analitos podría producir una elución muy temprana, y buena forma de pico. Las columnas que fueron evaluadas han sido:

- Hypercarb™ (100 mm x 2.1 mm, 5µm) contiene como fase estacionaria carbón grafitizado poroso (PGC) que proporciona una retención y separación idónea de compuestos muy polares. Ha sido utilizada en diversos métodos para el análisis de compuestos polares, como acrilamida, con eficientes separaciones y reproducibilidad.<sup>42</sup>
- ZORBAX Eclipse Plus C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.8 µm) es una columna empaquetada con una densa capa de dimetil-n-octadecilsilano, especialmente preparada para la separación de ácidos, bases y otros compuestos de alta polaridad, de resolución rápida y alto rendimiento.<sup>43</sup>
- Hypersil GOLD® aQ (100 mm x 2.1 mm, 1.9 µm) es una columna de sílice de alta pureza que incrementa la eficacia, capacidad de pico y velocidad de análisis. Es estable en cualquier fase móvil acuosa y proporciona una mejora en la retención y resolución de analitos polares.<sup>42</sup>
- Hypersil™ ODS (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) es una columna que contiene una fase estacionaria de C18 de uso general para su utilización en una amplia variedad de aplicaciones, con una excelente confianza y reproducibilidad certificadas.<sup>44</sup>

Se comenzó analizando las disoluciones de los analitos, a diferentes concentraciones, en extracto de tomate en cada una de las columnas utilizando como

fase móvil ACN acidificado al 1% con ACh (eluyente A) y agua (eluyente B) en modo isocrático, con flujos de 0,4 ml/min en las columnas Hypercarb™ y Hypersil™ ODS., y 0,2 ml/min en la columna ZORBAX Eclipse Plus e Hypersil GOLD® aQ, y 0,4 ml/min en la columna Hypersil™ ODS.

En la Figura 8 se presentan los cromatogramas de iones totales (TIC, *Total Ion Chromatogram*) obtenidos con cada una de las columnas en matriz de tomate. El primer cromatograma en verde corresponde a la inyección de 250 µg/l en extracto de tomate con la columna Hypercarb, el segundo en rojo representa 1 mg/l con la columna Eclipse Plus, el tercero en azul corresponde a 500 µg/l con Hypersil GOLD® y el cuarto en rosa a 500 µg/l con Hypersil ODS®.

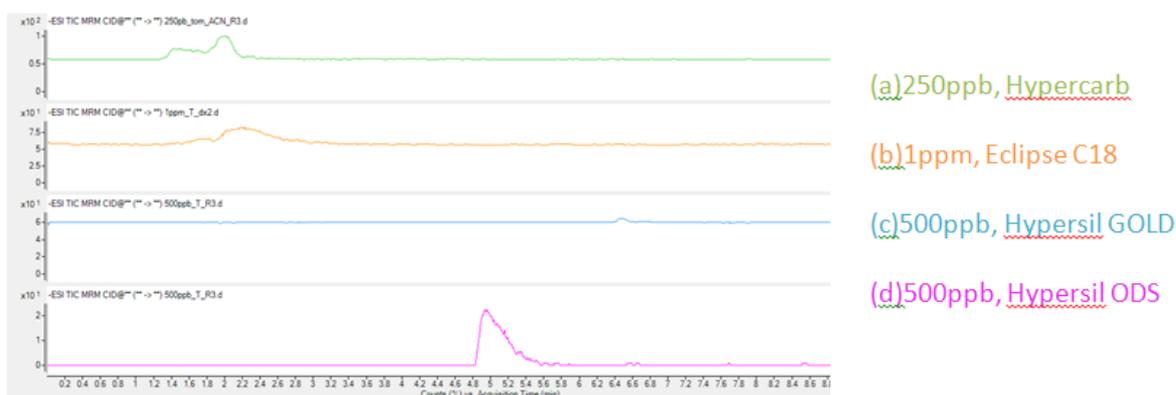


Figura 8: TIC de matriz de tomate fortificada con fosetyl-Al y ácido fosfónico obtenidos con las distintas columnas. (a)Hypercarb, (b) Eclipse, (c) H. GOLD (d) H. ODS.

Como se puede observar, la columna tiene una elevada influencia en el tiempo de retención, obteniéndose el menor tiempo de retención con la PGB (1.7 min) seguida de la C18 (2.2 min), H.ODS (5 min) y H.GOLD (6.6 min). Otro aspecto a tener en cuenta es la forma de pico. Teniendo en cuenta estos criterios y con el fin de minimizar las posibles interferencias, se seleccionó la columna Hypersil™ ODS, ya que ofrece un tiempo de retención de 5 min, donde no eluyen los componentes de la matriz que puedan interferir, además de obtenerse la mejor sensibilidad y forma de pico. En consecuencia dicha columna se ha utilizado en el resto del trabajo experimental realizado.

#### 4.2.2. Optimización de la composición de la fase móvil

Tras seleccionar la columna más adecuada, se procedió al estudio de la composición de la fase móvil. En base a lo encontrado en bibliografía (apartado 1.4) y a los eluyentes utilizados en estudios anteriores para analitos similares, se evaluaron diversas fases móviles compuestas básicamente por una fase orgánica (MeOH o ACN) y otra acuosa (a la que generalmente se le añade algún modificador). A modo resumen se pueden ver las distintas composiciones estudiadas de la fase móvil en la Tabla 7.

Tabla 7: Composiciones probadas para la fase móvil.

Fase móvil A	Fase móvil B
MeOH	0.1% ácido fórmico en H <sub>2</sub> O
ACN	H <sub>2</sub> O
ACN	0.5mM TBA en H <sub>2</sub> O
ACN	100 mM formiato amónico en H <sub>2</sub> O
ACN	100 mM acetato amónico en H <sub>2</sub> O
ACN	50mM amoniaco en H <sub>2</sub> O
0.1% AcH en ACN	1% AcH5% ACN en H <sub>2</sub> O

La elección de la fase móvil se realizó en base a los siguientes criterios: tiempo de retención, sensibilidad obtenida con cada una de ellas y la forma de pico obtenida. El estudio se llevó a cabo sobre extracto de blanco de tomate.

En la Figura 9 se pueden observar las diferencias en los cromatogramas obtenidos con cada una de las fases móviles estudiadas.

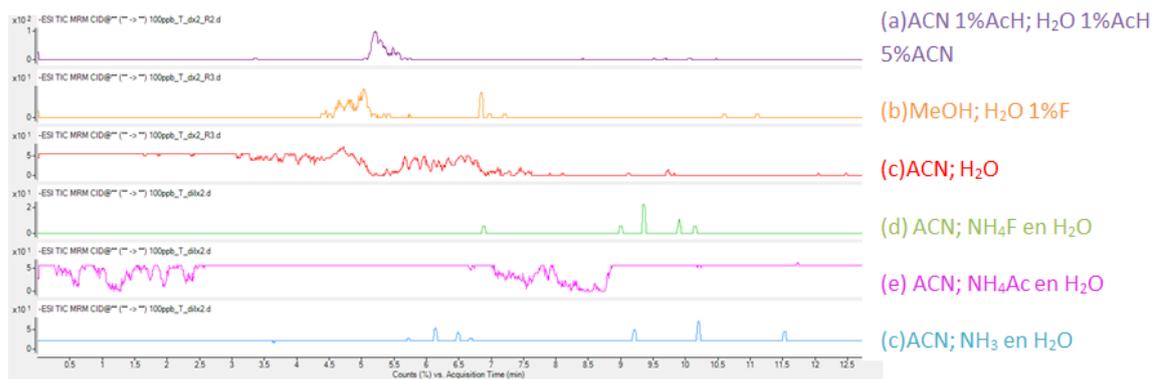


Figura 9: TIC de un punto de calibrado en extracto blanco de tomate, a 100 µg/l, con cada una de las fases móviles estudiadas.

Como puede observarse en la figura anterior, la fase móvil que proporcionó mejores resultados fue una fase orgánica compuesta por ACN acidificado al 1% con AcH (v/v) (eluyente A) y una disolución acuosa al 5% de ACN y 1% de AcH (v/v) (eluyente B), ya que se obtuvo el mejor tiempo de retención, en torno a los 5 minutos, una mejor sensibilidad y una mejor forma de pico.

#### 4.3. Optimización del proceso de extracción

Del mismo modo que para la separación cromatográfica se procedió al estudio de diversos parámetros implicados en el proceso de extracción con el fin de conseguir unos límites inferiores los más bajos posibles y, por tanto, una mayor sensibilidad. A continuación se desglosa el estudio de cada uno de ellos.

##### 4.3.1. Optimización del disolvente de extracción

El método de extracción desarrollado por el Laboratorio Europeo de Referencia de Stuttgart (*Laboratory for Chemical and Veterinary Analysis of Food*, CVUA, Stuttgart, Alemania)<sup>35</sup> para compuestos polares se lleva a cabo utilizando como disolvente de extracción una disolución de MeOH acidificado al 1% con ácido fórmico. En el presente trabajo para el análisis de los compuestos en estudio en muestras de tomate, se evaluaron tres disolventes de extracción con el objetivo de optimizar los valores de recuperación: MeOH acidificado al 1% con ácido fórmico, ACN acidificado al 1% con ácido fórmico y ACN

sin acidificar.

Los valores de recuperación obtenidos empleando MeOH 1% ácido fórmico y ACN sin acidificar estuvieron comprendidos entre el 40 y el 50%, siendo muy inferiores (< 10%) cuando se empleó como extractante ACN 1% ácido fórmico. Por otra parte, los valores obtenidos de precisión, expresados como %DER, al utilizar MeOH 1% fórmico fueron superiores al 20% y próximos al 10% con el empleo de ACN. Por todo ello, continuamos las experiencias optando por el uso de ACN como disolvente de extracción.

Asimismo en la Figura 10 se muestra un cromatograma con el TIC en una extracción con ACN (celeste) y con ACN 1%F (naranja). Como se muestra, la extracción con ACN presenta una mayor recuperación y forma de pico.

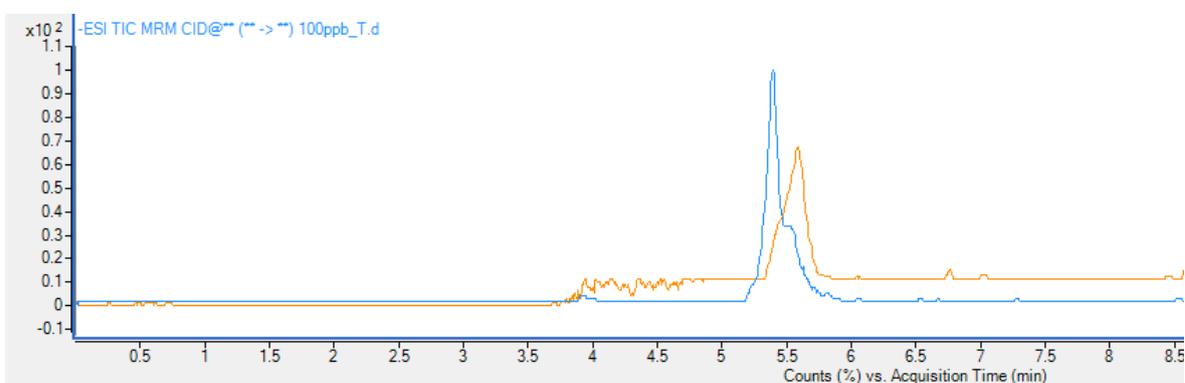


Figura 10: Comparación disolvente ACN 1%F y ACN en la extracción de fosetyl y ácido fosfónico en tomate.

Tras el estudio de los tres disolventes mencionados, se seleccionó el ACN como disolvente de extracción ya que mostró una mayor recuperación de los analitos, proporcionando por tanto una mayor sensibilidad al método.

#### **4.3.2. Optimización de la etapa de limpieza**

Una vez elegido el disolvente de extracción se concluyó con la evaluación de las sales de limpieza. Las sales que se evaluaron fueron PSA, GBC, C18, Z-Sep<sup>+</sup> y florisil de forma independiente.

El procedimiento consistió en fortificar tres muestras de blanco de tomate con los plaguicidas en estudio y someterlos al proceso de extracción y posterior limpieza con en

presencia de 25 mg de las diferentes sales de limpieza.

Paralelamente, se procesaron tres muestras de blanco de tomate que se extrajeron de acuerdo al procedimiento establecido, se aplicó la limpieza con las sales indicadas y se fortificaron a fin de ser usadas como puntos de calibrado.

El objetivo para la selección, o no, de una sal de limpieza consiste en obtener una recuperación entre el 70 y el 100% del fortificado sometido a limpieza respecto a aquel que no. El estudio fue realizado tanto de forma cuantitativa (Tabla 8) mediante el cálculo de las recuperaciones descritas.

Tabla 8: Recuperaciones de los fortificados con cada una de las sales estudiadas.

Sorbente	Recuperaciones (%)	
	Fosetyl-aluminio	Ácido fosfónico
PSA	61,7	35,5
<b>GBC</b>	<b>61,5</b>	<b>57,0</b>
Z-Sep+	43,9	54,8
C18	42,7	52,2
Florisil	78,4	44,3

De todas las sales estudiadas, aquella que para ambos analitos, fosetyl y ácido fosfónico, presenta una recuperación aceptable fue el GBC. Por ello se realizó un segundo estudio, a menores concentraciones, sometiendo varios fortificados a distintos niveles de concentración a una limpieza de GBC y se compararon con fortificados a los que no se les aplicó limpieza.

En la Figura 11 se puede observar el cromatograma de un fortificado extraído sin limpieza (rosa) y con limpieza con GBC (verde). Además, se analizaron los datos de forma cuantitativa procediendo del mismo modo que anteriormente (Tabla 9).

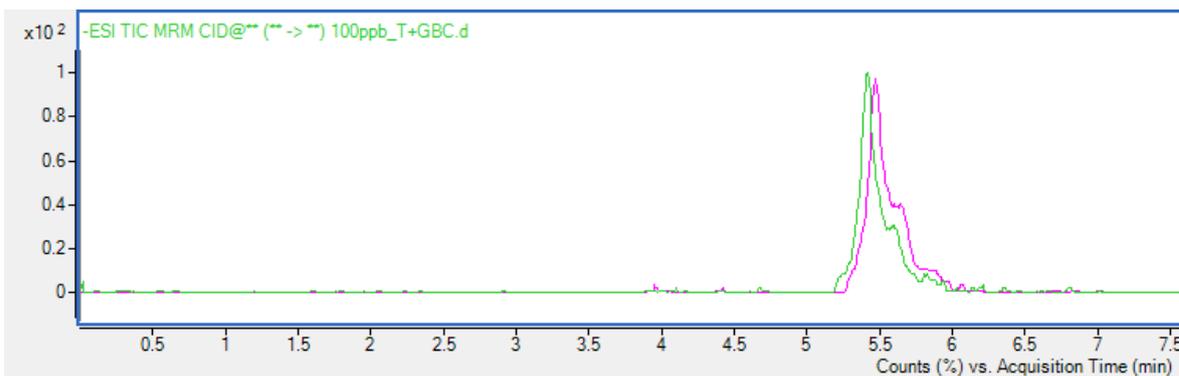


Figura 11: TIC punto de calibrado en tomate, a 100 µg/l, con y sin GBC.

Tabla 9: Recuperaciones y DER (%).

Analitos	Conc. teórica (µg/kg)	Conc. encontrada (µg/kg)	Recuperación (%)	DER (%)
	<b>Sin limpieza</b>			
Fosetyl-al	100	41,8	41,8	18,6
Ácido fosfónico	100	35,4	35,4	16,6

Analitos	Conc. teórica (µg/kg)	Conc. encontrada (µg/kg)	Recuperación (%)	DER (%)
	<b>Con GBC</b>			
Fosetyl-al	100	66,0	66,0	11,8
Ácido fosfónico	100	60,0	60,0	3,9

En base a los datos obtenidos, se observa una apreciable mejora en la extracción al utilizar GBC. Por tanto, se decidió continuar con el procedimiento con dicha etapa de limpieza a pesar de tener %R ligeramente inferiores al 70% pero por presentar unos adecuados valores de precisión.

#### 4.4. Validación del método

Una vez realizada la optimización el método instrumental y el de extracción, se procedió a la validación del método desarrollado con el fin de confirmar la validez y

viabilidad del mismo. Los parámetros de validación estudiados fueron: efecto matriz, linealidad y rango de trabajo, veracidad (% recuperación), precisión intradía e interdía, límite de detección, límite de cuantificación y especificidad.

#### 4.4.1. Linealidad y rango de trabajo

Para el estudio de la linealidad se realizó una extracción de blanco de tomate y se preparó una recta de calibrado en el extracto blanco de matriz con seis puntos, correspondientes a una concentración de 5, 10, 25, 50, 100 y 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Se representó gráficamente la respuesta cromatográfica, en este caso el área, frente a la concentración (Figura 12).

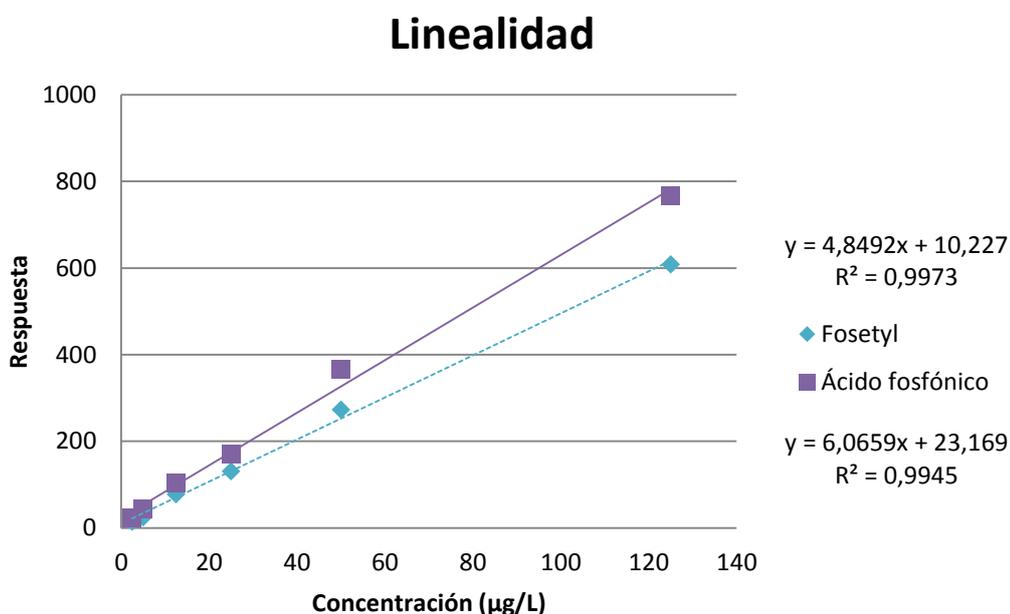


Figura 12: Linealidad de fosetyl y ácido fosfónico en tomate.

Como se puede observar en la Figura 12, para ambos compuestos se obtuvo un coeficiente de correlación  $R^2 > 0,99$ , lo que significa que la respuesta es lineal en el rango de concentraciones entre 5 y 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Además, la desviación de los puntos fue  $\leq \pm 20\%$ .

El rango de trabajo se estableció entre 10 y 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

#### 4.4.2. Efecto matriz

La evaluación del efecto matriz se realizó mediante la preparación y análisis de una recta de calibrado en disolvente y una recta de calibrado en matriz de tomate. El disolvente empleado consistió en una mezcla 50:50 (v/v) de la fase móvil A (ACN 1% ácido acético) y la fase móvil B (agua al 1% de ácido fórmico y 5% ACN). El estudio se realizó mediante la comparación de las pendientes de ambas rectas (Figuras 13 y 14) según la fórmula indicada en el apartado 1.5. Un valor negativo indica supresión de la señal cromatográfica y un valor positivo indica enriquecimiento de la respuesta.

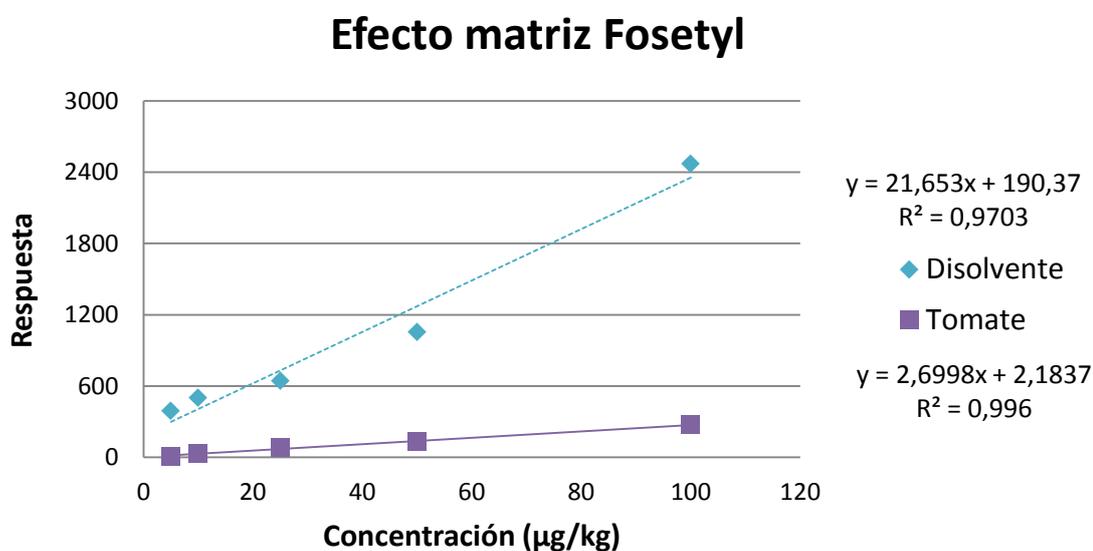


Figura 13: Efecto matriz del fosetyl.

$$EM \text{ fosetyl}(\%) = \left( \frac{\text{Pendiente matriz}}{\text{Pendiente disolvente}} - 1 \right) * 100 = \left( \frac{2,6998}{21,653} - 1 \right) * 100 = -87\%$$

## Efecto matriz ác.fosfónico

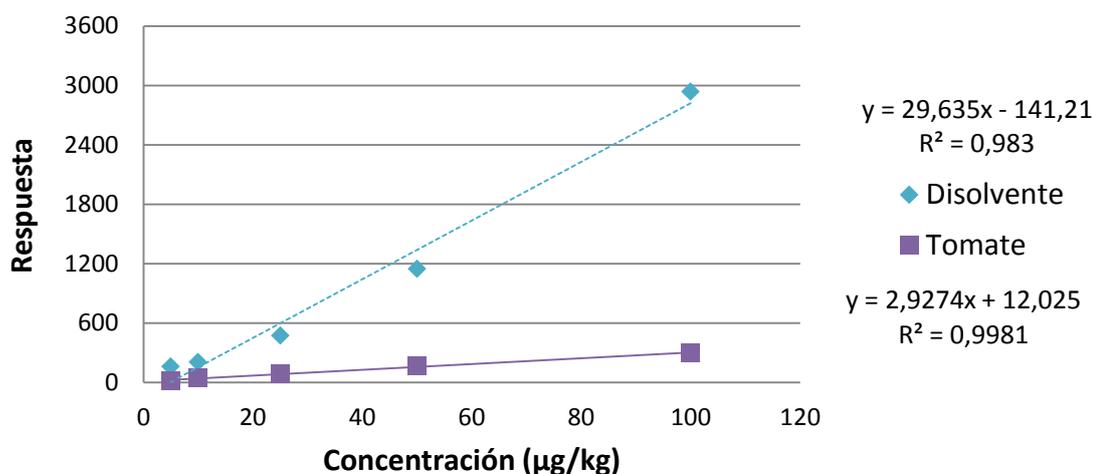


Figura 14: Efecto matriz del ácido fosfónico.

$$EM \text{ ác.fosfónico}(\%) = \left( \frac{\text{Pendiente matriz}}{\text{Pendiente disolvente}} - 1 \right) * 100 = \left( \frac{2,9274}{29,635} - 1 \right) * 100 = -90\%$$

Como se muestra en las figuras anteriores (13 y 14), el efecto matriz tanto de fosetyl como de ácido fosfónico es muy acusado, mostrándose una pendiente en la recta de calibrado en disolvente 10 veces superior a aquella en matriz. Por ello, para el análisis de muestras se prepararán las rectas de calibrado en matriz.

### 4.4.3. Veracidad (% recuperación)

La veracidad, estimada a partir del % de recuperación, se estudió a partir del análisis de cinco blancos de tomate fortificados a dos niveles de concentración de 10 y 100 µg/kg. Teniendo en cuenta que se trabajó con una dilución 1:1 de la matriz, corresponden a una concentración cromatográfica de 5 y 50 µg/l. Los resultados se recogen en la Tabla 10.

Tabla 10: Datos de veracidad (% recuperación).

Analitos	Conc. teórica ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Conc. encontrada ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recuperación (%)	DER (%)*
Fosetyl-al	10	61,0	61,1	13,0 (19)
	100	66,0	66,0	11,8 (17)
Ácido fosfónico	10	54,0	54,3	8,7 (15)
	100	60,0	60,0	3,9 (14)

\*RDS (%) correspondiente a precisión intradía (valores interdía entre paréntesis).

Se obtuvo una recuperación entre el 61 y el 66% para fosetyl y entre el 54 y 60% para el ácido fosfónico. Como muestran los datos, la recuperación obtenida está por debajo de lo estimado en la Guía SANTE, que estipula una recuperación adecuada entre el 70-120%.

#### 4.4.4. Precisión

Para estudiar la precisión del método se evaluó la precisión intradía o repetibilidad. Se calculó a partir del análisis de cinco blancos fortificados a tres niveles de concentración de 10 y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , tal como se realizó en el estudio de la veracidad, en un mismo día. Esta repetibilidad se obtuvo mediante el cálculo de la DER (Tabla 12).

Asimismo se estimó la precisión interdía a los mismos niveles que la precisión intradía pero a partir del análisis de 3 blancos fortificados en 3 diferentes días. Como se puede observar en la Tabla 12 se obtienen valores inferiores al 20% para ambos compuestos.

Los resultados mostraron una buena repetibilidad, con DER inferiores o iguales al 13% para el fosetyl y para el ácido fosfónico inferiores al 9%. Por tanto, estos datos de DER entran dentro de lo estipulado en la Guía SANTE ( $\text{DER} \leq 20\%$ ). Debido a que la recuperación está por debajo de lo estipulado en la Guía SANTE, pero la precisión a los niveles de concentración estudiados es correcta, en la determinación de muestras reales se aplicará un factor de corrección.

#### 4.4.5. Límites de detección y límites de cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se han calculado determinando la concentración menor que ofrecía una relación señal/ruido  $\geq 3$  (LOD) y una relación señal/ruido  $\geq 10$  (LOQ). El estudio se realizó analizando blancos de muestra fortificados a concentraciones decrecientes. Los límites estimados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Límites de detección y de cuantificación.

Analitos	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Fosetyl-al	5	10
Ácido fosfónico	5	10

#### 4.4.6. Especificidad

El estudio de la especificidad consistió en la preparación y análisis de un blanco de reactivo y un blanco de matriz de tomate. Se comprobó que no había ninguna señal interferente en el tiempo de retención de los analitos objeto de estudio.

En resumen, los datos de validación llevados a cabo concuerdan con la Guía SANTE:

- ✓ Linealidad: las rectas de calibrado presentan un  $R^2 > 0,99$ .
- ✓ Veracidad (% de recuperación): las recuperaciones presentan valores entre 52 y el 61%, con una DER asociada inferior al 20%. Se aplicará un factor de corrección.
- ✓ Precisión intradía e interdía: valores de DER inferiores al 20%.
- ✓ Límite de cuantificación: el método presenta unos valores adecuados de precisión y veracidad en el LOQ. Además, este valor es inferior al LMR.
- ✓ Especificidad: las muestras no presentan interferentes de la matriz que interfieran con los analitos.

Además de los parámetros ya mencionados, la Guía SANTE recoge la validación de la robustez y la incertidumbre, sin embargo, en este trabajo no han sido estimados por falta de tiempo. Por este mismo motivo, no se realizó la aplicación del método al análisis de muestras reales.

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo fin de Máster nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Se ha desarrollado un método instrumental mediante LC-QqQ-MS/MS para la determinación de fosetyl y su metabolito ácido fosfónico en tomate.
2. Se ha optimizado un método de extracción sencillo de los compuestos en tomate basado en el uso de acetonitrilo.
3. El método de análisis mediante LC-QqQ-MS/MS se ha validado para la determinación de fosetyl y ácido fosfónico en tomate proporcionando valores adecuados de especificidad, linealidad, veracidad y precisión. Los valores de LOD y LOQ son inferiores al LMR establecido en la Unión Europea para fosetyl en tomate (100 mg/kg).
4. La simplicidad del tratamiento de muestra, así como la rapidez del método de análisis, de 13 min, y la adecuada sensibilidad y capacidad de confirmación para fosetyl y ácido fosfónico hacen que esta metodología sea aplicable a análisis rutinarios realizados en laboratorios.

## CONCLUSIONS

According to the results that have been obtained in this work, we have reached the following conclusions:

1. An instrumental method has been developed by LC-QqQ-MS/MS for the determination of fosetyl-Al and its metabolite, the phosphonic acid, in tomato.
2. A simple extraction method has been optimized in tomato by using acetonitrile.
3. The analytical method has been validated for the determination of fosetyl-Al and phosphonic acid in tomato, providing suitable values of specificity, linearity, precision and accuracy. The LOD and LOQ values are lower than the MRL established by the European Union to fosetyl-Al in tomato (100 mg/kg).
4. The fast and simple sample pretreatment, as well as the short chromatographic run time, 13 min, the suitable sensibility and the confirmation capacity for fosetyl-Al and phosphonic acid allow this methodology to be applicable to routine analysis made in laboratories.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- 
- <sup>1</sup> Fry, W. Goodwin, S. Resurgence Of The Irish Potato Famine Fungus. *BioScience* 1997, 47, 363-371.
- <sup>2</sup> Padmanabhan, S. The Great Bengal Famine. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1973, 11, 11-24.
- <sup>3</sup> Deliopoulos, T.; Kettlewell, P.; Hare, M. Fungal Disease Suppression By Inorganic Salts: A Review. *Crop Protection* 2010, 29, 1059-1075.
- <sup>4</sup> Society, T. A. P. A short history of fungicides, 2016. American Phytopathological Society. <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Fungicides.aspx> (consultado abril 2016).
- <sup>5</sup> WHO. Pesticides, 2015. World Health Organization. [Online] <http://www.who.int/topics/pesticides/en/> (consultado febrero 2016).
- <sup>6</sup> B.O.E. 24 enero 1984. Real Decreto 30 noviembre 1983, núm. 3349/83 (Presidencia). PRODUCTOS QUÍMICOS, Reglamentación Técnico-Sanitaria para fabricación, comercialización y utilización de pesticidas. Diario Oficial de la UE.
- <sup>7</sup> EPA, U.; OCSPP. Biopesticides, 2016. United States Environmental Protection Agency. [Online] <https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides> (consultado marzo 2016).
- <sup>8</sup> Greaves, J. Biopesticides, regulatory innovation and the regulatory state. *Public Policy and Administration.* 2009, 24 (3), 245–264.
- <sup>9</sup> Center for Environmental Farming System. [Online] <http://www.cefs.ncsu.edu/newsevents/events/2010/sosa2010/20101013tomato/product04-bicarbonate.pdf> (consultado febrero 2016).
- <sup>10</sup> College of Agricultural Sciences. Understanding the Phosphonate products (center for Turfgrass science). Penn State College of Agricultural Sciences. [Online] <http://plantscience.psu.edu/research/centers/turf/extension/factsheets/phosphonate-products> (consultado abril 2016).
- <sup>11</sup> <http://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Impmanconenfcauphypadifculco.pdf> (consultado marzo 2016).
- <sup>12</sup> Haverkort, A. J.; Boonekamp, P. M.; Hutten, R.; Jacobsen, E.; Lotz, L. A. P.; Kessel, G. J. T.; Visser, R. G. F.; van der Vossen, E. A. G. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through Cisgenic modification. *Potato Research.* 2008, 51 (1), 47–57.
- <sup>13</sup> Echemendia Medina, Y. Phytophthora: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. [Online] <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1060/cuf0022s.pdf> (consultado abril 2016).
- <sup>14</sup> J.A. Ramírez, M. Lacasaña, Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición, *Arch Prev Riesgos Labor* 2001, 4(2), 67-75.

- 
- <sup>15</sup> Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental y Medio Natural. *Perfil Ambiental de España 2014*; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Secretaría General Técnica. Centro de Publicaciones.: Madrid, España, [Online] 2015; 156–157. [http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/pae2014\\_baja\\_completo\\_tcm7-361748.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/pae2014_baja_completo_tcm7-361748.pdf) (consultado abril 2016).
- <sup>16</sup> Bartual Sánchez, J.; Berenguer Subils, M. J. *Pesticidas: Clasificación y riesgos principales*. NTP 143; Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales.: Centro de investigación y asistencia técnica, Barcelona. España, [Online] 1980. [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/101\\_a200/ntp\\_143.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/101_a200/ntp_143.pdf) (consultado abril 2016).
- <sup>17</sup> Buenas Prácticas Agrícolas, 2008. FAO: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. [http://www.fao.org/prods/gap/index\\_es.htm](http://www.fao.org/prods/gap/index_es.htm) (consultado febrero 2016).
- <sup>18</sup> Ongley, E. D. Los plaguicidas, en cuanto contaminantes del agua. En *Lucha Contra la Contaminación Agrícola de Los Recursos Hídricos* [Online]; Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO): Italia, 1997; Capítulo 4. <http://www.fao.org/docrep/w2598s/w2598s00.htm#Contents> (consultado marzo 2016).
- <sup>19</sup> Elementos de un sistema nacional de control de los alimentos. En *Garantía de la Inocuidad y Calidad de Los Alimentos: Directrices Para El Fortalecimiento de Los Sistemas Nacionales de control de Los Alimentos* [Online]; World Health Organization, Food & Agriculture Organization of the United Nations (WHO, FAO): Italia, 2003; Capítulo 4. <http://www.fao.org/docrep/006/y8705s/y8705s04.htm#bm04> (consultado marzo 2016).
- <sup>20</sup> Reglamento (CE) No 149/2008 DE LA COMISIÓN, 2008.
- <sup>21</sup> CODEX Alimentarius: Home, 2016. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/> (consultado febrero 2016).
- <sup>22</sup> Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- <sup>23</sup> Documento No. SANTE/11945/2015. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. [http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant\\_pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_11945\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf) (consultado febrero 2016).
- <sup>24</sup> United States Environmental Protection Agency. *Fact sheet for fosetyl-al (aliette)*; 1991. EPA [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/reregistration/fs\\_PC-123301\\_1-Jan-91.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-123301_1-Jan-91.pdf) (consultado marzo 2016).
- <sup>25</sup> European Food Safety Authority. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fosetyl, 2005. EFSA. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/54r> (consultado febrero 2016).

- 
- <sup>26</sup> Kegley, S. E.; Hill, B. R.; Orme, S.; Choi, A. H. Pesticide Action Network, 2000. PAN Pesticide Database. [http://www.pesticideinfo.org/Detail\\_Chemical.jsp?Rec\\_Id=PC37097#Toxicity](http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC37097#Toxicity) (consultado mayo 2016). North America (Oakland, CA, 2014).
- <sup>27</sup> University of Hertfordshire. PPDB - pesticides properties dataBase, 2007. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm> (consultado marzo 2016).
- <sup>28</sup> Royal Society of Chemistry. ChemSpider, 2015. <http://www.chemspider.com/> (consultado febrero 2016).
- <sup>29</sup> Introduction to practical biochemistry, 2013. <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/index.html> (consultado mayo 2016).
- <sup>30</sup> [http://www.cbm.uam.es/joomla-rl/images/Servicios/080.Proteomica/documentos/Espectrometria\\_de\\_masas\\_ESI-MSMS\\_enero\\_2015.pdf](http://www.cbm.uam.es/joomla-rl/images/Servicios/080.Proteomica/documentos/Espectrometria_de_masas_ESI-MSMS_enero_2015.pdf) (consultado marzo 2016).
- <sup>31</sup> Saindrenan, P.; Darakis, G.; Bompeix, G. Determination of ethyl phosphite, phosphite and phosphate in plant tissues by anion-exchange high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *Journal of Chromatography* **1985**, 347, 267-273.
- <sup>32</sup> Hooijschuur, E. W. J.; Kientz, C. E.; Dijksman, J.; Brinkman, U. A. T. Potential of microcolumn liquid chromatography and capillary electrophoresis with flame photometric detection for determination of polar phosphorus-containing pesticides. *Chromatographia* **2001**, 54 (5-6), 295-301.
- <sup>33</sup> Hernández, F.; Sancho, J. V.; Pozo, Ó. J.; Villaplana, C.; Ibáñez, M.; Grimalt, S. Rapid Determination of Fosetyl-Aluminum Residues in Lettuce by Liquid Chromatography /Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International* **2003**, 86 (4), 832-838.
- <sup>34</sup> Poutska, J.; Hajšlová, J.; Holandová, K.; Nováková, K. Potential of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry for determination of fosetyl-aluminium residues in dried hops. *Czech J. Food Sci.* **2004**, 22 (1), 24-28.
- <sup>35</sup> Anastassiades, M.; Kolberg, D. I.; Benkenstein, A.; Eichhorn, E.; Zechmann, S.; Mack, D.; Wildgrube, C.; Sigalov, I.; Dörk, D.; Barth, A. Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method). Versión 9.1 mayo 2016. Laboratory for Chemical and Veterinary Analysis of Food (CVUA, Stuttgart, Alemania).
- <sup>36</sup> Ishibashi, M.; Ando, T.; Sakai, M.; Matsubara, A.; Uchikata, T.; Fukusaki, E.; Bamba, T. High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2012**, 1266, 143-148.

- 
- <sup>37</sup> Mol, H. G. J.; van Dam, R. C. J. Rapid detection of pesticides not amenable to multi-residue methods by flow injection–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406* (27), 6817–6825.
- <sup>38</sup> Karasali, H.; Kasiotis, K.; Machera, K. Rapid determination of fosetyl-aluminium in commercial pesticide formulations by high-performance liquid chromatography. *Chemical Papers* **2014**, *68* (6), 725–731.
- <sup>39</sup> Anastassiades, M.; Scherbaum, E.; Bertsch, D. Validation of a simple and rapid Multiresidue method (QuEChERS) and its implementation in routine pesticide analysis. *MGPR Symposium*; Francia, 2003. [http://www.super-lab.com/cms/mestoZaUploadFajlove/QuEChERS\\_new\\_.pdf](http://www.super-lab.com/cms/mestoZaUploadFajlove/QuEChERS_new_.pdf) (consultado mayo 2016).
- <sup>40</sup> ISO/IEC 17025:2005, (2005), General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- <sup>41</sup> EURACHEM Guide. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics, Eurachem: United Kingdom, 2014; 2nd edition.
- <sup>42</sup> <https://www.thermofisher.com/es/es/home.html> (consultado febrero 2016).
- <sup>43</sup> <https://www.agilent.com/home> (consultado febrero 2016).
- <sup>44</sup> [http://www.bioszeparacio.hu/user/downloads/Thermo%20Electron/Hypersil%20Brochure%20\(TG20133\\_E%200605M\\_M\).pdf](http://www.bioszeparacio.hu/user/downloads/Thermo%20Electron/Hypersil%20Brochure%20(TG20133_E%200605M_M).pdf) (consultado febrero 2016).