



Determinación de clordecona en leche mediante microextracción en fase sólida en combinación con cromatografía de gases–espectrometría de masas

Determination of chlordecone in milk by SPME–GC–MS

Nombre María del Mar Felices Salvador

Curso académico 2016–2017

Fecha: Septiembre 2017

Tutor/es

Dr. Antonia Garrido Frenich

Departamento de Química y Física

Dr. Francisco Javier Arrebola Liébanas

Departamento de Química y Física

Determinación de clordecona en leche mediante microextracción en fase sólida en combinación con cromatografía de gases-espectrometría de masas

Memoria del Trabajo Fin de Grado en Química presentada por
María del Mar Felices Salvador

Almería, 12 de Septiembre de 2017

Fdo: María del Mar Felices Salvador

Fdo: Antonia Garrido Frenich

Fdo: Francisco Javier Arrebola Liébanas

Life is a relationship between molecules

Linus Pauling

*Asegurémonos, pues, merced a una investigación bibliográfica cuidadosa,
de la originalidad del hecho o idea que deseamos exponer,
y guardémonos además de dar a luz prematuramente el fruto de la observación
Cuando nuestro pensamiento fluctúa todavía entre conclusiones diversas
y no tenemos plena conciencia de haber dado en el blanco,
ello es señal de haber abandonado harto temprano el laboratorio.
Conducta prudente será volver a él y esperar a que,
bajo el influjo de nuevas observaciones, acaben de cristalizar nuestras ideas.*
Santiago Ramón y Cajal “Reglas y consejos”

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a las personas que me han apoyado durante la realización de este Trabajo Fin de Grado.

Especialmente agradecer a mis tutores, Dra. Antonia Garrido Frenich y Dr Francisco Javier Arrebola Liébanas, por todo el tiempo dedicado, por el apoyo y la confianza que han depositado en mí desde el primer momento, así como por estar continuamente guiándome en la realización de este trabajo y por el trato que he recibido.

A todos los integrantes área de investigación por su ayuda y disposición en todo momento, y por hacer este trabajo mucho más fácil.

MEMORIA

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. ABSTRACT.....	5
3. INTRODUCCIÓN.....	7
3.1. PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS	8
3.2 PLAGUICIDA OBJETO DE ESTUDIO.....	9
3.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE CLORDECONA EN LECHE	11
3.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A MS	14
3.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	17
4. OBJETIVOS	19
5. MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	19
5. 1. REACTIVOS Y MATERIAL UTILIZADO	19
5.1.1 Reactivos.....	19
5.1.2 Equipos y materiales	19
5.2. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN	20
5.3. CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE LECHE	20
5.4 MÉTODO DE ANÁLISIS POR HS-SPME-GC-MS/MS	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
6.1 DESARROLLO DEL MÉTODO INSTRUMENTAL.....	21
6.1.1. Optimización de las condiciones espectrométricas para clordecona	21
6.1.2. Optimización condiciones cromatográficas para el análisis de clordecona	27
6.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO	32
6.3 APLICACIÓN DEL MÉTODO	34
7. CONCLUSIONES	35
8. BIBLIOGRAFÍA Y NOTAS	35
9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	37

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Estructura de clordecona	9
Figura 2. Jeringa de cromatografía de gases conteniendo una fibra de SPME	13
Figura 3. Modos de trabajo en SPME	14
Figura 4. Representación de un cromatógrafo de gases	15
Figura 5. Modos de trabajo MS/MS utilizando un analizador de triple cuadrupolo	16
Figura 6. Analizador triple cuadrupolo	17
Figura 7. Cromatograma obtenido para la caracterización espectrométrica inicial de clordecona	22
Figura 8. Espectro de masas obtenido en modo <i>full scan</i> para clordecona	23
Figura 9. Espectro de masas de clordecona en biblioteca espectral NIST	24
Figura 10. Espectro -MS/MS obtenido para clordecona con el método propuesto	25
Figura 11. Pico cromatográfico de clordecona obtenido a 100 ms de tiempo de barrido. Se pueden observar los puntos obtenidos para representar el pico cromatográfico	26
Figura 12. Cromatogramas superpuestos de clordecona durante el estudio de la temperatura de desorción de la fibra SPME en el inyector cromatográfico	27
Figura 13. Cromatograma obtenido para clordecona en las condiciones cromatográficas optimizadas	30
Figura 14. Optimización de la proporción de volúmenes entre leche y agua	31
Figura 15. Cromatogramas de clordecona obtenidos al realizar los experimentos variando el volumen de acetona	33

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas, químicas y toxicológicas más importantes de clordecona	10
Tabla 2. Parámetros de validación y criterios de aceptación	11
Tabla 3. Condiciones espectrométricas utilizadas en la detección de clordecona	21
Tabla 4. Optimización del tiempo de barrido en la adquisición de datos MS/MS	26
Tabla 5. Optimización de la temperatura del inyector cromatográfico para la desorción de clordecona de la fibra SPME	27
Tabla 6. Estudio del tiempo de cierre de la válvula de división del inyector	29
Tabla 7. Optimización del tiempo de extracción SPME	31
Tabla 8. Estudio del tiempo de desorción de clordecona en el inyector cromatográfico	32
Tabla 9. Estudio de la adición de NaCl a la muestra	32

1. RESUMEN

En este trabajo se ha desarrollado y validado un método de análisis para la determinación del plaguicida organoclorado clordecona, incluido dentro del grupo de contaminantes orgánicos persistentes (POPs, *Persistent Organic Pollutants*), en leche. Debido a los bajos niveles a los que es necesario su determinación se ha aplicado como metodología de análisis microextracción en fase sólida (SPME, *Solid Phase Microextraction*) en modo espacio-cabeza (HS, *Head-Space*) acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS, *gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*). El método fue validado a tres niveles de concentración, 10, 20 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, obteniendo valores adecuados de % recuperación (93-110%), precisión intradía (<6%) e interdía (<12%) y límite de detección (0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y de cuantificación (0,12 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Finalmente, el método fue aplicado al análisis de 15 muestras de leche comerciales, 5 de leche entera, 5 de leche semidesnatada y 5 de leche desnatada, sin detectar la presencia de clordecona en ninguna de ellas.

Palabras clave: *Clordecona, POPs, leche, HS-SPME-GC-MS/MS.*

2. ABSTRACT

An analytical method has been developed and validated for determining the organochlorine pesticide chlordecone, included in the Persistent Organic Pollutants (POPs) group, in milk. Due to the low levels requested for its determination, it has been applied Solid Phase Microextraction (SPME) in its form of Head-Space (HS) coupled to Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS). The method was validated at three concentration levels, 10, 20 and 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, obtaining adequate values of recovery (93-110%), intraday (<6%) and interday (<12%) precisions and limit of detection (0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and quantitation (0.12 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Finally, the method was applied to the analysis of 15 commercial milk samples, 5 of whole milk, 5 of semi-skimmed milk and 5 of skimmed milk without detection the presence of chlordecone in any of them.

Keywords: *Chlordecone, POPs, milk, HS-SPME-GC-MS/MS.*

3. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas comprenden un grupo numeroso de sustancias pertenecientes a distintas familias químicas que son eficaces contra las plagas que afectan a la producción agrícola y animal. Incluyen compuestos con una gran variedad de estructuras químicas y por consiguiente presentan diferencias en sus modos de acción, absorción, biotransformación y eliminación. Algunos residuos de estos compuestos persisten tras su aplicación en los alimentos, introduciéndose en la cadena alimentaria y constituyendo un riesgo importante para la salud humana.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, *Food and Agriculture Organization*) define plaguicida como "cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos y otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte."¹

Los plaguicidas pueden clasificarse según diferentes criterios. Así atendiendo al uso se clasifican en:

- Fungicidas: utilizados para combatir hongos
- Herbicidas: utilizados para combatir malas hierbas
- Nematicidas: utilizados para combatir nemátodos
- Molusquicidas: utilizados para combatir caracoles y babosas
- Acaricidas: utilizados para combatir ácaros
- Insecticidas: utilizados para combatir insectos
- Rodenticidas: utilizados para combatir roedores

Atendiendo a la familia química, los plaguicidas pueden clasificarse, entre otros, como:

- Organoclorados
- Organofosforados
- Piretroides
- Arsenicales
- Carbamatos
- Derivados de la cumarina
- Derivados de urea
- Dinitrocompuestos
- Organometálicos
- Tiocarbamatos
- Triazinas

Los derivados organoclorados fueron los primeros plaguicidas orgánicos sintetizados a mediados del Siglo XX, siendo el origen de la industria de los plaguicidas organosintéticos.

3.1. PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS

Desde un punto de vista histórico se pueden diferenciar tres etapas en el uso de plaguicidas: (i) la primera comienza en los inicios del siglo XIX al descubrir la acción plaguicida de algunos elementos como el arsénico, fósforo, cobre, azufre o de las piretrinas (sustancias obtenidas de los pétalos del crisantemo); (ii) la segunda etapa comienza en los inicios del Siglo XX con el empleo de diferentes aceites con propiedades insecticidas y (iii) la tercera etapa se inicia en 1940 al descubrir Müller las propiedades insecticidas del plaguicida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT, *Dichloro Diphenyl Trichloroethane*).

Tras su descubrimiento el DDT fue muy utilizado por su excelente eficacia y bajo precio para combatir plagas en la industria, la agricultura e incluso durante campañas de salud donde se aplicó de forma masiva para contrarrestar enfermedades como la malaria o el tifus. Sin embargo, la publicación en 1962 del libro “La primavera silenciosa” por Rachel Carlson² llevaron a la prohibición del DDT en 1972 por ser un compuesto muy persistente en el ambiente y producir problemas de salud. En España, el uso de plaguicidas organoclorados se restringió fuertemente en la década de 1970. A pesar de ello, hoy todavía persisten en el ambiente y en los tejidos humanos.³

En general los plaguicidas organoclorados (OC) representan una seria amenaza por su espectro de distribución y difícil biodegradación. Se consideran sustancias persistentes ya que su tiempo promedio de degradación es de unos 5 años puesto que sus estructuras químicas son muy estables y se degradan lentamente bajo condiciones ambientales extremas.⁴ Además son compuestos altamente tóxicos que inducen mutagénesis, teratogénesis y alteraciones sobre una gran variedad de funciones metabólicas y de reproducción. Muchos de ellos con efecto hormonal presentan en común su lipofilia, baja presión de vapor y persistencia en el ambiente, siendo generalmente difícilmente biodegradables.

A pesar de que el DDT y otros plaguicidas de similares características fueron prohibidos hace décadas, la migración hace que ninguna zona del planeta quede libre de su presencia. En los años 80 se demostró que la leche humana de madres en territorios de Canadá contenían concentraciones de compuestos organoclorados⁵.

En la categoría de plaguicidas orgánicos sintéticos están incluidos los OC, los cuales se clasifican por su estructura química en:

- Derivados halogenados de hidrocarburos alicíclicos (ejemplo lindano)
- Derivados halogenados de hidrocarburos aromáticos (entre ellos DDT y metabolitos)
- Derivados halogenados de hidrocarburos ciclodiénicos (ejemplo clordecona).

Ciertos plaguicidas organoclorados, DDT, aldrina, clordano, dieldrina, endrina, heptacloro, mirex, toxafeno, lindano y clordecona, se encuentran entre el grupo de contaminantes orgánicos persistentes, conocidos internacionalmente por su acrónimo en inglés POPs (*Persistent Organic Pollutants*). En dicho grupo se incluyen sustancias químicas que suponen una amenaza para la salud humana y el medio ambiente de todo el planeta debido a que al ser, en general, compuestos

organoclorados son resistentes a la degradación, son bioacumulables y tienen potencial para ser transportados a larga distancia, pudiendo llegar a regiones en las que nunca se han producido o utilizado.³ Debido a todas estas características, las Naciones Unidas establecieron el Convenio de Estocolmo sobre POPs⁶, que tiene por objeto proteger la salud humana y el medio ambiente frente a dichos contaminantes. Este Convenio entró en vigor el 17 de mayo de 2004, actualmente 178 países se encuentran suscritos a él, entre ellos todos los de la Unión Europea, estableciendo medidas para eliminar y, cuando ello no sea posible, reducir las emisiones y liberaciones de estos contaminantes. Dicho Convenio ha sufrido numerosas modificaciones la última de ellas el 15 de mayo de 2015.⁷

En este Convenio se ha recomendado la leche humana como matriz de referencia para determinar las posibles tendencias mundiales y su distribución espacial.⁸

En el presente trabajo se ha seleccionado el plaguicida organoclorado clordecona, incluido en el listado de POPs, para su estudio en la matriz de leche.

3.2 PLAGUICIDA OBJETO DE ESTUDIO

Clordecona (**Figura 1**), también conocida como Kepona, es un compuesto orgánico clorado sintético que ha sido empleado sobre todo como insecticida, larvicida y fungicida. Fue usado entre 1972 y 1993 especialmente en las Indias Francesas para proteger las plantaciones de plátanos ante posibles plagas dando lugar a la contaminación de compartimentos ambientales y llegando a la cadena alimentaria.^{9,10,11} También ha sido utilizado en cultivos de cítricos, tabaco y plantas ornamentales, para controlar la mosca doméstica, como larvicida y como fungicida en manzanos¹².

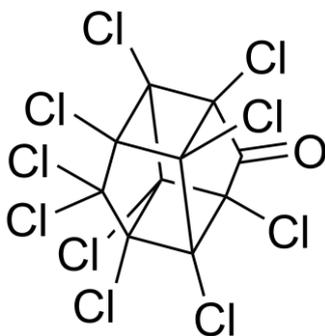


Figura 1. Estructura de clordecona.

Dada la alta estabilidad de clordecona se ha encontrado contaminando suelos tras 20 años desde su prohibición^{13,14,15}, aguas superficiales y residuales¹⁶ y acumulación en pescado y marisco^{17,18,19,20}.

Entre los sectores que presentan una mayor exposición a los plaguicidas se pueden citar el agrícola, jardineros y profesionales que estén en contacto continuo con la aplicación de estas sustancias.²¹ En el caso de clordecona la principal fuente de exposición es por ingestión²². Estudios experimentales en animales han demostrado que después de una exposición aguda o crónica, clordecona se distribuye ampliamente por el cuerpo y su acumulación se produce principalmente en el hígado. Su vida media en el cuerpo es del orden de varios meses y la excreción es

principalmente a través de las heces. Debido a esto, los mayores efectos adversos se observarán en el hígado, además de anomalías renales y signos neurológicos. Estudios en población infantil (7-18 meses) han demostrado que la exposición ambiental a niveles de clordecona tiene efectos en la motricidad durante la infancia^{23,24}. Sin embargo, estudios en adultos han demostrado un incremento significativo del riesgo de cáncer de próstata con el aumento de los niveles de clordecona en plasma²⁵.

Algunas de las propiedades físico-químicas y toxicológicas más importantes de este compuesto se encuentran detalladas en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Propiedades físicas, químicas y toxicológicas más importantes de clordecona^{26,27}.

Sustancia activa (Nombre común)	Clordecona
Nombre químico	1,1a,3,3a,4,5,5,5a,5b,6-Decacloro octahidro-1,3,4-meteno-2H-ciclobura[cd]pentalen-2-ona
Nombre IUPAC	Percloropentaciclodecan-5-ona
Fórmula molecular	C ₁₀ Cl ₁₀ O
Masa molecular (g/mol)	490,64
Aspecto a temperatura y presión de vapor	Sólido cristalino, blanco-tostado
Punto de descomposición (°C)	350
Presión de vapor mPa	3,0x10 ⁻⁵ (25°C)
Punto de fusión	Se descompone tras la fusión
Punto de ebullición	Se descompone tras la ebullición
Solubilidad en agua a 20°C (mg/l)	3.0
Constante de la Ley de Henry (Pa m ³ /mol)	2,53x10 ⁻³ (25°C)
Toxicidad	

Los pictogramas anteriores de la Tabla 1 indican su peligrosidad por ingestión, inhalación o contacto con la piel, puede ser perjudicial para determinados órganos y peligroso para el medio ambiente. Este etiquetado ha sido aprobado por la Unión Europea²².

Puesto que su uso se convirtió en un hábito común en la agricultura, y su toxicidad es elevada, las autoridades se vieron obligadas a controlar tanto su producción como su aplicación a través de la implantación de normas y procedimientos a seguir.

Los niveles permitidos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos se encuentran armonizados en todos los países de la Unión Europea. El Reglamento (CE) N° 396/2005²⁸ del Parlamento Europeo y del Consejo, firmado el 23 de febrero de 2005, es el marco que recoge los límites máximos de residuos (MRL, *Maximum Residue Limits*) de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. Este Reglamento establece el MRL para un número muy amplio de plaguicidas en diferentes matrices. En dicho Reglamento se establece el MRL de clordecona en un amplio abanico de matrices, fijándose en 0,02 mg/kg en leche.

Por todo ello es necesario disponer de métodos que permitan determinar este plaguicida a niveles bajos de concentración. La guía SANTÉ acrónimo del francés (*Santé consumers*) publicada por la Comisión Europea el 01/01/2016 presenta directrices a seguir con respecto a la validación y control de calidad en métodos para residuos de plaguicidas en alimentos y piensos²⁹. Asimismo, la guía indica valores aceptables de los parámetros de validación de un método para poder considerarlo como válido. En la **Tabla 2** se resumen los parámetros de validación y los criterios de aceptación de dichos parámetros establecidos en la guía SANTÉ.

Tabla 2. Parámetros de validación y criterios de aceptación.

Parámetro	Significado	Criterio
Linealidad/Sensibilidad	Linealidad evaluada con 5 niveles	Residuales $< \pm 20\%$
Efecto matriz	Comparación de pendientes de rectas en disolvente y matriz	$\leq \pm 20\%$
Límite de cuantificación (LOQ)	Nivel más bajo que cumple los criterios de veracidad y precisión	\leq MRL
Especificidad	Respuestas de blanco de reactivo y de blanco de muestras de control	$< 30\%$ que la señal al LOQ
Veracidad	Recuperación media de los niveles de fortificación ensayados	70-120%
Precisión (intradía)	RSD en condiciones de repetibilidad	$\leq 20\%$
Precisión (interdía)	RSD en condiciones de reproducibilidad dentro del laboratorio	$\leq 20\%$

RSD: desviación estándar relativa (*Relative Standard Deviation*)

LOQ: límite de cuantificación (*Limit of Quantification*)

3.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE CLORDECONA EN LECHE

En general los métodos tradicionales de extracción de plaguicidas en leche requieren grandes volúmenes de disolvente, largo tiempo de procesado y generan numerosos desechos. En los últimos años se han aplicado diversas técnicas para la determinación y extracción de plaguicidas en alimentos y muestras medioambientales que mejoran las limitaciones anteriores. Se han conseguido, entre

otros, reducir la cantidad de muestra a procesar, así como el volumen de disolventes, mejorar la automatización reduciendo las operaciones manuales y siendo más respetuosos con el medio ambiente (química verde) mediante el menor uso de disolventes orgánicos. Entre las técnicas aplicadas para la extracción de plaguicidas en leche se encuentran la extracción mediante *Soxhlet* tras aplicar una etapa de liofilización a la leche, la extracción líquido-líquido (LLE, *Liquid Liquid Extraction*) y la extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*). Asimismo, se han aplicado otras técnicas como dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, *Matrix Solid-Phase Dispersion*), extracción con fluidos presurizados (PLE, *Pressurized Liquid Extraction*), QuEChERS (*Quick Easy Chap Effective Robust and Safe*) y microextracción en fase sólida (SPME, *Solid-Phase MicroExtraction*), como se recoge en un artículo de revisión³⁰. Todas estas técnicas han sido aplicadas para la extracción de plaguicidas organoclorados en la matriz referida, leche, pero sin embargo en ninguno de los estudios se ha incluido el plaguicida clordecona. En relación a dicho plaguicida tan sólo hay publicados dos artículos en los que el compuesto se determina en leche tras largos procesos de extracción/partición con disolventes y limpieza final mediante cromatografía de permeación en gel; dichos estudios se comentan a continuación^{9,31}.

En 2015 se desarrolló un método para la determinación de clordecona a niveles ultratrazas en fluidos biológicos incluyendo leche materna. La extracción se realiza sobre 3 ml de leche realizando extracciones sucesivas con 10 ml de etanol, 5 ml de éter dietílico y 7 ml de hexano, reuniendo las fases orgánicas y aplicando una nueva extracción con 5 ml de hexano y pasándolas a través de sulfato sódico. Seguidamente se lleva a sequedad, se redisuelve en 500 µl de una mezcla de acetato de etilo:ciclohexano (50:50,v/v) y dicho extracto se somete a limpieza mediante cromatografía de permeación en gel, recogiendo la fracción que eluye entre 19 y 39 minutos. Dicha fracción se lleva a sequedad y se redisuelve en 50 µl de acetonitrilo que se analizan mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS, *Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry*). LC-MS/MS, alcanzando límites de cuantificación de 8 ng/l⁹.

En el segundo trabajo se desarrolla un método para la determinación de clordecona también en leche materna. La extracción se realiza a partir de 4 ml de leche con 2 ml de metanol, tras agitar vigorosamente se lleva a cabo una partición con una mezcla de 5 ml éter dietílico:hexano (50:50, v/v), se separan las fases y la fase acuosa se vuelve a extraer con otra alícuota de 5 ml éter dietílico:hexano (50:50,v/v). Los extractos orgánicos se vuelven a extraer con 5 ml de hexano, se llevan a sequedad redisolviendo en 1 ml de hexano que se somete a limpieza mediante cromatografía de permeación en gel, recogiendo la fracción que eluye en los primeros 11 minutos. Dicha fracción se lleva a sequedad y se redisuelve en 1 ml de hexano que se analiza mediante GC-MS/MS, alcanzando límites de cuantificación de 1,25 µg/l para clordecona en leche.

A continuación, se describe con más detalle la SPME, técnica de extracción aplicada en este trabajo.

SPME es una técnica de preparación de muestra, desarrollada por Ardur y Pawliszyn en 1990³², en la cual se utiliza una fibra de sílice fundida, recubierta con una fase estacionaria absorbente encargada de la absorción de los analitos de interés que posteriormente son desorbidos térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases, o bien mediante el uso de disolventes en el inyector de un cromatógrafo de líquidos³³. En general los materiales absorbentes más utilizados son

polidimetilsiloxano (PDMS, *Polydimethylsiloxane*), polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB, *Polydimethylsiloxane-divinylbenzene*), poliacrilato y carbowax. Las fibras se alojan en el interior de las agujas cromatográficas como se observa en la **Figura 2**. Estas deben de ser acondicionadas antes de llevarse a cabo el análisis³⁴. La fibra se expone a la muestra líquida o gaseosa a analizar, normalmente hasta que se establece un equilibrio entre el analito de la muestra y la fibra.

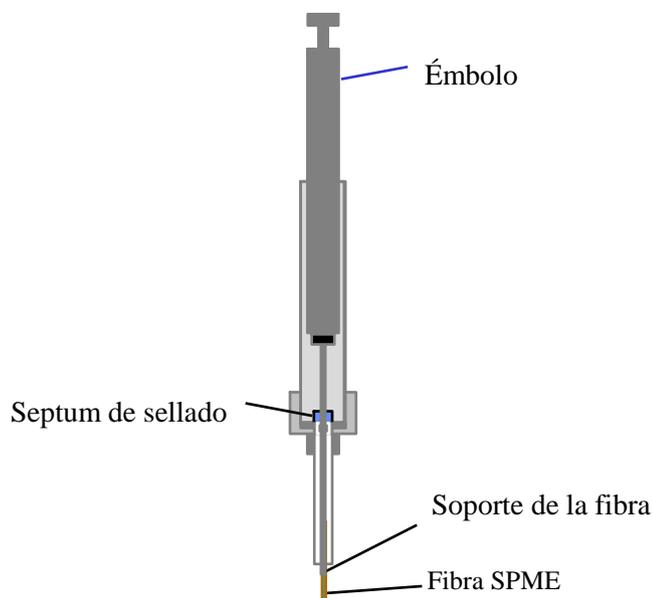


Figura 2. Jeringa de cromatografía de gases conteniendo una fibra de SPME.

Se diferencian dos métodos de trabajo en SPME para el proceso de absorción de los analitos de muestras líquidas (**Figura 3**):³⁵

- Modo de inmersión o inmersión directa (DI, *Direct Immersion*): la muestra líquida se coloca en un vial cerrado, la aguja perfora el septum y se introduce el material absorbente en la muestra (en agitación o reposo) durante un período de tiempo variable (5 - 60 minutos). Pasado ese tiempo se retira el material absorbente de la muestra, se saca la jeringa del vial y se desorben los analitos en el inyector del cromatógrafo.
- Modo de espacio-cabeza (HS, *Head Space*): la fibra de SPME, tras perforar el *septum* del vial se expone al aire del espacio en la zona superior del vial que queda por encima de la muestra, no se sumerge en el líquido. Este modo de trabajo preserva a la fibra de compuestos presentes en la matriz los cuales perjudican al análisis también, permite modificaciones en la matriz como cambios de pH sin que la fibra se vea afectada.

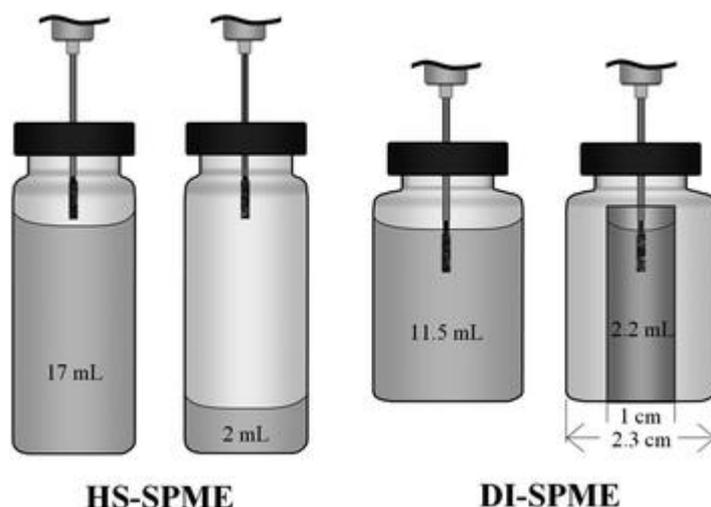


Figura 3. Modos de trabajo en SPME^{35,36}.

El mayor número de aplicaciones de esta técnica se encuentran dentro del ámbito medioambiental, aunque también se han incrementado las aplicaciones clínicas y alimentarias. Otro campo importante de aplicación es en el sector de aromas y fragancias.

En cuanto a la aplicación de la SPME a la extracción de plaguicidas organoclorados en la matriz de leche se procede a comentar la bibliografía encontrada. En el año 2000 Röhrig y Meisch³⁷ optimizan la determinación de 19 compuestos orgánicos clorados, incluyendo 8 plaguicidas, en leche materna utilizando como método de extracción HS-SPME con fibra de poliacrilato y análisis mediante cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD, *Gas Chromatography with Electron Capture Detector*). Para los plaguicidas organoclorados en estudio los límites de cuantificación variaron entre 1,2 -12,9 µg/l. Fernández-Álvarez y col.³⁸ optimizaron la determinación de más de 30 plaguicidas, incluyendo organoclorados y piretroides, en leche mediante GC con detector de micro captura de electrones. Tras evaluar los dos modos de trabajo y diversas fibras, el modo de inmersión directa y la fibra PDMS/DVB proporcionaron los mejores resultados, con valores de límites de cuantificación para los plaguicidas organoclorados entre 3-63 ng/l estimados con el criterio de la relación señal/ruido (S/N , *Signal to Noise Ratio*) ≥ 10 . Finalmente, en 2011 Rodrigues y col³⁹ optimizaron la determinación de un total de 10 plaguicidas organofosforados en leche de vaca mediante HS-SPME y análisis mediante GC-MS. Los mejores resultados se obtuvieron con la fibra de PDMS-DVB con límites de cuantificación entre 6,5-32,9 µg/l.

3.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A MS

La cromatografía de gases (GC, *Gas Chromatography*) es una técnica muy extendida, cuyas primeras aplicaciones, las cuales se remontan a principios de los años 40 del pasado siglo, iban dirigidas al control de las fracciones ligeras de las refinerías de petróleo. Desde entonces su desarrollo no ha parado, siendo una técnica con una gran sensibilidad y una gran polivalencia⁴⁰.

Está basada en la separación de moléculas que presentan diferencias en su estructura química. La cromatografía implica el paso de la muestra con ayuda de una fase móvil a través de la fase estacionaria a fin de separar los analitos. Las moléculas de la muestra interaccionan de forma diferente con la fase estacionaria dando lugar a la separación. Las técnicas cromatográficas pueden dividirse en diferentes categorías según las características de la fase móvil y estacionaria⁴¹.

La GC es la técnica de elección para la separación de las sustancias volátiles y térmicamente estables. Este campo de aplicación involucra un enorme número de sustancias orgánicas y organometálicas, así como gases, lo cual convierte a la técnica en una de las más versátiles y potentes en el laboratorio de análisis. Entre sus principales características se pueden citar que se opera en columna, se trabaja por elución, es capaz de separar mezclas complejas o incluso solutos muy parecidos, es rápida, es necesario el uso de poca muestra proporcionando una información tanto cualitativa como cuantitativa. Las sustancias se separan por distribución entre una fase inmovilizada y una fase móvil. La fase inmovilizada puede ser sólida o líquida. La fase móvil tendrá como papel principal transportar los solutos, en GC dicha fase es un gas inerte, He, N₂ o H₂. Su elección dependerá de la naturaleza de la fase estacionaria y de las características del detector⁴².

La **Figura 4** muestra el esquema de un cromatógrafo de gases, el cual consta básicamente de un inyector conectado con un horno que contiene la columna cromatográfica y finalmente un detector.

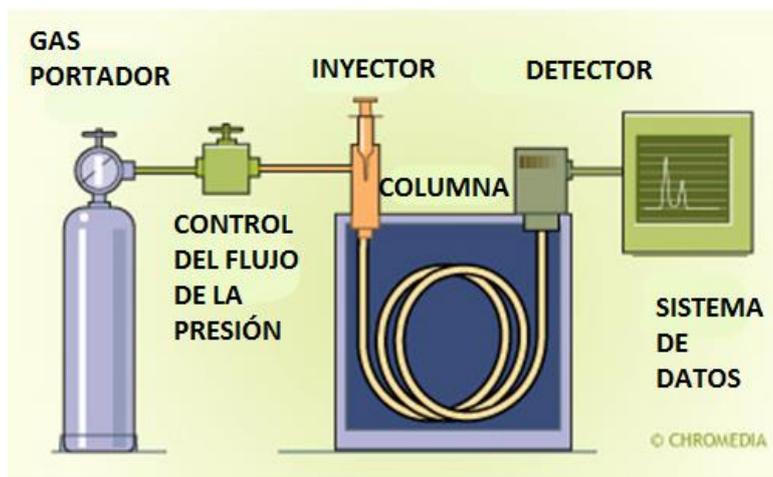


Figura 4. Esquema de un cromatógrafo de gases⁴².

Al cromatógrafo de gases se le pueden acoplar diversos sistemas de detección, entre los cuales uno de los más usados es el de espectrometría de masas (MS). La MS utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo con su relación masa-carga (m/z). De esta manera la MS es una técnica analítica por medio de la cual las sustancias químicas se identifican separando los iones gaseosos en campos eléctricos y magnéticos.

Un espectrómetro de masas consta de varios componentes básicos:⁴³

- Dispositivo de introducción de muestra.
- Cámara de ionización o fuente, donde se generan los iones a partir de las sustancias químicas a analizar.

- Analizador, que diferencia los iones generados en función de su relación m/z .
- Detector que produce una señal eléctrica amplificada para cada uno de los iones generados.

Los analizadores de MS pueden trabajar en dos modos básicos. Por un lado, en el *modo de barrido completo o full scan*, se realizan barridos de los iones generados en la fuente de ionización en un rango m/z seleccionado, obteniéndose espectros de masas completos dentro de dicho rango. Por otro lado, se encuentra el modo de *monitorización de iones seleccionados* (SIM, *Selected Ion Monitoring*) en el cual se puede fijar un voltaje, seleccionando únicamente uno o varios iones determinados del compuesto de interés y filtrando todos los demás. Es un modo de trabajo más selectivo y sensible que el anterior para el análisis de compuestos diana. En cambio, tiene el inconveniente de pérdida de información estructural de los analitos de interés respecto al modo *full scan*⁴⁴.

En función del tipo de analizador es posible repetir el ciclo de ruptura-detección de fragmentos generados, apareciendo lo que se denomina espectrometría de masas en tándem (MS/MS), cuyo objetivo es obtener más información estructural mediante la fragmentación de iones aislados, así como mejorar la selectividad y sensibilidad para el análisis cuantitativo. En estos acoplamientos en tándem también se encuentran diferentes modos de trabajo (**Figura 5**), los cuales se esquematizan a continuación utilizando un analizador de triple cuadrupolo.

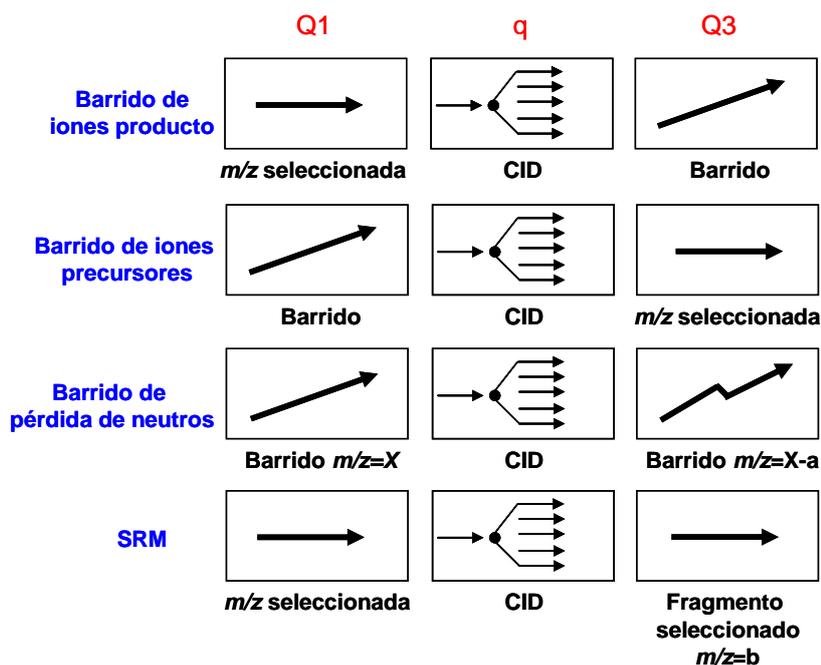


Figura 5. Modos de trabajo MS/MS utilizando un analizador de triple cuadrupolo⁴⁵.

En el modo *barrido de iones producto* se selecciona un ion precursor de una determinada m/z en el primer cuadrupolo (Q1), el cual se fragmenta en el segundo cuadrupolo (q) mediante disociación inducida por colisión (CID, *Collision Induced Dissociation*) y se analizan todos los iones producto generados en el tercer cuadrupolo (Q3). El modo *barrido de iones precursores* implica la selección de un

ion producto y la determinación de los iones precursores que lo generan, se requiere la focalización del Q3 en un ion seleccionado mientras se analizan las masas en el Q1. Todos los iones precursores que producen iones con la masa seleccionada son detectados. El modo *barrido de pérdida de neutros* se basa en la selección de un fragmento neutro y la detección de todas las fragmentaciones que llevan a la pérdida de ese fragmento neutro. El barrido requiere que ambos analizadores de masas escaneen juntos, pero con una diferencia de masas constante entre ellos. De este modo para una diferencia de masa A, cuando el ion de masa M atraviesa Q1 la detección se produce si este ion genera un fragmento de masa M-A cuando abandona la celda de colisión. Finalmente, el modo de trabajo de *monitorización de reacciones seleccionadas* (SRM, *Selected Reaction Monitoring*), análogo al modo SIM mencionado anteriormente, aunque en este caso el ion seleccionado en Q1 solo se detecta si produce un determinado fragmento que es analizado en el Q3⁴⁵.

En este trabajo el analizador utilizado es de triple cuadrupolo (**Figura 6**)⁴⁶, operando en el modo de SRM. En esta modalidad los iones seleccionados por el primer cuadrupolo sólo son detectados si producen una fragmentación específica. Al no hacer un barrido de masas y solo medir una masa durante todo el tiempo permite aumentar la sensibilidad, reducción del ruido químico, minimización del efecto matriz y cuantificación precisa y reproducible⁴⁴.

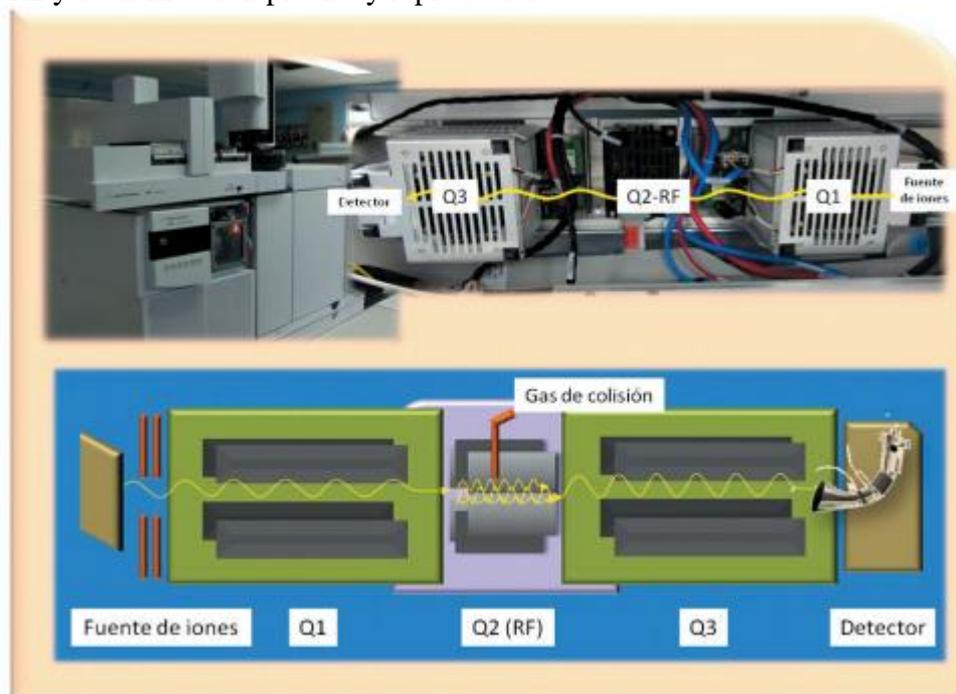


Figura 6. Imágenes de un analizador triple cuadrupolo⁴⁶.

3.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico es un paso fundamental a la hora de su desarrollo, puesto que hay que asegurarse que los resultados obtenidos son correctos. Es necesario minimizar errores, conseguir resultados reproducibles y fiables, así como evitar falsos positivos o falsos negativos. Para poder validar un método es necesario conocer si existen requerimientos normativos, por ejemplo, un MRL establecido y la matriz en la que se va a analizar.

La validación puede realizarse por un solo laboratorio o llevarse a cabo por un grupo de éstos. Se pueden encontrar diferentes organismos internacionales con programas de validación como la Guía SANTÉ²⁹, la Guía de la Red Europea Eurachem⁴⁷ y la Guía ISO 17025⁴⁸ (ISO, *International Organization for Standardization*). Los principales parámetros necesarios para validar un método de análisis se definen a continuación:

Selectividad/Especificidad: El término específico se refiere generalmente a un método que produce una respuesta para un único analito, mientras que la selectividad se refiere a un método que proporciona resultados para un número de analitos, pero con respuestas diferenciadas entre sí.

Precisión: La precisión es el grado de concordancia entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar de forma repetida el mismo método analítico a alícuotas distintas de la misma muestra. Se obtiene evaluando la repetibilidad (precisión intradía), la precisión intermedia (o interdía) y la reproducibilidad, estudios colaborativos entre varios laboratorios.

Veracidad/Recuperaciones: La veracidad puede definirse como la proximidad o grado de concordancia entre el valor que se adopta, ya sea como un valor de referencia convencional, verdadero o aceptado, y el valor encontrado tras aplicar el método. Puede evaluarse estimando el % de recuperación tras el proceso de fortificación de blancos de muestra. La recuperación obtenida dependerá de la matriz de la muestra, el procedimiento de tratamiento de la muestra y la concentración del analito.

Linealidad y curva de calibración: La linealidad en un método analítico está relacionada con el intervalo de concentraciones en el que existe una relación proporcional, bien directamente o a través de transformaciones matemáticas, entre la concentración de analito y la respuesta instrumental. La linealidad puede ser evaluada de forma gráfica o matemática. Se puede evaluar de manera visual, observando la gráfica en la cual se representen las señales en función de la concentración del analito.

Rango: El rango de un método analítico es el intervalo entre el mayor y el menor nivel de concentración que puede ser determinado con precisión, exactitud y linealidad usando el método descrito. Suele ser representado en las mismas unidades que los resultados.

LOD (Límite de detección): Es la concentración más baja de analito en una muestra que puede ser detectada pero no cuantificada. Puede estimarse como la mínima concentración de analito que proporciona una señal con una relación señal/ruido(S/N) ≥ 3 .

LOQ (Límite de cuantificación): El límite de cuantificación es la mínima concentración de analito que produce mediciones cuantitativas en la matriz diana con una precisión y exactitud aceptable. Asimismo, puede estimarse como la mínima concentración de analito que proporciona una señal con una relación (S/N) ≥ 10

Robustez: Es una medida de la capacidad de un método de análisis para que no sea afectado por pequeños cambios en sus parámetros fundamentales, tales como por ejemplo temperatura, tiempo de extracción, flujo y composición de la fase móvil⁴⁹.

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de clordecona en leche mediante GC-MS/MS.

Para alcanzar dicho objetivo se han llevado a cabo los siguientes pasos:

- Optimización de las variables del método instrumental para la determinación de clordecona mediante GC-MS/MS, utilizando un analizador de triple cuadrupolo.
- Optimización del método de extracción basado en la técnica de SPME.
- Validación del método desarrollado mediante el cálculo de diferentes parámetros característicos, como son: linealidad, límites de detección y cuantificación, veracidad y precisión interdía e intradía.
- Aplicación de la metodología desarrollada al análisis de muestras reales.

5. MÉTODOS EXPERIMENTALES

5.1. REACTIVOS Y MATERIAL UTILIZADO

5.1.1 Reactivos

- Patrón analítico de alta pureza (>99%) de clordecona de Sigma-Aldrich (Seelze, Alemania)
- Agua destilada Milli Q (Milipore, Bedford, USA)
- Acetona Chromasolv para HPLC de alta pureza >99.8% de Sigma-Aldrich
- Acetonitrilo Cromasolv para HPLC alta pureza > 99.9% de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania)
- Acetato de etilo Chromasolv de alta pureza >99.7% de Riedel Haën.
- Helio tipo N50 pureza del 99.9999%
- Argón pureza del 99.9999%

5.1.2 Equipos y materiales

- Cromatógrafo de gases Scion GC 320-MS (Bruker Corporation, Fremont, CA, EE. UU) con Software: MS Workstation Versión 7.0 de Bruker Corporation
- Automuestreador Bruker 8400 (Bruker Corporation)
- Jeringa (10 µl) PAL LIQ. SYRINGE Hamilton Products (Bonaduz/Switzerland)
- Columna cromatográfica VF-5 ms (30 m x 0.25 mm, y 0.25 mm) de Agilent Technologies. (Santa Clara, CA, EE. UU)
- Precolumna (1.5 mm x 0.25 mm) Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU)
- Espectrómetro de masas Scion MS/MS (QqQ) (Bruker Corporation) operando en modo de ionización electrónica (EI, -70 eV)
- Fibras de SPME de poliacrilato (PA) de 85 µm de espesor de Supelco.
- Balanza analítica Mettler Toledo (Greifensee, Switzerland)
- Vórtex IKA 4 basic (Staufen, Alemania).
- Pipetas automáticas de 10-100 µl, 100-1000 µl y de 1-5 ml suministradas por Thermo Scientific (Madrid, España)

- Software para el procesado de datos. Bruker Chemical Analysis Workstation 8.0.1 (Bruker Corporation)
- Pesa-sustancias
- Espátula
- Vasos de precipitado
- Matraz aforado de 10 ml categoría A
- Frascos topacio de 60 ml con tapones de rosca
- Viales para cromatografía de 20 ml

5.2. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN

Para la preparación de la disolución patrón se pesaron usando una balanza analítica 13,117 mg de clordecona en un pesa-sustancias y se transfirieron a continuación a un matraz aforado de 25 ml, enjuagando al menos tres veces el pesa-sustancias con pequeñas alícuotas de acetonitrilo, disolvente que también se empleó para enrasar el matraz obteniéndose así una disolución madre de concentración 524,7 mg/l. A continuación, se preparó una disolución de trabajo intermedia de 50 mg/l de dicha sustancia mediante dilución de la disolución madre antes descrita. Para ello, en un matraz aforado de 10 ml, se tomaron 953 μ l de la disolución madre y se enrasó con acetonitrilo. Posteriormente, 200 μ l de la disolución intermedia de 50 mg/l fueron nuevamente diluidos con acetonitrilo hasta 10 ml en un matraz aforado para elaborar una segunda disolución de trabajo de 1 mg/l.

El patrón de clordecona sólido empleado, así como todas las disoluciones descritas fueron conservadas en frascos color topacio, cerrados herméticamente en congelador a una temperatura de -20°C. Todas las disoluciones fueron convenientemente etiquetadas indicando el analista que las realizó, su concentración, disolvente empleado y fecha de preparación. Las disoluciones empleadas durante el experimental de este trabajo fueron siempre atemperadas antes de su utilización.

5.3. CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE LECHE

Las muestras de leche utilizadas para la validación del método y preparación de las rectas de calibrado fueron adquiridas en un comercio de la ciudad de Almería. Un total de 5 muestras de leche entera (4,5% materia grasa), 5 muestras de leche semidesnatada (3% materia grasa) y 5 muestras de leche desnatada (0,4% materia grasa) fueron analizadas durante el estudio. Todas las muestras fueron conservadas mediante refrigeración a 4°C. Las muestras fueron homogenizadas y atemperadas antes de su utilización.

5.4 MÉTODO DE ANÁLISIS POR HS-SPME-GC-MS/MS

Un ml de muestra de leche fue introducido en un vial de cromatografía de vidrio de 20 ml. A continuación, se añadieron 9 ml de agua Milli-Q, se selló el vial y se homogeneizó la mezcla utilizando un vortex durante 1 min. El vial se depositó en el carrusel del automuestreador para su extracción mediante HS-SPME. Para ello, el vial fue preincubado a 40 °C durante 5 min. Posteriormente, la fibra de SPME de 85 μ m de PA fue expuesta al espacio en cabeza del vial durante 30 min a una temperatura de 40 °C. Durante estos procesos de preincubación y extracción, el vial fue agitado durante 4 s a 250 rpm con descansos de 2 s entre agitación. Posteriormente, la fibra fue introducida en el inyector del GC para la desorción de los

componentes de la muestra a 280 °C durante 2 min. Durante este tiempo, la salida de división del inyector permaneció cerrada. Después, la fibra se mantuvo dentro del inyector durante 12 minutos más con la válvula de división abierta y una relación de división de 100:1 para limpiar la fibra y evitar un potencial efecto memoria. La programación térmica del horno cromatográfico comenzó a 70 °C (mantenida durante 2 min) y se incrementó hasta 300 °C a una velocidad de 50 °C/min. Finalmente, se mantuvo esta temperatura durante 7 min. Las condiciones espectrométricas se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones espectrométricas utilizadas en la detección de clordecona.

Ionización Electrónica	-70 eV
Temperatura línea de transferencia	280 °C
Temperatura colector	40 °C
Temperatura fuente de ionización	280 °C
Modo de adquisición	MRM
Tiempo de barrido	100 ms
Ventana de tiempo de retención	± 3 min
Reacción monitorizada 1 (Energía colisión CID)	272>237 (10V)
Reacción monitorizada 2 (Energía colisión CID)	237>143 (30V)
Gas CID	1.5 m Torr de presión
Tiempo apagado inicial MS	8 min

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 DESARROLLO DEL MÉTODO INSTRUMENTAL

6.1.1. Optimización de las condiciones espectrométricas para clordecona

Inicialmente para el desarrollo del método instrumental se procedió a la caracterización espectrométrica del compuesto clordecona. Para ello se analizó una muestra de agua Milli-Q conteniendo 50 mg/kg del compuesto. Como condiciones experimentales iniciales la temperatura del incubador del automuestreador fue de 40 °C, se incubó la muestra durante 10 min y se extrajo durante 20 min. La desorción de la fibra se realizó en el inyector cromatográfico a 250 °C con la válvula de división cerrada durante 1 min. La rampa de separación cromatográfica inicialmente ensayada comenzó a 70 °C (mantenida durante 3,5 min) y se incrementó hasta 300 °C a una velocidad de 50 °C/min. Finalmente se mantuvo esta temperatura durante 7 min. En la **Figura 7** se observa el cromatograma obtenido en las condiciones arriba indicadas, donde puede observarse un único pico cromatográfico a un tiempo de retención de 9,4 min.

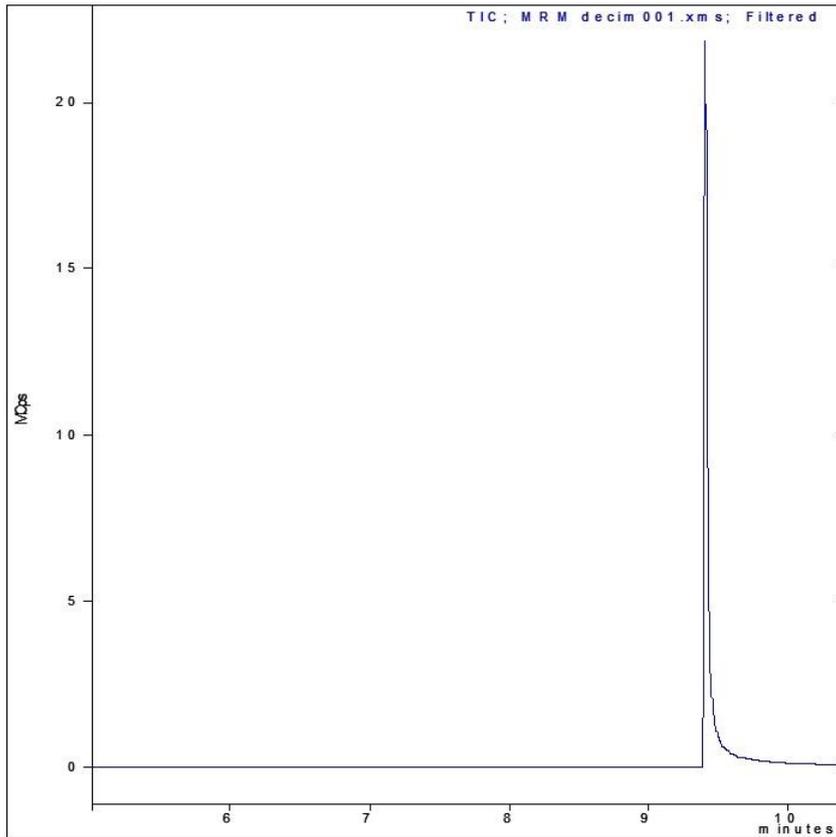


Figura 7. Cromatograma obtenido para la caracterización espectrométrica inicial de clordecona.

En la **Figura 8**, se muestra el espectro de masas obtenido en modo barrido completo durante el experimento de caracterización espectrométrica del compuesto. El rango de masas (m/z) monitorizado fue 90-500.

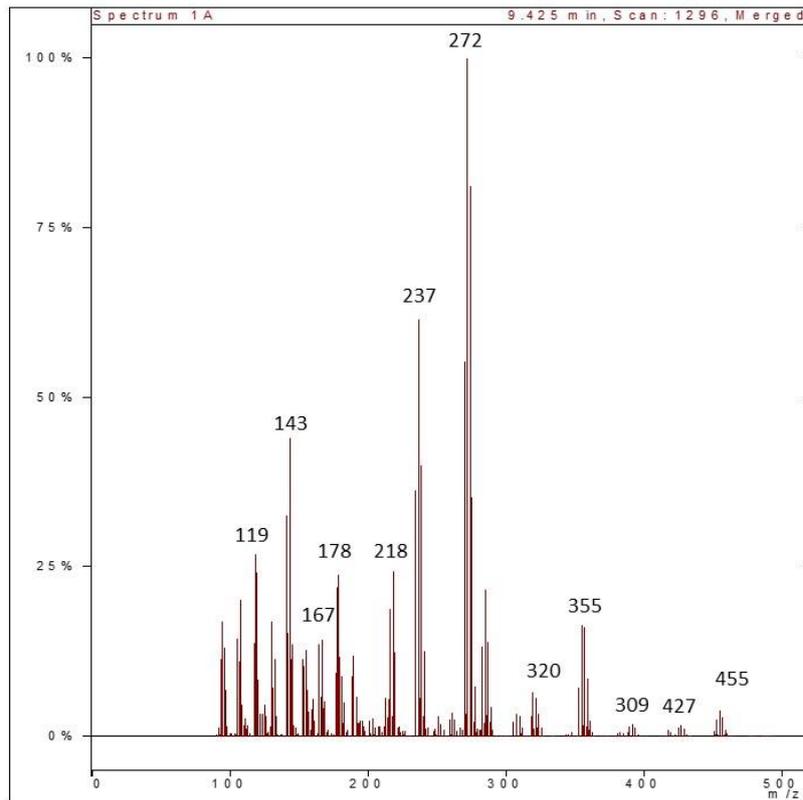


Figura 8. Espectro de masas obtenido en modo *full scan* para clordecona.

El espectro de masas obtenido fue comparado con la biblioteca espectral NIST suministrada con el equipo y fue satisfactoriamente confirmado como clordecona con un ajuste espectral (*match*) de 936 y ajuste espectral inverso (*reverse-match*) de 927, valores escalados a 1000 (espectros idénticos) y un porcentaje de probabilidad del 98,7%. Los valores de ajuste espectral obtenidos se pueden considerar como adecuados para la confirmación del compuesto. En la **Figura 9**, se muestra el espectro de masas almacenado en la biblioteca espectral NIST. Como puede observarse en ambos espectros los iones más abundantes son los de m/z 272, 237 y 143.

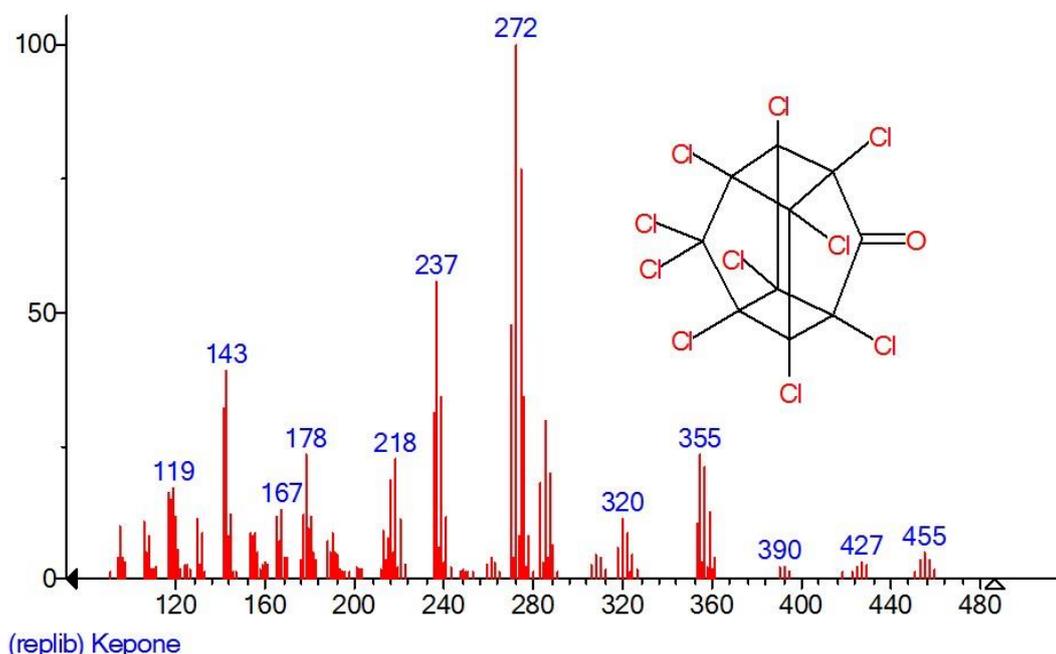


Figura 9. Espectro de masas de clordecona en la biblioteca espectral NIST.

A partir del espectro de masas obtenido para el compuesto objeto de estudio, se procedió a la optimización de las condiciones experimentales para su determinación mediante MS/MS. Para ello se seleccionó inicialmente el ion 272 como ion precursor por ser el más abundante y representativo del compuesto objeto de estudio y se monitorizaron los iones producto obtenidos a partir de él en el rango de 70-280 a los voltajes de excitación CID de 10, 20, 30 y 40 V. El principal ion producto obtenido resultó ser el ion 237 a un voltaje de 10 V de excitación. Dado que no se observaron otros iones producto relevantes por la disociación del ion 272, se seleccionó como segundo ion precursor el ion 237 y se procedió a evaluar su disociación variando el voltaje de excitación CID nuevamente evaluado entre 10 y 40 V. El estudio de los iones producto obtenidos en estas condiciones experimentales revelaron que el principal ion producto que se obtenía era el 143 a 30 V de excitación. Por lo tanto se decidió monitorizar dos transiciones MS/MS: 272>237 (10 V) y 237>143 (30 V) y así poder confirmar el compuesto mediante 3 puntos de identificación²⁹. En la **Figura 10** se muestra el espectro MS/MS obtenido en las condiciones experimentales seleccionadas.

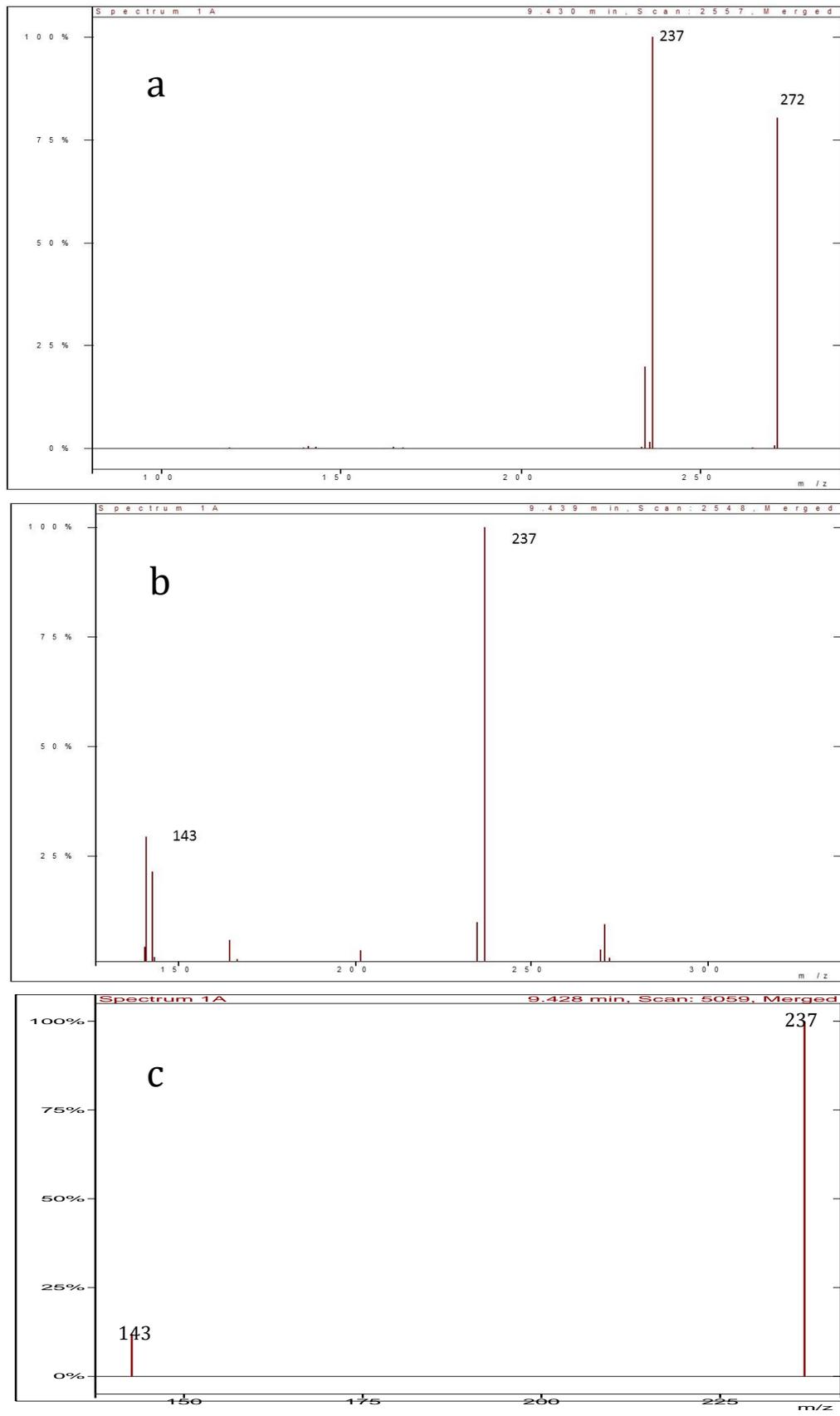


Figura 10. Espectros MS/MS obtenidos para clordecona con el método propuesto: (a) iones producto obtenidos a partir de ion 272 a 10V; (b) iones producto obtenidos a partir del ion 237 a 30V y (c) MRM final obtenido monitorizando las transiciones 272>237 y 237>143.

El ion propuesto más representativo es el de la transición 272>237, correspondiente a la pérdida de un cloro. El ion 237> 143 corresponde a la pérdida de dos carbonos y dos cloros.

A fin de optimizar la sensibilidad del método espectrométrico y definir el número de puntos (espectros MS/MS) con los que se representa un pico cromatográfico, se optimizó el tiempo de barrido de cada ion, algunos fabricantes lo mencionan como tiempo de residencia o *dwell time*. Para ello, una disolución de clordecona en agua Milli-Q a la concentración de 50 mg/kg fue analizada siguiendo las condiciones experimentales antes descritas, pero modificando el tiempo de barrido entre 50 y 300 ms. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Optimización del tiempo de barrido en la adquisición de datos MS/MS.

Tiempo de barrido (ms)	Área	S/N
50	$3.354 \cdot 10^7$	$1.43 \cdot 10^5$
75	$4.267 \cdot 10^7$	$1.424 \cdot 10^5$
100	$4.890 \cdot 10^7$	$2.063 \cdot 10^5$
200	$4.259 \cdot 10^7$	$1.31 \cdot 10^4$
300	$4.173 \cdot 10^7$	$3.16 \cdot 10^4$

Los datos demostraron que la mayor intensidad de pico cromatográfico y relación S/N se observó al utilizar un tiempo de barrido de 100 ms por lo que se seleccionó este valor para el resto de estudios. En la **Figura 11** puede observarse ampliado el pico cromatográfico de clordecona obtenido a 100 ms de barrido y el número de puntos obtenido para representar dicho pico que fue superior a 30. Ese valor se considera adecuado para representar con conveniente resolución el pico cromatográfico.

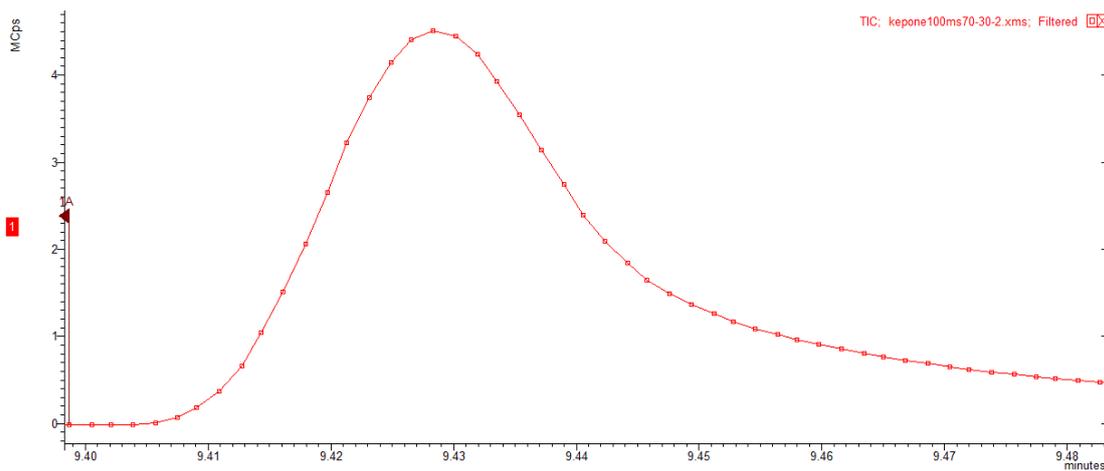


Figura 11. Pico cromatográfico de clordecona obtenido a 100 ms de tiempo de barrido. Se pueden observar los puntos obtenidos para representar el pico cromatográfico.

6.1.2. Optimización condiciones cromatográficas para el análisis de clordecona

La desorción térmica de la clordecona adsorbida en la fibra se produce dentro del inyector cromatográfico. Para la optimización de dicho proceso se estudiaron la temperatura de desorción (temperatura del inyector cromatográfico) y el tiempo de desorción (tiempo que se mantenía cerrada la válvula de división del inyector).

La temperatura del inyector se evaluó entre 200 y 280 °C. Para ello se analizaron muestras de agua Milli-Q conteniendo 50 mg/kg de clordecona en las condiciones espectrométricas antes optimizadas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Optimización de la temperatura del inyector cromatográfico para la desorción de clordecona de la fibra SPME

Temperatura inyector (°C)	Área (Cps)
200	805
220	1905
240	9758
260	9758
280	42628

En la **Figura 12** se pueden observar superpuestos los cromatogramas obtenidos para los citados experimentos:

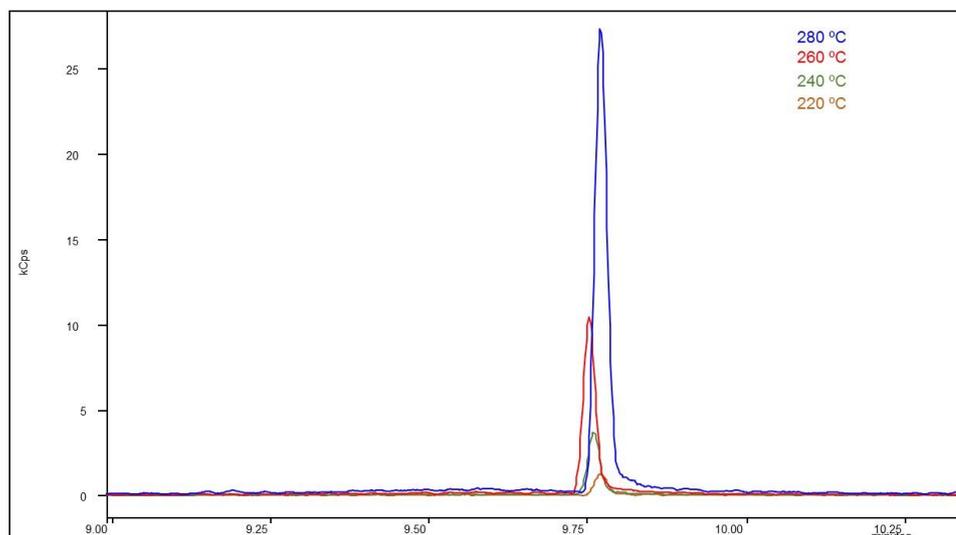


Figura 12. Cromatogramas superpuestos de clordecona durante el estudio de la temperatura de desorción de la fibra SPME en el inyector cromatográfico.

No se ensayaron temperaturas superiores a 280 °C porque ésta era la máxima temperatura recomendada por el fabricante de fibras SPME para la fibra empleada.

Se puede observar en los resultados obtenidos que la mejor desorción de clordecona se produjo a 280 °C, temperatura que fue seleccionada para futuros experimentos.

A continuación, se estudió el tiempo que se mantenía la válvula de división del inyector cerrada a fin de transferir la clordecona desorbida térmicamente en el inyector hasta la columna analítica. Los estudios se realizaron en las mismas condiciones experimentales antes descritas pero modificando el tiempo que se mantenía cerrada la válvula de división. La válvula de división se mantuvo cerrada durante 1, 2, 3, 4 y 5 min. Los resultados experimentalmente obtenidos se recogen en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Estudio del tiempo de cierre de la válvula de división del inyector

T (min)	Área (Cps)
1	2767
2	7020
3	5974
4	4153
5	3574

Durante este tiempo la clordecona fue volatilizada dentro del inyector a alta temperatura (280 °C), la válvula de división del mismo permaneció cerrada y se forzó a que el analito migrase a la cabeza de la columna cromatográfica que se encontraba claramente más fría que el inyector. Dicho transporte del analito es favorecido por flujo de gas portador que empuja al compuesto volatilizado en el inyector hacia la columna cromatográfica y por la diferencia de temperatura entre ambas zonas, inyector y columna, ayudando a que condense el analito en la columna mediante el conocido como efecto trampa fría.

El pico cromatográfico de clordecona más intenso se obtuvo al cerrar la válvula de división del inyector durante 2 min, tiempo que fue seleccionado como óptimo para futuros experimentos.

La rampa de temperaturas programada para el horno cromatográfico fue ajustada convenientemente después de optimizar el tiempo de cierre de la válvula de división. Inicialmente, la temperatura del horno se mantenía a 70 °C en modo isoterma durante 3,5 min, pero se redujo a 2 min para sincronizarlo con el tiempo que permanecía la válvula de división cerrada. Esto disminuyó el tiempo de retención del compuesto en 1,5 min, resultando finalmente en 7,89 min. La rampa de calentamiento del horno se decidió mantener a 50 °C/min para no favorecer el solapamiento cromatográfico de sustancias procedentes de la matriz objeto de estudio. Si bien el modo de adquisición de datos espectrométricos es altamente selectivo (MS/MS), una potencial coelución del analito de interés con un elevado número de componentes, no monitorizados, pero si presentes en el eluato de la matriz objeto de estudio, redundaría negativamente en una peor ionización de las moléculas de clordecona. En la **Figura**

13 puede observarse un cromatograma obtenido para clordecona en las condiciones cromatográficas finalmente optimizadas.

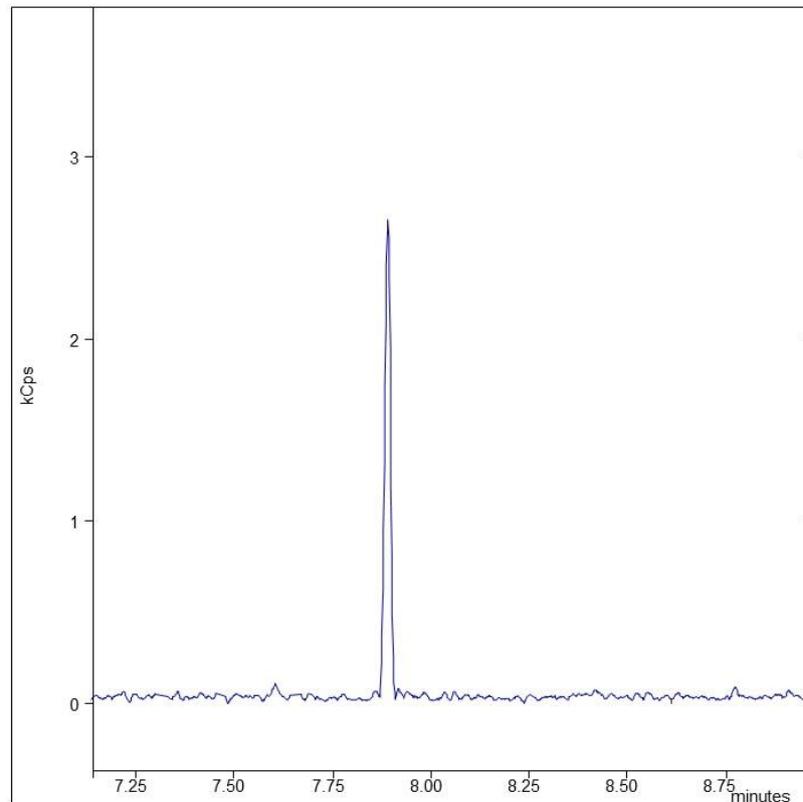


Figura 13. Cromatograma obtenido para clordecona en las condiciones cromatográficas optimizadas

6.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Inicialmente se evaluó la cantidad de muestra a ser utilizada. Para ello se seleccionó un volumen de 10 ml a fin de llenar hasta la mitad el vial cromatográfico y dejar un espacio suficiente para el desarrollo de la extracción del compuesto volatilizado en su modalidad de espacio en cabeza. Se evaluó la extracción de una muestra solamente compuesta por leche (10 ml) y de muestras de leche diluidas en diferentes proporciones con agua Milli-Q. Se ensayaron las siguientes proporciones leche:agua expresadas en v/v y todas ellas con un volumen final de 10 ml: 90:10, 75:25, 50:50, 25:75 y 10:90. La muestra de leche analizada estaba fortificada con un patrón de clordecona para que tuviese una concentración en leche de 50 mg/kg. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 14**.

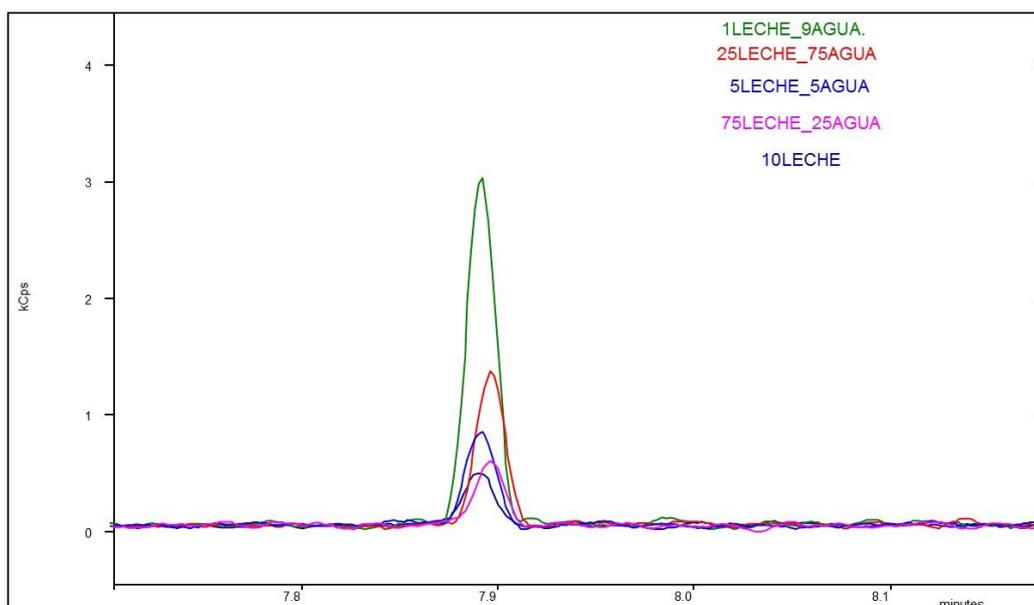


Figura 14. Optimización de la proporción de volúmenes entre leche y agua.

Como puede observarse a pesar de la dilución que representaba para la muestra la adición de agua Milli-Q, se obtuvieron los mejores resultados en términos de sensibilidad cuando 1 ml de leche era diluido con 9 ml de agua Milli-Q. Para posteriores experimentos se seleccionó esta proporción leche: agua.

El tiempo de extracción, es decir el tiempo que se expone la fibra al espacio en cabeza del vial cromatográfico, fue estudiado entre 15 y 75 min. Para ello 1 ml de leche fortificada a una concentración de 50 mg/kg y diluida con 9 ml de agua Milli-Q fueron analizadas. Los resultados experimentales obtenidos se recogen en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Optimización del tiempo de extracción SPME.

T(min)	Área (Cps)
15	35674
30	40825
45	5913
60	4300
75	3857

Los mejores resultados se obtuvieron para un tiempo de extracción de 30 minutos, como se observa en la **Tabla 7** puesto que claramente se obtienen los picos cromatográficos más intensos.

A continuación, se optimizó el tiempo de desorción que es el tiempo que se mantiene la fibra SPME dentro del inyector con la válvula de división cerrada para forzar que pase el analito volatilizado a la columna cromatográfica. En la **Tabla 8** se muestran los resultados experimentalmente obtenidos.

Tabla 8. Estudio del tiempo de desorción de clordecona en el inyector cromatográfico.

T (min)	Área (Cps)
1	2767
2	7020
3	5974
4	4153
5	3574

Como se puede observar en la tabla anterior los mejores resultados se obtuvieron cuando la válvula de división del inyector se cerraba durante 2 minutos.

A continuación, se evaluó la adición de NaCl analizando tres muestras de leche diluida con agua y conteniendo 50 mg/kg de clordecona. A una de las muestras fortificada no se le adicionó sal, a otra 1g/l y a otra 5 g/l. Los resultados se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Estudio de la adición de NaCl a la muestra

NaCl añadido (g/l)	Área (Cps)
0	7211
1	7020
5	7107

Los resultados evidenciaron que no había ninguna mejora significativa por la adición de NaCl por lo que se decidió no añadirla para posteriores experimentos.

También se estudió la posible influencia que podía tener la adición de acetona como modificador a fin de evitar la posible adsorción de compuestos sobre el vidrio del vial. Para ello se ensayaron experimentos de leche diluida con agua y fortificada con 50 mg/kg de clordecona en los que se añadían 0, 250 y 500 μ l de acetona. Los resultados se muestran en la **Figura 15**.

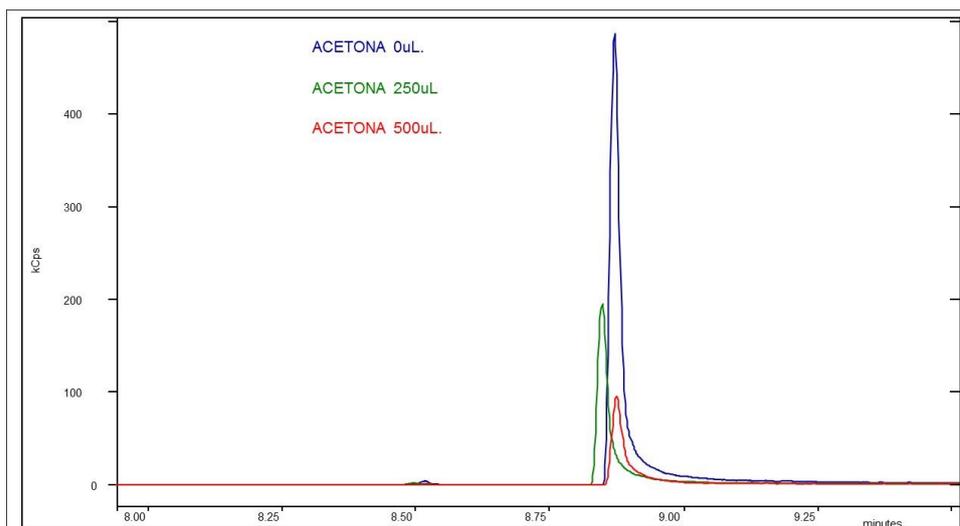


Figura 15. Cromatogramas de clordecona obtenidos al realizar los experimentos variando el volumen de acetona.

Como se observa en la **Figura 15** los mejores resultados obtenidos se obtuvieron sin la adición de acetona. Se puede sospechar que la acetona añadida volatiliza durante el proceso de extracción compitiendo con la clordecona por la fibra de SPME y reduciendo la eficacia de extracción del compuesto de interés.

6.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Una vez optimizada la metodología de análisis se procedió a su validación a fin de obtener las principales figuras de mérito del mismo y conocer estadísticamente su comportamiento y validez. Los parámetros de validación estimados fueron: linealidad, veracidad (expresada como porcentaje de recuperación), precisión intradía, precisión interdía, LOD y LOQ.

Para estudiar la linealidad se fortificaron diferentes alícuotas de una muestra de leche en proporción (1:9) con concentraciones comprendidas entre **10 y 50 µg/kg** y se procedió a su análisis mediante el método propuesto. Para verificar la linealidad del método se representó la señal de los patrones frente a la concentración. Tras aplicar el tratamiento estadístico adecuado y evaluar un ajuste lineal, se comprobó la tendencia de los datos sobre la recta. La **Figura 16** muestra los resultados experimentalmente obtenidos donde se puede observar que el coeficiente de determinación, R^2 , fue superior a 0,99 y la desviación de los puntos de la recta fue inferior a $\pm 10\%$.

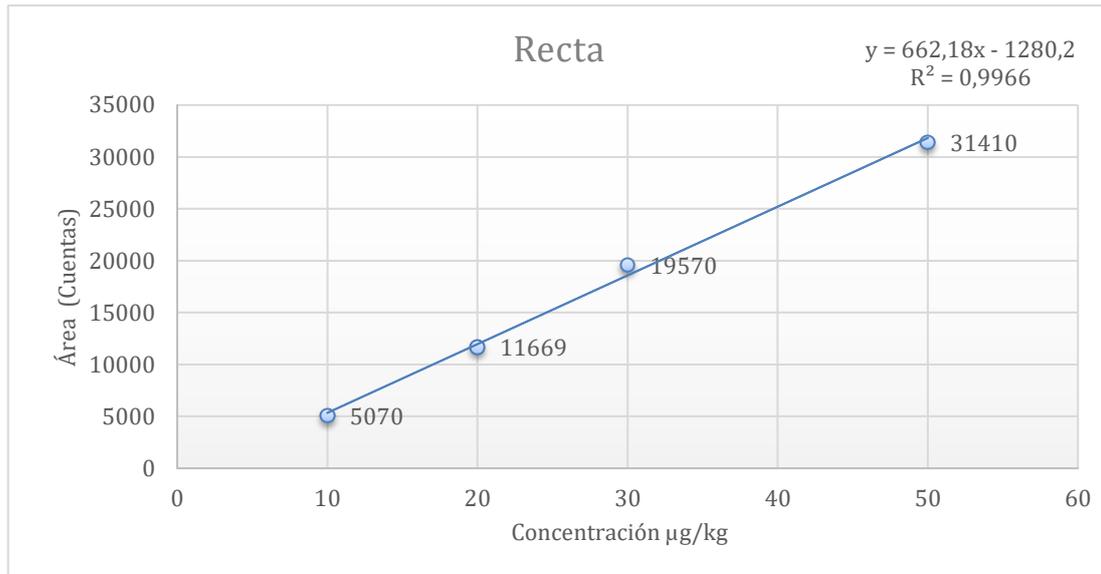


Figura 16. Representación gráfica del ajuste lineal de los patrones de la recta de calibrado.

Este intervalo lineal se consideró también como el rango de trabajo del método, el cual incluye el MRL establecido legalmente por la Unión Europea que es de 20 µg/kg para clordecona en leche. También se realizó un estudio del potencial efecto matriz realizando una recta de calibrado fortificando alícuotas de 10 ml de agua Milli-Q (sin leche) a los mismos niveles de concentración indicados para la recta de calibrado (10, 20, 30 y 50 µg/kg). La recta de calibrado así obtenida obtuvo un R^2 0.99753 y una ecuación de calibración $y = 1037.31 x - 731.4$. Dado que la variación en las pendientes fue superior al 30% con respecto a la calibración en matriz (leche + agua), se considera que el método analítico presenta efecto matriz y se recomienda realizar siempre la calibración mediante el método de calibración en matriz (leche + agua).

Los valores de % de recuperación se estudiaron a tres niveles de concentración diferentes. Para ello se fortificaron muestras de leche ($n=5$), a la máxima concentración permitida por la legislación europea (20 µg/kg), así como una concentración inferior (10 µg/kg) y otra superior (50 µg/kg). Las recuperaciones obtenidas para estos valores respectivamente fueron: 93%, 108% y 110% respectivamente cumpliendo por lo tanto con el criterio establecido por la guía SANTÉ, que indica que las recuperaciones deben encontrarse entre 70-120%.

Asimismo se estimaron los valores de precisión intradía e interdía a los mismos tres niveles de concentración ($n=5$) a los que se ha estimado el % de recuperación. Los resultados obtenidos para la precisión intradía, expresados mediante RSD, no superan el 6% para ningún nivel de concentración por lo que el método presenta una buena repetibilidad. Por otro lado, la precisión interdía, la cual se evaluó mediante los resultados de las recuperaciones de cinco réplicas realizados en 5 días consecutivos, también se presentaron buenos resultados no llegando a superar el 12% de RSD.

Los LOD y LOQ del método propuesto fueron calculados en base a la relación señal/ruido (S/N) del pico cromatográfico obtenido para la clordecona cuando se

analizaron concentraciones conocidas y decrecientes. Se estableció el LOD como aquella concentración que generaba pico cromatográfico con una relación S/N igual o superior que 3 y el LOQ como aquella concentración que generaba un pico cromatográfico con una S/N igual o superior a 10. El LOD se estableció en 0,04 µg/kg y el LOQ resultó ser 0,12 µg/kg, claramente inferiores al MRL establecido legalmente por la Unión Europea para clordecona en leche. El análisis de blancos no reveló en ningún momento la presencia de algún pico cromatográfico al tiempo de retención de clordecona indicando que la especificidad del método propuesto es adecuada.

6.3 APLICACIÓN DEL MÉTODO

Finalmente se propuso la aplicación del método analítico propuesto al análisis de diversas muestras reales adquiridas en un supermercado local. Para ello se analizaron 5 muestras de leche desnatada, 5 muestras de leche semidesnatada y 5 muestras de leche entera. Las muestras fueron analizadas conjuntamente con un blanco (leche previamente analizada que se sabía que no contenía clordecona por encima del LOD del método analítico), una recta de calibrado establecida con patrones comprendidos entre los 10 y 50 µg/kg y una muestra de leche fortificada a la concentración de 20 µg/kg. Ninguna de las muestras seleccionadas para su análisis presentó clordecona por encima del LOD del método propuesto.

El estudio del análisis de blanco demostró la ausencia de contaminación por clordecona ni en los reactivos, ni en el material e instrumento utilizado. La recta de calibrado verificó la linealidad del método en el rango de concentraciones estudiado y el análisis de una muestra fortificada demostró la capacidad del método de extracción al presentar una recuperación del 95%. La **Figura 17** muestra uno de los cromatogramas obtenidos al analizar una muestra real de leche entera.

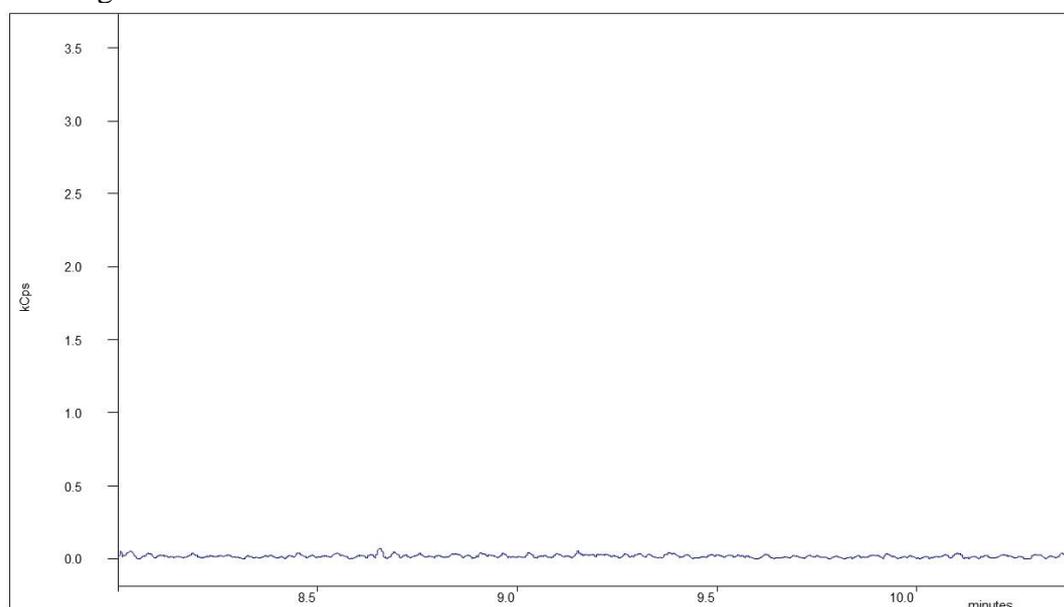


Figura 17 Cromatograma obtenido al analizar una muestra real de leche entera. No contenía clordecona por encima del LOD del método analítico.

Nuevamente, pudo observarse la ausencia de cualquier potencial interferente al tiempo de retención del analito utilizando el método experimental propuesto. Puede por tanto observarse la elevada selectividad del modo de adquisición MS/MS.

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas al finalizar este trabajo fin de grado son las descritas a continuación:

- Se ha desarrollado un método analítico para la determinación de clordecona mediante GC-MS/MS en leche.
- Se ha optimizado un método de extracción que no implica la realización de una fase previa de limpieza o *clean-up* lo que hace que el uso de disolventes/reactivos y el tiempo empleado disminuyan; todo ello hace de éste un método de extracción más económico, rápido y siguiendo las recomendaciones de la “química verde”
- El método de análisis GC-MS/MS ha sido validado para la determinación de clordecona en leche proporcionando unos valores adecuados tanto de veracidad como linealidad, y precisión (interdía e intradía). Los valores obtenidos para los límites de detección y cuantificación son adecuados puesto que son inferiores al MRL establecido para el plaguicida objeto de estudio en leche.
- La simplicidad de la etapa de tratamiento de muestra, incluyendo la correcta sensibilidad proporcionada por el método propuesto, hacen que este proceso pueda ser implementando en otros laboratorios de ensayo los cuales se dedique n al control de residuos de plaguicidas.

8. BIBLIOGRAFÍA Y NOTAS

- (1) FAO –Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Noviembre 2002
- (2) González O.; García A.; “*Introducción al conocimiento y prevención de los contaminantes Orgánicos Persistentes*”. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.Madrid.2012
- (3) Zubero M.; Aurrekoetxea J.; Ibarluzea J.; Goñi F.; López R.; Exteandia A.; Rodríguez C.; Sáenz J. “*Plaguicidas organoclorados en población general adulta de Bizkaia*”GAc Saint.**2010**.24.274-281
- (4) Calva G.; Torres M.; “*Plaguicidas organoclorados*” Lab de ecosistemas Costeros, Departamento de Hidrobiología. D.C.B.S. UAM-I.**1998**.30.35-46.
- (5) “Perfil de riesgos. Éter de Pentabromodifenilo” Informe del Comité de Examen de los Contaminantes Orgánicos Persistentes sobre la labor realizada en su segunda reunión.**2006**.30-31.
- (6) Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Genève, Suisse.**2010**.
- (7) “DECISIÓN DEL CONSEJO por la que se establece la posición que debe adoptarse en nombre de la Unión Europea, en la séptima reunión de la Conferencia de las Partes en el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes respecto a la propuesta de enmiendas al anexo A, B y C. Comisión Europea. Bruselas.**2015**.
- (8) Van den Berg M.; Kypke K.; Kotz A.; Tritscher A.; Yong Lee S.; Magulova K.; Fiedler H.; Malisch R.; “*WHO/UNEP global surveys of PCDDs,PCDFs,PCBs and DDTs in human milk and benefits-evaluation of breastfeeding*”. Archives of Toxicology. **2017**.91.83-96.
- (9) Bichon E, Guiffard I, Vénisseau A, Marchand P, Antignac J, Bizec B.; “*Ultra-trace quantification method for chlordane in human fluids and tissues*”. Journal of Chromatography B. **2015**.1408. 169-177.
- (10) Seurin S.; Rouger F.; Reninger J.; Gillot.; Loynet C.; Cordier S.; Multigner L.; Leblanc J.; Volatier J.; Heraud F. “*Dietary exposure of 18-month-old Guadeloupian toddlers to chlordane*” Regulatory Toxicology and Pharmacology. **2012**.63.471-479.
- (11) Guldner L.; Multigner L.; Heraud F.; Monfort C.; Pierre Thomé J.; Giusti A.; Kadhel P.; Cordier S. “*Exposición de las mujeres embarazadas de Guadalupe a plaguicidas. Cuestionario de frecuencia alimentaria para estimar la concentración sanguínea de la clordecona*”.Environmental Research. **2010**.110.146-151

- (12) Nieto O.; HEnao S.; "Fichas técnicas de plaguicidas a prohibir o restringir incluidos en el acuerdo N°9 de la XVI Reunión del Sector Salud de Centroamérica y República Dominicana". OMS. **2001**.69-70
- (13) Cabidoche Y.M.; Achard R.; Cattan P.; Clermont-Dauphin C.; Massat F.; San-soulet J.; "Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: a simple leaching model accounts for current residue". , *Environmental Pollution*. **2009**.157.1697–1705.
- (14) Levillain J.; Levillain P.; Colin F.; Voltz M.; Cabidoche Y.-M.; "Analysis of environmental and farming factors of soil contamination by a persistent organic pollutant, chlordecone, in a banana production area of French West Indies". *Agriculture, Ecosystems & Environment*. **2012**. 159. 123–132
- (15) Martin-Laurent F.; Sahnoun M.M.; Merlin C.; Vollmer G.; Lubke M.; "Detection and quantification of chlordecone in contaminated soils from the French West Indies by GC–MS using the ¹³C10-chlordecone stable isotope as a tracer". *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*. **2014**. 21. 4928–4933.
- (16) Cimetiere N.; Giraudet S.; Papazoglou M.; Fallou H.; Amrane, P. "Le Cloirec, Analysis of chlordecone by LC/MS–MS in surface and wastewaters," *J. Environ. Chem. Eng*. **2014**.2. 849–856.
- (17) Luellen D.R.; Vadas G.G.; Unger M.A. "Kepone in James River fish": 1976–2002, *Science of the Total Environment*. **2006**. 358. 286–297.
- (18) A.W.H.M. Meus, G.F. Ernst, "Rapid gas chromatographic method for the determination of kepone in the eel". *Journal of Chromatography*. **1979**. 171.486–489.
- (19) Fisher D.J.; Clark J.R.; Roberts M.H. Jr.; Connolly J.P.; Mueller L.H.; "Bioaccumulation of Kepone by spot (*Leiostomus xanthurus*): Importance of dietary accumulation and ingestion rate". *Aquatic Toxicology*. **1986**.9. 161–178.
- (20) Fisher D.J.; Clark J.R.; "Bioaccumulation of Kepone by grass shrimp" (*Palaemonetes pugio*): importance of dietary accumulation and food ration. *Aquatic Toxicology*. **1990**.17. 167–186.
- (21) Hearherington C.; Fisher H.; Sumler M.; Waller C.; Shah P.; Hall S. "Percutaneous absorption and disposition of [¹⁴C] chlordecone in young and adult female rats". *Environmental Research*. **1997**.79.138-155.
- (22) ECHA (European Chemical Agency) <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.005.093> (último acceso septiembre 2017)
- (23) Boucher O.; Simard M.-N.; Muckle G.; Rouget F.; Kadhel P.; Bataille H.; Cha-jès V.; Dallaire R.; Monfort C.; Thomé J.-P.; Multigner L.; Cordier "Exposure to an organochlorine pesticide (chlordecone) and development of 18-month-old infants". *Neurotoxicology*. **2013**. 35. 162–168.
- (24) Dallaire R.; Muckle G.; Rouget F.; Kadhel P.; Bataille H.; Guldner L.; Seurin S.; Chajes V.; Monfort C.; Boucher O.; Thomé J.-P.; Jacobson S.W.; Multigner L.; Cordier S.; "Cognitive, visual, and motor development of 7-month-old Guadeloupean infants exposed to chlordecone". *Environmental Research*. **2012**.118. 79–85.
- (25) Multigner L.; Ndong J.R.; Giusti A.; Romana M.; Delacroix-Maillard H.; Cordier S.; Jegou B.; Thome J.P.; Blanchet P.; "Chlordecone exposure and risk of prostate cancer". *Journal of Clinical Oncology*. **2010**.28. 3457–3462.
- (26) Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Comité de Examen de los Contaminantes Orgánicos Persistentes. Convenio de Estocolmo sobre contaminantes persistentes." Informe del Comité de Examen de los Contaminantes Orgánicos Persistentes sobre la labor realizada en su segunda reunión" Perfil de riesgos de la Clordecona. 21 de noviembre de 2006.
- (27) PPDB: Pesticide Properties DataBase. University of Hertfordshire.
- (28) Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de Febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo Diario Oficial de la Unión Europea. DO N° L 70 de 16.3.2005,9.1.
- (29) Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015. Supersedes SANCO/12571/2013. Implemented by 01/01/2016. EUROPEAN COMMISSION.
- (30) Gomes J, Amaya A, Waliszewski S, Colín A, García M." *Extraction and clean-up methods for organochlorine pesticides determination in milk*". *Chemosphere*. 2013. 92,233-246.
- (31) Moreno Frías M.; Jiménez Torres M.; Garrido Frenich A.; Martínez Vidal J.; Olea-Serrano F.; and Olea N.; "Determination of organochlorine compounds in human biological samples by GC–MS/MS". *Biomedical chromatography*. **2004**.18.102–111.
- (32) Catherine L. Ardur; Pawliszyn, J "Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers" *Analytical Chemistry*. **1990**. 62. 2145-2148.

- (33) Cela R, Lorenzo R, Casais, M. Técnicas de separación en Química Analítica. Ed. Síntesis, **2002**, 8, 295-297.
- (34) Chammui Y.; "Rapid Analysis of some endocrine disruptor chemicals leaching from baby milk feeding bottles using SPME and SDME techniques". *Food Analytical Methods*. **2017**.10.2607-2618.
- (35) Lloyd N.; Dungan S.; Ebeler S."Measuring gas-liquid partition coefficients of aroma compounds by solid phase microextraction, sampling either headspace or liquid" *Analyst*..**2011**.136.3375-3383
- (36) Pawliszyn J "Solid Phase microextraction, theory and practice", Wiley-VCH, New York, **1997**.
- (37) Röhring L.; Meisch H. "Application of solid phase micro extraction for the rapid analysis of chlorinated organics in breast milk". *Fresenius Journal Analytical Chemistry*. **2000**. 366. 106-111.
- (38) Fernández-Alvarez.; Lompart M.; Lamas J.; Lores M.; Garcia C.; Cela R.; Dagnac T. "Development of a solid-phase microextraction gas chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresidue analysis of pesticides in bovine milk". *Analytica Chimica Acta*. **2008**. 617. 37-50.
- (39) Rodrigues F.; Mesquita P.; Oliveira L.; Oliveira F.; Menezes A.; Pereira P.; Andrade J. "Development of a headspace solid-phase microextraction /gas chromatography-mass spectrometry method for determination of organophosphorus pesticide residues in cow milk". *Microchemical Journal*. **2011**. 98. 56-61.
- (40) Rouessac F.; Rouessac A. "Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas". Mc Graw Hill. Madrid, **2003**.
- (41) Kupiec, T. "Quality-control analytical methods: high-performance liquid chromatography". *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. **2004**. 8. 223-227.
- (42) Harold M.; "Introduction to GC". Chromedia Analytical Sciences. Virginia Tech, USA. **2017**
- (43) Romero,R.; Fernández, J L.; Plaza, P.; Garrido, A.; Martínez, J. L. "Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria". *Revista Española de Salud Pública*. **2007**.81.4461-4474
- (44) Picó Y, Blasco C, Font G. "Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview". *Mass Spectrometry Reviews*. **2004**. 23. 45-85.
- (45) Hoffmann E.; Stroobant V.; "Mass Spectrometry. Principles and Applications". 2nd Edition. Jonh Wiley & Sons. England. **2002**.
- (46) Stashenko E.; René Martínez J. "GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿Para qué?". *Scientia Chromatographica*.**2010**.2.24-48
- (47) "V. Barwick (Ed), *Eurachem/CITAC Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry*": An Aid to Accreditation (3rd ed. **2016**). ISBN 978-0-948926-32-7. Available from www.eurachem.org. (último acceso septiembre de 2017)
- (48) ISO/IEC 17025:2005,**2005**, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- (49) <http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx> (último acceso septiembre de 2017)

9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- CE: Comunidad Europea
CID: Collision Induced Dissociation
DDT: Dichloro Diphenyl Trichloroethane
DI: Direct Immersion
FAO: Food and Agriculture Organization
GC: Gas Chromatography
HS: Head Space
ISO: International Organization for Standardization
LLE: Liquid Liquid Extraction
LMR: Límites Máximos de Residuos
LOD: Límite de Detección
LOQ: Límite de cuantificación
MSPD: Matrix Solid-Phase Dispersion

MS: Mass Spectrometry
PDMS: Polydimethylsiloxane
PDMS-DVB: Polydimethylsiloxane-divinylbenzene
POP: Persistent Organic Pollutants
PLE: Pressurized Liquid Extraction
Q1: Primer Cuadrupolo
Q3: Tercer Cuadrupolo
RSD: Relative Standard Deviation
OC: Plaguicidas Organoclorados
SANTÉ: Acronimo del francés Santé Consumers
SIM: Selected Ion Monitoring
S/N: Relación Señal Ruido
SPE: Solid Phase Extraction
SPME: Solid-Phase MicroExtraction
SRM: Selected Reaction Monitoring
QuEChERS: Quick Easy Chap Effective Robust and Safe

