



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y
ANALÍTICA**

TESIS DOCTORAL

**NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS
BASADAS EN ESPECTROMETRÍAS DE
MASAS PARA EL ANÁLISIS MULTI-RESIDUO
DE PLAGUICIDAS Y OTROS
CONTAMINANTES EN VEGETALES CON
ALTO CONTENIDO GRASO
Y EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS DE
ORIGEN VEGETAL**

**PRESENTADA POR:
BIENVENIDA GILBERT LÓPEZ**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. ANTONIO MOLINA DÍAZ
DR. D. JUAN FRANCISCO GARCÍA REYES**

JAÉN, 17 DE DICIEMBRE DE 2010

ISBN 978-84-8439-583-6

Nombre y apellidos del autor:

BIENVENIDA GILBERT LÓPEZ

Título de la Tesis Doctoral:

NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS BASADAS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS
PARA EL ANÁLISIS MULTI-RESIDUO DE PLAGUICIDAS Y OTROS CONTAMINANTES EN
VEGETALES CON ALTO CONTENIDO GRASO Y EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS DE ORIGEN
VEGETAL

I.S.B.N.:

978-84-8439-583-6

Fecha de Lectura:

17 DE DICIEMBRE DE 2010

Centro y Departamento en que fue realizada la lectura:

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
Departamento de Química Física y Analítica

Composición del Tribunal/Dirección de la Tesis:

| | |
|-------------------------|--|
| Dirección de la Tesis | Dr. D. Antonio Molina Díaz Dr. D. Juan Francisco García Reyes |
| Presidente del Tribunal | Dr. D. José Luis Gómez Ariza |
| Vocales | Dr. D. Félix Hernández Hernández Dr. D. Peter Fodor Dra. Dña. Ana María Agüera López |
| Secretario | Dra. Dña. Natividad Ramos Martos |

Calificación Obtenida:

SOBRESALIENTE CUM LAUDE (MENCIÓN DOCTORADO EUROPEO)



UNIVERSIDAD DE JAÉN

tesis doctoral

RESUMEN

Los contaminantes pueden ser transferidos a los alimentos a través del ambiente o durante el procesado. La presencia de estos contaminantes a altos niveles de concentración puede constituir un riesgo para la salud, siendo la identificación y cuantificación de contaminantes en alimentos un tema de gran interés en seguridad alimentaria. Los límites máximos de residuos (MRLs) establecidos por las normativas europeas (ej: Reglamento CE 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo 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) son cada vez más exigentes y hacen necesario el desarrollo de nuevas metodologías analíticas más sensibles, fiables y robustas.

El desarrollo de metodologías para el análisis de plaguicidas en frutas y vegetales mediante la técnica acoplada cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC-MS) ha sido extensamente descrito en la literatura. Por el contrario, el desarrollo de métodos multi-residuo para el análisis de plaguicidas en alimentos procesados elaborados a base de fruta (como potitos de fruta, zumos y refrescos) no ha sido ampliamente abordado. Además, es de particular interés, dada su complejidad, la evaluación de nuevas técnicas de preparación de muestra para el análisis de contaminantes en muestras vegetales con alto contenido graso, como aceite de oliva y aceitunas. Para estas muestras, además de los plaguicidas, existe un grupo de contaminantes volátiles de interés denominado BTEXS (benceno, tolueno, etilbenceno, los isómeros m-, p- y o-xileno, y estireno), que pueden estar presentes en aceite de oliva y aceituna por diversas causas. Sin embargo, no se han descrito métodos de análisis de BTEXS en aceituna.

Debido a la escasa literatura disponible acerca de métodos de análisis mediante LC-MS de residuos de plaguicidas en matrices grasas y alimentos procesados de origen vegetal, el principal objetivo de la presente Tesis fue el desarrollo de metodologías analíticas basadas en la detección mediante espectrometría de masas para el análisis multi-residuo de plaguicidas en estos productos. Se prestó especial atención a matrices grasas como aceitunas y aceite de oliva (producto derivado), y a productos elaborados a base de fruta, como potitos, zumos y refrescos. Los procedimientos desarrollados

cubren diferentes metodologías basadas en la combinación de distintas técnicas de preparación de muestra (como dispersión de la muestra en fase sólida (MSPD), extracción en fase sólida (SPE), extracción líquido-líquido seguida de una extracción en fase sólida dispersiva, y técnica de espacio de cabeza) con cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas de alta resolución mediante un analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS), cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas en tándem mediante un analizador de triple cuadrupolo (LC-MS/MS), o cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS). Los resultados derivados de estos trabajos han sido publicados en revistas científicas del área de Química Analítica de difusión internacional, sumando un total de 8 artículos (1 review y 7 artículos de investigación originales).

ABSTRACT

Several contaminants can be transferred to the food by the ambient or during processing stage. The presence of these contaminants at high concentration levels may pose a risk for human health, being the identification and quantitation of contaminants in food an issue of great interest in food safety. The increasingly stringent maximum residue levels (MRLs) regulations established by the European Union (e.g. Regulation EC 396/2005 of the European Parliament and the Council on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin) are fostering the development of new, more sensitive, reliable and rugged analytical methodologies.

The development of methodologies for pesticide testing in fruits and vegetables based on liquid chromatography-mass spectrometric analysis (LC-MS) has been extensively described in the literature. In contrast, the development of multi-residue methods for the analysis of pesticides in processed fruit-based food (such as baby food, fruit-based soft drinks and juices) has not been addressed in detail. Moreover, it is of particular interest -due to its complexity- the evaluation of new and fast sample preparation techniques for the analysis of contaminants in fatty vegetable samples, such as olives and olive oil. For these samples, besides the pesticides, there are volatile contaminants such as the so-called BTEXS group (benzene, toluene, ethylbenzene, the three o-, m- and p-xylene isomers and styrene) that may be present in both olive oil and olives. However, there are no available methodologies for the determination of BTEXS in olives.

Because of the scarce literature available in this field of LC-MS based pesticide testing in fatty matrices and plant-origin foodstuffs, the main goal of the presented PhD Thesis was the development of analytical methodologies based on mass spectrometric techniques for large-scale pesticide testing in food, paying particular attention to fatty matrices such as olives and olive oil (derivate product), and also to fruit-based products such as baby food, juices and fruit-based soft drinks. The PhD Thesis comprises eight articles (1 review and 7 original research articles) devoted to these topics, covering different methodologies based on the combination of different sample preparation strategies (such as matrix solid-phase dispersion (MSPD), solid-phase extraction (SPE), liquid-liquid partitioning with dispersive solid phase extraction cleanup, and headspace technique) with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry using a time-of-flight analyzer (LC-TOFMS), liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS).



UNIVERSIDAD DE JAÉN

NUEVAS METODOLOGÍAS
ANALÍTICAS BASADAS EN
ESPECTROMETRÍA DE MASAS
PARA LA DETERMINACIÓN
MULTI-RESIDUO DE PLAGUICIDAS
Y OTROS CONTAMINANTES EN
VEGETALES CON ALTO CONTENIDO
GRASO Y EN PRODUCTOS
ALIMENTICIOS DE ORIGEN VEGETAL

BIENVENIDA GILBERT LÓPEZ

tesis doctoral

A mis padres

A AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han colaborado de algún modo en la realización de este trabajo:

A la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía, porque sin la beca predoctoral que he disfrutado mi participación en este proyecto no habría sido posible.

A mis padres y a mi hermano, ejemplo de tesón, honradez y humildad. Me siento orgullosa y afortunada por tener vuestro apoyo incondicional, porque nunca os ha hecho falta “entender” para creer en mí.

A Antonio Molina Díaz, por haber confiado en mí desde el principio y haber puesto a mi disposición todos los recursos necesarios para la realización de esta Tesis. Gracias por tu ayuda en todo momento y por tus lecciones no sólo de Química Analítica, sino también de honradez, humildad, esfuerzo, afán de superación y generosidad.

A Juanfran, porque soy una privilegiada por contar con tu asesoramiento científico y tu amistad. Admiro tu talento, esfuerzo y generosidad, y espero haber aprendido algo... Gracias por los malos ratos vividos en el laboratorio y los buenos, fuera de la Universidad.

A mis compañeros del Departamento de Química Física y Analítica, por los momentos compartidos tanto dentro como fuera del mismo. Gracias a Pilar Ortega, que guió mis pasos cuando me inicié en esto de la investigación; a Juana Escudero, Javi, María, Eulogio y Macarena, que me tendieron la mano cuando llegué al laboratorio. Gracias a Natividad Ramos por introducirme definitivamente en el maravilloso mundo de la Seguridad de los Alimentos. Gracias también a Juan Carlos, Marina, Lucía, Fernando, Rocío, Ague y Josetu por aguantarme con tanta paciencia. Y por supuesto, a Robles, el que más me ha sufrido día a día y me ha ayudado y aconsejado en muchos aspectos... Gracias *Alfredo!!!*

A mis compañeros de la sala de becarios: Lily, Gregorio, Lucía, Ana, Mamen, Jaime y Sergio. Gracias por aguantarme con tan buen humor durante el *sprint* final.

A la fuerza sideral que me hizo compartir las sobremesas allá por mis comienzos con Manu y Manolo, porque el café de máquina mezclado con buena compañía y algunos chistes malos puede ser una experiencia científica tan buena como para aparecer en tres tesis...

A Manu, gracias por todo lo compartido a lo largo de estos años.

A Manolo Montejo y Ana Cañuelo, porque siempre estáis ahí, por abrirme las puertas de vuestra casa y brindarme vuestro apoyo tanto en los buenos como en los malos momentos. Vuestra amistad es de lo mejor que me llevo de estos años. Mil Gracias!

A Rocío y Sara, porque siempre tenéis tiempo para un café, y espero que siga siendo así... Una tesis no me daría para agradeceros vuestra amistad y vuestro apoyo. ¡Gracias por mostrarme siempre vuestra mejor sonrisa!

Al profesor Amadeo Rodríguez Fernández-Alba de la Universidad de Almería y a su equipo de investigación (Ana, M^a José, Mai, Octavio, Milagros, M^a Dolores,...), por la ayuda recibida y por el afecto con el que me habéis tratado durante mis visitas a "vuestra casa".

Thanks to Dr. Franzke and Dr. Hayen for giving me the opportunity of work with them at the Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V, in Dortmund. My stay there was really amazing not only for all I could learn, but also for the great people I could met there: Roth, Cordula, Antje, Dirk, Julia, Marc, Chris, Pauline, Freddy,... and specially to Magnus, Cristina and Helma. Vielen dank für Ihr Hilfsmittel und Friendship!

Por último, quiero agradecer a todos aquellos que aun no han sido mencionados y también han compartido conmigo parte de este camino, dejando una huella imborrable al lado de la mía (especialmente mi familia, Manolo Raya, Yolanda, Josefina y Vanessa), porque no todo es investigar, porque la investigación, ante todo, la realizan personas, y porque las personas somos la suma de todo lo que nos rodea...

Bienve

*“La inspiración existe,
pero tiene que encontrarte trabajando”*

Pablo Picasso

ÍNDICE



I. OBJETIVOS / AIMS OF THE THESIS 12 /14**II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**

| | |
|--|----|
| II.1. Residuos tóxicos en alimentos | 16 |
| II.2. Residuos de plaguicidas en alimentos | 18 |
| II.2.1. Clasificación de los plaguicidas | 18 |
| II.2.2. Uso de plaguicidas en agricultura | 21 |
| II.2.3. Riesgos de la presencia de plaguicidas en alimentos..... | 22 |
| II.3. Residuos de hidrocarburos aromáticos monocíclicos (MAHs) en alimentos de origen vegetal. BTEXS..... | 24 |
| II.4. Normativas sobre residuos de plaguicidas y otros contaminantes químicos en alimentos de origen vegetal | 25 |
| II.4.1. Legislación europea | 25 |
| II.4.2. Legislación española | 31 |
| II.5. Análisis de residuos de plaguicidas e hidrocarburos aromáticos en frutas, vegetales y alimentos derivados. Aspectos generales | 31 |
| II.6. Preparación de muestras para el análisis de residuos de plaguicidas e hidrocarburos aromáticos | 32 |
| II.6.1. Técnicas de preparación de muestra | 33 |
| II.6.2. Antecedentes | 44 |
| II.7. Determinación de hidrocarburos aromáticos y residuos de plaguicidas en frutas, vegetales y alimentos derivados mediante técnicas cromatográficas | 47 |

| | |
|---|----|
| II.7.1. Cromatografía de gases | 47 |
| II.7.2. Cromatografía de líquidos | 49 |
| II.7.3. La espectrometría de masas como detector para cromatografía | 52 |
| II.7.4. Antecedentes | 79 |

III. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

| | |
|--|----|
| III.1. Analitos | 84 |
| III.2. Preparación de la muestra | 84 |
| III.3. Análisis cromatográfico | 88 |

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV.1. DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE FUNGICIDAS EN ALIMENTOS INFANTILES ELABORADOS A PARTIR DE FRUTA Y VERDURA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO (LC-TOFMS).

| | |
|--------------------------------------|-----|
| IV.1.1. Resumen | 95 |
| IV.1.2. Experimental | 96 |
| IV.1.3. Resultados y discusión | 99 |
| IV.1.4. Conclusiones | 113 |

IV.2. DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE FUNGICIDAS EN ZUMOS DE FRUTAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO (LC-TOFMS).

| | |
|--------------------------------------|-----|
| IV.2.1. Resumen | 115 |
| IV.2.2. Experimental | 115 |
| IV.2.3. Resultados y discusión | 118 |
| IV.2.4. Conclusiones | 129 |

IV.3. DETECCIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN REFRESCOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO (LC-TOFMS). ESTUDIO DE MUESTRAS DE DISTINTOS PAÍSES.

| | |
|---|-----|
| IV.3.1. Resumen | 131 |
| IV.3.2. Experimental | 132 |
| IV.3.3. Resultados y discusión | 134 |
| IV.3.4. Conclusiones | 149 |
| IV.3.5. Información suplementaria | 150 |

IV.4. DESARROLLO DE UN MÉTODO MULTI-RESIDUO RÁPIDO PARA EL ANÁLISIS DE PESTICIDAS REFRESCOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO (LC-TOFMS).

| | |
|--------------------------------------|-----|
| IV.4.1. Resumen | 158 |
| IV.4.2. Experimental | 158 |
| IV.4.3. Resultados y discusión | 161 |
| IV.4.4. Conclusiones | 179 |

IV.5. DESARROLLO DE UN MÉTODO MULTI-RESIDUO PARA EL ANÁLISIS DE PESTICIDAS EN ACEITE DE OLIVA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO (LC-TOFMS).

| | |
|--------------------------------------|-----|
| IV.5.1. Resumen | 181 |
| IV.5.2. Experimental | 182 |
| IV.5.3. Resultados y discusión | 188 |
| IV.5.4. Conclusiones | 205 |

IV.6. DESARROLLO DE UN MÉTODO MULTI-RESIDUO PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ACEITUNA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS). VENTAJAS DEL MRM NO SEGMENTADO.

| | |
|--------------------------------------|-----|
| IV.6.1. Resumen | 207 |
| IV.6.2. Experimental | 208 |
| IV.6.3. Resultados y discusión | 212 |
| IV.6.4. Conclusiones | 231 |

IV.7. DESARROLLO DE UN MÉTODO MULTI-RESIDUO AUTOMÁTICO PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES AROMÁTICOS MONOCÍCLICOS (BTEXS) EN ACEITE DE OLIVA Y ACEITUNA MEDIANTE LA TÉCNICA DE ESPACIO DE CABEZA COMBINADA CON CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS (HS-GC-MS).

| | |
|--------------------------------------|-----|
| IV.7.1. Resumen | 234 |
| IV.7.2. Experimental | 234 |
| IV.7.3. Resultados y discusión | 237 |
| IV.7.4. Conclusiones | 249 |

V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS 251 / 255

VI. BIBLIOGRAFÍA 258

VII. CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS 284

ÍNDICE DE TABLAS 290

ÍNDICE DE FIGURAS 294

ACRÓNIMOS 299

I. OBJETIVOS



Los principales objetivos de esta tesis son los siguientes:

- 1) Evaluar y mejorar los métodos de extracción actuales para el análisis multi-residuo de contaminantes orgánicos en alimentos de origen vegetal, prestando especial atención a aquellos con un alto contenido graso, como aceite de oliva y aceituna. El objetivo es obtener extractos limpios que contengan los compuestos de interés mediante la utilización de metodologías prácticas y respetuosas con el medio ambiente, lo que involucra el desarrollo de métodos rápidos, sencillos y con un menor consumo de disolventes orgánicos.
- 2) Desarrollar nuevos métodos multi-residuo para el análisis de contaminantes en alimentos elaborados a base de frutas o vegetales, que han sido poco estudiados hasta el momento. En este sentido, se pretende desarrollar métodos combinando el uso de protocolos de extracción simples y detección mediante las técnicas LC-MS y GC-MS para el análisis de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos en zumos de frutas, alimentos infantiles, refrescos, aceite de oliva y, en un caso, en aceituna.
- 3) Emplear técnicas de detección avanzadas basadas en el acoplamiento cromatografía/espectrometría de masas con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo, con el propósito de alcanzar los requerimientos de sensibilidad y reproducibilidad que marcan las normativas europeas vigentes en el campo de análisis de contaminantes en alimentos. Además, se evaluará el uso de columnas cromatográficas de resolución mejorada y tamaño de partícula reducido, para acortar el tiempo de análisis y aumentar el número de plaguicidas que se pueden determinar en un único análisis.

I. AIM OF THE THESIS



The main goals of this PhD. Thesis are as follows:

- 1) To evaluate and improve the current extraction procedures for the multi-residue analysis of organic contaminants in fruit and vegetable-based foodstuffs, paying special attention to those matrices with high fat content such as olive oil and olives. The challenge is to obtain clean extracts containing the target compounds by the application of practical and environmentally-friendly procedures, comprising minor solvent consumption and simplicity as main features of the methods.
- 2) To develop new multi-residue methods for derivative vegetable and fruit products, scarcely investigated in terms of content of contaminants. In this sense, different LC-MS and GC-MS methods will be developed to test the presence of pesticides and other contaminants in fruit juices, baby food, soft drinks, olive oil and olives, using simplified extraction procedures.
- 3) To evaluate the combined use of advanced hyphenated chromatographic techniques with mass spectrometers equipped with either triple quadrupole or time-of-flight analyzers for pesticide testing in foodstuffs, in order to develop analytical methodologies in compliance with the European regulations requirements in terms of sensitivity and reproducibility. For this purpose, the use of short LC columns with small particle size will be tested to achieve shorter analysis time for the multi-residue analysis of a large number of pesticides.

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES



II.1. RESIDUOS TÓXICOS EN ALIMENTOS.

Los alimentos pueden contener componentes tóxicos, definidos como agentes químicos que ingresados en el organismo alteran componentes bioquímicos fundamentales para la vida. Estos tóxicos pueden estar presentes en el organismo en una dosis alta (concentración perjudicial para el ser humano), o pueden estar en una dosis baja y acumularse en el organismo, ocasionando daños para la salud a medio o largo plazo. Estos tóxicos pueden tener diversa procedencia:

- *Constituyentes naturales de los alimentos.* Ejemplos: aminas, inhibidores de enzimas, sustancias anticolinesterasas, cianógenos, antivitaminas, agentes quelantes como el ácido oxálico, estimulantes como el alcohol etílico, la cafeína, etc.
- *Aditivos alimentarios.* Los aditivos alimentarios llevan un código compuesto de una letra seguida de tres cifras. La primera cifra (centenas) hace referencia a la inclusión en grupos establecidos: 1- Colorantes, 2- Conservantes, 3- Antioxidantes y 4- Estabilizantes.
- *Sustancias derivadas.* Aparecen como consecuencia de reacciones de degradación de los alimentos. Ejemplos: peróxidos y radicales libres procedentes de la oxidación de lípidos, micotoxinas originadas por procesos metabólicos de mohos.
- *Contaminantes químicos.* Llegan al alimento durante las fases de producción, procesado, distribución y manipulación. Pueden ser: residuos de plaguicidas, compuestos derivados de procesos de calentamiento como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), contaminantes accidentales o ambientales, residuos de medicamentos veterinarios, etc.

Debido al riesgo que suponen para la salud del consumidor, es necesario controlar la presencia de estos agentes tóxicos en los alimentos. Por ello, desde el año 2000, las exigentes normas de la Unión Europea (UE) se han hecho aún más estrictas para garantizar que los alimentos de los ciudadanos europeos sean lo más seguros posible. Así, en el libro blanco sobre seguridad alimentaria [1] se indica que una de las prioridades de la Comisión de las Comunidades Europeas es velar por los más elevados niveles de seguridad alimentaria en la UE. El planteamiento de la seguridad alimentaria es ahora más integrado: se sigue cuidadosamente la pista de los alimentos y los piensos a través de toda la cadena

alimentaria, desde la misma explotación hasta la mesa del consumidor (trazabilidad). Las autoridades de la UE evalúan meticulosamente el riesgo y consultan a los mejores expertos científicos antes de prohibir o permitir la inclusión de cualquier producto, ingrediente, aditivo u organismo genéticamente modificado, en cualquier pienso o alimento, venga de dentro o de fuera de la UE.

Para llevar a cabo un control efectivo sobre la presencia de residuos de contaminantes en los alimentos, se establecen límites máximos de residuos tolerados (MRLs) de acuerdo con el procedimiento del Comité permanente de la Cadena Alimentaria y Sanidad Animal y previa consulta a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ("European Food Safety Authority", EFSA) [2]. Pese a todo este esfuerzo, en los últimos años, la confianza de los consumidores en la seguridad de los productos alimenticios se ha visto a veces alterada por las crisis sanitarias relacionadas con los alimentos. Se demandan cada vez más alimentos poco elaborados y con ingredientes "naturales", pero que a su vez cumplan con los más exigentes controles sanitarios.

Para hacer frente a este problema, así como para ir por delante de los infractores, entre otros aspectos hay que desarrollar nuevas técnicas y metodologías analíticas avanzadas para la detección de sustancias químicas y métodos de producción de alimentos prohibidos o no conformes con las buenas prácticas. Aunque en los últimos años, se han producido grandes avances en los métodos de control de contaminantes en alimentos, los casos recientes de uso de sustancias químicas prohibidas (melamina en leche en polvo, insecticidas no autorizados en pimientos, etc. [3-5]) evidencian las limitaciones que presentan las metodologías que se usan actualmente en la mayoría de laboratorios acreditados de control de residuos. Por tanto, es muy importante que se investigue en el desarrollo y mejora de los métodos actuales de control de sustancias químicas en alimentos así como la incorporación de nuevas técnicas de detección que proporcionen mayor información de alta calidad de forma rápida y efectiva.

II.2. RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL.

II.2.1. Clasificación de los plaguicidas.

Se pueden realizar distintas clasificaciones de los plaguicidas, atendiendo a diversos criterios:

a) *Según su acción específica.* A continuación se muestra una clasificación muy general según este criterio, y dentro de cada una de estas categorías se incluirán algunas clases de plaguicidas según su *composición química* [6]:

■ Para el control de invertebrados:

- Insecticidas:

- *Químicos orgánicos:* organoclorados, organofosforados, carbamatos, formimidias, tiocianatos, dinitrofenoles, organoestannicos, piretroides sintéticos.
- *Químicos inorgánicos:* derivados de azufre, mercurio, boro, talio, arsénico, antimonio, selenio y fluoruro.
- *Botánicos:* Nicotina, Rotenona, Sabadilla, Ryania, Pyretrum.
- *Fumigantes:* Derivados de moléculas orgánicas que son gases aproximadamente a 5°C y ácido cianhídrico.
- *Microorganismos:* Bacillus thuringiensis, Heliothis (virus), Hirsutella thompsonii (hongo), Nosema locustae (protozoo).
- *Reguladores del crecimiento:* Ecdysone (hormona de la muda), JH (hormona juvenil).
- *Repelentes de insectos:* Dietil toluamida, entre otros.

- Molusquicidas:

- Carbamatos, organoclorados, metacetaldehído, derivado de la nitrosalicilanilida.

- Nematicidas:

- Hidrocarburos halogenados, organofosforados, isotiocianatos, carbamatos.

■ Para el control de vertebrados:

- Rodenticidas:

- *Anticoagulantes:* cumarinas, indadionas.
- *Botánicos:* bulbo de Escila (cardiotóxico), estriquina.
- *Químicos orgánicos:* organoclorados, organofosforados.

- *Inorgánicos*: fósforo amarillo y fosforo de cinc.
 - *Miscelánea*: fluoroacetato sódico y fluoroacetamida, derivados de la urea.
- *Avicidas*:
- *Repelente*: 4-aminopiridina, metiocarb, glucocloralosa (soporífero).
 - *Para tratamiento de posaderos*: endrín (organoclorado), fentiión (organofosforado).
 - *Cebos*: estricnina, 3-cloro-p-toluidina.
 - *Quimioesterilizantes*: 20,25-diazacolesterol.
- *Piscicidas*:
- *Organoclorados*: endrin, toxafeno, endosulfán.
 - *Antibióticos*: antimicina
 - *Lampricidas*: clonitralid, TFN.
- *Repelentes*:
- *De aves*: olfatorios (naftaleno); táctil (mezclas de aceites de ricino, petrolato, polibutano, resinas, difenilamina, pentaclorofenol, quinona, óxido de cinc, disolventes aromáticos); gestatorios (captan, antraquinona, glucocloralosa, turpentina, metiocarb).
 - *De perros*: naftaleno, paradiclorobenceno, aceites esenciales.
 - *De ciervos*: tiram y ziram (fungicidas).
 - *De conejos*: naftaleno, nicotina, tiram, ziram.
 - *De roedores*: tributil estaño, naftaleno, paradiclorobenceno, polibutanos, polietilenos, tiram, tert-butil dimetiltritioperoxycarbamato.
- **Para el control de plantas:**
- *Herbicidas*:
- *Inorgánicos*: sulfato de cobre, derivados de arsénico, sales amónicas, boratos, clorato sódico, ácido sulfúrico.
 - *Orgánicos*: derivados del petróleo (gasolina, queroseno,...), arsenicales orgánicos, fenoxiderivados (MCPA, 2,4,5-T, metil diclofop, 2,4,-D), amidas sustituidas (aldiclor, difenamid, propanil, napropamida), nitroanilinas (trifluralin, benefin, nitralin, isopropalin,...), ureas sustituidas (monuron, diuron,...), carbamatos (profam, barban,...), tiocarbamatos (EPTC, pebulato,...), heterociclos nitrogenados (atrazina, simazina,...), ácidos alifáticos (ácido tricloroacético, dalapón,...), derivados del ácido

benzoico (dicamba, fenac,...), derivados fenólicos (dinitrofenoles), nitrilos sustituidos (diclobenil, bromoxynil,...), derivados de amonio cuaternario (paraquat, diquat).

- *Micoherbicidas: Phytophthora palmivora.*

- Reguladores del crecimiento de las plantas:

- Auxinas, giberelinas, citoquininas, generadores de etileno, retardantes sintéticos del crecimiento (clormequat, mepiquat).

- Defoliantes:

- Sales inorgánicas (clorato sódico, clorato magnésico,...), ácidos alifáticos (ácido neodecanoico), paraquat, organofosforados (merphos,...).

- Desecantes:

- Nitrato amónico, disolventes del petróleo, borato sódico, clorato sódico, ácido arsénico, derivados fenólicos, derivados de amonio cuaternario (paraquat, diquat).

■ Para el control de microorganismos:

- Fungicidas y bactericidas:

- *Inorgánicos:* sulfuros, sales de cobre, sales de mercurio.
- *Orgánicos:* ditiocarbamatos (tirad, maneb,...), tiazoles (etazol,...), triazinas (anilazina), aromáticos sustituidos (hexaclorobenceno, pentaclorodinitro-benceno,...), dicarboximidias (captan,...), fungicidas sistémicos (oxathiinas, benzimidazoles, pirimidinas, organofosforados, acilalaninas, triazoles, piperazinas, imidas), dinitrofenoles (dinocap), quinonas (cloranil,...), organoestannicos (hidróxido de trifenilestaño), compuestos alifáticos nitrogenados (dodine,...), fumigantes (cloropicrina, bromuro de metilo, isocianato de metilo,...), antibióticos (estreptomina, cicloheximida,...),...

- Alguicidas:

- *Inorgánicos:* hipoclorito sódico, hipoclorito cálcico, clorito sódico, derivado de cobre.
- *Orgánicos:* derivados orgánicos de cobre (cobre-trietanolamina), derivados de amonio cuaternario (cloruro de alquildimetilbenzilamonio).

- Desinfectantes.

b) Según su toxicidad aguda (24 a 96h), los plaguicidas se pueden clasificar en [7]:

Tabla II.1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad aguda.

| | Vía de entrada al organismo | Sólidos | Líquidos | Gaseosos Fumigantes Aerosoles |
|--------------------|-----------------------------|--|--|--|
| | | DL ₅₀ (mg/kg peso corporal) | DL ₅₀ (mg/kg peso corporal) | Polvo de Ø 50 µm CL ₅₀ (mg/L de aire) |
| Muy tóxicos | Vía oral | DL ₅₀ ≤ 5 | DL ₅₀ ≤ 25 | |
| | Vía respiratoria | | | CL ₅₀ ≤ 0,5 mg/L (4h) |
| | Vía dérmica | DL ₅₀ ≤ 10 | DL ₅₀ ≤ 50 | |
| Tóxicos | Vía oral | 5 < DL ₅₀ ≤ 50 | 25 < DL ₅₀ ≤ 200 | |
| | Vía respiratoria | | | 0,5 < CL ₅₀ ≤ 2 mg/L (4h) |
| | Vía dérmica | 10 < DL ₅₀ ≤ 100 | 50 < DL ₅₀ ≤ 400 | |
| Nocivos | Vía oral | 50 < DL ₅₀ ≤ 500 | 200 < DL ₅₀ ≤ 2000 | |
| | Vía respiratoria | | | 2 < CL ₅₀ ≤ 20 mg/L (4h) |
| | Vía dérmica | 100 < DL ₅₀ ≤ 1000 | 400 < DL ₅₀ ≤ 4000 | |

donde: DL₅₀ es la dosis letal media (muere el 50% de la población de prueba) por vía oral o dérmica para la rata.

CL₅₀ es la concentración letal media (muere el 50% de la población de prueba) por vía respiratoria para la rata.

II.2.2. Uso de plaguicidas en agricultura.

El incremento constante de la población mundial requiere de una producción muy elevada de alimentos, por lo que la protección de cultivos contra el ataque de parásitos y de otros agentes biológicos es más que necesaria. El empleo de plaguicidas en la agricultura es imprescindible para mejorar su potencial económico, permitiendo la protección de los cultivos frente a plagas y enfermedades, aumentando el periodo de desarrollo de las plantas, incrementando el periodo de almacenamiento post-cosecha y reduciendo los costes de producción de los alimentos [8]. Entre sus múltiples campos de aplicación podemos citar su uso sistemático tanto a nivel agrícola como industrial, doméstico, en jardinería o en veterinaria [9].

El control en el uso de los productos fertilizantes y de los productos fitosanitarios, utilizados para el aumento del rendimiento en las producciones y el control de plagas y enfermedades, es de gran importancia por el riesgo de contaminación que conllevan o, más bien, que supone

el abuso de los mismos. Además de la acumulación de estos compuestos persistentes en el medioambiente (aire, agua o suelo), los plaguicidas entran en la cadena alimentaria de animales, llegando en último término a alcanzar la cadena alimenticia humana, donde se acumulan en algunos órganos vitales y provocan el desarrollo de intoxicaciones de distinta gravedad. Así, por ejemplo, se han descrito efectos adversos para la salud de tipo neurológico, reproductivo, inmunológico y cancerígeno [10].

La distribución y uso de plaguicidas en la agricultura es una actividad de gran importancia económica, que en el año 2007 (últimos datos disponibles) supuso un consumo de 33.390 millones de dólares a nivel mundial, siendo los herbicidas los productos más demandados [11]. El consumo en Europa se situó en 7.080 millones de euros para ese mismo año. En España (segundo país de la UE por superficie cultivada, y cuarto por su aportación final agrícola de la Unión), desde mediados de los años noventa el uso de plaguicidas ha experimentado un incremento que rompe el fuerte descenso iniciado a finales de la década de los ochenta. Aunque en un principio la aplicación de las reformas de la Política Agraria Común (PAC) de 1992 contribuyó parcialmente a la reducción de su consumo, los procesos de intensificación agraria y, sobre todo, el aumento de su especificidad y eficacia, están agravando el problema de la contaminación medioambiental al aumentar el consumo de plaguicidas y su toxicidad. Desde 1995, aumenta el consumo de plaguicidas en estrecha relación con la producción hortícola, alcanzándose en 2004 la cifra máxima de kilogramos de ingrediente activo por hectárea. En 2005 el consumo de productos fitosanitarios en España se redujo en un 12,69%, manteniéndose prácticamente constante desde entonces [12]. En 2008 (últimos datos disponibles) se consumieron en España un total de 94.549 toneladas de productos fitosanitarios, correspondiendo el 28,56% a herbicidas, el 24,87% a fungicidas y el 16,45% a insecticidas.

II.2.3. Riesgos de la presencia de plaguicidas en alimentos.

Se define como residuo de plaguicida a los residuos, incluidas las sustancias activas, los metabolitos y los productos de degradación o de reacción de sustancias activas utilizadas actualmente o con anterioridad en productos fitosanitarios [13].

Estos residuos están presentes en los alimentos debido a un uso legal de los productos fitosanitarios, y en la mayoría de los casos los niveles no suponen ningún problema. El “uso legal” de los productos fitosanitarios implica que se apliquen las dosis recomendadas por el fabricante y en los periodos estacionales adecuados, respetando los periodos de reingreso y de carencia. El periodo de reingreso es el tiempo mínimo que se debe esperar, después de haberse hecho una aplicación para el ingreso de personas y/o animales al área tratada, y el periodo de carencia o de espera es el tiempo mínimo legalmente permitido, expresado usualmente en números de días, que debe transcurrir entre la última aplicación de un fitosanitario y el consumo del producto vegetal tratado.

De cualquier modo, los residuos de plaguicidas pueden afectar negativamente a la salud, por lo que su presencia en los alimentos no es deseable, ya que se pueden acumular en el organismo y alcanzar concentraciones tóxicas. Generalmente los plaguicidas aparecen en los alimentos a muy bajas concentraciones, del orden de partes por millón (mg kg^{-1}) o menos [14].

La Ingesta Diaria Admisible (IDA) es un índice toxicológico establecido por las autoridades competentes, tanto a nivel nacional como internacional. Se define como la cantidad de un compuesto químico (incluidos los plaguicidas), expresada en relación con el peso corporal, que puede ser ingerida a diario durante toda la vida de una persona sin que llegue a representar un riesgo apreciable para la salud. Es muy importante cuantificar bien los riesgos para la salud ocasionados por la exposición a contaminantes como los plaguicidas a través de la dieta. Las IDAs se obtienen en animales de laboratorio, después de administrarles el plaguicida en el alimento durante períodos prolongados de tiempo. De esta manera se determina el nivel de dosis sin efecto (NOEL) y la ingesta diaria admisible (IDA). La ingesta diaria admisible es la máxima cantidad del plaguicida que la especie experimental puede recibir sin ningún tipo de manifestación toxicológica. Pero tras esta experiencia hay que extrapolar de alguna manera al hombre, cosa que no es fácil. En general, lo que se hace es aplicar a la ingesta diaria aceptable del animal de laboratorio un factor de seguridad que se ubica normalmente en un valor de 100, aunque a veces puede ser más bajo y, en oportunidades, ser elevado a 1000 (cuando los riesgos lo justifican). De esta manera se obtiene la IDA para el consumidor humano [15].

Teniendo en cuenta la IDA y las buenas prácticas agrícolas, se establecen los límites máximos de residuos (MRLs) (ver **figura II.1**). El MRL es, simplemente, el máximo nivel de residuos que

se puede aceptar en un determinado alimento para que un humano que lo consume en forma normal y abundante no supere la IDA para el residuo en cuestión.

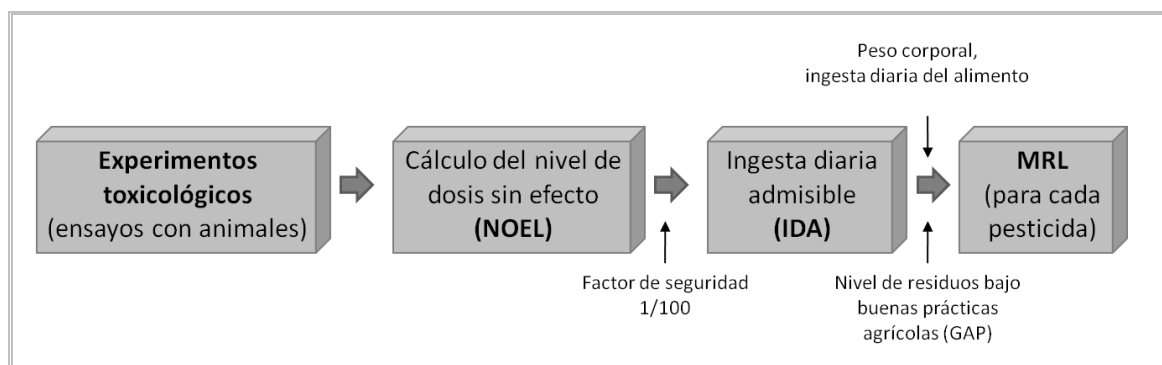


Figura II.1. Diagrama de flujo de los pasos seguidos para el establecimiento de los MRLs de plaguicidas en alimentos.

No obstante, se debe seguir trabajando para desarrollar una metodología que tome en consideración los efectos acumulativos y sinérgicos, teniendo en cuenta la exposición de los consumidores a combinaciones de sustancias activas.

II.3. RESIDUOS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS MONOCÍCLICOS (MAHS) EN ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL. BTEXS.

Los hidrocarburos monoaromáticos (MAHs) y en particular los BTEXS (Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xilenos y Estireno), están presentes en los productos derivados del petróleo, como las gasolinas. Además, son muy utilizados como disolventes industriales y productos para pinturas [16,17]. El estireno, por otra parte, es empleado en la producción de plásticos usados como contenedores para multitud de productos alimenticios, a los que puede contaminar por migración de monómeros del estireno. Los MAHs (igual que los PAHs) son muy solubles en aceites y grasas, a los que pueden llegar principalmente por contaminación ambiental. Dada su alta volatilidad, es de esperar que los niveles encontrados en aceite de oliva virgen sean muy superiores a los encontrados en otros aceites que han sido sometidos a un proceso de refinación. Así, se han llevado a cabo algunos estudios para establecer los niveles de BTEXS en aceite de oliva virgen, al que fueron incorporados por contaminación aérea y procesos de extracción [18,19]. En el caso del aceite de oliva la presencia de estireno

puede tener también un origen natural, ya que es producido por descarboxilación del ácido cinámico presente en la pulpa de la aceituna [20].

La Unión Europea ha mostrado ya su preocupación acerca de la exposición a los BTEX y estireno en la dieta y en particular a través del aceite de oliva [21-23] recogiendo resultados de estudios realizados en Grecia, Alemania y Francia. El Comité Científico de Alimentación de la Unión Europea recomendó en 1999 la conveniencia de realizar estudios sobre métodos analíticos (dado que no existe un método de análisis oficialmente aceptado), y sobre el origen de estos compuestos en el aceite de oliva.

II.4. NORMATIVAS SOBRE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS E HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL.

II.4.1. Legislación europea.

II.4.1.a) Directiva 91/414/CEE [24] del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.

Modificaciones:

Esta normativa ha sufrido diferentes modificaciones entre los años 2003-2007, siendo destacable el Reglamento CE/396/2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal.

En el año 2006 se publicaron dos actos legislativos altamente relacionados con esta Directiva, puesto que constituyen el marco reglamentario de gestión de las sustancias químicas (REACH), y contemplan la creación de la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos. Se trata del Reglamento (CE) nº 1907/2006 y la Directiva 2006/121/CE, que serán expuestos posteriormente (sección II.4.1.g).

II.4.1.b) *Decisión 2002/657/CE* [25] de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.

II.4.1.c) *Directiva 2003/13/CE* [26] de la Comisión, de 10 de febrero de 2003, por la que se modifica la Directiva 96/5/CE relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y los alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.

- El anexo I establece límites máximos de residuos de plaguicidas y de metabolitos de plaguicidas en este tipo de alimentos.
- El anexo II establece los plaguicidas que no se podrán utilizar en productos agrícolas destinados a la elaboración de estos alimentos.

II.4.1.d) *Directiva 2003/14/CE* [27] de la Comisión, de 10 de febrero de 2003, por la que se modifica la Directiva 91/321/CEE relativa a los preparados para lactantes y los preparados de continuación.

- El anexo I establece los plaguicidas que no se podrán utilizar en productos agrícolas destinados a la elaboración de estos alimentos.
- El anexo II establece límites máximos de residuos de plaguicidas y de metabolitos de plaguicidas en este tipo de alimentos.

II.4.1.e) *Reglamento (CE) 396/2005* [28] 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.

Deroga las distintas directivas europeas relativas a la fijación de contenido máximo tolerado de residuos de plaguicidas en cada tipo de alimento (Directivas 76/895/CEE (frutas y hortalizas), 86/362/CEE (cereales), 86/363/CEE (productos origen animal) y 90/642/CEE (productos de origen vegetal, incluidas frutas y verduras)), excepto las directivas relativas a los alimentos infantiles citadas anteriormente, que siguen vigentes, de forma que se establece un único acto legislativo que fija a escala comunitaria los límites

máximos permitidos de residuos de plaguicidas (MRL) en productos de origen vegetal y animal, teniendo en cuenta las buenas prácticas agrícolas.

- El anexo I establece la lista de productos a los que se le aplicarán los MRL armonizados. Este anexo se establece en el Reglamento (CE) 178/2006 [29], que incluye la lista de alimentos y piensos a los que se aplican los contenidos máximos de residuos de plaguicidas.
- El anexo II establece los MRLs armonizados para los productos detallados en el anexo I. Para las sustancias activas no incluidas en este anexo, ni tampoco en los anexos IV y V se aplicará un MRL por defecto de 0.01 mg kg^{-1} , en cualquier producto alimenticio.
- El anexo III establece los MRLs armonizados temporales o provisionales. Cuando se consideren definitivos pasarán al anexo II.
- El anexo IV establece la lista de sustancias activas respecto a las que no se exigen MRL.

El Reglamento (CE) 149/2008 [30] establece los mencionados anexos II, III y IV del Reglamento (CE) 396/2005, que estipulan los límites máximos de residuos para los productos que figuran en el anexo I de dicho Reglamento.

- El anexo V establece la lista de sustancias activas para las que se aplica un MRL por defecto distinto de 0.01 mg kg^{-1} . Este anexo no ha sido publicado aún.
- El anexo VI establece los factores de conversión (concentración o dilución) que habrá que aplicar a los MRLs para los productos elaborados. Este anexo no ha sido publicado aún.
- El anexo VII establece niveles de residuos de sustancias activas que excedan de los límites especificados en los anexos II y III para un producto concreto, tras un tratamiento por fumigación posterior a la cosecha, siempre y cuando tales productos no se destinen al consumo inmediato y se disponga de controles adecuados para garantizar que los productos no pueden ponerse a disposición del usuario o consumidor final, si son suministrados directamente a éste, hasta que los residuos dejen de superar los límites máximos especificados en los anexos II o III. Este anexo queda establecido en el Reglamento (CE) 260/2008 [31], donde se incluye la lista de combinaciones de sustancia activa y producto a las que se aplica la excepción respecto al tratamiento por fumigación posterior a la cosecha.

Modificaciones:

- Reglamento (CE) 839/2008, que modifica el Reglamento (CE) 396/2005 en lo que se refiere a los anexos II, III y IV relativos a límites máximos de residuos de plaguicidas en el interior o la superficie de determinados productos.
- Reglamento (CE) 256/2009, por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de determinados plaguicidas en determinados productos.
- Reglamento (CE) 822/2009, por el que se modifican los anexos II, III y IV del Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de determinados plaguicidas en determinados productos.
- Reglamento (CE) 1050/2009, por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de determinados plaguicidas en determinados productos.
- Reglamento (CE) 1097/2009, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de determinados plaguicidas en determinados productos.
- Reglamento (CE) 304/2010, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de 2-fenilfenol en determinados productos. El presente Reglamento entrará en vigor el 1 de enero de 2011.
- Reglamento (UE) 459/2010, por el que se modifican los anexos II, III y IV del Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de determinados plaguicidas en determinados productos.
- Reglamento (UE) 600/2010, por el que se modifica el anexo I del Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo a fin de añadir y modificar ejemplos de variedades u otros productos relacionados a los que se aplica un mismo LMR. El anexo I del Reglamento (CE) n o 396/2005 se sustituye por el texto recogido en el anexo del presente Reglamento.
- Reglamento (UE) 750/2010, que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de determinados plaguicidas en determinados productos.

- Reglamento (UE) 765/2010, que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de determinados plaguicidas en determinados productos.
- Reglamento (UE) 893/2010, por el que se modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de determinados plaguicidas en determinados productos.

Observaciones:

Los límites máximos de residuos permitidos que establece el Reglamento (CE) 396/2005 entraron en vigor en el año 2008, seis meses después de la publicación del Reglamento (CE) 149/2008, por el que se establecían los anexos II, III y IV del Reglamento (CE) 396/2005. Por lo tanto, durante ese periodo de tres años seguían en vigor las distintas directivas europeas relativas a la fijación de contenido máximo tolerado de residuos de plaguicidas en cada tipo de alimento: Directivas 76/895/CEE (frutas y hortalizas), 86/362/CEE (cereales), 86/363/CEE (productos origen animal) y 90/642/CEE (productos de origen vegetal, incluidas frutas y verduras). Los MRLs establecidos en dichas directivas fueron actualizados mediante nuevas directivas europeas (Directivas 2005/74/CE, 2006/30/CE, 2006/53/CE, 2006/60/CE, 2007/27/CE, 2007/28/CE, 2007/39/CE, 2007/55/CE, 2007/56/CE, 2007/57/CE) previo a su incorporación en los anexos II y III del Reglamento (CE) 396/2005.

II.4.1.f) *SANCO 2009-10684* [32]. “Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed”.

Esta guía da orientación sobre la validación de los métodos analíticos para la monitorización de residuos de plaguicidas en la Unión Europea.

II.4.1.g) *Actos legislativos del sistema REACH*¹.

La Unión Europea (UE) moderniza la legislación europea en materia de sustancias químicas y crea el sistema REACH, un sistema integrado único de registro, evaluación y autorización

¹http://europa.eu/legislation_summaries/internal_market/single_market_for_goods/chemical_products/l21282_es.htm. Último acceso: noviembre de 2010. Última modificación: junio de 2009.

de sustancias y preparados químicos, y crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos. REACH obliga a las empresas que fabrican e importan sustancias y preparados químicos a evaluar los riesgos derivados de su utilización y a adoptar las medidas necesarias para gestionar cualquier riesgo identificado. La carga de la prueba de la seguridad de las sustancias y preparados químicos comercializados recae en la industria. La Unión pretende garantizar un nivel elevado de protección de la salud humana y el medio ambiente, así como fomentar la competitividad y la innovación en la industria química europea.

El sistema REACH sustituye más de 40 directivas y reglamentos y crea un sistema único aplicable a todos los productos químicos. El marco normativo del sistema REACH está basado en dos actos legislativos: el Reglamento (CE) nº 1907/2006 y la Directiva 2006/121/CE:

- *Reglamento (CE) nº 1907/2006* del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión.
- *Directiva 2006/121/CE* del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, por la que se modifica la Directiva 67/548/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas, para adaptarla al Reglamento (CE) nº 1907/2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), y por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos.

El sistema REACH se completa con el Reglamento (CE) nº 1272/2008 sobre la clasificación, etiquetado y envasado de las sustancias químicas y sus mezclas. Dicho Reglamento integra los criterios de clasificación y las normas de etiquetado del Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de las Naciones Unidas en la legislación

comunitaria, y las disposiciones de REACH en lo referente al inventario de las clasificaciones y los etiquetados.

II.4.2. Legislación española.

II.4.2.a) *Orden pre/3301/2006* [33], de 27 de octubre, por la que se modifican los anexos II de los Reales Decretos 569/1990, de 27 de abril, y 280/1994, de 18 de febrero, por los que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen animal y vegetal, respectivamente. Esta orden traspone al derecho español las Directivas europeas 2006/30/CE, 2006/60/CE.

II.4.2.b) *Orden pre/508/2008* [34], de 26 de febrero, por la que se modifican los anexos II de los Reales Decretos 569/1990, de 27 de abril y 280/1994, de 18 de febrero, por los que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen animal y vegetal, respectivamente. Esta orden traspone al derecho español las Directivas europeas 2005/74/CE, 2006/30/CE, 2006/53/CE, 2007/27/CE, 2007/28/CE y 2007/39/CE.

II.4.2. c) *Orden pre/695/2008* [35], de 7 de marzo, por la que se modifica el anexo II del Real Decreto 569/1990, de 27 de abril y los anexos I y II del Real Decreto 280/1994, de 18 de febrero, por los que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen animal y vegetal, respectivamente. Esta orden traspone al derecho español la Directivas europeas 2007/55/CE, 2007/56/CE y 2007/57/CE.

II.5. ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS E HIDROCARBUROS AROMÁTICOS EN FRUTAS, VEGETALES Y ALIMENTOS DERIVADOS. ASPECTOS GENERALES.

Para el análisis de residuos se requieren métodos sensibles, selectivos, precisos, automáticos y aplicables a un gran número de compuestos en una amplia gama de matrices alimenticias.

La detección y confirmación de contaminantes orgánicos en alimentos es muy compleja, no sólo porque se necesitan equipamientos que son sofisticados, sino debido al elevado número y a la gran variedad de clases químicas, incluyendo compuestos con unas propiedades fisicoquímicas muy variables y todo ello se debe realizar en muestras sólidas, semisólidas o líquidas muy complejas y a niveles de concentración muy bajos de los compuestos de interés. Las metodologías analíticas que se vienen empleado en los últimos años para el análisis multi-residuo de contaminantes orgánicos están basadas en el acoplamiento cromatografía/espectrometría de masas.

II.6. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS E HIDROCARBUROS AROMÁTICOS.

La preparación de la muestra consiste en una serie de pasos encaminados a la obtención de un extracto que contenga los compuestos de interés (analitos) en un disolvente adecuado para la técnica de análisis a emplear. La calidad de un análisis depende a menudo de la forma en que se ha realizado esta etapa preliminar. Su influencia sobre el resultado es incluso más importante que la medida en sí misma o la precisión del instrumento utilizado. Este acondicionamiento de la muestra para el análisis, que se realiza a continuación del muestreo propiamente dicho, puede ser laborioso, delicado y llevar un cierto tiempo. Lo ideal sería separar totalmente el analito del resto de constituyentes de la matriz. La gran variedad de matrices encontradas en los alimentos hacen que existan diferentes formas de llevar a cabo este proceso [36]. Normalmente se empieza por una etapa de trituración-homogeneización de la muestra, como paso previo a la etapa de extracción. Después se realiza una purificación o limpieza del extracto y, si es necesario, una etapa de derivatización del analito.

La homogeneización puede consistir únicamente en la mezcla uniforme del alimento triturado, o se le puede adicionar un tampón acuoso. Después, el proceso de extracción dependerá de las características físico-químicas tanto de la muestra como de los analitos de interés. En los últimos años se han publicado diversas revisiones sobre las técnicas de preparación de muestra comúnmente utilizadas para el análisis multi-residuo en alimentos [37-39]. A continuación (sección II.6.1.), se expone el fundamento de algunas de ellas.

II.6.1. Técnicas de preparación de muestra

II.6.1.1. Extracción sólido líquido (SLE).

Una porción homogénea de la muestra sólida (o semisólida) se mezcla con un disolvente capaz de extraer los analitos de la matriz del alimento, de forma que la concentración residual que queda en el alimento sea despreciable. Dentro de esta categoría se podría incluir el método “QuEChERS” (acrónimo de las palabras inglesas “*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*”) [40], que consiste en una extracción con acetonitrilo seguida de una purificación con distintas fases sólidas (extracción en fase sólida dispersiva o en cartucho), principalmente con sílice enlazada a amina primaria-secundaria (PSA) en modo dispersivo, aunque también se puede utilizar la extracción en fase sólida con cartuchos [41]. Este procedimiento ha sido muy utilizado en la última década para la extracción de residuos de plaguicidas en alimentos como paso previo a un análisis por cromatografía de gases o de líquidos acoplada a un detector de espectrometría de masas, siendo validado mediante ensayos de recuperación y estudios colaborativos [42,43]. Varias versiones de este método QuEChERS han sido publicadas, dependiendo del tipo de alimento al que se fuera a aplicar. Así, para mejorar la extracción en frutas y vegetales de algunos plaguicidas sensibles al pH, se desarrolló un protocolo en el que el tampón ácido acético/acetato aseguran la extracción a pH ácido [44]; para la extracción de plaguicidas en alimentos con bajo contenido graso se utilizó C₁₈ además de PSA en la etapa de purificación del extracto [45]; finalmente, para alimentos con alto contenido graso se incorporó el carbón grafitizado en la etapa de limpieza del extracto [46].

II.6.1.2. Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD).

En MSPD [47], una pequeña cantidad de muestra (entre 0.5 y 1 g) se mezcla en un mortero con una cantidad similar (2 g) de un sorbente adecuado (C₁₈, alúmina, sílice enlazada con aminopropil, etc) hasta conseguir una mezcla homogénea. Esta mezcla se coloca en un cartucho de extracción y los analitos son eluidos con un disolvente. Para aumentar la limpieza del extracto, en la mayoría de los casos se empaqueta primero un pequeño lecho de un sorbente de distinta polaridad (Florisil, por ejemplo). El volumen de disolvente extractante suele estar comprendido entre 2 y 10 mL. Las principales ventajas de la MSPD son: el uso de

una pequeña cantidad de disolvente, el procedimiento analítico es más corto y simple, se elimina la posibilidad de formación de emulsiones y la eficiencia de la extracción aumenta al exponerse la totalidad de la muestra al extractante. La principal desventaja es la imposibilidad de automatización del procedimiento.

El sorbente más utilizado tradicionalmente ha sido la sílice enlazada-C₁₈. Teóricamente, las partículas de sílice rompen la arquitectura gruesa de las muestras biológicas, mientras que las cadenas alquílicas enlazadas contribuyen a disolver sus componentes. En general, las moléculas orgánicas de polaridad media son eficientemente extraídas si se utiliza como sorbente C₁₈ y como eluyente un disolvente polar (acetonitrilo, metanol). Sin embargo, últimamente se está reemplazando el uso de C₁₈ por sílice enlazada con aminopropil o amina primaria-secundaria (PSA) para muestras con alto contenido graso, ya que el carácter de intercambiador iónico débil del grupo amino parece ser el responsable de una mejor retención de los ácidos grasos en el sorbente y una elución más selectiva de las moléculas de interés por parte del disolvente polar.

La técnica MSPD ha sido aplicada al análisis multi-residuo de muestras de alimentos. Como ejemplos, se pueden citar la determinación de plaguicidas en aceituna usando aminopropil como fase sólida dispersante y Florisil en la etapa de purificación del extracto [48], o C₁₈ y MgSO₄ como fase dispersante y sin purificación del extracto [49]; el análisis de fungicidas en frutas y vegetales usando C₁₈ como fase dispersante y acetato de etilo como eluyente, con [50] o sin [51] purificación posterior del extracto con gel de sílice, y el análisis de plaguicidas en zumo de frutas utilizando tierra de diatomeas como fase dispersante [52], entre otros.

II.6.1.3. Extracción líquido-líquido (LLE).

La extracción líquido-líquido está basada en la solubilidad relativa de un analito en dos fases inmiscibles y está gobernada por el coeficiente de distribución o reparto. Éste es uno de los métodos de preparación de muestra tradicionales más comúnmente utilizados, particularmente para la extracción de compuestos orgánicos presentes en matrices acuosas. El procedimiento experimental consiste en mezclar un volumen determinado de muestra con uno o varios volúmenes de un disolvente (o mezcla de disolventes) orgánico de polaridad

similar a la de los analitos e inmiscible con la muestra. Después se agita en un embudo de decantación y se dejan separar las fases, de forma que influirá la intensidad y la duración de la agitación. Cualquiera de las dos fases se puede recoger para un análisis posterior. Para aumentar la selectividad de la técnica podemos adicionar sales inorgánicas que facilitarán el paso del analito a la fase orgánica (*salting-out effect*) [36]. Otro parámetro a controlar es el pH de la muestra, de forma que la acidificaremos para que los analitos ácidos pasen a la fase orgánica más fácilmente, y la alcalinizaremos para que los analitos básicos sean extraídos. Para asegurar la completa extracción de un analito en la fase deseada, a menudo se hacen necesarias varias repeticiones de la extracción con distintas porciones del disolvente extractante. Sin embargo, con esta técnica de extracción se consumen grandes volúmenes de disolventes orgánicos, se generan importantes interferencias de matriz, y en ocasiones se pueden formar emulsiones difíciles de romper. Éstos y otros inconvenientes hacen que la LLE esté cada vez más en desuso, siendo empleada como etapa de extracción o de limpieza del extracto previa a otra técnica de preparación de muestra, como la extracción en fase sólida [53] o la MSPD [48].

Extracción líquido-líquido miniaturizada

Para subsanar el inconveniente del uso de grandes volúmenes de disolventes, se desarrolló por primera vez en 1996 la microextracción en fase líquida (*LPME – liquid phase microextraction*) [54], en la que el analito se reparte entre un volumen relativamente grande de muestra y un volumen muy pequeño de disolvente orgánico. Incluso se ha llegado a utilizar una única gota de disolvente suspendida en la punta de una aguja, que es expuesta a la disolución de la muestra (*SDME – single-drop microextraction*). También se puede utilizar un sistema trifásico, de modo que los analitos son extraídos en una gota acuosa a través de una fina capa de disolvente orgánico en la punta de una microjeringa [55,56].

Las aplicaciones de esta técnica al análisis de alimentos son limitadas, siendo utilizada principalmente para el análisis de residuos de plaguicidas en aguas. Entre ellas [57] se encuentran, por ejemplo, la aplicación de la SDME al análisis de plaguicidas organofosforados en zumo de naranja [58], o la determinación de residuos de fungicidas en vegetales [59].

II.6.1.4. Extracción en fase sólida (SPE).

Los métodos cromatográficos son exigentes en lo que respecta a la naturaleza de las matrices en el seno de las cuales se encuentran los analitos. Para el análisis de trazas o microcontaminantes, la metodología de extracción en fase sólida es mucho mejor que el método clásico de extracción con disolventes en un embudo de decantación. Este procedimiento consiste en hacer pasar la muestra a través de un cartucho relleno con un adsorbente sólido, de forma que los analitos quedarán retenidos en él y podrán ser eluidos posteriormente con un disolvente apropiado. Podemos dividir este proceso en las siguientes etapas: 1) acondicionamiento del sorbente haciendo pasar un disolvente de propiedades similares a la muestra, 2) carga de la muestra en el cartucho, 3) lavado con un disolvente que no eluya los analitos, pero sí otras sustancias presentes en la muestra, y 4) elución de los analitos con un disolvente apropiado.

Esta técnica se usa a menudo para purificar extractos obtenidos mediante otras técnicas [60]. Es muy adecuada para:

- Eliminación de interferencias (aislamiento de los analitos): Se retienen los analitos en la fase sólida, pasando otras especies constituyentes de la muestra que pueden actuar como interferentes. También se podría dar el caso contrario: retener los interferentes y no los analitos.
- Preconcentración de analitos: Los analitos quedan retenidos en la fase sólida, pudiendo ser eluidos con pequeños volúmenes de disolvente.

Existe en el mercado una amplia gama de adsorbentes como las sílices enlazadas químicamente con cadenas alquílicas (C-18, C-8) o grupos polares (-CN, -NH₂), polímeros porosos (estireno-divinilbenceno), Florisil (silicato de magnesio activado) y carbón grafitizado. Grupos funcionales iónicos como el ácido carboxílico o los grupos amino también pueden enlazarse a sílice o polímeros para crear adsorbentes de intercambio iónico. También existen adsorbentes de modo mixto y algunos muy específicos, como los polímeros de impresión molecular (MIPs). Las interacciones analito-adsorbente pueden estar basadas, por tanto, en enlaces de hidrógeno, interacciones polares o apolares, intercambio aniónico o catiónico, y

exclusión por tamaño. Esto nos permite seleccionar adsorbentes adecuados para la determinación de analitos dentro de un mayor rango de polaridades y características físico-químicas. Recientemente, el empleo de adsorbentes de balance hidrofílico – lipofílico, como el Oasis® HLB (Waters)[61] está teniendo una gran aplicación. Oasis® HLB es un relleno de fase reversa, adecuado para la extracción en fase sólida de una amplia gama de compuestos. Su composición consiste en una combinación de dos monómeros: N-vinilpirrolidona (hidrofílica) y divinilbenceno (lipofílica). Esta combinación proporciona una capacidad de retención superior en fase reversa, con una capacidad especial para optimizar la retención de los analitos polares.

La SPE ha sido muy utilizada en el análisis de contaminantes en alimentos [62,63]. Así, ha sido la técnica de elección como tratamiento previo de la muestra para el análisis de residuos de plaguicidas en vinos [64], en frutas y vegetales [65,66] o miel [67]. También ha sido utilizada como técnica de *clean-up* o purificación del extracto obtenido mediante otra técnica de preparación de muestra, como LLE o SLE [68,69], MSPD [48,50]

Recientemente se ha desarrollado una técnica de purificación de extractos relacionada con la SPE, basada en el empaquetamiento de una fase sólida en la punta de una micropipeta (*DPX – disposable pipette extraction*), que ha sido aplicada al análisis de plaguicidas organofosforados en magdalenas de maíz y semillas de cacao [70], así como para el análisis de residuos de plaguicidas organoclorados, organofosforados y fungicidas en frutas y vegetales [71]. La principal ventaja de esta técnica reside en el bajo consumo de disolventes orgánicos.

II.6.1.5. Microextracción en fase sólida (SPME).

La SPME [72,73] utiliza una fibra de sílice fundida recubierta de un material adsorbente, que es en general un recubrimiento polimérico, que se utiliza para la extracción de compuestos orgánicos y/o inorgánicos volátiles derivados del mercurio, arsénico, etc. La fibra se encuentra en el interior de un tubo hueco, de tal forma que ésta puede retraerse y sacarse de su interior, quedando así expuesta a la muestra. Su uso implica dos etapas bien diferenciadas: primero la **etapa de extracción** (retención de los analitos en la fase estacionaria mediante procesos de absorción o adsorción), que puede llevarse a cabo sumergiendo directamente la fibra en el interior de una disolución (*DI-SPME – direct inmersión SPME*), o bien, manteniéndola en el

espacio en cabeza que está en equilibrio con la disolución (*HS-SPME* – *headspace-SPME*); y, segundo, **la etapa de desorción**, que se puede hacer térmicamente (en el inyector de un cromatógrafo de gases), o bien, utilizando disolventes orgánicos (de forma manual, o acoplado con un cromatógrafo de líquidos). Existen varios tipos de fibras disponibles comercialmente (ver **tabla II.2**), que difieren en el tipo de adsorbente y en su espesor. La elección de la fibra depende de la naturaleza fisicoquímica de los compuestos a extraer. La mayoría de las fibras puede utilizarse en combinación con cromatografía de gases (desorción térmica) y, en menor número, con cromatografía líquida (desorción con disolventes).

Tabla II.2. Tipos de fibras disponibles comercialmente para SPME.

| Adsorbente | Espesor (µm) | Temperatura de operación recomendada (°C) | Usos * |
|---|----------------|---|--|
| Carboxen ®/Polidimetilsiloxano (Carboxen/PDMS) | 75 85 | 250 - 310 | Gases y moléculas con bajo peso molecular (30-225 MW) |
| Polidimetilsiloxano (PDMS) | 7 30 100 | 220 - 320 200 - 280 200 - 280 | Compuestos volátiles (60-275 MW) |
| Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB) | 60 65 | 200 - 270 | Aminas volátiles, nitroaromáticos (50-300 MW) |
| Poliacrilato (PA) | 85 | 220 - 300 | Compuestos polares, semivolátiles |
| Divinilbenceno/Carboxen/ Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) | 50/30 | 230 - 270 | Compuestos aromáticos, volátiles y semivolátiles, C3-C20 (40-275 MW) |
| Polietilenglicol (PEG) | 60 | 200 - 250 | |
| Carbopack® Z | 15 | 250 - 340 | |
| Carbowax®/Divinilbenceno (DVB) | 70 | 200 - 240 | |

* MW = peso molecular

En general, en cromatografía de gases, los compuestos volátiles requieren fibras con un recubrimiento de mayor espesor, mientras para compuestos semivolátiles resulta efectivo el uso de fibras con un recubrimiento más delgado. Hay que tener en cuenta que cuanto mayor es el espesor de la fibra, mayor es el tiempo de extracción, aunque también es cierto que mayor es la cantidad de analito extraído, pero también el riesgo de retención irreversible de otros compuestos presentes en la matriz. Otros factores que hay que optimizar, además del tiempo de extracción son: la temperatura de extracción y desorción, el tiempo de desorción, el volumen de muestra, la velocidad de agitación de la muestra (para homogeneizarla durante el calentamiento), el pH, la fuerza iónica, el disolvente de desorción y la adición de disolventes o medios micelares.

La SPME integra extracción y preconcentración en un solo paso (la muestra es preconcentrada en la propia fibra), requiriendo mínimas cantidades de disolventes orgánicos, lo que supone una ventaja sobre la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida.

Desde su aparición, la SPME ha jugado un papel importante en el análisis medioambiental y, dentro de éste, en el análisis de plaguicidas [74]. En lo que al análisis de plaguicidas se refiere, la necesidad de desarrollar metodologías analíticas cada vez más rápidas y compatibles con el medio ambiente ha hecho de la SPME una técnica cada vez más utilizada, sobre todo acoplada a cromatografía de gases (GC), técnica analítica con la que más se utiliza actualmente. Variantes de la técnica como la denominada extracción sobre barra agitadora (*SBSE - stir bar sorptive extraction*) o extracción dinámica en fase sólida (*SPDE - solid phase dynamic extraction*) han mejorado su aplicación a distintos tipos de muestras.

Espacio de cabeza-SPME (HS-SPME)

La muestra se introduce en un vial de vidrio, sin llenarlo, cerrado por un tapón perforado y sellado por un séptum. Se introduce la fibra en el vial y se deja transcurrir un periodo de equilibrado termodinámico entre las fases presentes (entre 30 min y 1 hora), y adsorción de los analitos en la fibra. En estas condiciones, la cantidad de cada compuesto volátil en el volumen de espacio de cabeza es proporcional a su concentración en la matriz. Pasado ese tiempo de equilibrio, los analitos son desorbidos en el inyector del cromatógrafo de gases. Cuando se opera en el modo HS-SPME, cuanto menor es dicho espacio mayor es la sensibilidad. En general se recomienda que esté comprendido entre un 30 y un 50% del vial, aunque dicho volumen puede ser mayor cuando se trata de muestras más concentradas. Es importante también mantener constante tanto el volumen de la muestra como el del espacio en cabeza, para garantizar una buena reproducibilidad. Además, y también con este fin, la fibra debe mantenerse siempre a la misma altura dentro del vial.

Hasta la fecha se han publicado varias revisiones sobre la utilización de la SPME para el análisis de alimentos [75,76]. La mayor parte de las aplicaciones descritas usan el modo de espacio de cabeza (HS-SPME) [77-80], ya que mediante SPME por inmersión directa se corre el riesgo de dañar la fibra mediante la adsorción irreversible de algunos componentes de los alimentos

objeto de análisis. No obstante, existen algunas referencias sobre la utilización del acoplamiento SPME-LC para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos [81].

II.6.1.6. Extracción acelerada por disolventes (ASE).

Esta técnica, también denominada “extracción líquida presurizada (*PLE – pressurized liquid extraction*)” o “extracción con disolventes presurizada (*PSE – pressurized solvent extraction*)”, entre otros, consiste en la extracción de muestras sólidas con disolventes a elevadas temperaturas y presiones [82]. Las altas temperaturas provocan el descenso de la viscosidad de los disolventes, acelerando la solubilidad de los analitos de interés, al mismo tiempo que se debilitan las interacciones analito-matriz, favoreciendo el paso de los analitos a la superficie de la matriz. Las altas presiones permiten alcanzar una mayor rapidez en el proceso de extracción. El procedimiento experimental consiste en introducir una cantidad de muestra comprendida entre 1 – 30 g en una celda de acero inoxidable, se le añade un agente desecante, (como el sulfato sódico anhidro, Na_2SO_4) y se rellena el volumen muerto con arena limpia. La celda de extracciones se introduce en un horno y se calienta, mientras se hace fluir a través de ella un disolvente a alta presión. El volumen de disolvente será 1.2 – 1.5 veces el volumen de la celda de extracción. Finalmente, el extracto se recoge en un vial de unos 40 mL. El extracto obtenido se puede evaporar y reconstituir en un volumen adecuado para su análisis cromatográfico, o puede someterse a una etapa de limpieza o *clean-up*, dependiendo de la suciedad del mismo.

La extracción acelerada por disolventes se ha aplicado al análisis de residuos de plaguicidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en muestras complejas, fundamentalmente sedimentos, aunque también ha sido utilizada para el análisis de estos compuestos en alimentos [83-86].

II.6.1.7. Extracción asistida por microondas (MAE).

La extracción asistida por microondas (*MAE – microwave assisted extraction*) [87] se basa en el calentamiento con energía microondas de un disolvente o una mezcla de disolventes en contacto con la muestra, de forma que los compuestos de interés (analitos) pasarán de la

muestra al disolvente. Estas digestiones tienen lugar a alta temperatura y presión en recipientes cerrados. Inicialmente, se usaba la energía microondas para la mineralización de muestras en medio ácido, con el objeto de determinar analitos de tipo inorgánico. Fue a partir de los años 80 cuando se empezaron a usar microondas para la extracción de compuestos orgánicos [88]. Se deben usar disolventes polares, ya que los disolventes apolares no absorben la energía microondas (la absorción de energía microondas en una disolución está causada por la rotación dipolar de las moléculas y por la conductividad iónica).

Los equipos de microondas comerciales disponen de recipientes de extracción transparentes a la radiación y capaces de soportar altas presiones. Estos recipientes son cerrados tras la introducción de muestra y disolventes, mediante un sistema de seguridad que permite la salida al exterior de los gases generados en cada uno de los recipientes de extracción. Esta técnica presenta como ventajas la rapidez y el bajo consumo de disolventes, que permite el procesado de varias muestras simultáneamente a alta presión y temperatura, de forma que el calentamiento de la muestra se produce de forma homogénea y los parámetros de extracción son fácilmente controlados durante todo el proceso.

La MAE se ha aplicado fundamentalmente a muestras medioambientales [89], especialmente a sólidos. Sin embargo, en los últimos años se ha utilizado satisfactoriamente para el análisis de plaguicidas organoclorados y organofosforados en alimentos de origen vegetal [90,91]. Recientemente, se ha publicado el uso de extracción asistida por microondas a presión atmosférica para el análisis de plaguicidas organofosforados en aceite de oliva y aguacate [92].

II.6.1.8. Cromatografía de permeación en gel (GPC).

La cromatografía de permeación en gel (*GPC – gel permeation chromatography*) [93] es el nombre que recibe la cromatografía de exclusión por tamaño (*SEC – size exclusion chromatography*) cuando la fase móvil es un disolvente orgánico. Cuando la fase móvil es acuosa, la SEC se denomina cromatografía de filtración en gel (*GFC – gel filtration chromatography*). Esta técnica permite la separación de las moléculas según su tamaño utilizando fases estacionarias de una porosidad determinada: los poros deben tener un diámetro del mismo orden de tamaño que el de las especies a separar, que irán disueltas en la

fase móvil. Las moléculas cuyo diámetro es más grande que el de los poros, son “excluidas” de la fase estacionaria, ya que atraviesan la columna sin ser retenidas formando un único pico en el cromatograma. La ausencia de interacción química con la fase estacionaria, una elución rápida y la recuperación total de los analitos constituyen los puntos fuertes de esta técnica. No se utiliza gradiente de elución, dado que no hay interacción soluto-fase móvil. En GPC se utilizan geles de estireno-divinilbenceno para separar moléculas o polímeros de síntesis. La instrumentación es comparable a la utilizada en HPLC.

La GPC se utiliza a menudo como técnica de *clean-up* o purificación de extractos, sobre todo para eliminar interferentes de tipo lipídico de muestras con alto contenido graso (aceites, aceitunas, etc) a las que se le va a hacer un análisis multi-residuo. Para ello, se suele utilizar como fase estacionaria un copolímero de estireno-divinilbenceno. Como fase móvil se emplea una mezcla de acetato de etilo/ciclohexano [94], que recientemente ha reemplazado el uso de diclorometano [95], más tóxico.

II.6.1.9. Extracción con fluidos supercríticos (SFE).

La utilización de fluidos supercríticos como extractantes puede presentar ciertas ventajas derivadas de sus propiedades físicas intermedias entre las de los líquidos y las de los gases. El dióxido de carbono es con diferencia el más utilizado porque el punto crítico de este gas tiene valores fáciles de conseguir ($T_c = 31\text{ °C}$ y $P_c = 7400\text{ kPa}$). Además, este gas es poco tóxico, no inflamable, inodoro y no corrosivo. También se utiliza, aunque más raramente, el monóxido de nitrógeno (N_2O , $T_c = 132\text{ °C}$ y $P_c = 11500\text{ kPa}$). La originalidad de estos fluidos supercríticos reside en la posibilidad de cambiar su densidad, y por tanto su poder de solvatación, al modificar la presión utilizada. Es posible actuar sobre la capacidad de solvatación del fluido introduciendo modificadores orgánicos (metanol, acetona). Los extractores para SFE poseen un recipiente tubular muy resistente en el cual se coloca la muestra (sólida o semisólida) y se le hace llegar el fluido supercrítico. Para controlar el caudal del fluido supercrítico se utiliza una bomba de inyección o de pistón en la cual la cabeza debe mantenerse por debajo de la temperatura crítica con la ayuda de un criostato regulado a cero grados. El líquido pasa a continuación por un serpentín termostatzado para elevar su temperatura por encima del

punto crítico, con el fin de convertirlo en un fluido supercrítico. Una vez que éste ha estado en contacto con la muestra, se puede trabajar de dos modos:

- “Off-line”: Se despresuriza el fluido supercrítico que, al volver al estado gaseoso, abandona los analitos ya preconcentrados, así como eventuales impurezas indeseables, sobre la pared del recipiente de extracción. Se continúa el tratamiento por extracción selectiva con disolventes clásicos o con SPE.
- “On-line”: Consiste en hacer un análisis directo de lo extraído (siempre a presión elevada) haciéndolo pasar por una instalación de cromatografía (*SFC – Supercritical fluid chromatography*, o HPLC). Este procedimiento sólo es aplicable a aquellos compuestos que no son afectados por interferencias debidas al arrastre de una parte de la matriz.

La SFE funciona mejor para sólidos pulverizados finamente y con buena permeabilidad, como suelos y plantas secas, pudiendo ser difícil la extracción de muestras húmedas o líquidas. Los compuestos lipídicos son frecuentemente extraídos junto con los analitos de interés, por lo que una de las principales aplicaciones de la extracción con fluidos supercríticos de alimentos es la extracción de lípidos y la determinación del contenido graso de alimentos crudos o procesados. Sin embargo, la aplicación de esta técnica para la extracción de compuestos polares no es muy eficaz [96]. Varios autores han resumido las aplicaciones de la SFE al análisis de alimentos [97,98], entre las que se incluyen, por ejemplo, la determinación de PAHs en aceite vegetal [99] o la determinación de plaguicidas en soja, espinacas y naranjas [100], en huevos [101] y en grasas y aceites [96].

Después de la extracción por cualquiera de los métodos descritos, a menudo los analitos (que se encuentran en un disolvente orgánico volátil) deben ser concentrados por evaporación y reconstituidos con un disolvente compatible con el sistema de detección elegido. La evaporación del disolvente se puede hacer por calentamiento o mediante una suave corriente de nitrógeno o argón de alta pureza. En cualquier caso, para evitar contaminaciones y pérdidas de los compuestos de interés, se debe usar un material perfectamente limpio y evitar llegar a sequedad total.

Una vez que tenemos un extracto concentrado de los analitos, si no se dispone de una técnica de análisis que permita detectarlos directamente habrá que derivatizarlos, es decir, transformarlos en compuestos derivados mediante una reacción química, de forma que adquieran ciertas propiedades como la absorción de la luz visible, fluorescencia o mayor volatilidad (para su análisis por cromatografía de gases).

II.6.2. Antecedentes

II.6.2.1. Bebidas de frutas no alcohólicas.

a) Tratamiento de muestra previo a la determinación de residuos de plaguicidas en bebidas de frutas no alcohólicas.

El análisis de plaguicidas en bebidas de frutas no alcohólicas mediante técnicas cromatográficas se ha investigado mayoritariamente en zumos [102]. Diversas técnicas de extracción han sido utilizadas para este propósito, como la extracción líquido-líquido para el análisis de carbamatos [103] o la extracción acelerada con disolventes para el análisis de plaguicidas organofosforados [104] en zumos de frutas. Para el análisis multi-residuo las técnicas más empleadas han sido aquellas que requieren el empleo de una fase sólida, como SPE [105-107], MSPD [108-110] y SPME, tanto en modo de inmersión directa (DI-SPME) [111,112] como en modo espacio de cabeza (HS-SPME) [80]. Para zumos vegetales se ha empleado recientemente la técnica QuEChERS de modo satisfactorio [113].

Más escasa es la bibliografía encontrada para el análisis de plaguicidas en bebidas refrescantes. En todos los casos, las bebidas carbonatadas requieren una desgasificación previa a su análisis. Tras la desgasificación (si ésta es necesaria) las muestras se pueden someter a distintos tratamientos para su análisis cromatográfico, que van desde una simple filtración [114] a la extracción líquido-líquido [115], en ocasiones seguida de una purificación mediante GPC [116] o extracción en fase sólida [117].

b) Tratamiento de muestra previo a la determinación de BTEXS en bebidas de frutas no alcohólicas.

Aunque la presencia de BTEXS no es esperada en bebidas, debido al carácter lipofílico de los mismos, y a la ausencia de disolventes en el proceso de fabricación del alimento, en los últimos años se han publicado algunos artículos en los que se analizan residuos de benceno y otros hidrocarburos aromáticos monocíclicos en refrescos de distintos países, como Bélgica, Reino Unido, Canadá o Italia (ver sección II.7.4.1.). Algunos autores no realizan ninguna etapa de pretratamiento de la muestra, debido a la alta volatilidad de los compuestos de interés, que se pueden separar fácilmente de una muestra acuosa (como los refrescos) por calentamiento. Por lo tanto, en estos casos la determinación de BTEXS en refrescos se realizó por análisis directo de las muestras mediante cromatografía de gases (generalmente acoplada a un detector de espectrometría de masas) utilizando como método de introducción de muestra la técnica de espacio de cabeza, bien sea estático [118] (HS) o dinámico (purga y trampa) [119]. Otros autores han empleado la microextracción en fase sólida “en tubo” [120] y la microextracción en fase líquida [121], ambas en modo espacio de cabeza.

II.6.2.2. Alimentos infantiles elaborados a partir de frutas y vegetales.

a) Tratamiento de muestra previo a la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos infantiles elaborados a partir de frutas y vegetales.

Se han descrito diversas técnicas de preparación de muestra para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos infantiles elaborados a partir de frutas y vegetales mediante técnicas cromatográficas. Así, la extracción líquido-líquido fue empleada para el análisis de plaguicidas en zumos infantiles [122] y purés de frutas [123]. Otros autores han utilizado una etapa de *clean-up* mediante SPE para purificar los extractos obtenidos mediante LLE [124,125]. La extracción líquida presurizada también ha sido utilizada para el análisis de plaguicidas en alimentos infantiles [84], al igual que la SBSE [126]. La MSPD también ha sido evaluada satisfactoriamente para este tipo de análisis [127], al igual que el método QuEChERS [128-131].

b) Tratamiento de muestra previo a la determinación de BTEXS en alimentos infantiles elaborados a partir de frutas y vegetales.

Un estudio reciente determinó la presencia de benceno a bajos niveles de concentración ($< 1 \mu\text{g L}^{-1}$) en zumos infantiles de zanahoria (además de en otras bebidas), como consecuencia del calentamiento al que eran sometidos estos alimentos durante su etapa de elaboración. Las muestras se analizaron mediante HS-GC-MS tras ajustarle el pH a 10 [132].

II.6.2.3. Aceite de oliva y aceituna.

a) Tratamiento de muestra previo al análisis multi-residuo de plaguicidas en aceite de oliva y aceituna.

Para la determinación cromatográfica de residuos de plaguicidas en aceite de oliva, a menudo se emplea la extracción líquido-líquido como método preliminar de eliminación de grasas. Posteriormente, el extracto se purifica principalmente mediante GPC [94,133-134] o SPE [135-136]. En el caso de las aceitunas, la masa de aceituna triturada se mezcla con un disolvente (generalmente éter de petróleo) y se homogeneiza. El extracto obtenido se purifica mediante GPC [137] y SPE [138-139], del mismo modo que los extractos de aceite de oliva.

La extracción en fase sólida sin pretratamiento también ha sido utilizada para el análisis de plaguicidas en aceite de oliva [140]. Otras técnicas de extracción utilizadas para el análisis de plaguicidas en aceite de oliva han sido la extracción con fluidos supercríticos [96], extracción asistida por microondas [141-142] y HS-SPME [143], entre otras.

En los últimos años, el método QuEChERS modificado para matrices grasas [46,144] y la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) [48,49] han cobrado cierta relevancia en el análisis de plaguicidas de aceite de oliva y aceituna. Sin embargo, ninguno de estos dos métodos de tratamiento de muestra ha sido evaluado para una gran variedad de plaguicidas (más de un centenar) en estas matrices tan complejas.

b) Tratamiento de muestra previo a la determinación de BTEXS en aceite de oliva y aceituna.

La determinación de BTEXS se suele llevar a cabo mediante cromatografía de gases (GC), generalmente con detección por espectrometría de masas. Debido a la naturaleza volátil de estos compuestos, el tratamiento al que se somete la muestra es un calentamiento a

temperaturas comprendidas entre 40-90°C. Posteriormente, se toma con una jeringa un volumen del espacio de cabeza del vial, donde estarán los analitos en forma gaseosa, y se inyecta en el cromatógrafo. Este método de introducción de muestra, denominado espacio de cabeza estático (HS), es el que más frecuentemente se ha utilizado para el análisis de BTEX en aceite de oliva, seguido de GC-MS (HS-GC-MS) [20,145], o de espectrometría de masas directamente [146]. Se ha descrito también la aplicación de la microextracción en fase sólida como medio de introducción de la muestra aplicándose el método a aceites vegetales [147]. Por último se ha propuesto un método de extracción líquido-líquido utilizando nanotubos de carbono recubiertos de un surfactante como paso previo al análisis de BTEXS por HS-GC-MS [148].

No se ha encontrado ninguna referencia acerca de la determinación de BTEXS en aceituna previa a esta Tesis. Sin embargo, sería interesante realizar estudios sobre la materia prima (la aceituna) con el fin de determinar si la incorporación estos contaminantes al aceite de oliva se produce ya en el propio árbol o si tiene lugar durante las etapas de transporte y extracción del aceite.

II.7.DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS Y RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN FRUTAS, VEGETALES Y ALIMENTOS DERIVADOS MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.

II.7.1. Cromatografía de gases (GC).

En cromatografía de gases, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte (generalmente helio o nitrógeno) que no interacciona con las moléculas de analito: su única función es la de transportar el analito a través de la columna. El analito se distribuye entre la fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte.

Existen distintas formas de introducir de muestra en un cromatógrafo de gases:

- a) Inyección de muestras líquidas.- Es necesario preparar un extracto de la muestra en un disolvente volátil, siendo los más utilizados acetona, n-hexano y ciclohexano. El volumen de extracto inyectado está comprendido entre 1-20 μL .
- b) Espacio de cabeza estático (HS).- Se inyecta un volumen del espacio de cabeza del vial, por lo que esta modalidad es muy limpia, ya que evita la acumulación de componentes no volátiles en el cromatógrafo de gases. A bajas concentraciones (< 50 ppb), el equilibrio de distribución de los analitos entre la muestra y el espacio de cabeza depende de la concentración, no del volumen de la muestra. Sin embargo, a concentraciones mayores, el volumen adquiere una mayor significación y se debe mantener constante en todas las muestras y patrones.
- c) Espacio de cabeza dinámico (purga y trampa).- Los componentes volátiles de la muestra son arrastrados mediante una corriente gaseosa hasta una trampa fría o un soporte inerte, donde se produce el enriquecimiento de los analitos, que después son transferidos directamente hacia el cromatógrafo de gases mediante desorción térmica. La principal desventaja de esta técnica es que los interferentes volátiles son preconcentrados al mismo tiempo que los analitos.
- d) SPME.- Como se ha comentado previamente (Sección II.6.1.5.), los analitos pueden ser desorbidos de la fibra directamente en el inyector del cromatógrafo de gases.

Actualmente existen en el mercado unos muestreadores automáticos para GC muy versátiles, que permiten el análisis de muestras por cualquiera de los modos de inyección descritos. Para pasar de un modo de inyección a otro es necesario un pequeño ajuste de la configuración del muestreador.

II.7.1.1. Cromatografía de gases con detectores selectivos.

Uno de los primeros detectores que se utilizaron en cromatografía de gases, y uno de los que todavía tiene una gran aplicación, es el detector de conductividad térmica (TCD), basado en los cambios en la conductividad térmica de una corriente de gas (generalmente helio o hidrógeno), ocasionados por la presencia de analito. Las ventajas del detector de conductividad térmica son su sencillez, su amplio intervalo dinámico lineal y su respuesta

universal tanto a especies orgánicas como inorgánicas. Una importante limitación de este detector es su baja sensibilidad.

El detector de ionización de llama (FID) es el detector más extensamente utilizado, y por lo general, uno de los más aplicables en cromatografía de gases. Se fundamenta en la mezcla del efluente de la columna con hidrógeno y aire en un quemador. La mayoría de los compuestos orgánicos cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrógeno/aire forman iones que son conducidos mediante una diferencia de potencial hacia un electrodo colector.

El detector de captura de electrones (ECD) ha llegado a ser uno de los detectores más ampliamente utilizados para el análisis de muestras medioambientales, debido a su selectividad para detectar compuestos que contienen halógenos, como es el caso de los plaguicidas y bifenilos policlorados. Este detector se fundamenta en la ionización del gas portador (generalmente nitrógeno) y la producción de una ráfaga de electrones, de forma que se generará una corriente eléctrica constante, que se verá alterada por la presencia en el efluente de la columna de especies altamente electronegativas como los halógenos (debido a su tendencia a capturar electrones). Los detectores de captura de electrones son altamente sensibles, pero su intervalo de respuesta lineal se limita normalmente a dos órdenes de magnitud.

El detector termoiónico (TID ó NPD) es un detector selectivo de los compuestos orgánicos que contienen fósforo y nitrógeno, siendo particularmente útil para la determinación de muchos plaguicidas organofosforados. El fundamento de este detector es similar al del detector de ionización de llama.

II.7.2. Cromatografía de líquidos (LC).

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (*HPLC – High performance liquid chromatography*) es probablemente la técnica analítica de separación más utilizada actualmente, debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas y su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles. El tipo de cromatografía líquida más utilizada es la de reparto, en el que el analito se distribuye entre la fase móvil líquida

(generalmente un disolvente o mezclas de disolventes polares) y una fase líquida (fase estacionaria generalmente apolar) inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte según su polaridad. Generalmente se utiliza una elución en gradiente a alta presión, de modo que se utiliza una mezcla de dos o tres disolventes de polaridad distinta cuya proporción varía de forma programada durante el análisis.

El método más usado para la introducción de la muestra utiliza válvulas de 6 vías con bucles de volúmenes comprendidos entre 5 y 500 μL .

II.7.2.1. Cromatografía de líquidos con detectores ópticos.

La mayoría de los fabricantes de instrumentos de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) ofrecen detectores de absorción ultravioleta (UV), o ultravioleta-visible (UV-Vis) de diodos en serie. Estos instrumentos permiten recoger los datos de un espectro completo en aproximadamente un segundo, de forma que los datos espectrales para cada pico cromatográfico se pueden recoger y almacenar a medida que van saliendo de la columna.

Otro tipo de detectores ópticos muy usados en cromatografía líquida son los *detectores de fluorescencia*, más sensibles que los de absorción UV-Vis. Sin embargo, son menos universales y a veces es necesario realizar un tratamiento de la muestra para originar derivados fluorescentes de los analitos de interés. Este tratamiento de derivatización puede realizarse como paso previo a la separación cromatográfica, o posterior a la misma mediante un procedimiento on-line (tratamiento post-columna).

También se han usado detectores de índice de refracción, que tienen la ventaja de que responden a casi todos los solutos. Sin embargo, su respuesta se ve muy afectada por los cambios de temperatura, y además no son tan sensibles como la mayoría de los otros detectores.

Existen algunas aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas en alimentos que utilizan un detector de luz dispersada tras evaporación (ELSD). El efluente de la columna se evapora,

originando una nube de finas partículas de analito que pasa a través de un láser. Finalmente, se detecta la radiación dispersada por estas partículas de analito.

II.7.3. La espectrometría de masas como detector para cromatografía.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica basada en la ionización de la muestra y en la separación y registro de los iones producidos, según su relación masa-carga, en un sistema de vacío. Actualmente es la técnica de detección más empleada para el análisis de contaminantes en alimentos, reemplazando progresivamente a los detectores selectivos en cromatografía gaseosa y los detectores ópticos en cromatografía líquida. Esto es debido a las exigencias cada vez mayores de sensibilidad y selectividad de los métodos analíticos, marcadas por los bajos MRLs tolerados para mantener un gran nivel de seguridad alimentaria [25,32].

El acoplamiento cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) proporciona suficiente selectividad y sensibilidad para el análisis de compuestos relativamente apolares, volátiles y térmicamente estables [149]. Sin embargo, la presencia de grupos funcionales polares en la estructura de compuestos de interés en el ámbito de la seguridad alimentaria, hace obligatoria la introducción de una etapa de derivatización. Es por ello que cada vez se utiliza más el acoplamiento cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC-MS) [150].

Las ventajas que presenta la espectrometría de masas y que la convierten en técnica de referencia para el análisis de contaminantes en alimentos son:

- ✓ Es cualitativa y cuantitativa.
- ✓ Puede analizar mezclas complejas.
- ✓ Posee gran sensibilidad.
- ✓ Es universal y específica.
- ✓ Presenta la posibilidad de determinar especies que coeluyen.
- ✓ Puede proporcionar información estructural.
- ✓ Proporciona información isotópica.
- ✓ Es una técnica rápida.

Un espectrómetro de masas es un instrumento que separa los iones que se desplazan rápidamente según su relación masa-carga, m/z (donde m es la masa del ión en unidades de masa atómica y z es su carga). La mayoría de los iones que se estudian presentan una sola carga, de modo que la relación es sencillamente el peso molecular del ion. Un hecho característico de los espectrómetros de masas es la necesidad de disponer de un sistema de vacío adecuado para mantener bajas presiones (de 10^{-8} a 10^{-4} torr) en todos los componentes del instrumento (ver **figura II.2**). La necesidad de producir un alto vacío se debe a que las partículas cargadas (incluidos los electrones) interaccionan mediante colisiones con los componentes de la atmósfera y como consecuencia son destruidos. Un espectrómetro de masas consta de tres partes fundamentales: la fuente de iones, el analizador de iones (o de masas) y el detector.

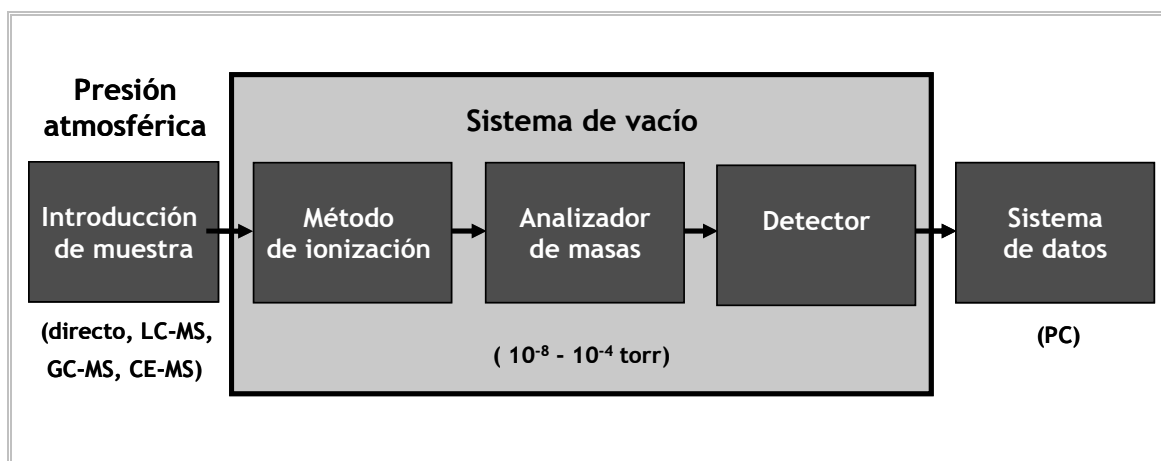


Figura II.2. Esquema de un espectrómetro de masas.

La forma más extendida (y de mayor potencialidad analítica) de introducir la muestra en un espectrómetro de masas es mediante el acoplamiento del mismo a una técnica separativa: cromatografía gaseosa (GC-MS), cromatografía líquida (LC-MS), o electroforesis capilar (CE-MS). En esta tesis sólo se tratará el acoplamiento cromatografía-espectrometría de masas.

No obstante, también es posible el análisis directo de muestras sólidas por espectrometría de masas, utilizándose ésta como una técnica independiente. Así, la muestra se suele introducir mediante una sonda que contiene la fuente de ionización, encargada de transformar las moléculas de analito en iones gaseosos.

II.7.3.1. Fuentes de ionización.

A menudo, las fuentes de iones se clasifican en fuentes duras y fuentes blandas. Las fuentes duras comunican energía suficiente a las moléculas, de manera que se encuentran en un estado de energía altamente excitado. La relajación posterior implica la rotura de algunos de sus enlaces, produciendo iones fragmentados con una relación masa-carga menor que la del ión molecular. Las fuentes blandas dan lugar a poca fragmentación, por lo que el espectro de masas resultante suele constar del pico correspondiente al ión molecular (GC-MS) o molécula (de)protonada (LC-MS). Por tanto, los espectros de masas obtenidos mediante ionización por fuentes blandas contienen escasa o ninguna información estructural de los compuestos analizados, obteniéndose principalmente información sobre la masa molecular.

La técnica de ionización de uso más extendido en análisis directo de muestras sólidas por espectrometría de masas es la *desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI)*[151]. La muestra se mezcla con un gran exceso de una matriz (generalmente un ácido orgánico cristalino de bajo peso molecular, con grupos funcionales que absorben radiación en la región UV) y luego se expone a la acción de un láser o de un haz de átomos (de xenón o argón) de alta energía, respectivamente. Es una fuente blanda y han sido utilizadas en instrumentos de LC-MS.

El análisis directo por espectrometría de masas se suele aplicar a biomoléculas, principalmente péptidos y proteínas (proteómica). El auge alcanzado por la proteómica en los últimos años ha llevado al desarrollo de nuevas técnicas de ionización, capaces de ionizar las moléculas de analito presentes en una muestra a presión atmosférica (*Ambient Mass Spectrometry*) [152]. Entre dichas fuentes de ionización podemos citar, a modo de ejemplo, *DART (direct analysis in real time)* [153], *DBDI (dielectric barrier discharge ionization)* [154], o *LTP (low temperature plasma)* [155]. Estas tres técnicas han sido recientemente aplicadas para el análisis de moléculas pequeñas, como hidrocarburos aromáticos policíclicos [156] o componentes naturales del aceite de oliva (triacilglicérols, polifenoles,...) [157-158]. Por último, cabe mencionar la técnica *DESI (desorption electrospray ionization)* [159], basada en la generación de un electrospray del disolvente, de forma que las gotas cargadas de éste serán las que ionicen los analitos presentes en una muestra que se coloca en una superficie "al aire". La

fente DESI ha sido utilizada con éxito en el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos [160].

En la siguiente tabla (**tabla II.3**) se resumen los principales tipos de fuentes de iones, sus mecanismos de ionización y si se han usado en espectrómetros de masas acoplados a cromatógrafos de gases o de líquidos:

Tabla II.3. Principales tipos de fuentes de iones usadas en espectrometría de masas molecular

| Tipo de fuente | Símbolo | Tipo de muestra a la que se aplica | Agente ionizante | Clasificación | | Acoplamiento LC, GC |
|--|---------|------------------------------------|---|--------------------|--------|---------------------|
| Impacto electrónico | EI | Gas | Electrones energéticos | F. de fase gaseosa | Dura | GC |
| Ionización química | CI | Gas | Iones gaseosos reactivos | F. de fase gaseosa | Blanda | GC |
| Electrospray | ESI | Líquido | Campo eléctrico elevado | Desorción | Blanda | LC |
| Ionización química a presión atmosférica | APCI | Líquido, Gas | Plasma de iones reactivos generado por descarga | Desorción | Blanda | LC, GC |
| Fotoionización a presión atmosférica | APPI | Líquido | Plasma de iones reactivos iniciado por fotoionización | Desorción | Blanda | LC |
| Desorción/ionización por láser asistida por una matriz | MALDI | Líquido, sólido | Haz de láser | Desorción | Blanda | LC |
| Análisis directo en tiempo real | DART | Líquido | Plasma de iones reactivos generado por descarga | Desorción | Blanda | LC |
| Descarga en una barrera dieléctrica | DBDI | Líquido | Plasma de iones reactivos generado por descarga | Desorción | Blanda | LC |
| Desorción por electrospray | DESI | Líquido | Gotas cargadas en forma de spray | Desorción | Blanda | - |
| Plasma de baja temperatura | LTP | Líquido | Plasma de iones reactivos generado por descarga | Desorción | Blanda | - |

En el análisis por GC-MS, la fuente de iones se encarga de transformar la corriente gaseosa que abandona el cromatógrafo de gases en una corriente de iones. Para ello, se utilizan fuentes de ionización en fase gaseosa, puesto que primero se volatiliza la muestra y luego se ioniza. A continuación, se resumen las principales características de las fuentes de ionización más utilizadas en GC-MS:

- *Impacto electrónico (EI)*. La muestra llega a la fuente en forma gaseosa (o se vaporiza in situ, si se hace un análisis directo por espectrometría de masas) y allí las moléculas son ionizadas por bombardeo con un haz de electrones de elevada energía [161]. Los electrones son emitidos por un filamento caliente de wolframio o de renio y se aceleran mediante un potencial de 70 eV que se aplica entre el filamento y el ánodo. Las trayectorias de los electrones y las moléculas están en ángulo recto y se cruzan en el centro de la fuente, donde colisionan y tiene lugar la ionización. El producto primario son iones de una única carga positiva que se forman cuando los electrones de elevada energía se acercan suficientemente a las moléculas como para causarles la pérdida de electrones por repulsión electrostática (ión molecular, M^{*+}). Sin embargo, la pequeña masa y la elevada energía cinética de los electrones generados en la fuente provoca pequeños aumentos en la energía cinética de las moléculas con las que chocan, de forma que éstas adquieren estados vibracionales y rotacionales excitados. La subsecuente relajación tiene lugar normalmente mediante una elevada fragmentación que da lugar a un gran número de iones positivos de diversas masas que son menores (y en ocasiones mayores) que las del ión molecular. Los complejos espectros de masas que se obtienen en la ionización por impacto de electrones son útiles para la identificación de compuestos. Existen bases de datos comerciales que contienen los espectros, obtenidos por impacto electrónico (siempre a 70 eV), de compuestos orgánicos de interés. No obstante, para cierto tipo de moléculas la fragmentación es tan efectiva que no queda ningún ión molecular, perdiéndose por tanto la información más importante para la determinación de la masa molecular (si la molécula es desconocida). Este tipo de fuente es sólo aplicable a analitos con masas moleculares menores de unos 10^3 daltons y que sean térmicamente estables, ya que es necesaria la volatilización de la muestra previa a su ionización.

- *Ionización química (CI)*. El diseño de este tipo de fuente es muy similar a las de impacto electrónico, pero en este caso los electrones generados no colisionan directamente con la muestra, sino con un gas reactivo. Las moléculas gaseosas de la muestra se ionizan al colisionar con los iones producidos al bombardear con electrones un exceso de gas reactivo [161]. Para llevar a cabo experimentos mediante ionización química, se introduce un reactivo gaseoso en la región de ionización y se mantiene a una presión de aproximadamente 1 torr, en una cantidad tal que la relación de concentración entre el reactivo y la muestra sea de $10^3 - 10^4$. Debido a esta gran diferencia de concentración, el haz de electrones reacciona casi exclusivamente con las moléculas de reactivo. Los iones reactivos dan lugar a reacciones de transferencia de protones o de hidruros con las moléculas de analito, originando, respectivamente, iones moleculares protonados ($[M+H]^+$) o deprotonados ($[M-H]^-$). Normalmente se utilizan iones positivos, aunque la ionización química que origina iones negativos se utiliza ocasionalmente en aquellos analitos que contienen átomos muy electronegativos. Uno de los reactivos más comunes es el metano, aunque también se han utilizado gases como propano, isobutano y amoníaco. Cada uno de ellos produce un espectro diferente con el mismo analito, siendo en cualquier caso los espectros de ionización química más sencillos (con menor fragmentación) que los espectros de impacto de electrones.

Un problema fundamental del acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas es el enorme contraste que existe entre los volúmenes de disolventes relativamente grandes de la primera y los requerimientos de vacío de la última. El efluente de la columna, que será un líquido compuesto por la muestra y los disolventes, tendrá que ser transformado en una corriente gaseosa de iones. Una primera aproximación consistió en el desarrollo de interfases que realizaban esta transformación en dos pasos: primero se eliminaba el disolvente y posteriormente se ionizaba el analito en forma gaseosa. Estas interfases (p.ej.: *particle beam (PB)*, *moving belt/wire* [162]) presentaban bastantes inconvenientes, sobre todo cuando se aumentaba el contenido de agua de la fase móvil. Actualmente se utilizan las llamadas “fuentes de desorción”, de forma que la muestra en estado líquido se transforma directamente en iones gaseosos. Una ventaja de este tipo de fuentes es que son aplicables a analitos no volátiles y térmicamente inestables. Las fuentes de desorción suelen ser fuentes blandas, de forma que el espectro de masas resultante estará

formado básicamente por el ión molecular protonado si trabajamos en modo positivo ($[M+H]^+$), y por el ión molecular desprotonado si trabajamos en modo negativo ($[M-H]^-$).

Las fuentes de ionización a presión atmosférica (*API – atmospheric pressure ionization*) son las más utilizadas actualmente. La instrumentación para todas ellas es común, excepto la sonda por donde se introduce la muestra. Se diferencian en el proceso de ionización y en las aplicaciones analíticas. Todas ellas son fuentes de ionización blandas, sensibles y robustas. Las ventajas de las fuentes API fueron resumidas por Voyksner [163] en cuatro puntos:

- Permiten trabajar con volúmenes de líquidos típicamente utilizados en LC.
- Son apropiadas para el análisis de compuestos no volátiles, polares y térmicamente inestables típicamente analizados por LC.
- Son sensibles, ofreciendo límites de detección comparables o mejores que los alcanzados mediante GC-MS.
- Son muy robustas y relativamente fáciles de usar.

A continuación se exponen los fundamentos de las principales fuentes API: electrospray, ionización química a presión atmosférica y fotoionización a presión atmosférica.

- *Electrospray (ESI)*. Es la fuente de ionización más usada en LC-MS. Fue introducida en el campo de la espectrometría de masas a finales de los años 70 [164], principio de los 80 [165], aunque el fenómeno se conocía anteriormente, y es llamada *ionspray* por algunos autores [166]. Se basa en la aplicación de un fuerte campo eléctrico a presión atmosférica a un líquido que fluye a través de un capilar metálico (aguja de nebulización) con un caudal bajo ($1 - 1000 \mu\text{L min}^{-1}$). Este campo eléctrico se genera aplicando una diferencia de potencial entre la aguja y un electrodo cilíndrico que la rodea y está separado de ella una distancia de 0.3 - 2 cm. El campo eléctrico induce una acumulación de carga en la superficie del líquido localizado al final de la aguja, de forma que éste se divide en pequeñas gotas cargadas. Un gas inyectado de forma coaxial y con un bajo caudal permite que la dispersión del spray sea limitada en el espacio. Estas gotas pasan después a través de una cortina de gas inerte (generalmente N_2) a alta temperatura para eliminar gran parte de las moléculas de disolvente, de forma que disminuye el tamaño de las gotas y aumenta la densidad de

carga. Cuando la fuerza del campo en la superficie de la gota supera la energía de solvatación de los iones del analito se produce la transferencia de dichos iones a la fase gaseosa. Finalmente, el proceso se completará en el interior de un capilar que guiará a los iones del analito hacia el analizador (**Figura II.3**).

La formación de iones, por tanto, es el resultado de un proceso electroquímico y de la acumulación de carga en las gotas. La corriente de electrospray está limitada por el proceso electroquímico que ocurre en la punta de la aguja del nebulizador y es sensible a la concentración, en vez de a la cantidad total de muestra. Esto permite la miniaturización de la técnica sin pérdida de sensibilidad, pero con una reducción de varios órdenes de magnitud en cuanto a consumo de muestra. Esto se aplica en nano-ESI, a menudo utilizada en el análisis de péptidos y proteínas.

La ionización se puede llevar a cabo en modo positivo o negativo. En el modo positivo, se podrán formar iones múltiplemente protonados $[M+nH]^{n+}$, donde n es el número de protones positivamente cargados en la molécula. Del mismo modo, es posible también la formación de aductos con iones de sodio, amonio, potasio, etc. En el modo negativo se observa normalmente la desprotonación de las moléculas, pudiéndose formar también iones múltiplemente desprotonados $[M-nH]^{n-}$.

Los parámetros que se han de ajustar para una buena ionización de los analitos y, por tanto, para una mayor sensibilidad del análisis son, entre otros, y dependiendo del tipo de instrumento y fabricante (ver **figura II.3**): voltaje de la aguja de nebulización (3); presión del gas de nebulización (2); temperatura (4) y caudal del gas de secado.

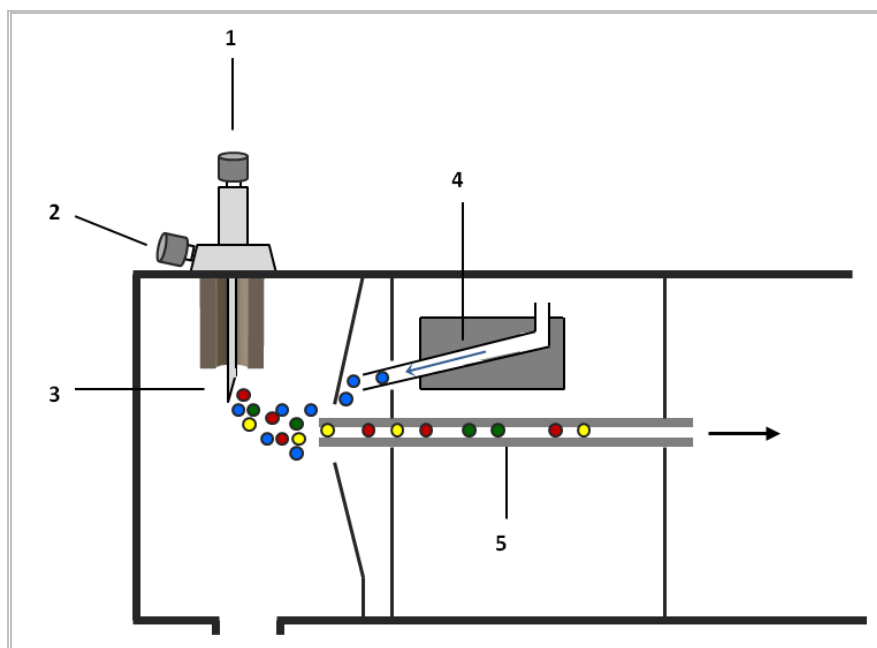


Figura II.3. Esquema de una fuente ESI. 1: entrada del líquido (efluente HPLC); 2: entrada del gas de nebulización; 3: aguja de nebulización; 4: calentador del gas de secado; 5: capilar de vidrio a través del cual pasan los iones hacia el analizador.

Una gran ventaja de la fuente ESI es su aplicabilidad a analitos termosensibles, lábiles o no volátiles [167]. Los hidrocarburos, sin embargo no se ionizan mediante ESI. Las aplicaciones de LC-ESI-MS cubren un amplio espectro de compuestos, de baja a alta masa molecular (plaguicidas, fármacos, proteínas, polímeros,...), siendo una técnica muy valiosa para la detección de compuestos de peso molecular medio. Se pueden citar, por ejemplo, la caracterización de péptidos y proteínas [168], el análisis cuantitativo de fármacos en aguas residuales [169], o el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos [170-171].

Cuando se trabaja con electrospray en análisis cuantitativo de compuestos orgánicos presentes en los alimentos, un factor a tener en cuenta es el “efecto de la matriz”, esto es, el efecto que pueden tener las especies que acompañan a los analitos en el extracto del alimento cuando éstos últimos alcanzan la fuente de ionización. Estas especies pueden favorecer la ionización de dichos analitos o dificultarla, e incluso impedirla (supresión de la ionización) [172-173]. Por lo tanto, una buena preparación de la muestra puede ser una etapa crucial en el análisis de alimentos mediante LC-ESI-MS.

- *Ionización química a presión atmosférica (APCI)* [161]. El efluente del HPLC es nebulizado y rápidamente evaporado mediante una corriente de nitrógeno coaxial en una cámara a alta temperatura (350 – 550 °C), de forma que el calor evapora el disolvente y los analitos. Aunque las elevadas temperaturas de trabajo pueden degradar los analitos, la alta velocidad de flujo del efluente del HPLC y el flujo de nitrógeno coaxial previenen la ruptura de las moléculas. Un electrodo de descarga de corona proporciona un haz de electrones que ionizan los gases de la fuente y los disolventes de la fase móvil. El plasma de iones generado será el responsable de la ionización en fase gas de los analitos. Las diferentes reacciones dependerán de la naturaleza del gas reactivo y del analito, fundamentalmente la afinidad protónica en modo positivo. En modo negativo, menos usual, el mecanismo de ionización es mediante la pérdida de un protón y/o captura de un electrón. Puesto que la formación de iones se produce en fase gas, no es apropiada para compuestos no volátiles o térmicamente lábiles. A diferencia del electrospray, APCI es una técnica que requiere trabajar con altas velocidades de flujo del efluente del HPLC (≥ 1 mL/min), ya que una baja velocidad de flujo podría generar problemas en la estabilidad del electrodo de descarga de corona. Por lo tanto, APCI es menos susceptible de miniaturización.

Esta técnica de ionización ha sido aplicada fundamentalmente a compuestos con un peso molecular < 1000 Da, como fármacos, metabolitos, PAHs, plaguicidas, etc. Como ejemplos de la aplicación de LC-APCI-MS al análisis de residuos tóxicos, se pueden citar la determinación de lactosas macrocíclicas en hígado bovino [174], la determinación de residuos de plaguicidas en aguas [175], o la determinación de aminas heterocíclicas en carne liofilizada [176].

Recientemente se ha utilizado APCI como fuente de ionización en un instrumento GC-MS de tiempo de vuelo [177] y se ha aplicado al análisis de plaguicidas en alimentos [178].

- *Fotoionización a presión atmosférica (APPI)* [151]. Formalmente sería una APCI iniciada por fotoionización. El proceso de fotoionización implica la absorción de energía radiante procedente de una fuente ultravioleta donde la energía incidente es mayor que el potencial de ionización (PI) para la pérdida de un primer protón por parte de la molécula de analito. Dicho proceso de fotoionización a presión atmosférica conduce

generalmente a la producción de iones moleculares (M^+), observándose escasa fragmentación. La ionización no depende de reacciones en fase gaseosa ni de la química ácido-base, por lo que con APPI se pueden ionizar moléculas que no son ionizables por ESI o APCI o lo son con baja sensibilidad. La eficacia es relativamente pobre en algunos casos debido a la absorción de fotones por parte de los disolventes y otras especies.

Como ejemplos de aplicaciones de LC-APPI-MS al análisis de alimentos podemos citar la determinación de aflatoxinas en leche de vaca [179], la determinación de acilglicerolos en aceites comestibles [180] o la determinación de residuos de plaguicidas en cítricos [181].

- *Fuentes multimodales.* Son dispositivos con más de una fuente de ionización (se suele combinar ESI y APCI en un solo sistema) y surgen con el objetivo de evitar duplicar inyecciones, especialmente en protocolos genéricos de caracterización de compuestos desconocidos.

II.7.3.2. Analizadores de iones (o masas).

Una vez que los iones han sido producidos en fase gaseosa, deben ser separados según su masa. Sin embargo, en vez de la masa, la propiedad física de los iones que miden los **analizadores de masas** es la relación masa-carga (m/z). Existen varios tipos de analizadores de masas (ver **tabla II.4**) [182], de forma que la separación de los iones en función de su relación masa-carga se basa en distintos principios. Todos los analizadores de masas usan campos eléctricos y/o magnéticos que pueden ser estáticos o dinámicos. La mayoría de las diferencias básicas entre los distintos tipos de analizadores reside en la forma en que se usan esos campos para conseguir la separación. Los analizadores de masas tienen distinto *poder de resolución*, que es un parámetro que se define como la habilidad de distinguir entre dos iones que difieren muy poco en su relación m/z :

$$R = m/\Delta m$$

donde Δm es la diferencia de masa entre dos picos adyacentes que están resueltos, y m es la masa nominal del primer pico (a veces se utiliza en su lugar la masa media de los dos picos). Se considera que dos picos están separados si la altura del valle entre ellos no es mayor de una

determinada fracción de su altura (a menudo un 10%). Así, un espectrómetro con una resolución de 4000 podrá resolver picos que aparezcan a valores de m/z de 400,0 y 400,1 (o 40,00 y 40,01). También se puede calcular el poder de resolución usando un único pico, de forma que bajo este criterio Δm es la anchura del pico a la mitad de su altura (Full Width Half Maximum – FWHM) y m es el valor de m/z del vértice del pico. Este último procedimiento está más extendido, puesto que se requiere un único pico.

De una forma muy general, se dice que un espectrómetro de masas es de alta resolución cuando $R > 5000$; por el contrario, un espectrómetro con $R < 5000$ es de baja resolución. En cualquier caso, es muy importante especificar el método de medida, ya que el poder de resolución registrado mediante el método FWHM es aproximadamente el doble que el obtenido utilizando dos picos adyacentes con un solapamiento del 10% de su altura.

En la siguiente tabla (**tabla II.4**) se resumen los distintos tipos de analizadores de iones, sus principales características y si se han usado en espectrómetros de masas acoplados a cromatógrafos de gases, de líquidos, o ambos:

Tabla II.4. Tipos de analizadores de masas

| Tipo de analizador | Símbolo | Principio de separación | Llegada de los iones al detector | Resolución | Acoplamiento LC, GC |
|---|---------|---------------------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|
| Sector eléctrico | E ó ESA | Energía cinética | Simultánea | Baja | GC |
| Sector magnético | B | Momento magnético | Secuencial | Baja | GC |
| Cuadrupolo | Q | m/z (estabilidad de la trayectoria) | Secuencial | Baja | GC, LC |
| Trampa de iones tridimensional | (Q)IT | m/z (frecuencia de resonancia) | Simultánea | Baja | GC, LC |
| Trampa de iones bidimensional o lineal | LIT | m/z (frecuencia de resonancia) | Simultánea | Baja | LC |
| Tiempo de vuelo | TOF | Velocidad (tiempo de vuelo) | Simultánea | Alta | LC,GC |
| Resonancia de ión-ciclotrón por transformada de Fourier | FT-ICR | m/z (frecuencia de resonancia) | Simultánea | Alta | LC |
| Orbitrap por transformada de Fourier | FT-OT | m/z (frecuencia de resonancia) | Simultánea | Alta | LC |

Los analizadores de masas más utilizados en el acoplamiento GC-MS son los de cuadrupolo sencillo, trampa de iones cuadrupolar e instrumentos de doble enfoque (triple sector eléctrico-magnético-eléctrico), aunque estos últimos no han sido muy empleados para el análisis de residuos de plaguicidas. En los últimos años, se han empezando a comercializarse instrumentos GC-MS con analizador de tiempo de vuelo (TOF), aunque su aplicación para el análisis de residuos de plaguicidas no está todavía tan extendida como en el caso del acoplamiento LC-TOFMS.

- a) *Analizador de masas cuadrupolar (Q)*. Un cuadrupolo está formado por cuatro barras cilíndricas paralelas que actúan como electrodos [161]. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par está unido al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par se une al terminal negativo (ver **figura II.4.**). Además, se aplican a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia que están desfasados 180 grados. Para obtener un espectro de masas con este dispositivo, los iones se aceleran en el espacio entre las barras mediante un potencial de 5 a 10 V. Entre tanto, las tensiones de corriente continua y de corriente alterna se incrementan simultáneamente desde cero hasta un valor máximo, mientras se mantiene constante su relación. El tiempo para un solo barrido es de unos pocos milisegundos (< 100 ms). En cualquier momento, todos los iones excepto aquellos que tengan un determinado valor de m/z inciden en las barras y se convierten en moléculas neutras. Por tanto, sólo los iones cuyo valor de m/z esté dentro de un intervalo limitado alcanzarán al detector, de forma que un cuadrupolo actúa como un filtro de masas. Generalmente, los instrumentos cuadrupolares separan fácilmente iones que difieren en su masa una unidad, son de bajo coste y su electrónica puede ser controlada fácilmente (simplicidad de operación). Los instrumentos de GC-MS cuadrupolares han sido muy utilizados para el análisis de residuos de plaguicidas [183-187], aunque progresivamente se van reemplazando por otros analizadores debido a su baja resolución y selectividad. Los analizadores cuadrupolares no se utilizan en el acoplamiento LC-MS puesto que las muestras son más complejas y es necesaria una mayor resolución.

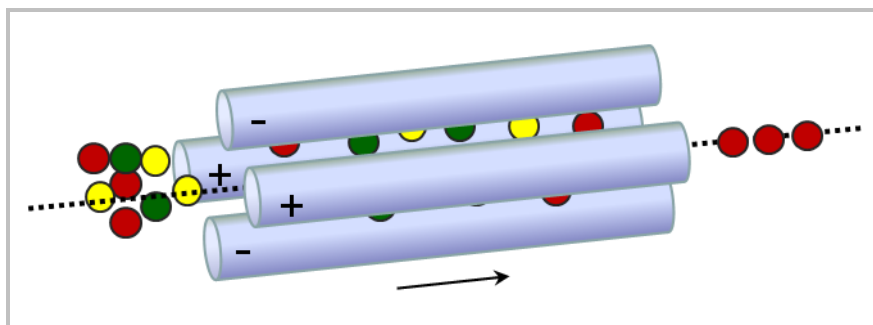


Figura II.4. Esquema de un analizador de masas cuadrupolar.

- b) *Trampa de iones tridimensional ó cuadrupolar ((Q)IT)*. Es un dispositivo en el que los iones en fase gas quedan confinados durante periodos de tiempo relativamente largos debido a la acción de campos eléctricos. Consta de un electrodo anular (o toroidal) y un par de electrodos colectores (uno de entrada y otro de salida) [161]. Al electrodo anular se le aplica un potencial de radiofrecuencia variable mientras que los dos electrodos colectores están conectados a tierra. El haz de iones penetra a través de la rejilla del electrodo colector superior y los iones quedan confinados en el electrodo anular (ver **figura II.5.**). Se realiza entonces un barrido de radiofrecuencias creciente que provoca la desestabilización resonante de los iones confinados, que abandonan la cavidad anular secuencialmente a través de la rejilla del electrodo colector inferior, en un orden de m/z creciente. Los iones emitidos pasan seguidamente al detector. Una versión comercial corriente de este dispositivo es capaz de resolver iones que difieren en una unidad de masa en el intervalo de masas de 500 a 2000 Daltons.

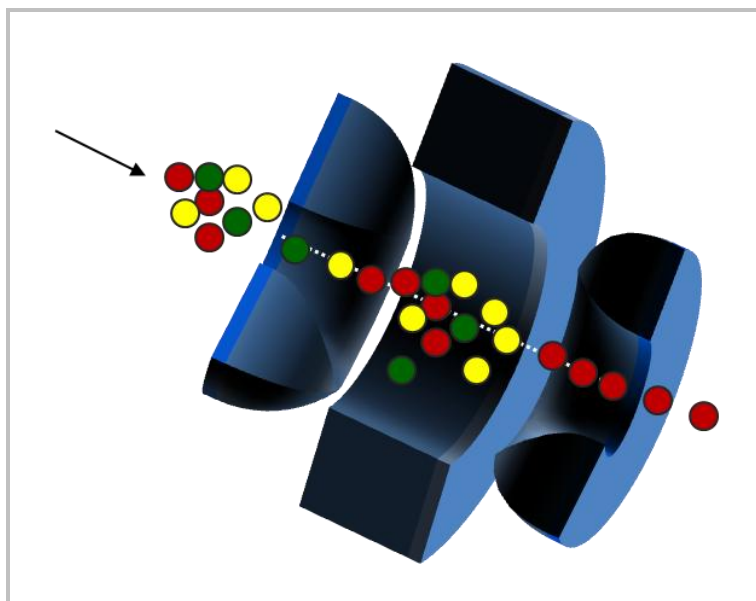


Figura II.5. Esquema 3D (sección) de una trampa de iones cuadrupolar. Los iones son expulsados selectivamente hacia el detector.

Además de su mejorada sensibilidad en *full scan* con respecto a los cuadrupolos simples, los analizadores de trampa de iones permiten la obtención de espectros de masas en tándem (MS/MS) de una forma sencilla. La técnica de MS/MS consiste en seleccionar en el espectro *full scan* un ión selectivo del analito, al que se denomina ión precursor. Una vez seleccionado, éste es aislado en la trampa de iones, expulsándose de la misma, mediante la aplicación de campos eléctricos adecuados, los iones de masa inferior y superior. A continuación, mediante la aplicación de un campo eléctrico sinusoidal, los iones almacenados colisionan con el helio presente en la trampa mediante un proceso conocido como disociación inducida por colisiones (*CID – collision induced dissociation*). Los iones producto así generados se expulsan de la trampa mediante la aplicación de una rampa de radiofrecuencia, registrándose el espectro de la segunda fragmentación (MS^2). Este modo de trabajo proporciona información estructural adicional, permitiendo la asignación de iones fragmento seleccionados, ya que es posible incluso repetir el proceso, aislándose de nuevo un ión producto para obtener espectros de MS^n . Sin embargo, en lugar de para elucidación estructural, el análisis por GC-MS/MS mediante trampa de iones de residuos de plaguicidas se ha centrado en mayor medida en la identificación de compuestos objetivo en muestras complejas, dada su mayor selectividad que repercute en una

mejora de la sensibilidad (en comparación con el modo *full scan*) [188-191]. Lo mismo sucede en el análisis de residuos de plaguicidas mediante LC-MS/MS [192-194].

- c) *Sector eléctrico (ESA)*. El analizador electrostático (ESA) consiste en dos placas metálicas lisas curvadas dispuestas paralelamente, a través de las cuales se aplica un potencial de corriente continua [161]. Este potencial tiene el efecto de limitar la energía cinética de los iones a un intervalo exactamente definido. Los iones con energías mayores que las promedio, chocan con la parte superior de la rendija ESA y se pierden; los iones que tienen energías que son inferiores a las promedio chocan con el lado inferior de la rendija ESA y son eliminados. Los analizadores de este tipo sólo se utilizan en los instrumentos GC-MS, y generalmente combinados con analizadores de sector magnético.
- d) *Sector magnético (B)*. Los analizadores de sector magnético utilizan un imán permanente o un electroimán para hacer que el haz procedente de la fuente de iones se desplace con una trayectoria circular de 180, 90 ó 60 grados. Los iones son acelerados entre dos rendijas y salen hacia el tubo analizador metálico, que se mantiene a una presión interna alrededor de 10^{-7} torr y está sometido al campo magnético creado por un imán [161]. Se puede llevar a cabo un barrido de los iones de diferente masa a través de la rendija de salida variando la fuerza del campo del imán o el potencial de aceleración entre las rendijas de entrada (desde la fuente de iones) y salida (hacia el tubo de aceleración). Generalmente, se usa un electroimán, de forma que lo que se varía es el campo magnético (responsable de que los iones realicen la trayectoria curva dentro del analizador), dejando el potencial de aceleración entre las rendijas constante. Los iones que pasan a través de la rendija de salida y cruzan el tubo analizador son finalmente recogidos en un electrodo colector, dando lugar a una corriente de iones que es amplificada y registrada. Se supone que todos los iones tienen la misma energía cinética después de ser acelerados, y puesto que ésta depende de la masa, los iones más pesados se desplazan a través del sector magnético a velocidades menores.

Los analizadores de sector magnético se denominan a menudo espectrómetros de enfoque simple. Esta terminología se utiliza porque a veces un conjunto de iones que salen de la fuente con la misma relación masa-carga tienen una distribución

direccional divergente. El campo magnético es capaz de corregir estas desviaciones, haciendo converger las direcciones de los iones (“conduce los iones hacia el foco”), de forma que la energía cinética de los iones que abandonan la fuente es el factor responsable que limita en mayor medida la resolución de los instrumentos de sector magnético ($R \leq 2000$). Sin embargo, la distribución direccional de los iones no es la única limitación de este tipo de instrumentos, ya que también se puede dar una difusión de energías cinéticas que origine un ensanchamiento de haz que llega al detector, produciendo una pérdida de resolución. La distribución de la energía cinética de los iones que abandonan la fuente surge de la distribución de Boltzmann de energías de las moléculas a partir de las cuales se forman los iones, y de la no homogeneidad de campo de la fuente.

Para corregir tanto las desviaciones (o aberraciones) direccionales como las de energía de los iones que dejan la fuente, se usan los espectrómetros de doble enfoque, que combinan uno o varios analizadores electrostáticos (ESA) con un analizador magnético (B). En los más simples, los iones que proceden de la fuente son acelerados a través de las rendijas y pasan a través del campo electrostático, que sirve para enfocar un haz de iones que tiene una banda estrecha de energías cinéticas sobre una rendija que conduce al campo electromagnético curvado, donde dichos iones son separados en función de su relación masa-carga. Una amplia variedad de espectrómetros de doble enfoque se encuentra disponible en el mercado, alcanzando los más sofisticados una resolución del orden de 10^5 . Los analizadores de doble enfoque más utilizados son los de triple sector (ESA-B-ESA), capaces de separar iones cuya masa difiere en el cuarto decimal. Consecuentemente, a los espectrómetro de triple sector se les denomina espectrómetros de masas de alta resolución (HRMS), siendo muy empleado el acoplamiento GC-HRMS para el análisis de compuestos orgánicos persistentes (POPs)[195], principalmente dioxinas [196-197] en muestras medioambientales y biológicas. Sin embargo, escasas referencias se pueden encontrar sobre la aplicación de esta técnica (GC-HRMS) al análisis de residuos de plaguicidas [198-200].

- e) *Tiempo de vuelo (TOF)*. Los iones son acelerados (en la fuente de impulso o *pulser*) mediante un impulso de campo eléctrico de 10^3 a 10^4 V y una frecuencia de 10 a 50 kHz. Las partículas aceleradas pasan al tubo analizador (tubo de vuelo) de entre uno y dos metros de longitud, situado ortogonalmente a la fuente de iones y que no está

sometido a ningún campo. Debido a que todos los iones que entran en el tubo idealmente tienen la misma energía cinética, sus velocidades dentro del tubo deben variar inversamente con sus masas, llegando al detector antes las partículas más ligeras que las más pesadas [161]. Los tiempos de vuelo habituales van de 1 a 100 μs . Variaciones en la energía de los iones y en las posiciones iniciales de los mismos causan un ensanchamiento de los picos que suelen limitar la resolución obtenida. Algunas de las ventajas de este tipo de analizadores son: la sencillez, la robustez, facilidad de accesibilidad a la fuente de iones, un intervalo de masas virtualmente ilimitado y rapidez en la adquisición de datos. Otra característica interesante de los analizadores de tiempo de vuelo reside en su fácil calibración de masas (relación de tiempos de vuelo con masas) con sólo uno o dos puntos de referencia (uno o dos compuestos de masa perfectamente conocida). La resolución de masa depende del “tiempo de vuelo” y de la longitud del tubo. Para aumentar la trayectoria recorrida por los iones y, por lo tanto, su “tiempo de vuelo”, se utiliza lo que se denomina reflectrón (*reflectron*), que consiste en una serie de electrodos anulares colocados en el extremo opuesto al detector y que actúan como un “espejo” para los iones (adquisición en modo V) (ver **figura II.6.**). El reflectrón ayuda a corregir las pequeñas variaciones en la energía cinética de los iones, evitando el efecto que esto puede ocasionar en la resolución. En algunos instrumentos, para aumentar aún más la resolución, se pueden utilizar dos reflectrones (adquisición en modo W).

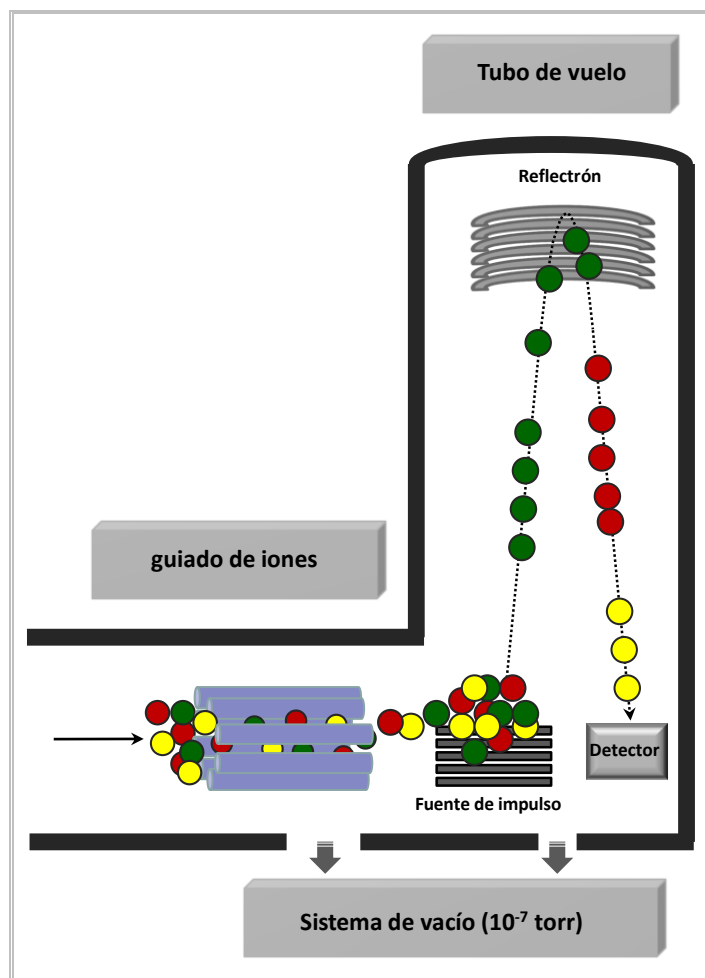


Figura II.6. Esquema de un analizador de tiempo de vuelo operando en modo "V".

La principal característica de los analizadores de tiempo de vuelo es la exactitud de masa que proporcionan, de hasta cuatro cifras decimales. Esto es posible gracias a la inyección constante durante el análisis de una disolución autocalibrante compuesta por uno o dos compuestos (dependiendo del fabricante) de masa perfectamente conocida. Recientemente se han desarrollado mejoras en el software de los instrumentos LC-MS con analizador de tiempo de vuelo que permiten la creación de bases de datos que proporcionan la identificación automática de los compuestos en base a su tiempo de retención y a su masa exacta. El acoplamiento LC-TOFMS también permite la detección de compuestos "no esperados" (*non target*) e incluso desconocidos (*unknowns*) para los cuales no se dispone de patrones analíticos a priori. La obtención de espectros en *full scan* con gran exactitud de masa, que pueden ser procesados a posteriori para la identificación de compuestos no esperados en un principio y la posibilidad de enfrentar dichos espectros a una base de datos, han

propiciado que en los últimos años los instrumentos LC-MS con analizador de tiempo de vuelo hayan sido ampliamente utilizados para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos de origen vegetal [201-206]. Por otra parte, hasta hace muy pocos años no se disponía de instrumentos de GC-MS comerciales con analizador de tiempo de vuelo. Sin embargo, recientemente ha sido descrita la aplicación de la técnica GC-TOFMS al análisis de residuos de plaguicidas en alimentos [207-213].

- f) *Trampa de iones bidimensional o lineal (LIT ó LTQ)*. Es un analizador cuadrupolar que termina en unas lentes que repelen los iones del interior del cuadrupolo, aplicando un potencial positivo para iones positivos (y negativo para iones negativos). En estas trampas los iones son confinados en la dimensión radial mediante el campo cuadrupolar y en la dimensión axial mediante un campo eléctrico situado al final de la trampa [182,214]. Los iones son enfriados mediante colisión con un gas inerte. Una gran ventaja de la trampa de iones lineal (LIT) es una capacidad de confinamiento de iones 10 veces superior a la de la trampa cuadrupolar (QIT), además de un menor efecto espacio-carga, ya que los iones son focalizados a lo largo de la línea central, en lugar de alrededor de un punto (ver **figura II.7**). Los iones confinados en una LIT pueden ser expulsados selectivamente a lo largo del eje de la trampa (expulsión axial) o perpendicular a dicho eje (expulsión radial), aunque la expulsión radial no ha sido aplicada a los instrumentos comerciales. Este tipo de analizadores se suelen utilizar en los instrumentos LC-MS.

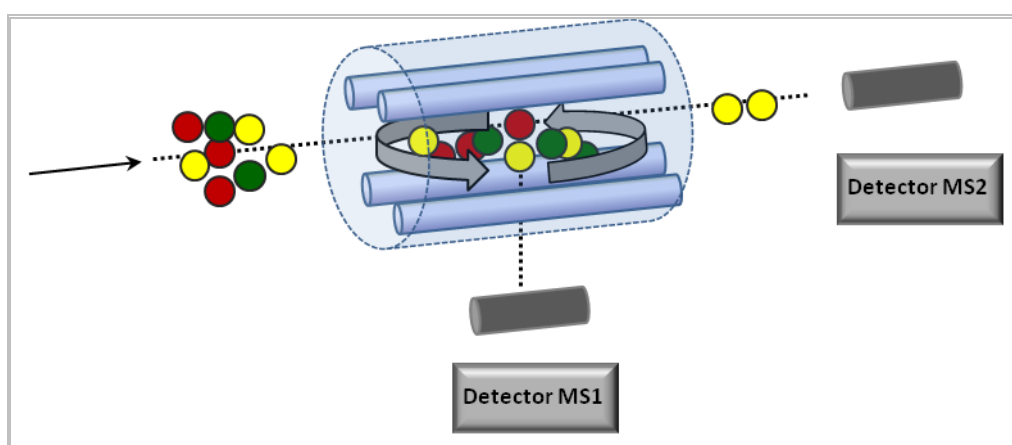


Figura II.7. Esquema de una trampa de iones lineal.

g) *Resonancia ciclotrónica de iones con Transformada de Fourier (FT-ICR – Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance)*. Estos analizadores son “trampas” que usan el fenómeno del ión ciclotrón en presencia de un campo magnético estático y homogéneo. Cuando una partícula ionizada entra en un campo magnético fuerte sufre un movimiento circular perpendicular a las líneas del campo magnético, conocido como movimiento ciclotrón [215]. Este movimiento tiene una frecuencia de resonancia que es específica de la relación masa-carga del ion. El movimiento del ión ciclotrón es transformado en un voltaje alternante mediante la célula ICR. Este voltaje es entonces amplificado y digitalizado. Esta señal digital es procesada mediante transformada de Fourier, obteniéndose así el espectro de masas. Con este instrumento se consigue una resolución y una exactitud de masa que no es superada por ningún otro analizador de masa; sin embargo, no se utilizan para el análisis de alimentos. Este tipo de analizadores se suelen utilizar en los instrumentos LC-MS.

h) *Orbitrap por Transformada de Fourier (FT-OT)*. El orbitrap (OT) [216] es una trampa de iones electrostática que usa la Transformada de Fourier (FT) para obtener el espectro de masas [217-218]. La parte externa es un electrodo con la forma de un barril cortado en dos partes iguales, con un pequeño intervalo de separación. El electrodo central tiene forma de huso. El diámetro máximo del electrodo central es de 8 mm y el del electrodo externo de 20 mm. Los iones son inyectados tangencialmente a través de los intersticios de las dos partes del electrodo externo. Estos iones inyectados con una alta energía cinética comienzan a oscilar en la trampa en forma de complicadas espirales alrededor del electrodo central, bajo la influencia de un campo electrostático. Una importante propiedad del orbitrap es que la frecuencia es directamente proporcional a la relación m/z e independiente de la energía cinética de los iones inyectados. La corriente inducida por los iones oscilantes es medida y convertida mediante Transformada de Fourier en frecuencias individuales e intensidades, generando el espectro de masas. El tiempo normal de adquisición durante un ciclo en el orbitrap es de 1 segundo. Este tipo de analizadores se suelen utilizar en los instrumentos LC-MS.

El orbitrap como analizador sencillo en espectrómetros de masas sólo es comercializado por la compañía Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemania). Estos instrumentos operan en *full scan* y a alta resolución (50000 – 100000 FWHM).

Actualmente también se comercializan instrumentos LC-MS híbridos *trampa de iones lineal-orbitrap* (LTQ-Orbitrap), que permiten realizar experiencias MS/MS.

II.7.3.3. Detectores para espectrometría de masas.

Una vez que los iones salen del analizador de masas, van hacia el *detector*. El detector registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ión pasa cerca o golpea una superficie. Se distinguen varios tipos de detectores [219]:

- *Copa de Faraday*. Es un dispositivo muy simple y robusto que detecta los iones mediante la medida directa de la carga con un electrodo conductor, que generalmente es un metal con forma de copa o un electrodo colector inclinado y rodeado de un armazón de metal. El electrodo colector está conectado a un amplificador de alta impedancia a través de una larga resistencia retroalimentada. El mecanismo de detección se basa en la transferencia de carga desde el haz de iones incidente hacia el electrodo colector, siendo amplificada la corriente resultante por el amplificador de alta impedancia. Estos detectores ofrecen una respuesta baja pero estable, por lo que no son adecuados para espectrómetros de masas de barrido. Sin embargo, sí son compatibles con espectrómetros de masas para relación de isótopos estables (IRMS). La respuesta de estos detectores es independiente de la energía de los iones incidentes.
- *Multiplicadores de electrones de díodos separados*. Los iones positivos golpean un cátodo de conversión que libera electrones que a continuación son “multiplicados” por una quincena de díodos colocados en cascada. Estos detectores tienen un tiempo rápido de respuesta, son muy sensibles y su ganancia llega a 10^8 . Nuevos revestimientos a base de aluminio sobre los díodos han mejorado los resultados obtenidos con los materiales tradicionales (Cu/Be), que envejecen bastante mal en la atmósfera residual de los espectrómetros o en los períodos de parada (retorno a la presión atmosférica).

- *Multiplicadores de electrones de dínodo continuo (CEM, CDEM ó ChannelTron®)*. Los iones son desviados a un colector cuya entrada, con forma de cono y construido en vidrio dopado con plomo o recubierto internamente con berilio, hace el papel de cátodo de conversión. Los electrones liberados por el haz de iones incidente son atraídos hacia un electrodo positivo. Los sucesivos choques de los electrones sobre la pared provocan su multiplicación, como ocurre en los dínodos separados. El montaje está descentrado en relación a la trayectoria incidente de los iones, para así proteger al detector del impacto de las especies neutras así como de fotones emitidos por el filamento.
- *Detectores de microcanales*. Constituidos por la suma de un número muy grande de “microcanaltrones” dispuestos a modo de colmena, funcionan como si se tratase de una placa fotográfica electrónica. Cada detector está formado de una porción de microtubo (25 μm de diámetro) recubierto interiormente de un material semiconductor funcionando como un dínodo continuo. La avalancha de electrones secundarios emitidos se recupera por un ánodo. Este sistema permite registrar simultáneamente iones de diferentes masas. Este es el tipo de detector que se suele emplear en los instrumentos con analizadores de tiempo de vuelo.

II.7.3.4. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

Para aumentar la selectividad y sensibilidad, así como para conseguir fragmentos de las moléculas de analito que conduzcan a una confirmación inequívoca de su presencia en la muestra sometida a análisis, se comercializan instrumentos híbridos que poseen varios analizadores de masas (“espectrometría de masas en tándem”, MS/MS).

Los únicos analizadores de masas sencillos que por sí solos tienen la capacidad de fragmentar las moléculas son las trampas de iones (tanto la tridimensional como la bidimensional), puesto que pueden confinar en su interior a los iones y hacerlos reaccionar con un gas de colisión (generalmente helio) a un voltaje determinado, expulsando posteriormente los fragmentos obtenidos de forma secuencial hacia el detector. Para conseguir fragmentos con otro tipo de analizador de masas es necesario combinar varios de ellos (iguales o diferentes) en un mismo

espectrómetro de masas. En un espectrómetro de masas en tándem, el primer analizador sirve para aislar los iones moleculares del resto de componentes de la muestra. Estos iones se introducen después uno detrás del otro en un segundo analizador consistente en una cámara de colisiones donde los iones son fragmentados por colisión con átomos de helio. Finalmente, los fragmentos generados son separados en función de su relación masa-carga, llegando secuencialmente hacia el detector.

La espectrometría de masa en tándem se puede realizar, por tanto, de dos formas: 1) de forma secuencial en el tiempo en un único analizador de masas (primero selecciona los iones, luego los fragmenta y posteriormente analiza los fragmentos obtenidos), y 2) de forma casi simultánea en el tiempo, utilizando una combinación de varios analizadores de masas (en uno se seleccionan los iones, a continuación se fragmentan en otro analizador y el último separa en función de su masa los fragmentos generados).

Los espectrómetros de masas híbridos comerciales poseen las siguientes combinaciones de analizadores de masas:

- *Instrumentos de sector múltiple.* Existen varias configuraciones posibles, siendo las más utilizadas las de triple sector: magnético-eléctrico-magnético (B-ESA-B) ó eléctrico-magnético-eléctrico (ESA-B-ESA). En esta última, los dos primeros sectores pueden ser utilizados como un espectrómetro de masa de alta resolución, seleccionando el ión precursor (también llamado ión padre); el tercer sector eléctrico analiza los iones fragmento.
- *Triple cuadrupolo (QQQ o TQ).* El primer cuadrupolo actúa como un filtro que selecciona y separa las moléculas protonadas o deprotonadas (según se trabaje en modo de ionización positivo o negativo, respectivamente) del resto de componentes que eluyen del cromatógrafo. El tercer cuadrupolo actúa como analizador de masas y registra los productos obtenidos en el proceso de disociación al que son sometidos los iones seleccionados en el primer cuadrupolo (denominados iones precursores o iones padre). Este proceso de disociación es inducido por un gas ionizado y acelerado en el segundo cuadrupolo, de forma que colisiona con las moléculas de analito provocando su fragmentación. Este tipo de fragmentación recibe el nombre de “disociación

inducida por colisiones". Un esquema del instrumento se puede ver en la **figura II.8.** En el apartado II.7.3.5. se describirán los cuatro modos de trabajo posibles en MS/MS con un instrumento de triple cuadrupolo: *product-ion scan (PIS)*, *multiple reaction monitoring (MRM)*, *constant neutral loss* y *precursor-ion scan*.

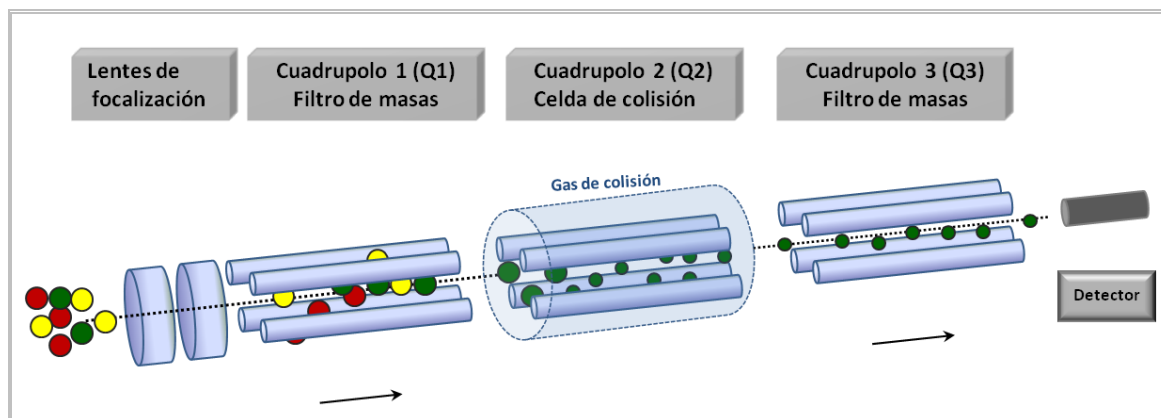


Figura II.8. Esquema del funcionamiento de un analizador de triple cuadrupolo. Q1: filtro de masas trabajando con una masa objetivo (color verde). Q2: el segundo cuadrupolo está envuelto por una atmósfera de gas reactivo, utilizado para la fragmentación. Q3: filtro de masas trabajando en *full scan*.

Estos instrumentos son robustos, de relativo bajo coste y fáciles de operar. Además, permiten monitorizar un gran número de transiciones ión precursor → ión fragmento en un único análisis. Sin embargo, la velocidad de escaneo de este tipo de instrumentos limita el número de transiciones que se pueden monitorizar simultáneamente con sensibilidad y precisión adecuadas. Este número de transiciones depende del instrumento (del valor de *dwell time* con el que opere el equipo). Por lo tanto, para obtener una buena resolución de los picos cromatográficos se requiere que las transiciones ión precursor → ión fragmento sean agrupadas en segmentos de tiempo (dependiendo del tiempo de retención esperado para los analitos de interés). Esto supone una desventaja a la hora de ampliar el número de compuestos que se analizan, puesto que para introducir una nueva transición en un método en uso el operador a menudo tiene que reorganizar los segmentos de tiempo establecidos. Además, si el nuevo compuesto eluye a un tiempo comprendido entre dos segmentos de tiempo, las transiciones ión precursor → ión fragmento que lo identifican deben ser incluidas en ambos segmentos. Para solventar este problema, distintos fabricantes han diseñado recientemente varios software que no requieren el establecimiento de segmentos de tiempo [220-222].

En cualquier caso, los instrumentos LC-MS de triple cuadrupolo son probablemente los más utilizados en los laboratorios para análisis de rutina de compuestos tóxicos, tanto en muestras medioambientales [223-224] como agroalimentarias [225-227].

- *Q-TRAP*. Estos instrumentos híbridos se podrían describir como un triple cuadrupolo en el que el tercer cuadrupolo ha sido sustituido por una trampa lineal. Ofrecen una gran velocidad de barrido de masas que permite realizar múltiples experimentos MS/MS simultáneamente. Por lo tanto, es posible obtener información estructural de los compuestos analizados y se puede operar en los mismos modos de trabajo que en un triple cuadrupolo. Una aplicación destacable de este tipo de instrumento, por afinidad con esta Tesis, es la determinación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva [144].

- *Cuadrupolo-Tiempo de vuelo (Q-TOF)*. En estos instrumentos, los iones producidos en la fuente son introducidos en el cuadrupolo (Q), donde algunos de ellos son seleccionados para una posterior fragmentación en un hexapolo que actúa como celda de colisión. Los iones fragmento que abandonan el hexapolo son focalizados hacia el analizador de tiempo de vuelo (TOF), donde son separados en función de su relación masa-carga con gran exactitud. Como resultado, se obtiene un espectro MS/MS de iones fragmento con gran exactitud de masa (4 cifras decimales), siendo ésta la principal característica de este tipo de instrumentos.

El uso de esta técnica para la determinación de residuos tóxicos en alimentos está aumentando en los últimos años, como muestran algunas publicaciones recientes [228-231].

- Instrumentos híbridos más sofisticados son *LTQ-FTICR* y *LTQ-Orbitrap*, de elevado coste y apenas utilizados en análisis alimentario. Ambos instrumentos ofrecen la posibilidad de monitorizar iones precursores e iones fragmento con alta resolución y exactitud, de gran utilidad en análisis estructural.

II.7.3.5. Modos de trabajo típicos de los analizadores de masas.

- *Full Scan*. El analizador separa todos los iones procedentes del eluyente de la columna cromatográfica según su relación m/z y los conduce hacia el detector, sin ninguna restricción.
- *Selected Ion Monitoring (SIM)*. Consiste en seleccionar la molécula protonada (en modo de ionización positivo) o deprotonada (en modo de ionización negativo) y al menos el fragmento más intenso. Estos iones son utilizados para la identificación del compuesto. Es una práctica común seleccionar al menos dos iones fragmento para la identificación de plaguicidas en alimentos. Este modo de trabajo requiere, por tanto, el conocimiento del compuesto que se está analizando. Este modo de trabajo se suele utilizar en los instrumentos de cuadrupolo sencillo.
- Los instrumentos de triple cuadrupolo poseen cuatro modos de trabajo en MS/MS, principalmente: *product-ion scan (PIS)*, *multiple reaction monitoring (MRM)*, *constant neutral loss* y *precursor-ion scan*. Estos cuatro modos de trabajo se corresponden con las cuatro combinaciones posibles entre los modos de operación de los cuadrupolos 1 y 3 (ver **tabla II.5**). Cada uno de ellos puede operar en *full scan* o SIM. El cuadrupolo 2 (Q2) operará en todo momento como celda de colisión.

Tabla II.5. Modos de trabajo MS/MS disponibles en un instrumento de triple cuadrupolo.

| Modo de trabajo | Configuración Q1 | Configuración Q2 |
|------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Product-ion scan | SIM iones precursores | Full Scan |
| Multiple reaction monitoring (MRM) | SIM iones precursores | SIM iones fragmento |
| Constant neutral loss | Full Scan | Full Scan |
| Precursor-ion scan | Full Scan | SIM iones fragmento |

- *Product Ion Scan*. El primer cuadrupolo (Q1) selecciona el ión de interés de un analito o analitos de interés, y envía únicamente estos iones seleccionados (iones precursores) a la celda de colisión (Q2), donde serán fragmentados mediante CID. Todos los iones fragmento serán entonces enviados al tercer cuadrupolo (Q3), donde serán separados

en función de su relación masa-carga previamente a su llegada al detector. De este modo, se obtiene el espectro de fragmentación de las especies de interés.

- *Multiple Reaction Monitoring (MRM)*. A veces se denomina *selected reaction monitoring (SRM)*, y se basa en la selección de los iones de interés en el cuadrupolo 1 (iones precursores), los cuales serán enviados al segundo cuadrupolo para su fragmentación. Finalmente, los fragmentos característicos (iones fragmento o producto) de cada compuesto serán monitorizados en el cuadrupolo 3.

- *Constant neutral loss scanning*. En este modo de trabajo, Q1 y Q3 escanean todos los iones que les llegan sincronizadamente, de forma que se establece una diferencia de masa fija entre ambos cuadrupolos. Por lo tanto, el instrumento puede calcular la pérdida de masa que sufren los iones entre Q1 y Q3 (es decir, en la celda de colisión Q2). Por ejemplo, si la pérdida de masa es de 50, mientras Q1 está escaneando a m/z 200, Q3 está escaneando a m/z 150. El valor de m/z 150 es registrado por detector junto con el valor de m/z detectado en Q1 a ese mismo tiempo. Este modo de trabajo es muy útil para la identificación de ciertas familias de compuestos, como las triazinas, que sufren una pérdida común de propileno (m/z 42). Hasta hace muy poco, sólo los instrumentos de triple cuadrupolo tenían la habilidad de trabajar en *constant neutral loss scanning*, pero recientemente se han desarrollado instrumentos Q-TOF que también ofrecen esta posibilidad.

- *Precursor Ion Scan*. Q1 opera en modo scan mientras que Q3 selecciona uno o varios iones específicos generados en la celda de colisión (Q2) y que son monitorizados en el detector. Cuando el ión de interés es detectado en Q3, el valor de m/z encontrado en ese momento en Q1 es registrado en conjunción con la intensidad registrada por el detector. Este modo de trabajo se utiliza para la identificación del ión precursor cuando los iones fragmento producidos en la celda de colisión pueden pertenecer a varios compuestos de una misma familia.

En una trampa de iones (tanto lineal como cuadrupolar), es el mismo analizador el que primero actúa como filtro, luego como cámara de colisión y por último como filtro separador de masas (pudiendo ser registrados todos los fragmentos obtenidos o sólo unos pocos

seleccionados por su abundancia). Por lo tanto, en un análisis MS/MS una trampa de iones permite trabajar en los modos SIM y PIS.

II.7.4. Antecedentes.

II.7.4.1. Bebidas de frutas no alcohólicas.

A) ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN BEBIDAS MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.

El análisis de plaguicidas en bebidas de frutas no alcohólicas mediante técnicas cromatográficas se ha investigado mayoritariamente en zumos [102]. Tradicionalmente, la técnica cromatográfica de elección ha sido la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas, siendo muy utilizados los instrumentos cuadrupolares debido a su bajo coste [108,112,232]. También se pueden encontrar en la bibliografía métodos para la determinación de plaguicidas en zumos mediante GC-MS con trampa de iones [233]. Sin embargo, el aumento de la polaridad de los plaguicidas ha hecho que cada vez se desarrollen más métodos basados en el acoplamiento LC-MS. Principalmente, se ha empleado la detección por espectrometría de masas en tándem con instrumentos LC-MS/MS de triple cuadrupolo [52,113,234-235], aunque también se han utilizado instrumentos provistos de una trampa de iones cuadrupolar [111].

Más escasa es la bibliografía encontrada para el análisis de plaguicidas en bebidas refrescantes. En todos los casos, las bebidas carbonatadas requieren una desgasificación previa a su análisis. Se han utilizado la cromatografía de gases con detector de captura electrónica [115] y GC-MS cuadrupolar [116]. También se han empleado instrumentos LC-MS, con detectores de tiempo de vuelo [117] y triple cuadrupolo [114].

No se ha realizado ningún estudio analítico a gran escala para evaluar la presencia de plaguicidas en este tipo de productos.

B) ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS MONOCÍCLICOS EN BEBIDAS MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.

Aunque la presencia de BTEXS no es esperada en bebidas, debido al carácter lipofílico de los mismos, y a la ausencia de disolventes en el proceso de fabricación del alimento, en los últimos años se han publicado algunos artículos en los que se analizan, por ejemplo, residuos de benceno [118] en refrescos del mercado belga, o de benceno y tolueno [119] en refrescos del mercado italiano. En el primer caso, la presencia de benceno en este tipo de bebidas a bajos niveles era el resultado de la reacción del ácido benzoico con ácido ascórbico y otros reguladores de acidez presentes en los refrescos. Sin embargo, en el estudio italiano se encontró que la presencia de benceno y tolueno en refrescos se debía a contaminación ambiental. En todos los trabajos el análisis de las muestras se realizó mediante GC-MS, pero difieren en el modo de introducción de la muestra: en el estudio belga se utilizó la técnica de espacio de cabeza estático, mientras que en el italiano la técnica de elección para la introducción de la muestra en el cromatógrafo fue la técnica de purga y trampa (espacio de cabeza dinámico).

II.7.4.2. Alimentos infantiles elaborados a partir de frutas y vegetales.

A) ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS INFANTILES ELABORADOS A PARTIR DE FRUTAS Y VEGETALES.

La determinación de residuos de plaguicidas volátiles en alimentos infantiles se ha llevado a cabo fundamentalmente mediante el uso de GC-MS con analizadores de cuadrupolo sencillo [125-128]. No obstante, también se han utilizado GC-MS provistos de analizadores de tiempo de vuelo (GC-TOFMS) [122,130], cuyo uso es menos común en el campo del análisis de residuos. Para el análisis de plaguicidas más polares en alimentos infantiles la técnica más usada ha sido la cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), empleando analizadores de triple cuadrupolo [124,129,131,236].

Al comenzar esta Tesis no existía ninguna referencia sobre la determinación de plaguicidas en alimentos infantiles mediante LC-TOFMS.

B) ANÁLISIS DE BTEXS EN ALIMENTOS INFANTILES ELABORADOS A PARTIR DE FRUTAS Y VEGETALES.

Un estudio reciente determinó la presencia de benceno a bajos niveles de concentración ($< 1 \mu\text{g L}^{-1}$) en zumos infantiles de zanahoria (además de en otras bebidas), como consecuencia del calentamiento al que eran sometidos estos alimentos durante su etapa de elaboración. Las muestras se analizaron mediante HS-GC-MS tras ajustarle el pH a 10 [132].

II.7.4.3. Aceite de oliva y aceituna.

A) ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN ACEITE DE OLIVA Y ACEITUNA MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.

Para la determinación de residuos de plaguicidas no polares y volátiles en aceite de oliva y aceituna la técnica más utilizada actualmente es la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS), con analizadores de triple cuadrupolo [133,141] y trampa de iones [134,136-137]. Esta técnica mejora la sensibilidad, selectividad y grado de confirmación de los analitos con respecto al análisis de residuos de plaguicidas mediante GC-MS con analizadores de cuadrupolo sencillo [237], muy utilizados en análisis de rutina en los últimos años [46,48,49]. En cuanto al análisis de plaguicidas más polares en aceite de oliva y aceituna, la técnica más usada ha sido la cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), empleando fundamentalmente analizadores de triple cuadrupolo [46,48,139], aunque también ha sido descrito un método basado en el uso de un instrumento híbrido cuadrupolo-trampa de iones lineal (QqLIT ó QTRAP) [144].

La principal desventaja del uso de espectrometría de masas en tándem es la necesidad de agrupar las transiciones de interés en segmentos de tiempo, debido a que para introducir una nueva transición en un método en uso el operador a menudo tiene que reorganizar los segmentos de tiempo establecidos. Para solventar este problema, como se ha comentado anteriormente, distintos fabricantes han diseñado recientemente varias herramientas de software que no requieren el establecimiento de segmentos de tiempo [220-222].

B) ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS MONOCÍCLICOS EN ACEITE DE OLIVA Y ACEITUNA MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.

Los métodos publicados para la determinación de BTEX están en su mayoría aplicados a muestras medioambientales. La técnica habitualmente empleada es GC-MS utilizando espacio de cabeza estático (HS) o dinámico (purga y trampa) [238] para la introducción de la muestra.

Los métodos de determinación de estos compuestos en aceites son muy escasos. Así, en la literatura existen hasta la fecha sólo unos pocos métodos que abordan la determinación de BTEX en aceite de oliva virgen. Dos de los métodos utilizan el espacio de cabeza estático seguido de GC-MS [20,145], y un tercero propone una extracción líquido-líquido previa de la muestra utilizando nanotubos de carbono recubiertos de un surfactante como paso previo al análisis de BTEXS por HS-GC-MS [148]. También se ha propuesto un método rápido de screening para la detección de BTEX por combinación directa del muestreo por espacio de cabeza estático y la detección por espectrometría de masas [146]. Se ha descrito también la aplicación de la microextracción en fase sólida (SPME) como medio de introducción de la muestra, aplicándose el método a aceites vegetales [147].

Para realizar estudios sobre el origen de la presencia de estos compuestos en aceite de oliva resulta imprescindible abordar además el análisis de la materia prima, la aceituna, con el fin de determinar si la incorporación de los mismos se produce fundamentalmente ya en el propio árbol o si tiene lugar durante las etapas de transporte y extracción del aceite. No se ha encontrado ninguna referencia acerca de la determinación de BTEXS en aceituna previa a esta Tesis.

III. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN



III.1. ANALITOS

Los patrones de los plaguicidas de calidad analítica fueron adquiridos bien de Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania), o bien de Riedel-de-Häen (Seelze, Alemania). Los nombres de los plaguicidas se han mantenido en inglés a lo largo de toda la Tesis. Se prepararon disoluciones concentradas ($200 - 300 \text{ mg L}^{-1}$) de cada plaguicida en metanol o acetonitrilo y se almacenaron en el congelador ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$). Posteriormente se preparó en metanol una disolución de trabajo (10 mg L^{-1}) que contenía la mezcla de los plaguicidas a analizar en cada estudio. La disolución de trabajo también se conservó a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los patrones de benceno, tolueno, etilbenceno, estireno, y los isómeros *o*-, *m*- y *p*-xileno fueron adquiridos de Riedel-de-Häen (Seelze, Alemania) con calidad analítica (OEKANAL®). Se prepararon disoluciones concentradas de cada uno de estos hidrocarburos en metanol (1000 mg L^{-1}). Posteriormente se preparó en metanol una disolución concentrada (100 mg L^{-1}) que contenía la mezcla de los compuestos. Mediante dilución de la disolución concentrada que contenía la mezcla de los compuestos, se prepararon disoluciones de trabajo (también en metanol) de concentraciones 1 y 10 mg L^{-1} (de cada uno de los analitos presentes en la mezcla). Todas las disoluciones se conservaron a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$, mientras que los patrones puros se conservaron refrigerados ($+4 \text{ }^\circ\text{C}$).

III.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

III.2.1. Reactivos

a) Disolventes

El acetonitrilo y el metanol de grado HPLC se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El sistema de agua Mili-Q-Plus ultrapura de Millipore (Milford, MA, EEUU) se empleó para obtener agua de grado HPLC para los análisis. Éter de petróleo, acetato de etilo y n-hexano fueron adquiridos en Riedel-de-Häen (Seelze, Alemania). El ácido acético era de la marca Panreac (Barcelona, España).

En todos los casos, los extractos fueron filtrados a través de un filtro de HPLC de PTFE de 0.45 μm de poro (Millex FG, Millipore, Milford, MA, EEUU) como paso previo a su trasvase a un vial.

b) Método QuEChERS para muestras con bajo contenido graso

La amina primaria-secundaria (Supelclean™ PSA SPE Bulk Packing, 50 μm) se obtuvo de Supelco (Bellefonte, CA, EEUU). El sulfato de magnesio anhidro y el acetato sódico eran de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

c) Método QuEChERS para muestras con alto contenido graso (aceite de oliva y aceituna)

La amina primaria-secundaria (Supelclean™ PSA SPE Bulk Packing, 50 μm) y el carbón grafitizado (Supelclean™ ENVI-Carb™ SPE Bulk packing, 120-400 mesh) se obtuvieron de Supelco (Bellefonte, CA, EEUU). El sulfato de magnesio anhidro era de Sigma-Aldrich (Madrid, España), mientras que el cloruro sódico fue adquirido de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EEUU). La fase sólida C_{18} fue adquirida de Análisis Vínicos (Tomelloso, España).

d) Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)

La fase sólida aminopropil (Bondesil-NH₂ Bond Elut, de 40 μm de tamaño de partícula) para la dispersión de la matriz fue obtenida de Varian Inc. (Palo Alto, Ca, EEUU). Los cartuchos de Florisil (1 g, 50 μm , 12 mL) fueron adquiridos de Análisis Vínicos (Tomelloso, España).

e) Extracción en fase sólida (SPE) de bebidas

Para la extracción en fase sólida se usaron cartuchos Oasis HLB® (200 mg, 6 mL) de Waters (Milford, MA, EEUU), junto con un dispositivo de vacío para SPE: Supelco Visiprep®, de Supelco.

III.2.2. Instrumentación

La extracción en fase sólida se llevó a cabo en un dispositivo de vacío para SPE: Supelco Visiprep®, de Supelco (Bellefonte, CA, EEUU). El dispositivo se muestra en la **figura III.1**.



Figura III.1. Dispositivo de vacío utilizado para la extracción en fase sólida (Supelco Visiprep®).

La evaporación de los extractos se realizó bajo corriente de nitrógeno bien de forma manual utilizando un adaptador para tubos de ensayo con 6 salidas, o bien utilizando un evaporador-concentrador Turbovap LV (Caliper LifeSciences, Hopkinton, MA, EEUU) con capacidad para 48 tubos de ensayo, que permitía monitorizar y controlar la presión de N₂ y la temperatura del baño de agua. El evaporador utilizado se muestra en la **figura III.2**.



Figura III.2. Evaporador-concentrador Turbovap LV, utilizado para la evaporación de los extractos.

Para el análisis multi-residuo de contaminantes en aceitunas, es necesaria una molienda de las mismas. Este proceso se llevó a cabo en un molino especialmente diseñado para la trituración de aceitunas (ver **figura III.3**), que se fabrica por encargo (Talleres Lopera, Priego de Córdoba, Córdoba). Las dimensiones del molino eran: 45 cm (largo) x 51.5 cm (alto) x 35 mm (ancho), 40 kg (peso). El molino consistía en una tolva que conducía las aceitunas a un tornillo sin fin conectado a un rotor (1.1 kW). El rotor tritura las aceitunas (incluyendo el hueso), que posteriormente pasan a través de una criba con orificios de pequeño tamaño (5 mm d.i.). Bajo la criba se emplaza el recipiente para la muestra.



Figura III.3. Molino triturador de aceituna (modelo M-R, Talleres Lopera).

III.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

III.3.1. Disolventes y aditivos para la fase móvil

El acetonitrilo y el metanol de grado HPLC se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El ácido fórmico y el formiato amónico (calidad de aditivo para fase móvil de LC-MS) se obtuvieron de Fluka (Buchs, Suiza).

III.3.2. HPLC-TOF MS Agilent MSD TOF

El sistema de cromatografía de líquidos (HPLC) utilizado fue un Agilent Series 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU), compuesto por una bomba binaria, un mezclador, un degasificador y un muestreador automático que es capaz de tomar volúmenes comprendidos entre 0.1 – 100 μL con gran precisión. El muestreador automático tiene capacidad para 100 viales de 2 mL.

El HPLC estaba conectado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Agilent 6220. La calibración del equipo para llevar a cabo medidas de masa exacta se realizó mediante un sistema automático y continuo que utiliza una fuente ESI dual, de modo que se introduce simultánea y ortogonalmente al efluente del HPLC una disolución calibrante (disolución calibrante A, Agilent Technologies). La disolución calibrante contiene una mezcla de concentración conocida de dos sustancias cuyas masas se utilizan como referencia interna: purina ($C_5H_4N_4$, de m/z 121.0508739) y HP-921 [hexakis-(1*H*, 1*H*, 3*H*-tetrafluoropentoxo)-phosphazene] ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$, de m/z 922.009798). El software del instrumento registra continuamente los valores de las masas internas de referencia y se autocalibra al mismo tiempo que registra los resultados de la muestra. El instrumento usado proporciona una resolución típica de 9700 ± 500 a media altura de pico (FWHM) a un valor de m/z 922. La velocidad de barrido era superior a 20 scans por segundo. En la **Figura III.4.** se muestra una fotografía del instrumento utilizado.



Figura III.4. Equipo de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS Agilent MSD TOF) utilizado en los experimentos. Grupo de investigación Residuos de plaguicidas (AGR-0159). Universidad de Almería.

Para el control del HPLC-TOF MS, adquisición de datos y procesamiento de resultados se utilizó el programa Analyst (for Agilent TOF) de Applied Biosystem / MDS SCIEX (Frankfurt, Alemania).

III.3.3. HPLC-QqQ MS Agilent 6410 Triple Quad

El sistema de cromatografía de líquidos (HPLC) utilizado fue un Agilent Series 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU), compuesto por una bomba binaria, un mezclador, un desgasificador y un muestreador automático que es capaz de tomar volúmenes comprendidos entre 0.1 – 100 μ L con gran precisión. El muestreador automático tiene capacidad para 100 viales de 2 mL.

El HPLC estaba conectado a un espectrómetro de masas de triple cuádrupolo Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) equipado con una fuente de electrospray (ESI). El instrumento utilizado se muestra en la **Figura III.5**.



Figura III.5. Equipo de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas con analizador de triple cuádrupolo (LC-QQQMS Agilent 6410 Triple Quad) utilizado en los experimentos. Grupo de investigación Residuos de plaguicidas (AGR-0159). Universidad de Almería.

Para el control del HPLC-MS, adquisición de datos y procesado de resultados se utilizó el programa Agilent MassHunter WorkStation (versión B.03.01) de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EEUU), que incluye la herramienta Dynamic Multiple Reaction Monitoring (DMRM) para la adquisición de datos en modo MS/MS y la herramienta MassHunter Optimizer para la optimización automática del voltaje de fragmentación y la energía de colisión de cada transición MRM.

III.3.4. GC-MS Varian 300-MS

El sistema de cromatografía de gases (GC) utilizado fue un Varian CP-3800 (Varian Inc., Walnut Creek, California USA), equipado con control de flujo electrónico (EFC) y un inyector universal capilar 1079, que permitía la inyección con rampa de temperatura (PTV injection port). El cromatógrafo de gases también disponía de un muestreador automático CombiPal (CTC Analytics) con capacidad para 98 viales de 2 mL y 32 viales 10 o 20 mL para análisis mediante las técnicas de espacio de cabeza (HS) o microextracción en fase sólida (SPME), compuesto por un horno para el calentamiento de los viales en los experimentos de HS, SPME y HS-SPME, y un brazo robótico donde se emplaza la jeringa intercambiable (según se trabaje en inyección líquida, espacio de cabeza ó SPME). La separación se realizó en una columna capilar Varian FactorFour VF-5ms (30m x 0.25 mm id x 0.25 micras de espesor de película), usando como gas portador helio con un caudal de 1.5 mL min⁻¹.

El cromatógrafo de gases estaba conectado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Varian 300-MS (Varian Inc. Walnut Creek, California, EE.UU.) mediante una línea de transferencia inerte. La ionización por impacto electrónico se realizó a 70 eV. Al filamento se le aplicó una corriente de 50 μ A y al multiplicador una tensión de 1300 V. Se fijó un tiempo de retardo de varios minutos para el encendido del multiplicador, al objeto de prevenir la sobresaturación del detector con el frente del disolvente. El espectrómetro de masas se calibró con perfluorotributilamina (PFTBA).

Para el control del GC-MS, adquisición de datos y procesado de resultados se utilizó el programa de Varian MS WorkStation (versión 6.9). En la **Figura III.6.** se puede ver una fotografía del instrumento utilizado.



Figura III.6. Equipo de cromatografía de gases/espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo (GC-300MS Varian) utilizado en los experimentos.

En los estudios de HS-GC-MS se utilizaron viales de 20 mL de fondo plano (22.7 mm diámetro externo x 75 mm) con sellos magnéticos de PTFE-silicona (3.0 mm d.i.), que fueron obtenidos de Supelco (Madrid, España). Para la agitación de la muestra, se introducía en cada uno de los viales un imán recubierto de teflón (6 mm x 12 mm).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CAPÍTULO IV.1



Desarrollo de un método para el análisis de residuos de fungicidas en alimentos infantiles derivados de fruta mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas de tiempo de vuelo.

IV.1. DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE FUNGICIDAS EN ALIMENTOS INFANTILES ELABORADOS A PARTIR DE FRUTA Y VERDURA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO (LC-TOFMS).

IV.1.1. Resumen

En este trabajo se ha desarrollado un método para la determinación de 12 fungicidas (carbendazim, thiabendazole, imazalil, tridemorph, triadimefon, bitertanol, prochloraz, flutriafol, myclobutanil, iprodione, diphenylamine y procymidone) en alimentos infantiles elaborados a base de fruta (purés y zumos). El método desarrollado parte de una preparación de muestra basada en una extracción con acetonitrilo seguida de una extracción en fase sólida dispersiva con amina primaria-secundaria (PSA), para el caso de los purés o purés de fruta. Los zumos infantiles fueron procesados mediante extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos poliméricos Oasis HLB®. Tras la preparación de la muestra por el procedimiento correspondiente, los extractos fueron analizados mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por electrospray (LC-TOFMS). La identificación y confirmación de los compuestos de interés se basó en las medidas de masa exacta de los iones seleccionados para cada compuesto, generalmente la molécula protonada y un fragmento de intensa señal. En la mayoría de los casos, los errores de masa obtenidos a bajos niveles de concentración ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) fueron inferiores a 2 ppm. El estudio del efecto matriz reveló que el aumento o disminución en la señal de los analitos con respecto a su señal en disolvente era inferior al 20% para la mayoría de los compuestos estudiados. Las recuperaciones obtenidas en extractos de purés a un nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ variaban entre el 78 y el 105% para la mayoría de los plaguicidas, con desviaciones estándar relativas (RSD) menores del 10%. Los límites de detección (LODs) obtenidos estaban en el rango $0.1 - 4 \mu\text{g kg}^{-1}$, dependiendo del compuesto. Finalmente, el método propuesto se aplicó satisfactoriamente a un total de 33 muestras de purés compradas en España y el Reino Unido. Aunque imazalil, thiabendazole y carbendazim fueron detectados en un gran número de muestras (en torno al 60%), ninguna de las muestras analizadas superaba el límite de residuos máximo permitido (MRL) establecido por la normativa vigente en la Unión Europea (0.01 mg kg^{-1}).

IV.1.2. Experimental

IV.1.2.1. Preparación de muestra

a) Purés de frutas

Para la preparación de la muestra se utilizó el llamado método QuEChERS [40,44,127]. El procedimiento propuesto para este estudio constaba de los siguientes pasos: una porción representativa de la muestra de 15 g fue pesada en un tubo de centrifuga de plástico de 50 mL de capacidad. Acto seguido se añadieron 15 mL de acetonitrilo (MeCN) con 1% (v/v) de ácido acético (HAc) y el tubo se agitó manualmente durante 1 minuto. Después se añadieron 6 g de sulfato de magnesio anhidro ($MgSO_4$) y 1.5 g de acetato sódico (AcNa). Inmediatamente después (para evitar la coagulación del sulfato de magnesio anhidro) el tubo se agitó de nuevo energicamente durante 1 minuto y posteriormente la mezcla se centrifugó a 3700 revoluciones por minuto (rpm) durante otro minuto. Una vez separadas las fases, se tomaron 5 mL del sobrenadante (extracto de acetonitrilo) que fueron transferidos a un tubo de centrifuga de plástico de 15 mL de capacidad al que se habían añadido previamente 750 mg de $MgSO_4$ y 250 mg de PSA (amina primaria-secundaria). El segundo tubo fue inmediatamente agitado durante 20 s y después se centrifugó a 3700 rpm durante 1 min. De este modo se obtuvo un extracto en acetonitrilo que contenía el equivalente de 1 g de muestra por mililitro de extracto. Un volumen de 3 mL de dicho extracto fue evaporado en un tubo de ensayo de vidrio hasta casi sequedad bajo una corriente de nitrógeno, para posteriormente ser reconstituido con 0.3 mL de metanol (MeOH) y 2.7 mL de agua ultrapura (milli Q). Finalmente, el extracto fue filtrado a través de un filtro de 0.45 μm y transferido a un vial para su análisis mediante HPLC-MS. En la **figura IV.1.1.** se puede ver un esquema de este procedimiento.

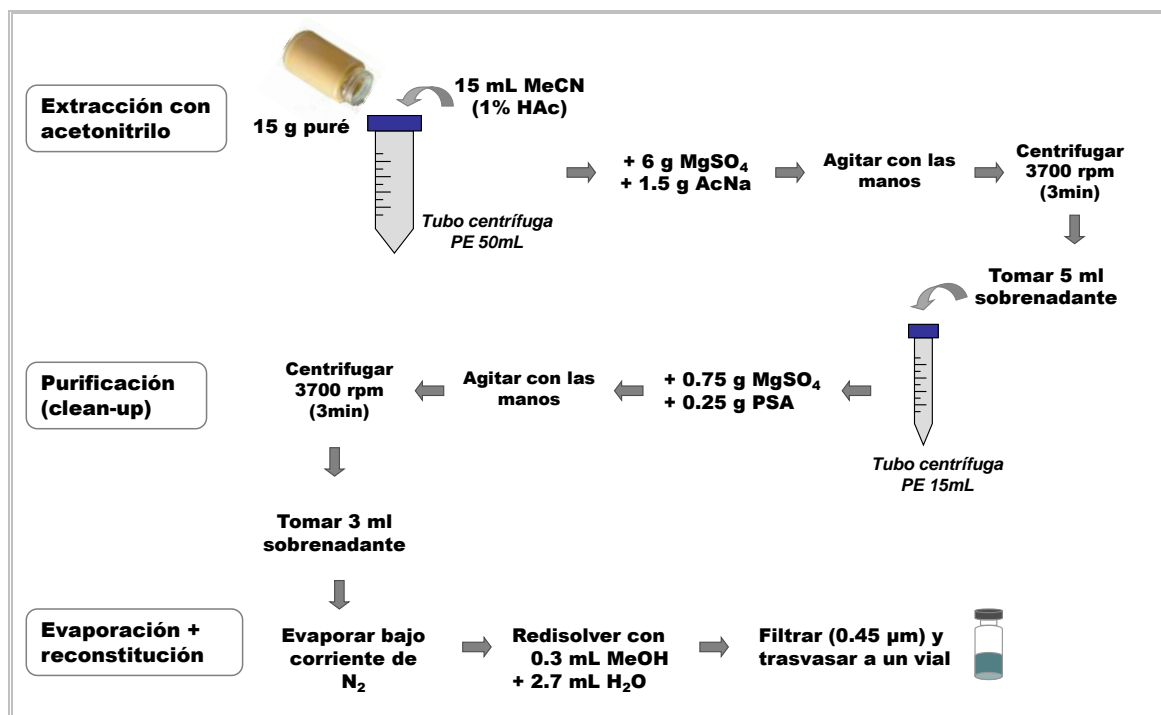


Figura IV.1.1. Esquema de la obtención del extracto de purés de frutas mediante el método QuEChERS.

b) Zumos infantiles

El procedimiento seguido aparece esquematizado en la **figura IV.1.2** y consta de las siguientes etapas:

- 1) *Acondicionamiento*: Se acondiciona el cartucho de SPE Oasis HLB® (200 mg/ 6 mL) con 5 mL de metanol (MeOH) seguidos de 5 mL de agua ultrapura, todo ello con un caudal de unos 2 mL min⁻¹.
- 2) *Carga de muestra*: Se pasan 30 mL de zumo a través del cartucho, a un flujo de unos 3 mL min⁻¹.
- 3) *Elución*: Los analitos retenidos en el cartucho son eluidos con 5 mL de MeOH a un flujo de 1 mL min⁻¹. El eluato se recoge en un tubo de ensayo de 15 mL.
- 4) El extracto se evapora bajo corriente de N₂ hasta casi sequedad y luego se reconstituye con 2 mL de H₂O ultrapura y 1 mL de metanol. De esta forma, tenemos un factor de preconcentración de 10 (30 mL ⇒ 3 mL). El último paso es filtrar el extracto con un filtro de HPLC de PTFE de 0.45 μm de poro (PTFE filter, Millex FG, Millipore, Milford, MA) y trasvasar a un vial. Si no se va a realizar el análisis de forma inmediata, conservar en frío a - 20°C.

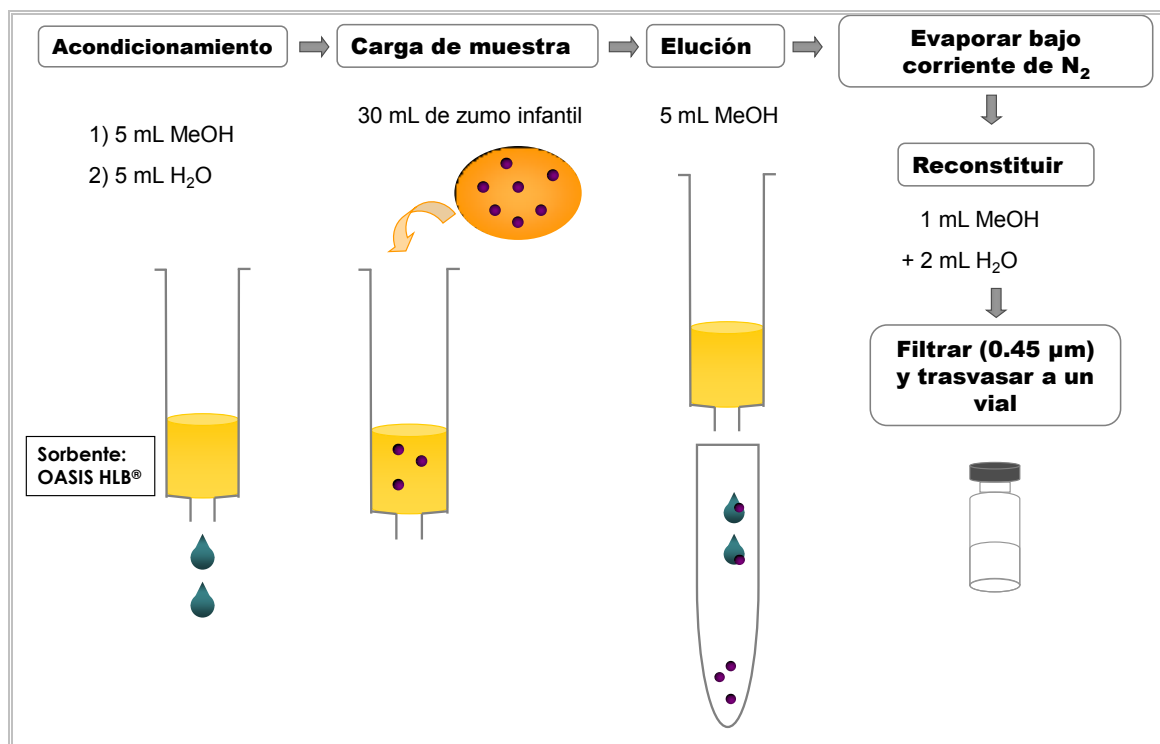


Figura IV.1.2. Esquema de la obtención del extracto de zumos infantiles mediante SPE.

IV.1.2.2. Fortificación de las muestras para los estudios de recuperación.

a) *Purés de fruta.* En un mortero de vidrio se pesó una porción homogénea y representativa de 200 g de un puré elaborado con un 100% de puré de fruta. A continuación se le añadió el volumen apropiado de la disolución concentrada (10 mg L^{-1}) que contenía la mezcla de fungicidas, de modo que la muestra quedase fortificada a un nivel de concentración de 10 µg kg^{-1} . Después la mezcla se agitó durante una hora para su homogeneización. Transcurrido ese tiempo, se dejó a temperatura ambiente durante una hora más para que se evaporase el disolvente. Finalmente, se conservó a -18°C hasta su análisis. Para realizar el estudio de recuperación, se tomaron 6 porciones, de 15 g cada una, de la mezcla fortificada y se sometieron individualmente al proceso de extracción descrito en el apartado IV.1.2.1.

b) *Zumos infantiles.* Los zumos infantiles se dividieron en porciones de 30 mL y se fortificaron a distintos niveles de concentración, en el rango: $5 - 12 \text{ µg L}^{-1}$. Posteriormente, cada una de esas muestras fortificadas se sometió al proceso de extracción descrito en el apartado IV.1.2.1.

IV.1.2.3. Parámetros instrumentales del análisis cromatográfico.

En este estudio se utilizó el equipo HPLC-TOFMS Agilent MSD TOF descrito en el capítulo III. Los valores óptimos elegidos para los parámetros instrumentales fueron los siguientes:

a) Condiciones cromatográficas:

- Fases móviles: A = H₂O (0.1% HCOOH, v/v); B = Acetonitrilo.
- Gradiente: durante 5 min se mantiene constante un 10% de B, seguido de un gradiente lineal hasta el 100% B a los 30 min.
- Velocidad de flujo: 0.6 mL min⁻¹.
- Columna: C8, 150 mm × 4.6 mm i.d. y 5 μm de tamaño de partícula (Zorbax Eclipse XDB-C8, Agilent).
- Volumen de inyección: 50 μL.
-

b) Espectrómetro de masas:

- Fuente: ESI (+)
- Voltaje del capilar: 4000 V
- Temperatura de la fuente: 300 °C
- Presión del gas de secado (N₂): 40 psig
- Flujo del gas de secado: 9 L min⁻¹
- Voltaje de fragmentación en la fuente: 190 V
- Rango de masas: 50 – 1000 m/z
- Resolución: 9700 ± 500

IV.1.3. Resultados y discusión

IV.1.3.1. Identificación, confirmación y cuantificación mediante LC-TOFMS.

Los parámetros de la fuente fueron optimizados para conseguir la mayor sensibilidad. Sin embargo, a excepción del voltaje de fragmentación en la fuente (fragmentor voltage), en el rango estudiado ninguno de ellos afectaba significativamente a la señal de los analitos. Se estudiaron tres valores para el voltaje de fragmentación: 160 V, 190 V y 250 V, al objeto de obtener baja, media o alta fragmentación de los compuestos de interés. Se eligió 190 V como un valor de compromiso entre sensibilidad de la molécula protonada (utilizada para la

cuantificación de los analitos) e información adicional proporcionada por los fragmentos a efectos de confirmación. Usando 190 V, al menos un fragmento podía ser usado para la confirmación de los compuestos, excepto para thiabendazole, imazalil y tridemorph, para los que no se observó una fragmentación significativa, ni siquiera a altos valores de voltaje. Para casi todos los fungicidas estudiados el ión más abundante era la molécula protonada, que fue utilizada para la cuantificación de los mismos (ver **Tabla IV.1.1**). Únicamente para prochloraz y bitertanol se utilizaron fragmentos de mayor intensidad que la molécula protonada (a efectos de cuantificación).

Tabla IV.1.1. Estudio de fragmentación en la fuente de los plaguicidas estudiados.

| Compuesto | m/z ion | Abundancia relativa (%) | | |
|---------------|--|-------------------------|-------|-------|
| | | 160 V | 190 V | 230 V |
| Carbendazim | 192 [M+H] ⁺ | 100 | 100 | 100 |
| | 160 [M+H - CH ₃ OH] ⁺ | 10 | 48 | 100 |
| Thiabendazole | 202 [M+H] ⁺ | 100 | 100 | 100 |
| | 175 [M+H - CHN] ⁺ | - | <1 | 9 |
| Imazalil | 297 [M+H] ⁺ | 100 | 100 | 100 |
| | 255 [M+H - C ₃ H ₆] ⁺ | - | <1 | 2 |
| | 159 [M+H - C ₇ H ₁₀ N ₂ O] ⁺ | - | <1 | 6 |
| Flutriafol | 302 [M+H] ⁺ | 100 | 100 | 48.9 |
| | 233 [M+H - C ₂ H ₄ N ₃] ⁺ | - | 4 | 21 |
| | 70 [C ₂ H ₄ N ₃] ⁺ | 3 | 15 | 100 |
| Tridemorph | 298 [M+H] ⁺ | 100 | 100 | 100 |
| Prochloraz | 376 [M+H] ⁺ | 100 | 40 | 2 |
| | 308 [M+H - C ₃ H ₄ N ₂] ⁺ | 23 | 100 | 100 |
| | 266 [M+H - C ₆ H ₁₀ N ₂] ⁺ | 2 | 5 | 23 |
| | 223 [M+H - C ₇ H ₁₁ N ₃ O] ⁺ * | - | 2 | 16 |
| Myclobutanil | 289 [M+H] ⁺ | 100 | 100 | 100 |
| | 220 [M+H - C ₂ H ₃ N ₂] ⁺ | - | - | 3 |
| | 125 [C ₇ H ₆ Cl] ⁺ | - | - | 16 |
| | 70 [C ₂ H ₄ N ₃] ⁺ | 2 | 4 | 73 |
| Triadimefon | 294 [M+H] ⁺ | 100 | 100 | 25 |
| | 225 [M+H - C ₂ H ₃ N ₃] ⁺ | 5 | 10 | 31 |
| | 197 [C ₁₁ H ₁₄ OCl] ⁺ | 6 | 10 | 100 |
| | 141 [C ₇ H ₆ OCl] ⁺ | - | - | 8 |
| | 69 [C ₅ H ₉] ⁺ | - | - | 18 |
| Bitertanol | 338 [M+H] ⁺ | 100 | 55 | 2 |
| | 269 [M+H - C ₂ H ₄ N ₃] ⁺ | 15 | 100 | 44 |
| | 251 [M+H - C ₂ H ₆ N ₃ O] ⁺ | - | 6 | 25 |
| | 70 [C ₂ H ₄ N ₃] ⁺ | 5 | 54 | 100 |
| Iprodione | 330 [M+H] ⁺ | 100 | 100 | 8 |
| | 352 [M+Na] ⁺ | 24 | 82 | 21 |
| | 288 [M+H - C ₃ H ₆] ⁺ | - | 13 | 12 |
| | 245 [M+H - C ₄ H ₇ N] ⁺ | 6 | 58 | 100 |
| Diphenylamine | 170 [M+H] ⁺ | 100 | 100 | 100 |
| | 153 [C ₁₂ H ₉] ⁺ | - | - | 4 |
| | 152 [C ₁₂ H ₉] ⁺ * | - | - | 2 |
| | 93 [C ₆ H ₇ N] ⁺ * | - | 5 | 51 |
| | 92 [C ₆ H ₆ N] ⁺ | - | 2 | 17 |
| Procymidone | 284 [M+H] ⁺ | 100 | 100 | 100 |
| | 256 [M+H - CO] ⁺ | 3 | 16 | 44 |

Las medidas de masa exacta se llevaron a cabo según el siguiente procedimiento: A partir del cromatograma de iones totales (TIC) se extrae la relación masa-carga (m/z) teórica de cada analito con una ventana de masa de 40 mDa. De este modo se obtiene el cromatograma de ión extraído (EIC). Como se ha indicado anteriormente, a excepción de prochloraz y bitertanol, para los que se utilizó un fragmento más abundante, para el resto de compuestos estudiados la cuantificación se realizó utilizando la masa exacta de la molécula protonada. A efectos de confirmación, además de los fragmentos se utilizaron los patrones isotópicos proporcionados por la presencia de átomos de cloro o azufre en la composición de algunos de los fungicidas analizados (por ejemplo: imazalil, thiabendazole, myclobutanil). En la **tabla IV.1.2.** se muestran los resultados obtenidos para la identificación y confirmación de los 12 fungicidas analizados en un extracto de puré fortificado a un nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Como se puede observar, la exactitud de masa es excelente, con errores inferiores a 2 ppm en la mayoría de los casos. En resumen, las medidas de masa exacta de la molécula protonada junto con los fragmentos característicos, el perfil isotópico y el tiempo de retención, permiten la identificación y confirmación de los plaguicidas estudiados a bajos niveles de concentración, como es el caso de los alimentos infantiles.

Tabla IV.1.2. Resultados de las medidas de masa exacta mediante LC-TOFMS de las moléculas protonadas y los principales fragmentos de los fungicidas estudiados en un extracto de puré fortificado a un nivel de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

| Compuesto | ion | Composiciones elementales | m/z teórica | m/z experimental | Error | |
|---------------|-----------------|---------------------------------|---------------|--------------------|-------|-----|
| | | | | | mDa | ppm |
| Carbendazim | $[M+H]^+$ | $C_9H_9N_3O_2$ | 192.0767 | 192.0762 | -0.55 | 2.9 |
| | Frg. | $C_8H_6N_3O$ | 160.0505 | 160.0502 | -0.33 | 2.1 |
| Thiabendazole | $[M+H]^+$ | $C_{10}H_8N_3S$ | 202.0433 | 202.0427 | -0.64 | 3.2 |
| | ^{34}S ion | $C_{10}H_8N_3^{34}S$ | 204.0391 | 204.0397 | -0.56 | 2.7 |
| Imazalil | $[M+H]^+$ | $C_{14}H_{15}N_2OCl_2$ | 297.0555 | 297.0555 | -0.09 | 0.3 |
| | ^{37}Cl ion | $C_{14}H_{15}N_2OCl^{37}Cl$ | 299.0526 | 299.0528 | 0.15 | 0.5 |
| Flutriafol | $[M+H]^+$ | $C_{16}H_{14}N_3OF_2$ | 302.1099 | 302.1096 | -0.34 | 1.1 |
| | Frg. 1 | $C_{14}H_{11}OF_2$ | 233.0772 | 70.0402 | 0.22 | 3.2 |
| | Frg. 2 | $C_2H_4N_3$ | 70.0399 | 233.0769 | -0.35 | 1.5 |
| Tridemorph | $[M+H]^+$ | $C_{19}H_{40}NO$ | 298.3104 | 298.3101 | -0.34 | 1.1 |
| Prochloraz | $[M+H]^+$ | $C_{15}H_{17}N_3O_2Cl_3$ | 376.0380 | 376.0379 | -0.18 | 0.5 |
| | ^{37}Cl ion | $C_{15}H_{17}N_3O_2Cl_2^{37}Cl$ | 378.0351 | 378.0349 | -0.23 | 0.6 |
| | $^{37}Cl_2$ ion | $C_{15}H_{17}N_3O_2Cl^{37}Cl_2$ | 380.0321 | 380.0319 | -0.28 | 0.8 |
| | Frg. 1 | $C_{12}H_{13}NO_2Cl_3$ | 308.0006 | 308.0004 | -0.24 | 0.8 |
| | ^{37}Cl ion | $C_{12}H_{13}NO_2Cl_2^{37}Cl$ | 309.9976 | 309.9974 | -0.29 | 0.9 |
| | $^{37}Cl_2$ ion | $C_{12}H_{13}NO_2Cl^{37}Cl_2$ | 311.9947 | 311.9946 | -0.14 | 0.4 |

| | | | | | | |
|---------------|-----------------|-------------------------------|----------|----------|-------|------|
| | Frg. 2 | $C_9H_7NO_2Cl_3$ | 265.9536 | 265.9532 | -0.49 | 1.8 |
| | ^{37}Cl ion | $C_9H_7NO_2Cl_2^{37}Cl$ | 267.9507 | 267.9504 | -0.34 | 1.3 |
| | $^{37}Cl_2$ ion | $C_9H_7NO_2Cl^{37}Cl_2$ | 269.9477 | 269.9478 | 0.012 | 0.1 |
| Myclobutanil | $[M+H]^+$ | $C_{15}H_{18}N_4Cl$ | 289.1214 | 289.1209 | -0.55 | 1.9 |
| | ^{37}Cl ion | $C_{15}H_{18}N_4^{37}Cl$ | 291.1185 | 291.1183 | -0.20 | 0.7 |
| | Frg. | $C_2H_4N_3$ | 70.0399 | 70.0402 | 0.22 | 3.2 |
| Triadimefon | $[M+H]^+$ | $C_{14}H_{17}N_3O_2Cl$ | 294.1003 | 294.1004 | 0.02 | 0.1 |
| | ^{37}Cl ion | $C_{14}H_{16}N_3O_2^{37}Cl$ | 296.0974 | 296.0977 | 0.27 | 0.9 |
| | Frg. 1 | $C_{12}H_{14}O_2Cl$ | 225.0676 | 225.0676 | -0.08 | 0.4 |
| | ^{37}Cl ion | $C_{12}H_{14}O_2^{37}Cl$ | 227.0647 | 227.0651 | 0.37 | 1.6 |
| | Frg. 2 | $C_{11}H_{14}OCl$ | 197.0727 | 197.0726 | -0.17 | 0.9 |
| | ^{37}Cl ion | $C_{11}H_{14}O^{37}Cl$ | 199.0698 | 199.0700 | 0.18 | 0.9 |
| Bitertanol | $[M+H]^+$ | $C_{20}H_{24}N_3O_2$ | 338.1863 | 338.1860 | -0.30 | 0.9 |
| | Frg. | $C_{18}H_{21}O_2$ | 269.1536 | 269.1535 | -0.10 | 0.4 |
| Iprodione | $[M+H]^+$ | $C_{13}H_{14}N_3O_3Cl_2$ | 330.0406 | 330.0400 | -0.67 | 2.0 |
| | ^{37}Cl ion | $C_{13}H_{14}N_3O_3Cl^{37}Cl$ | 332.0377 | 332.0377 | -0.07 | 0.1 |
| | Frg. 1 | $C_{10}H_8N_3O_3Cl_2$ | 287.9937 | 287.9928 | -0.92 | 3.2 |
| | ^{37}Cl ion | $C_{10}H_8N_3O_3Cl^{37}Cl$ | 289.9907 | 289.9915 | 0.72 | 2.5 |
| | Frg. 2 | $C_9H_7N_2O_2Cl_2$ | 244.9879 | 244.9873 | 0.60 | 2.5 |
| | ^{37}Cl ion | $C_9H_7N_2O_2Cl^{37}Cl$ | 246.9849 | 246.9844 | -0.56 | 2.3 |
| Diphenylamine | $[M+H]^+$ | $C_{12}H_{12}N$ | 170.0964 | 170.0960 | -0.42 | 2.5 |
| | Frg. | C_6H_7N | 93.0573 | 93.0572 | -0.10 | -1.1 |
| Procymidone | $[M+H]^+$ | $C_{13}H_{12}NO_2Cl_2$ | 284.0239 | 284.0242 | 0.24 | 0.8 |
| | ^{37}Cl ion | $C_{13}H_{12}NO_2Cl^{37}Cl$ | 286.0210 | 286.0215 | 0.49 | 1.7 |
| | Frg. 1 | $C_{12}H_{12}NOCl_2$ | 256.0290 | 256.0300 | 0.95 | 3.7 |
| | ^{37}Cl ion | $C_{12}H_{12}NOCl^{37}Cl$ | 258.0260 | 258.0255 | 0.99 | 3.8 |

IV.1.3.2. Parámetros analíticos.

Para evaluar la linealidad del método se prepararon curvas de calibración con nueve niveles de concentración comprendidos en el rango aproximado 1 – 1000 $\mu g\ kg^{-1}$. Se realizó también una calibración por adición de patrón en el mismo rango de concentración, fortificando extractos de purés que no contenían los plaguicidas objeto de análisis. Para llevar a cabo este estudio se prepararon tres curvas de calibración utilizando como matrices los extractos de purés con distinto porcentaje de fruta, concretamente, 55, 85 y 100%.

Como se ha descrito previamente en la sección IV.1.3.1., la cuantificación se llevó a cabo utilizando las áreas obtenidas en el cromatograma extraído (con una ventana de masa de 40mDa) de la molécula protonada de cada uno de los compuestos de interés, a excepción de

prochloraz y bitertanol, para los que se utilizó el área de un fragmento más abundante. En la **Figura IV.1.3** se muestra el TIC de una muestra de puré fortificada a un nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, junto con los cromatogramas extraídos (EIC) de algunos de los compuestos estudiados. Como se puede ver, para un nivel tan bajo de concentración, la relación señal-ruido obtenida es elevada, ilustrando los bajos límites de detección y por tanto la alta sensibilidad y la idoneidad del acoplamiento LC-TOFMS para el análisis de plaguicidas en alimentos a nivel de trazas.

Las curvas de calibrado para cuatro de los plaguicidas estudiados se muestran en la **Figura IV.1.4**. Como puede verse en la figura, la linealidad del método es excelente, obteniéndose coeficientes de correlación superiores a 0.998 en todos los casos. En la **tabla IV.1.3** se muestran los coeficientes de correlación obtenidos para todos los analitos estudiados, así como las rectas de calibrado, límites de detección (LODs) y la desviación estándar relativa (RSD%) intra-día e inter-día. La reproducibilidad, repetitividad y exactitud del método fueron también evaluadas utilizando patrones en matriz a dos niveles de concentración: 0.01 y 0.05 mg kg^{-1} . Los valores de la desviación estándar relativa intra-día estaban comprendidos entre el 1.6 y el 6.7%, y los valores de la desviación estándar relativa inter-día estaban comprendidos entre el 4.1 y el 11%. Por lo tanto, podemos decir que la precisión del método era buena.

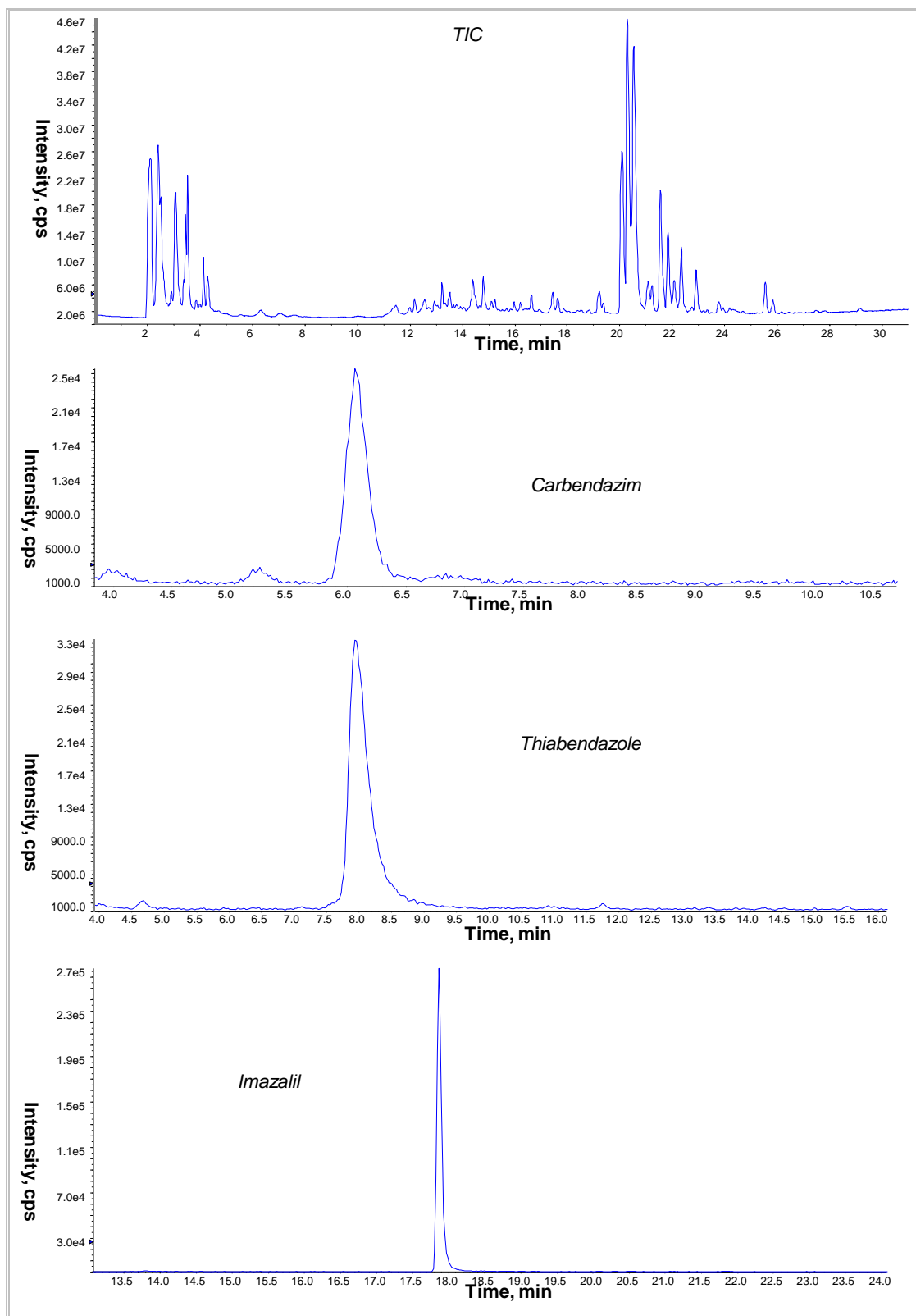


Figura IV.1.3. Cromatograma de iones totales (TIC) correspondiente al análisis de una muestra de puré fortificada con la mezcla de fungicidas ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) mediante LC-TOFMS. También se muestran los cromatogramas extraídos (EICs) correspondientes a la molécula protonada de algunos de los plaguicidas estudiados (ventana de masa: 40 mDa).

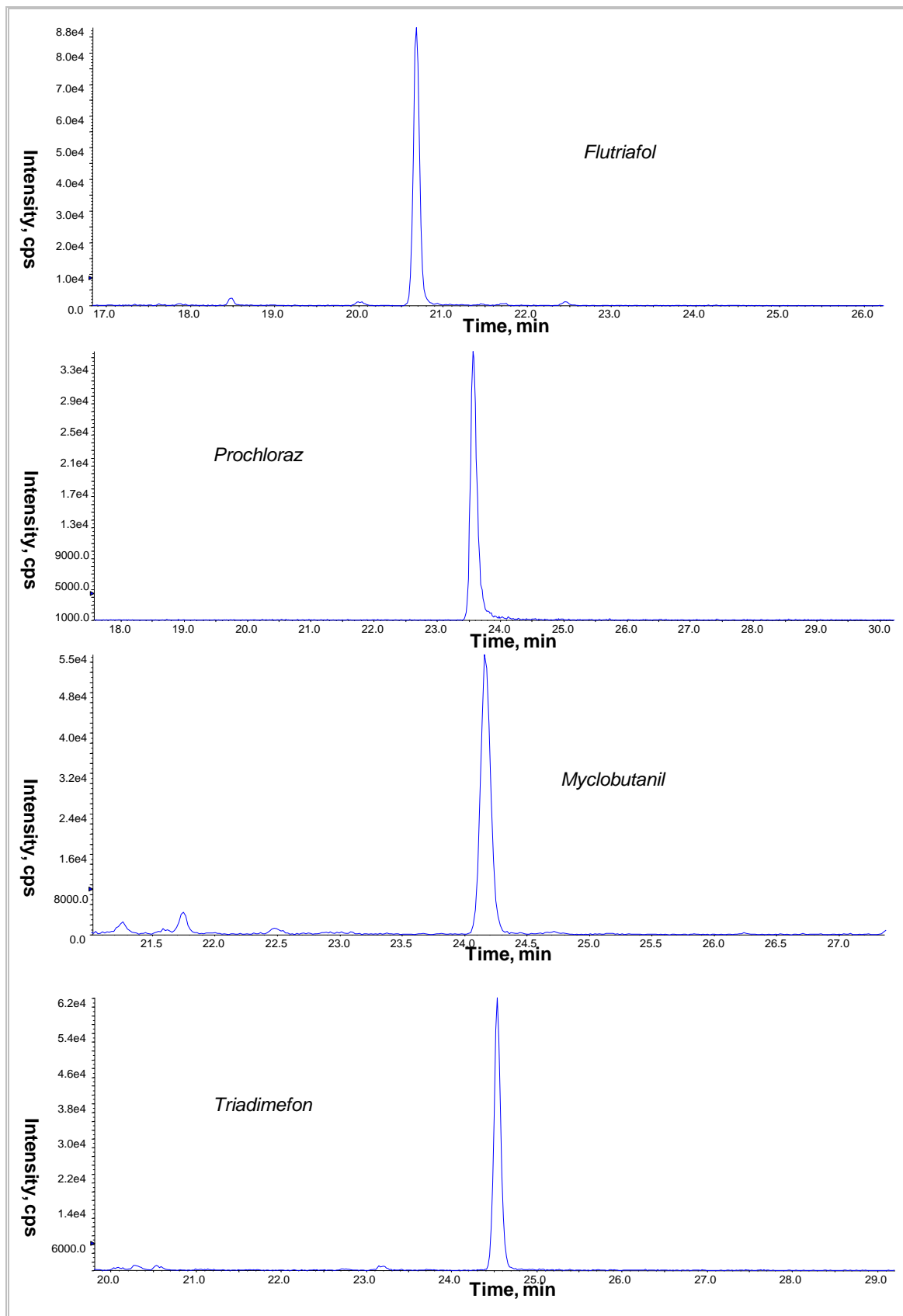


Figura IV.1.3. (continuación)

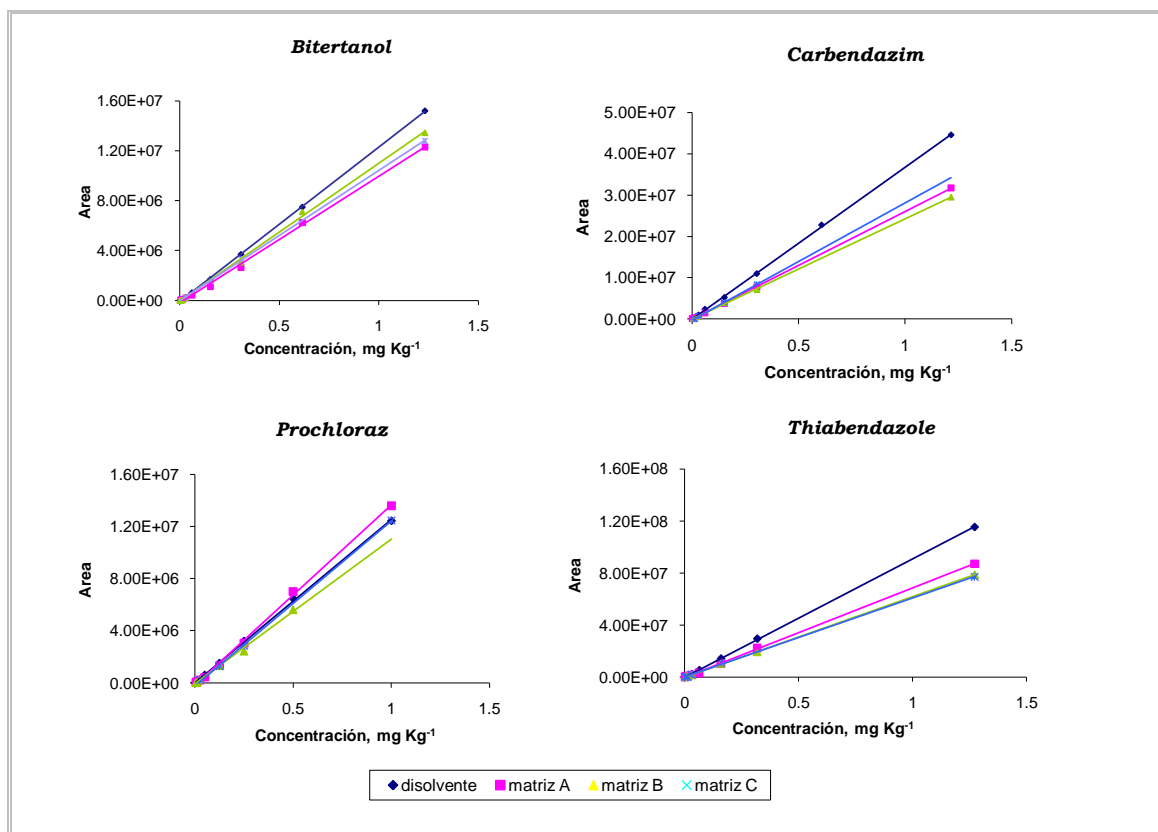


Figura IV.1.4. Comparación de las pendientes de las curvas de calibración obtenidas para bitertanol, carbendazim, prochloraz y thiabendazole, usando estándares preparados por adición de patrón sobre diferentes extractos de purés de frutas (matriz A: 55% fruta, matriz B: 100% fruta, matriz C: 85% fruta) y patrones preparados en disolvente.

Los límites de detección fueron estimados mediante la inyección de patrones en matriz de concentraciones correspondientes a una relación señal-ruido (S/N) igual a 3. Los resultados obtenidos para cada fungicida se muestran en la **tabla IV.1.3.**, siendo destacable la obtención de límites de detección tan bajos como $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ para imazalil, o $0.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para carbendazim y prochloraz. En general, los límites de detección son bajos, con un valor medio de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, apropiado para el tipo de análisis que se propone, teniendo en cuenta el estándar europeo de 0.01 mg kg^{-1} (Directiva 96/5/CE) establecido como límite máximo permitido para la concentración de plaguicidas en alimentos infantiles. Los LODs del método propuesto para los zumos infantiles son incluso menores, teniendo en cuenta que se preconcentran 20 veces en el proceso de extracción SPE.

Tabla IV.1.3. Parámetros analíticos obtenidos para el análisis de fungicidas en purés de frutas mediante LC-TOFMS.

| Compuesto | Coeficiente de correlación (r) | LOD ¹ (µg/kg) | RSD (%) (n=6) | | | |
|---------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
| | | | 0.01 mg kg ⁻¹ | | 0.05 mg kg ⁻¹ | |
| | | | Intra-día | Inter-día | Intra-día | Inter-día |
| Carbendazim | 0.99995 | 0.2 | 6.5 | 13.8 | 2.2 | 6.7 |
| Thiabendazole | 0.99985 | 0.4 | 4.8 | 10.1 | 5.1 | 9.8 |
| Imazalil | 0.99985 | 0.1 | 2.6 | 5.8 | 1.7 | 4.5 |
| Flutriafol | 0.99995 | 0.3 | 2.8 | 7.1 | 2.2 | 6.7 |
| Tridemorph | 0.99920 | 1.5 | 4.2 | 8.1 | 5.8 | 9.9 |
| Prochloraz | 0.99930 | 0.2 | 2.1 | 4.5 | 2.4 | 4.1 |
| Myclobutanil | 0.99945 | 0.8 | 3.9 | 6.8 | 3.4 | 8.1 |
| Triadimefon | 0.99935 | 0.5 | 2.9 | 5.5 | 2.3 | 5.5 |
| Bitertanol | 0.99905 | 1.0 | 2.5 | 4.8 | 2.2 | 6.1 |
| Iprodione | 0.99955 | 4.0 | 6.1 | 9.9 | 4.1 | 10.6 |
| Diphenylamine | 0.99995 | 1.0 | 4.1 | 8.5 | 5.6 | 8.8 |
| Procymidone | 0.99940 | 1.6 | 8.2 | 12.6 | 6.7 | 11.0 |

¹ Para la preparación de los patrones en matriz se utilizó un puré con 85% de fruta.

IV.1.3.3. Efecto matriz.

Los efectos de la matriz juegan un papel importante en la cuantificación de plaguicidas mediante LC-MS con fuentes de ionización a presión atmosférica. Estos efectos se pueden manifestar como incremento o descenso en la respuesta del analito cuando se compara con la obtenida en patrones preparados en disolvente. Generalmente, el descenso o supresión de la señal ocurre de forma más frecuente. El aumento o descenso en la respuesta de cada analito depende de sus características fisicoquímicas, de la matriz en cuestión, del método de preparación de muestra, etc. Para evaluar estos posibles efectos, las pendientes obtenidas para distintas calibraciones en matriz se compararon con la pendiente obtenida para la recta de calibrado en disolvente, calculando relaciones pendiente en matriz/pendiente en disolvente para cada fungicida analizado. Los resultados mostraron que la señal se veía afectada por la matriz en la mayoría de los casos (relación de pendientes $\neq 1$). Los resultados obtenidos para la matriz B se muestran en la **tabla IV.1.4**. Además, en la **figura IV.1.4** se pueden ver cuatro ejemplos (bitertanol, carbendazim, prochloraz y thiabendazole) de comparación de las

pendientes de las curvas de calibrado en disolvente y en matriz, habiendo sido evaluadas tres matrices de purés con distinto porcentaje de fruta: matriz A: 55%, matriz B: 100%, matriz C: 85%. Como puede observarse, el efecto matriz es similar en todos los casos, no existiendo grandes diferencias entre las distintas matrices para cada uno de los fungicidas estudiados. Esto sugiere que el uso de calibración por adición de patrón proporciona un modo fiable de cuantificación de fungicidas en purés de fruta.

Tabla IV.1.4. Evaluación del efecto matriz: comparación de las pendientes de las curvas de calibración.

| Compuesto | Disolvente: Agua/Metanol | | Pendiente matriz / Pte. disolvente |
|---------------|---|----------------------------------|---------------------------------------|
| | Ecuación* | Coefficiente de regresión (r) | |
| Carbendazim | $y = 4.00 \cdot 10^7 C - 6.65 \cdot 10^4$ | 0.99990 | 0.75 |
| Thiabendazole | $y = 9.00 \cdot 10^7 C - 3.36 \cdot 10^5$ | 0.99995 | 0.78 |
| Imazalil | $y = 8.00 \cdot 10^7 C + 3.12 \cdot 10^5$ | 0.99990 | 1.08 |
| Flutriafol | $y = 7.00 \cdot 10^7 C - 5.75 \cdot 10^4$ | 0.99955 | 0.57 |
| Tridemorph | $y = 2.00 \cdot 10^8 C - 2.10 \cdot 10^6$ | 0.99825 | 1.00 |
| Prochloraz | $y = 1.00 \cdot 10^7 C + 2.36 \cdot 10^3$ | 0.99975 | 1.00 |
| Myclobutanil | $y = 7.00 \cdot 10^7 C - 5.27 \cdot 10^4$ | 0.99930 | 1.00 |
| Triadimefon | $y = 5.00 \cdot 10^7 C - 6.19 \cdot 10^4$ | 0.99979 | 0.80 |
| Bitertanol | $y = 1.00 \cdot 10^7 C - 9.13 \cdot 10^4$ | 0.99990 | 1.00 |
| Iprodione | $y = 3.82 \cdot 10^5 C - 7.42 \cdot 10^3$ | 0.99970 | 1.16 |
| Diphenylamine | $y = 5.00 \cdot 10^7 C - 3.69 \cdot 10^5$ | 0.99990 | 0.60 |
| Procymidone | $y = 5.58 \cdot 10^5 C - 4.42 \cdot 10^3$ | 0.99970 | 1.11 |

*C: $\mu\text{g kg}^{-1}$

IV.1.3.4. Validación: Estudios de recuperación.

Para evaluar la efectividad del método de extracción se llevaron a cabo diferentes estudios de recuperación mediante la fortificación de un puré de fruta a un nivel de concentración: $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Seis réplicas de la muestra fortificada se analizaron mediante el método LC-TOFMS propuesto, obteniéndose recuperaciones para los fungicidas de interés comprendidas entre el 78 y el 105%, como muestra la **tabla IV.1.5**. Estos satisfactorios resultados muestran la

viabilidad del método de extracción ensayado para el análisis multi-residuo de plaguicidas en purés de fruta.

Tabla IV.1.5. Estudios de recuperación (n=6) en un extracto de puré de frutas fortificado con la mezcla de fungicidas a un nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

| Plaguicida | Recuperación ¹ (%) | RSD (%) |
|---------------|-------------------------------|---------|
| Carbendazim | 104.7 | 11.1 |
| Thiabendazole | 94.9 | 6.8 |
| Imazalil | 77.6 | 7.6 |
| Flutriafol | 97.2 | 8.9 |
| Tridemorph | 81.0 | 10.3 |
| Prochloraz | 81.4 | 8.2 |
| Myclobutanil | 86.3 | 6.2 |
| Triadimefon | 91.7 | 9.4 |
| Bitertanol | 92.5 | 10.6 |
| Iprodione | 83.6 | 8.7 |
| Diphenylamine | 81.5 | 9.5 |
| Procymidone | 85.0 | 11.9 |

¹ Puré con 100% de fruta

IV.1.3.5. Aplicación a muestras reales.

El método propuesto se aplicó al análisis de 33 muestras de alimentos infantiles de distinto tipo: puré de frutas y zumos, adquiridas en supermercados españoles y del Reino Unido. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla IV.1.6**. Únicamente se encontraron residuos de carbendazim, imazalil y thiabendazole, presentándose todos ellos a niveles de concentración inferiores a los límites máximos permitidos (MRLs) por la legislación europea. El 30% de las muestras analizadas contenía residuos de carbendazim, mientras que el 40% de las mismas contenía residuos de imazalil y thiabendazole. Si se tiene en cuenta que alrededor del 30% de las muestras analizadas presentaba residuos de más de un plaguicida (ver **tabla IV.1.6**), debe llamarse la atención sobre la carencia de un límite establecido por la administración para el contenido total de plaguicidas en alimentos infantiles (hasta la fecha sólo existen MRLs individuales).

Tabla IV.1.6. Residuos de fungicidas encontrados en las muestras de alimentos infantiles analizadas.

| No. | Producto (% fruta) | Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | |
|-----|--|---|------|------|-----------------------------------|-------|
| | | CBZ | TBZ | IMZ | Resto de fungicidas estudiados | Total |
| 1 | Puré de 3 frutas (51) | ND | ND | 0.30 | ND | 0.30 |
| 2 | Puré multifruta (92) | ND | ND | ND | ND | ND |
| 3 | Puré de fruta y galleta | ND | ND | 0.25 | ND | 0.25 |
| 4 | Puré multifruta (66) | ND | ND | ND | ND | ND |
| 5 | Puré multifruta (85) | ND | ND | ND | ND | ND |
| 6 | Puré de dos frutas (51) | 0.58 | ND | ND | ND | 0.58 |
| 7 | Zumo de manzana (100) | 2.84 | ND | 2.00 | ND | 4.84 |
| 8 | Puré multifruta (50) | ND | ND | ND | ND | ND |
| 9 | Puré multifruta (66) | ND | 0.93 | ND | ND | 0.93 |
| 10 | Puré de 3 frutas (51) | ND | ND | 0.55 | ND | 0.55 |
| 11 | Puré multifruta (85) | ND | ND | ND | ND | ND |
| 12 | Puré de fruta y galleta | ND | 2.89 | 1.16 | ND | 4.05 |
| 13 | Puré de dos frutas (51) | ND | ND | 1.10 | ND | 1.10 |
| 14 | Puré de pera y manzana (100) | ND | 1.71 | ND | ND | 1.71 |
| 15 | Puré multifruta ecológico (69) | ND | ND | ND | ND | ND |
| 16 | Puré de plátano y manzana (100) | 1.45 | ND | ND | ND | 1.45 |
| 17 | Zumo multifruta (100) | 2.94 | ND | 0.14 | ND | 3.08 |
| 18 | Puré multifruta (91) | ND | 0.82 | ND | ND | 0.82 |
| 19 | Puré de 2 frutas (92) | ND | 0.94 | 0.24 | ND | 1.18 |
| 20 | Compota de manzana ecológica (85) | ND | 1.38 | 0.21 | ND | 1.59 |
| 21 | Puré de 2 frutas (93) | ND | 1.03 | 0.58 | ND | 1.61 |
| 22 | Puré multifruta (89) | ND | 0.87 | 0.19 | ND | 1.06 |
| 23 | Puré multifruta ecológico (85) | ND | 1.10 | ND | ND | 1.10 |
| 24 | Puré de 3 frutas (92) | ND | ND | ND | ND | ND |
| 25* | Zumo de naranja y manzana (69) | ND | ND | ND | ND | ND |
| 26 | Puré multifruta (92) | ND | 1.06 | ND | ND | 1.06 |
| 27* | Puré de pollo con arroz y vegetales orgánicos (44) | 8.12 | ND | ND | ND | 8.12 |
| 28* | Pudding de manzana y pera orgánico (96) | ND | ND | ND | ND | ND |
| 29 | Puré multifruta (91) | ND | 0.99 | ND | ND | 0.99 |
| 30 | Puré de manzana (94) | 1.04 | ND | ND | ND | 1.04 |
| 31* | Puré orgánico de mango y plátano con yogurt (18) | ND | ND | ND | ND | ND |
| 32 | Puré multifruta (73) | ND | 1.13 | 2.20 | ND | 3.33 |
| 33 | Puré multifruta (85) | 1.29 | 3.63 | 0.42 | ND | 5.34 |

CBZ: Carbendazim ; **TBZ:** Thiabendazole; **IMZ:** Imazalil; **ND:** no detectado.

* Muestras adquiridas en el Reino Unido. El resto de las muestras fueron adquiridas en supermercados españoles.

A modo de ejemplo, en las **figuras IV.1.5. y IV.1.6.** se muestra el análisis de dos muestras reales de purés, las cuales contenían residuos de imazalil y carbendazim o thiabendazole. En ambas muestras, los positivos de los fungicidas detectados fueron confirmados con excelentes

exactitudes de masa (< 3 ppm), lo que ilustra la utilidad y fiabilidad de LC-TOFMS para el análisis de plaguicidas en alimentos infantiles.

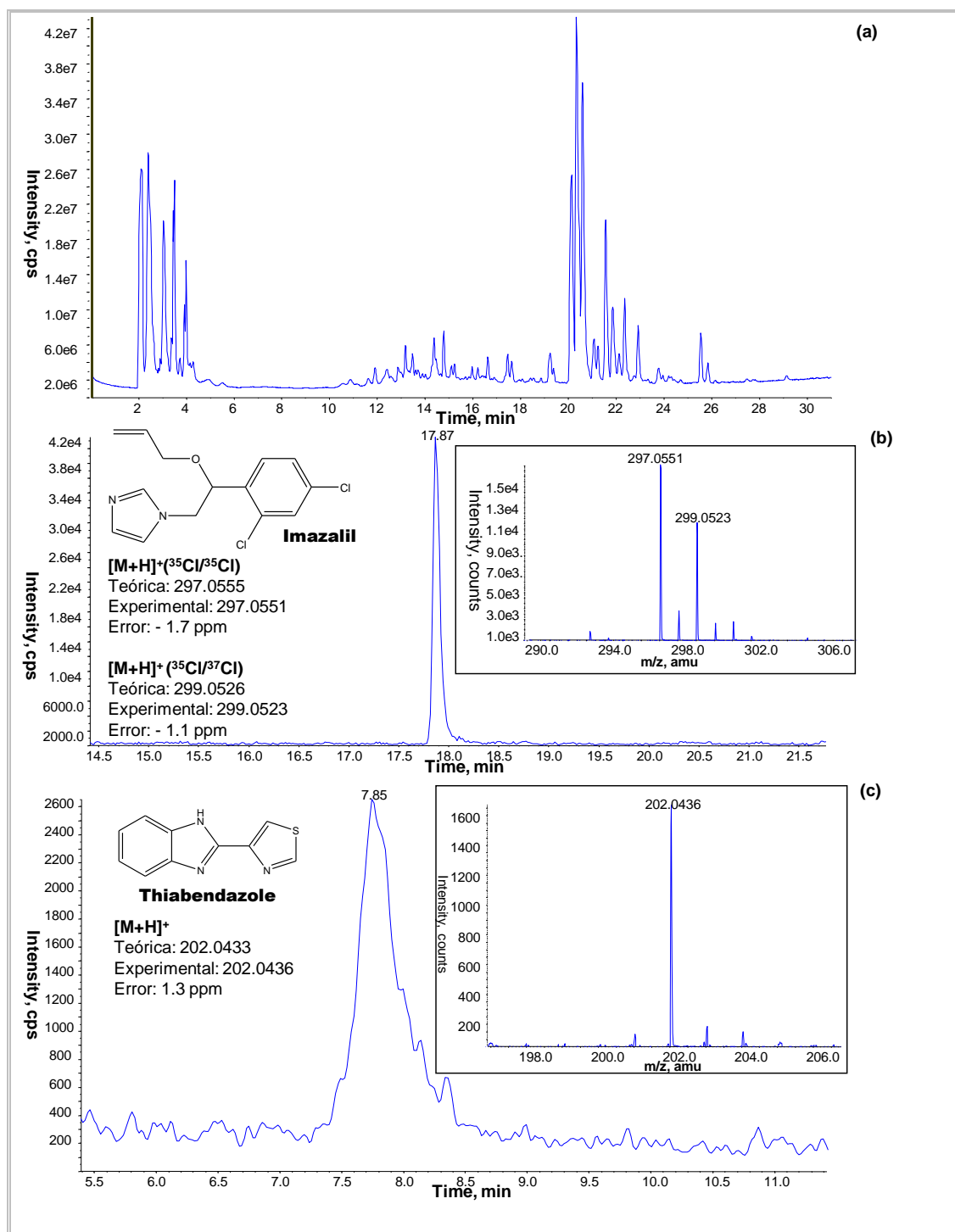


Figura IV.1.5. (a) Cromatograma de iones totales (TIC) correspondiente al análisis mediante LC-TOFMS de un puré multifrutas (muestra nº 32), en la que fueron detectados thiabendazole ($1.1 \mu\text{g kg}^{-1}$) e imazalil ($2.2 \mu\text{g kg}^{-1}$). (b) Cromatograma extraído de imazalil (recuadro: espectro de masa exacta). (c) Cromatograma extraído de thiabendazole (recuadro: espectro de masa exacta).

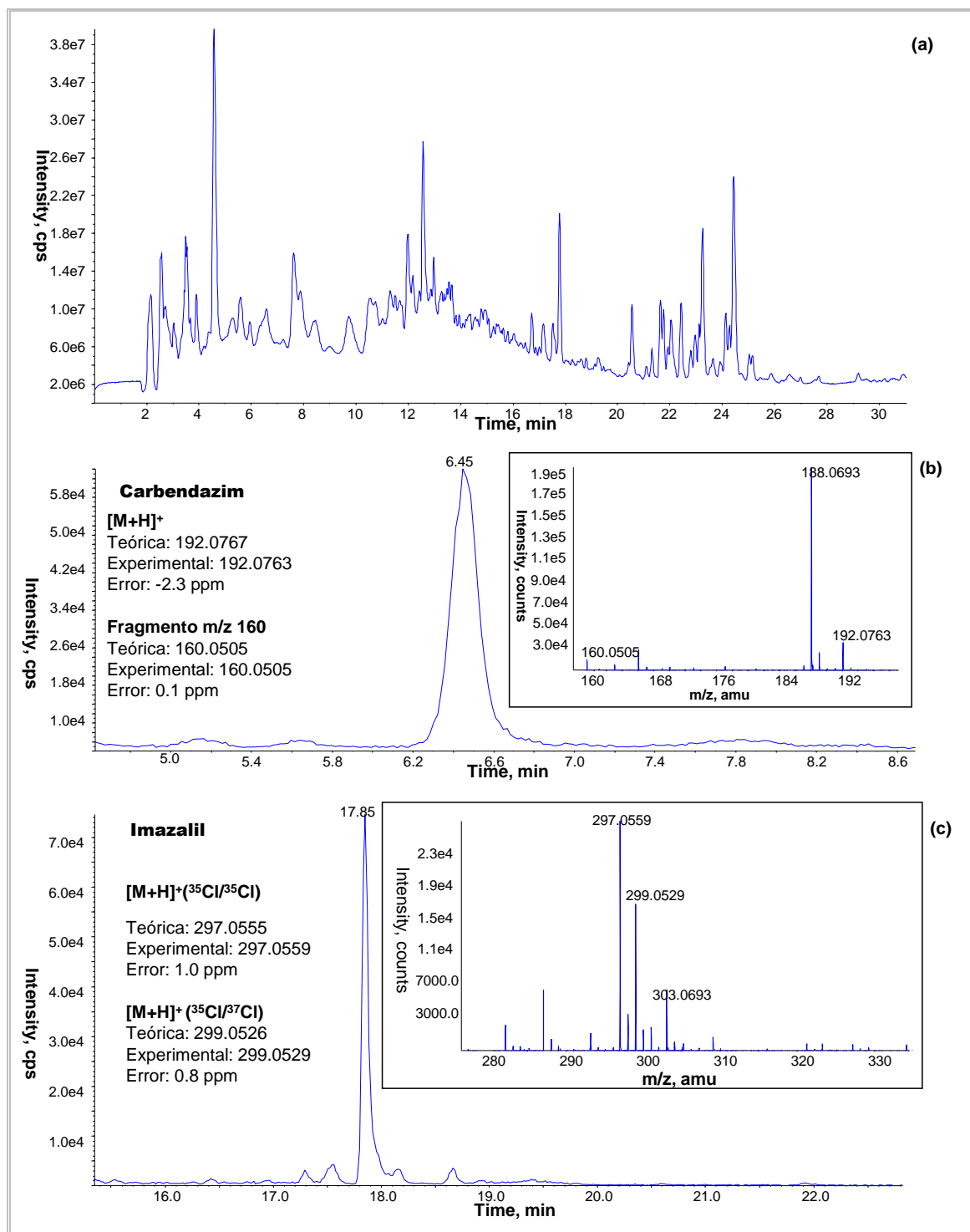


Figura IV.1.6. (a) Cromatograma de iones totales (TIC) correspondiente al análisis mediante LC-TOFMS de un zumo multifrutas (muestra nº 17), en la que fueron detectados carbendazim ($2.9 \mu\text{g L}^{-1}$) e imazalil ($0.14 \mu\text{g L}^{-1}$). (b) Cromatograma extraído de carbendazim (recuadro: espectro de masa exacta). (c) Cromatograma extraído de imazalil (recuadro: espectro de masa exacta).

IV.1.4. Conclusiones

Se ha llevado a cabo un estudio para evaluar la potencialidad del acoplamiento LC-TOFMS para el análisis cuantitativo de plaguicidas en alimentos infantiles. El método desarrollado permite el monitoreo de 12 fungicidas, incluyendo los más ampliamente utilizados en tratamientos post-cosecha, en frutas y vegetales. Los resultados muestran que la sensibilidad obtenida mediante LC-TOFMS es apropiada para el análisis multi-residuo de plaguicidas en alimentos infantiles elaborados a base de fruta. Esta alta sensibilidad alcanzada, llegando a obtener, por ejemplo, un LOD de $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ para imazalil, es de conformidad con las exigentes normativas europeas establecidas para alimentos infantiles. El potencial del método propuesto fue demostrado mediante el análisis de muestras reales, obteniéndose una excelente sensibilidad y selectividad, lo que permite la identificación y confirmación inequívoca (mediante análisis de masa exacta) y la cuantificación a bajos niveles de concentración de los plaguicidas estudiados en un amplio rango de productos alimenticios infantiles. Teniendo en cuenta que un 30% de las muestras analizadas contenían más de un plaguicida, las autoridades podrían considerar la necesidad de establecer un límite para la suma total de plaguicidas presentes en muestras de alimentos infantiles, de la misma manera que queda establecido en las normativas europeas referentes al contenido de plaguicidas en agua para consumo humano.

CAPÍTULO IV.2



Desarrollo de un método para el análisis de residuos de plaguicidas en zumos de fruta mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas de tiempo de vuelo.

IV.2. DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE FUNGICIDAS EN ZUMOS DE FRUTAS MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO (LC-TOFMS).

IV.2.1. Resumen

Se ha desarrollado un método analítico basado en el uso de cromatografía líquida-espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC-TOFMS) para el análisis cuantitativo en zumos de frutas de cinco fungicidas post-cosecha ampliamente utilizados (carbendazim, thiabendazole, imazalil, prochloraz e iprodione) y dos de sus productos de transformación (metabolitos de imazalil y prochloraz). El método propuesto consiste en una etapa de preparación de muestra basada en extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos poliméricos Oasis HLB® y metanol como eluyente. Extractos de zumos fortificados a distintos niveles de concentración (10 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$) mostraron recuperaciones en el rango 71 – 109% con valores de RSD(%) por debajo del 15%. LC-TOFMS con ionización por electrospray en modo positivo fue utilizado para cuantificación y confirmación de estos plaguicidas en zumos de frutas a nivel de trazas. La confirmación de los compuestos de interés se basó en la medida de masa exacta de las moléculas protonadas y los fragmentos, obteniendo errores de masa inferiores a 2 ppm para la mayoría de los casos. Los límites de detección (LODs) obtenidos estaban comprendidos en el rango 0.08 – 0.45 $\mu\text{g L}^{-1}$. Finalmente, el método propuesto fue aplicado satisfactoriamente a 23 muestras de zumos de frutas compradas en distintos países europeos y Estados Unidos, mostrando la potencial aplicabilidad del método en análisis de rutina. Alrededor del 50% de las muestras estudiadas contenían residuos de plaguicidas, pero a niveles de concentración relativamente bajos.

IV.2.2. Experimental

IV.2.2.1. Preparación de muestra

Los plaguicidas fueron extraídos mediante un proceso de extracción en fase sólida (SPE) “off-line”. Como paso previo a la extracción, unos 50 mL de zumo fueron centrifugados (a 3700 rpm) durante 3 min para eliminar las partículas sólidas que pudieran bloquear los cartuchos. El

procedimiento SPE seguido aparece esquematizado en la **figura IV.2.1** y consta de las siguientes etapas:

- 1) **Acondicionamiento:** Se acondiciona el cartucho de SPE Oasis HLB® (200 mg/ 6 mL) con 5 mL de metanol (MeOH) seguidos de 5 mL de agua ultrapura, todo ello con un caudal de unos 2 mL min⁻¹.
- 2) **Carga de muestra:** Se pasan 30 mL de zumo centrifugado a través del cartucho, a un flujo de unos 3 mL min⁻¹.
- 3) **Elución:** Los analitos retenidos en el cartucho son eluidos con 5 mL de MeOH a un flujo de 1 mL min⁻¹. El eluato se recoge en un tubo de ensayo de 15 mL.
- 4) El extracto se evapora bajo corriente de N₂ hasta casi sequedad y luego se reconstituye con 2 mL de H₂O ultrapura y 1 mL de metanol. De esta forma, tenemos un factor de preconcentración de 10 (30 mL ⇒ 3 mL). El último paso es filtrar el extracto con un filtro de HPLC de PTFE de 0.45 µm de poro (PTFE filter, Millex FG, Millipore, Milford, MA) y trasvasar a un vial. Si no se va a realizar el análisis de forma inmediata, conservar en frío a -20°C.

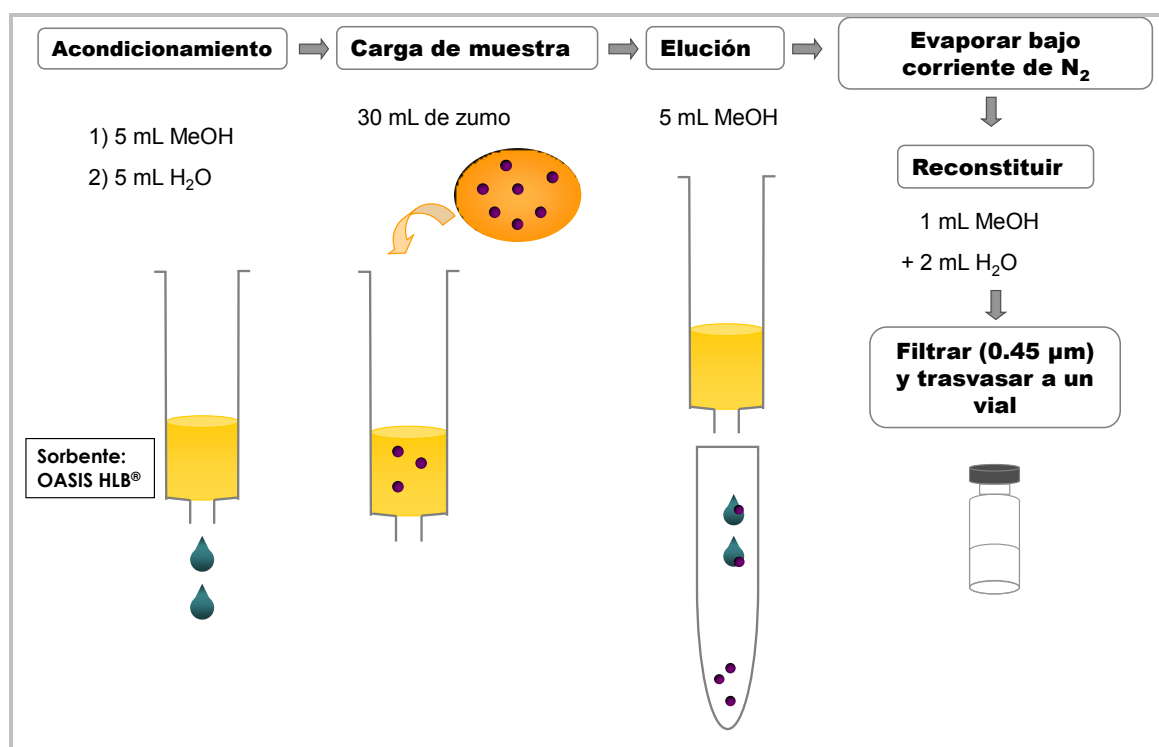


Figura IV.2.1. Esquema de la obtención del extracto de zumos mediante SPE.

IV.2.2.2. Calibración por adición de patrón y estudios de recuperación.

Se prepararon patrones de calibración en matriz mediante la fortificación de extractos de zumo con un volumen apropiado de la disolución de trabajo (mezcla de los plaguicidas, 10 mg L⁻¹). Para los estudios de recuperación, las muestras de zumo fueron fortificadas antes de someterlas al proceso de extracción a dos niveles de concentración: 10 y 20 µg L⁻¹.

IV.2.2.3. Parámetros instrumentales

En este estudio se utilizó el equipo HPLC-TOFMS Agilent MSD TOF descrito en el capítulo III. Los valores elegidos como óptimos para los parámetros instrumentales fueron los siguientes:

a) Condiciones cromatográficas:

- Fases móviles: A = H₂O (0.1% HCOOH, v/v); B = Acetonitrilo.
- Gradiente: durante 5 min se mantiene constante un 10% de B, seguido de un gradiente lineal hasta el 100% B a los 30 min. Entonces, se mantiene constante (100%B) durante 5 min. Finalmente, se disminuye la velocidad de flujo para volver a las condiciones iniciales (10%B) en 12 min (post-run).
- Velocidad de flujo: 0.6 mL min⁻¹. (0.4 mL min⁻¹ durante el post-run)
- Columna: C8, 150 mm × 4.6 mm i.d. y 5 µm de tamaño de partícula (Zorbax Eclipse XDB-C8, Agilent).
- Volumen de inyección: 20 µL.

b) Espectrómetro de masas:

- Fuente: ESI (+)
- Voltaje del capilar: 4000 V
- Temperatura de la fuente: 325 °C
- Presión del gas de secado (N₂): 40 psig
- Flujo del gas de secado: 9 L min⁻¹
- Voltaje de fragmentación en la fuente: 190 V
- Rango de masas: 50 – 1000 m/z
- Resolución: 9700 ± 500

IV.2.3. Resultados y discusión

IV.2.3.1. Identificación y cuantificación mediante LC-TOFMS.

Las condiciones de la ionización por electrospray fueron estudiadas para conseguir la mejor selectividad y sensibilidad de los compuestos seleccionados. Se encontró que los parámetros de la fuente no afectaban significativamente a la señal de los analitos, por lo que se usaron valores estándar para la temperatura de la fuente, presión y flujo del gas de secado (nitrógeno), y voltaje del capilar. Dada la experiencia previa con este tipo de compuestos [201,239], para el voltaje de fragmentación en la fuente (Fragmentor voltage) se eligió un valor medio de 190 V, como compromiso entre la sensibilidad de la molécula protonada para la cuantificación y la información adicional que proporcionan los fragmentos a efectos de confirmación.

Para la identificación y cuantificación de los analitos se utilizaron los cromatogramas extraídos (EICs) con una ventana de masa de 20 mDa ($[M+H]^+ \pm 10$ mDa). La molécula protonada ($[M+H]^+$) se utilizó para la confirmación y cuantificación en la mayoría de los casos, a excepción de prochloraz, para el cual la abundancia relativa del fragmento característico mayoritario (m/z 308) era mayor que la abundancia de la molécula protonada, en las condiciones de análisis seleccionadas (ver **figura IV.2.2.**). Además, algunos de los plaguicidas estudiados presentaban átomos de cloro (ej: imazalil, imazalil metabolito y prochloraz), los cuales ofrecen un patrón isotópico característico, proporcionando información adicional para la identificación inequívoca de los compuestos de interés. A modo de ejemplo, en la **figura IV.2.2.** se muestra el espectro de masa exacta de prochloraz en un extracto de zumo fortificado con $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de la mezcla de plaguicidas estudiada.

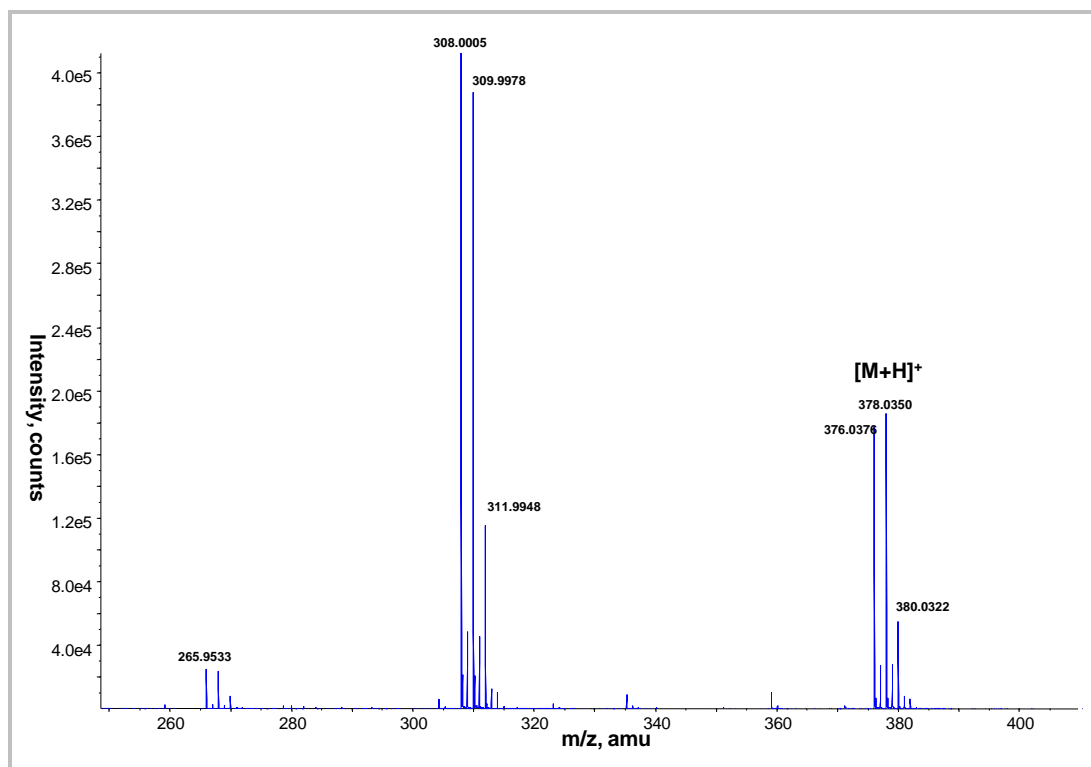


Figura IV.2.2. Espectro de masa exacta para la confirmación de prochloraz en un extracto de zumo fortificado a un nivel de concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

En la **figura IV.2.3.** aparecen recogidos el cromatograma de iones totales (TIC) de un extracto de zumo fortificado con $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de la mezcla de plaguicidas estudiada y los cromatogramas extraídos (EICs) de los compuestos presentes en la mezcla.

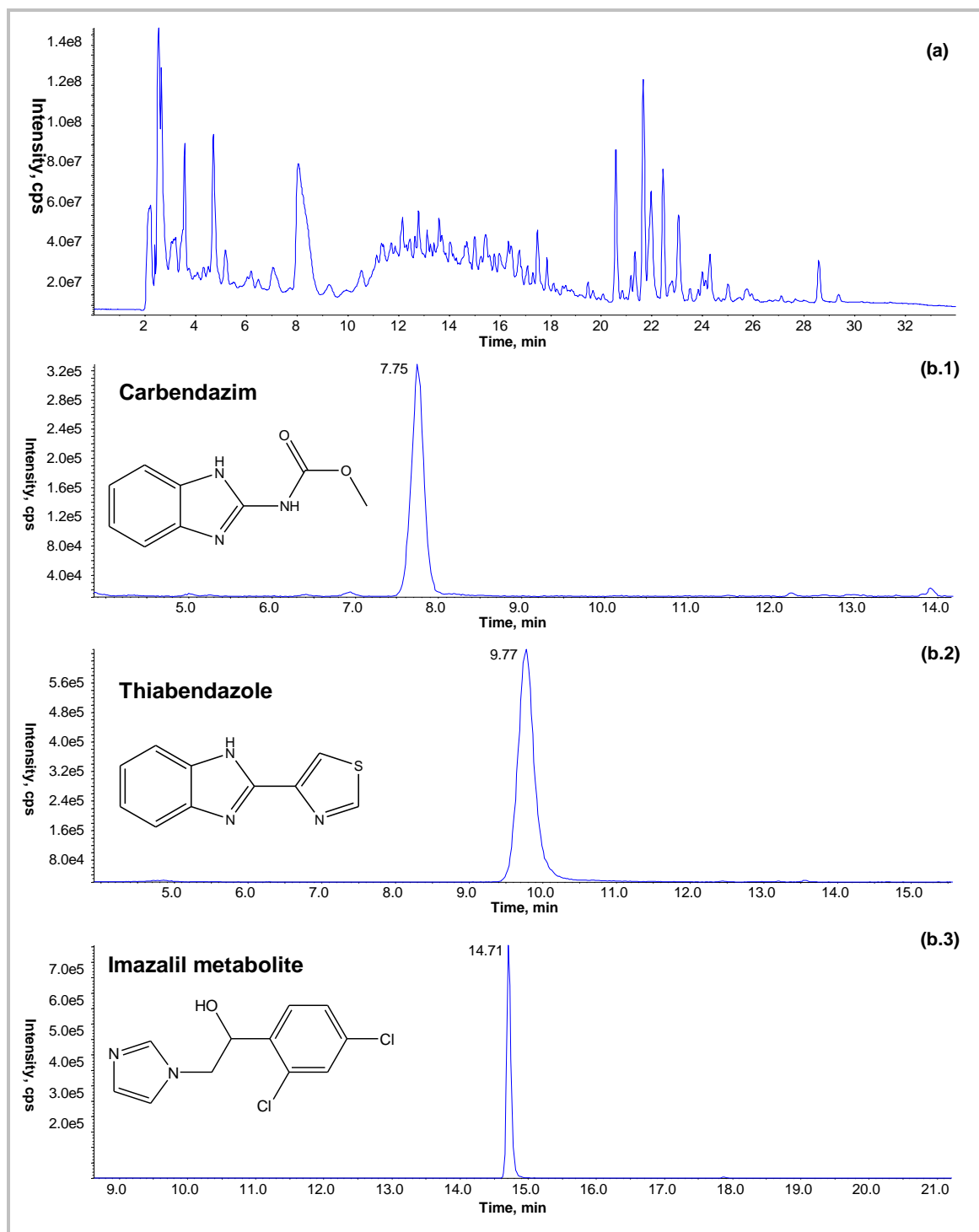


Figura IV.2.3. (a) TIC correspondiente al análisis mediante LC-TOFMS de una muestra de zumo fortificada con los plaguicidas estudiados (nivel de fortificación: $10 \mu\text{g L}^{-1}$). **(b)** EIC correspondiente a la molécula protonada de los plaguicidas estudiados (ventana de masa: 20 mDa).

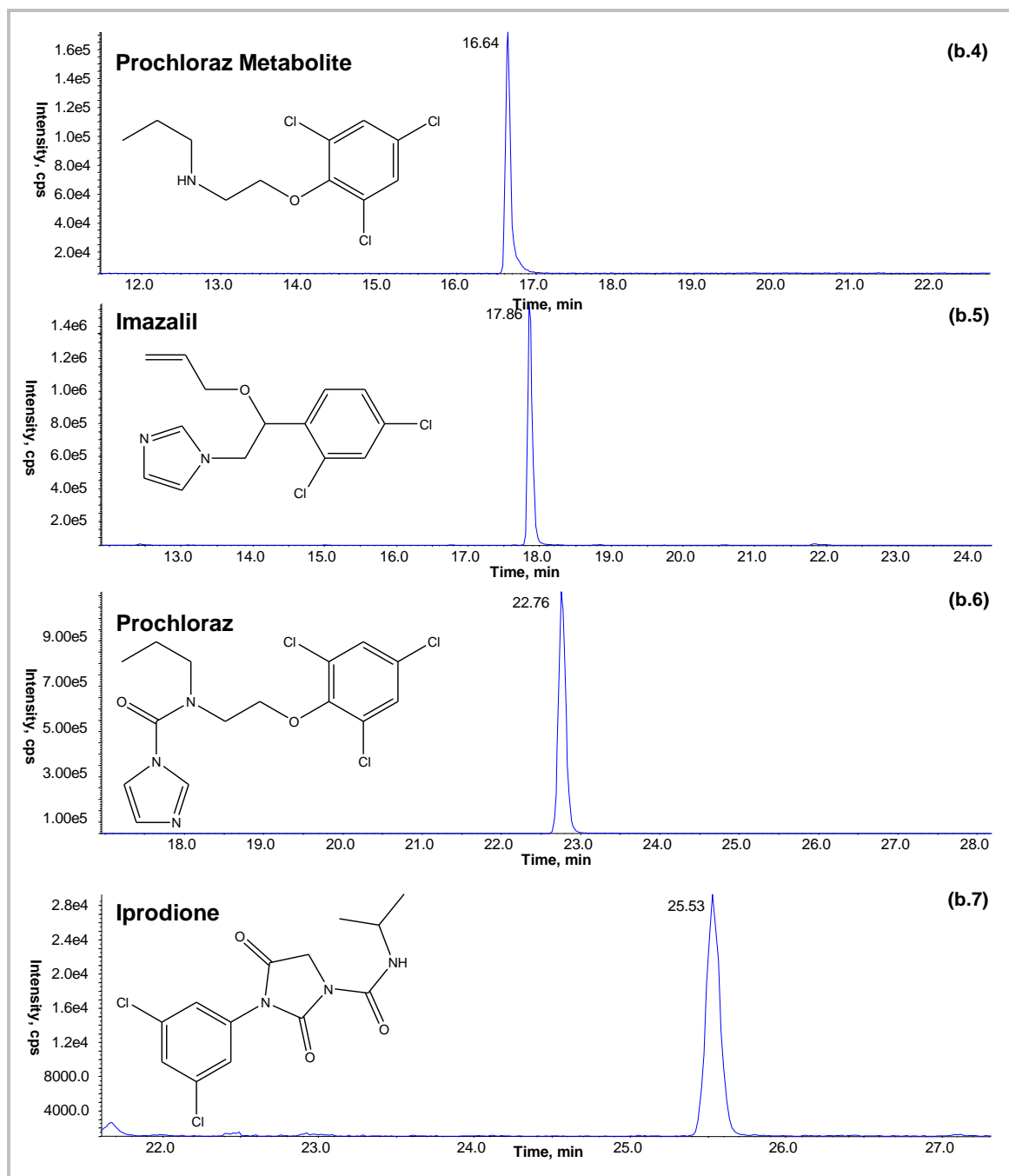


Figura IV.2.3. (cont)

La **tabla IV.2.1.** muestra los resultados obtenidos para el análisis de masa exacta de los plaguicidas seleccionados en un patrón en matriz de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. En el caso de los compuestos clorados, la medida de masa exacta también se realizó en las señales correspondientes al isótopo de ^{37}Cl . A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que el método ofrece mucha seguridad en la etapa de confirmación debido a su alta exactitud de masa, permitiendo medidas rutinarias de masa exacta con errores inferiores a 2 ppm en la mayoría de los casos.

Tabla IV.2.1. Identificación de los plaguicidas estudiados en extractos de zumo fortificados usando la medida de masa exacta de la molécula protonada y los fragmentos característicos mediante LC-TOFMS. Nivel de fortificación: 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

| Compuesto | t_R | ión | Composiciones elementales | m/z teórica | m/z experimental | Error | |
|------------------------------|-------|-----------------------------------|--|-------------|------------------|-------|------|
| | | | | | | mDa | ppm |
| Carbendazim | 7.7 | [M+H] ⁺ | C ₉ H ₁₀ N ₃ O ₂ | 192.0767 | 192.0763 | -0.45 | 2.4 |
| | | Frg. | C ₈ H ₆ N ₃ O | 160.0505 | 160.0500 | -0.53 | 3.4 |
| Thiabendazole | 9.8 | [M+H] ⁺ | C ₁₀ H ₈ N ₃ S | 202.0433 | 202.0434 | 0.054 | 0.3 |
| Imazalil metabolito | 14.7 | [M+H] ⁺ | C ₁₁ H ₁₁ N ₂ OCl ₂ | 257.0242 | 257.0238 | -0.59 | 2.3 |
| | | ³⁷ Cl ion | C ₁₁ H ₁₁ N ₂ OCl ³⁷ Cl | 259.0213 | 259.0209 | -0.44 | 1.7 |
| Prochloraz metabolito | 16.7 | [M+H] ⁺ | C ₁₁ H ₁₅ NOCl ₃ | 282.0213 | 282.0210 | -0.37 | 1.3 |
| | | ³⁷ Cl ion | C ₁₁ H ₁₅ NOCl ₂ ³⁷ Cl | 284.0184 | 284.0181 | -0.32 | 1.1 |
| | | ³⁷ Cl ₂ ion | C ₁₁ H ₁₅ NOCl ³⁷ Cl ₂ | 286.0154 | 286.0152 | -0.27 | 1.0 |
| Imazalil | 17.8 | [M+H] ⁺ | C ₁₄ H ₁₅ N ₂ OCl ₂ | 297.0555 | 297.0551 | -0.50 | 1.6 |
| | | ³⁷ Cl ion | C ₁₄ H ₁₅ N ₂ OCl ³⁷ Cl | 299.0526 | 299.0518 | -0.85 | 2.8 |
| Prochloraz | 22.8 | [M+H] ⁺ | C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₂ Cl ₃ | 376.0380 | 376.0376 | -0.49 | 1.3 |
| | | ³⁷ Cl ion | C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₂ Cl ₂ ³⁷ Cl | 378.0351 | 378.0350 | -0.14 | 0.4 |
| | | ³⁷ Cl ₂ ion | C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₂ Cl ³⁷ Cl ₂ | 380.0321 | 380.0322 | 0.01 | 0.04 |
| | | Frg. 1 | C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ Cl ₃ | 308.0006 | 308.0005 | -0.14 | 0.4 |
| | | ³⁷ Cl ion | C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ Cl ₂ ³⁷ Cl | 309.9976 | 309.9978 | 0.11 | 0.4 |
| | | ³⁷ Cl ₂ ion | C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ Cl ³⁷ Cl ₂ | 311.9947 | 311.9948 | 0.06 | 0.2 |
| Iprodione | 25.5 | [M+H] ⁺ | C ₁₃ H ₁₄ N ₃ O ₃ Cl ₂ | 330.0406 | 330.0399 | -0.77 | 2.3 |
| | | ³⁷ Cl ion | C ₁₃ H ₁₄ N ₃ O ₃ Cl ³⁷ Cl | 332.0377 | 332.0375 | -0.22 | 0.7 |
| | | Frg. 1 | C ₁₀ H ₈ N ₃ O ₃ Cl ₂ | 287.9937 | 287.9930 | -0.72 | 2.5 |
| | | ³⁷ Cl ion | C ₁₀ H ₈ N ₃ O ₃ Cl ³⁷ Cl | 289.9907 | 289.9908 | 0.027 | 0.1 |
| | | Frg. 2 | C ₉ H ₇ N ₂ O ₂ Cl ₂ | 244.9879 | 244.9880 | 0.09 | 0.4 |
| | | ³⁷ Cl ion | C ₉ H ₇ N ₂ O ₂ Cl ³⁷ Cl | 246.9849 | 246.9853 | 0.34 | 1.4 |

IV.2.3.2. Tratamiento de la muestra y estudios de recuperación.

Para la etapa de extracción en fase sólida (SPE), 30 mL de zumo fue el volumen de muestra elegido. Se estableció un factor de preconcentración 10:1 debido a la complejidad de la matriz. Debido a que el método propuesto se basa en un protocolo SPE directo sin etapas de purificación adicionales, los extractos eran relativamente sucios para ser inyectados en el instrumento de LC-MS, siendo obligado un factor de preconcentración pequeño. Un factor de preconcentración de 20:1 o mayor implicaba extractos complejos que empeoraban la relación señal/ruido y ensuciaban la entrada del espectrómetro de masas, siendo necesarios la limpieza

y mantenimiento de la fuente con mucha mayor frecuencia. Además, en estas condiciones, el efecto matriz era considerable: alrededor de un 35% de supresión en todos los analitos estudiados. Por el contrario, el uso de un factor de preconcentración de 10:1 (o menor) no afectaba significativamente a la sensibilidad y a la estabilidad de la fuente de ionización durante largos periodos de operación. Además, el efecto matriz se redujo en la mayoría de los casos (ver apartado IV.2.3.3.b). Por otra parte, el uso de este factor de preconcentración (10:1) permite simplificar el procedimiento SPE, ya que se emplean cartuchos de extracción de menor tamaño, un reducido volumen de carga de muestra y un reducido volumen de eluyente, mejorando el rendimiento de la etapa de extracción.

Por otro lado, no se encontraron pérdidas significativas de plaguicidas usando zumos centrifugados. Los estudios de recuperación se llevaron a cabo fortificando los zumos antes de la etapa de centrifugación, observándose que los resultados no se veían afectados por esta etapa. En lo que respecta al sorbente utilizado en la etapa de extracción en fase sólida, se realizaron experimentos con C_{18} , obteniéndose bajas recuperaciones para la mayoría de los analitos y extractos no muy limpios. Se encontró que los cartuchos más adecuados eran los de relleno polimérico Oasis HLB®. La combinación de esta fase polimérica con metanol fue utilizada para el aislamiento y preconcentración de plaguicidas polares en zumos de fruta. Además, estos cartuchos son los más adecuados para ampliar este método incluyendo otras clases de plaguicidas (herbicidas, insecticidas, etc), ya que ofrecen altas recuperaciones para un gran número de compuestos con diferentes propiedades fisicoquímicas.

Para evaluar la efectividad del método, se llevaron a cabo distintos estudios de recuperación utilizando una muestra de zumo de naranja de 1L. Se eligió la matriz de zumo de naranja como la matriz más representativa de zumo. La diferencia de pH entre diferentes zumos de frutas no es significativa, siendo este parámetro el que más se debe controlar en el desarrollo de un método SPE. Varias alícuotas de 50 mL fueron fortificadas a dos niveles de concentración (10 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$) con la disolución de trabajo. Después, las muestras fortificadas se centrifugaron y se extrajeron con el método descrito. Finalmente, los extractos se analizaron mediante el método LC-MS desarrollado, obteniendo recuperaciones entre el 71 y el 109%, como puede verse en la **tabla IV.2.2**. Los resultados muestran la fiabilidad del método de extracción seguido para el análisis de residuos de plaguicidas en zumos de fruta.

Tabla IV.2.2. Estudios de recuperación en extractos de zumo fortificados con la mezcla de plaguicidas a dos niveles de concentración: 10 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

| Plaguicida | Nivel de concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Recuperación (%) | RSD (%) ($n = 5$) |
|-----------------------|---|------------------|---------------------|
| Carbendazim | 10 | 77.5 | 12.7 |
| | 20 | 96.7 | 8.8 |
| Thiabendazole | 10 | 99.3 | 10.1 |
| | 20 | 104.6 | 7.8 |
| Imazalil metabolito | 10 | 91.8 | 11.1 |
| | 20 | 85.7 | 9.0 |
| Prochloraz metabolito | 10 | 75.3 | 11.4 |
| | 20 | 82.0 | 10.3 |
| Imazalil | 10 | 96.3 | 8.4 |
| | 20 | 108.8 | 7.8 |
| Prochloraz | 10 | 71.1 | 12.1 |
| | 20 | 81.7 | 9.3 |
| Iprodione | 10 | 74.1 | 14.0 |
| | 20 | 76.7 | 11.6 |

IV.2.3.3. Parámetros analíticos.*a) Linealidad, calibración y precisión.*

Las curvas de calibración de los compuestos analizados fueron construidas a diferentes concentraciones en el rango 0.2 – 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando extractos de zumo para preparar los patrones por adición estándar. La linealidad de la respuesta analítica en el rango estudiado es excelente teniendo en cuenta que todas las rectas de calibrado de los plaguicidas analizados mostraron coeficientes de correlación mayores de 0.996, como se puede ver en la **tabla IV.2.3.**, donde se muestran también los límites de detección (LODs) y la desviación estándar relativa (RSD%) intra- e inter-día. Los valores de RSD ($n=6$) entre análisis estaban en el rango de 1.6 a 5.8% y los valores inter-día estaban entre 6.0 y 10.3%. Estos resultados indican la buena precisión del método desarrollado. Los límites de detección obtenidos se calcularon inyectando patrones en matriz a niveles de concentración bajos, correspondientes a una relación señal-ruido (S/N) próxima a 3. De forma análoga, los límites de cuantificación (LOQs) fueron estimados considerando el criterio $S/N = 10$. Los resultados obtenidos para cada fungicida se muestran en la **tabla IV.2.3.** Los límites de detección obtenidos destacables, llegando a 0.08 $\mu\text{g L}^{-1}$ para prochloraz y siendo menores de 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el resto de los compuestos estudiados.

Tabla IV.2.3. Parámetros analíticos para la determinación de residuos de plaguicidas en muestras de zumos mediante LC-TOFMS.

| Compuesto | Rango de concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Coeficiente de regresión (r) | LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | RSD (%) ($n=6$) | |
|-----------------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|-----------|
| | | | | | Intra-día | Inter-día |
| Carbendazim | 0.25 – 30 | 0.9963 | 0.25 | 1.0 | 2.5 | 7.1 |
| Thiabendazole | 0.20 - 30 | 0.9993 | 0.20 | 0.8 | 4.1 | 8.8 |
| Imazalil metabolito | 0.25 – 30 | 0.9994 | 0.25 | 1.0 | 3.8 | 9.1 |
| Prochloraz metabolito | 0.15 - 30 | 0.9999 | 0.15 | 0.5 | 5.1 | 8.0 |
| Imazalil | 0.30 – 30 | 0.9999 | 0.30 | 1.0 | 1.6 | 6.0 |
| Prochloraz | 0.08 – 30 | 0.9997 | 0.08 | 0.25 | 2.4 | 8.5 |
| Iprodione | 0.45 – 30 | 0.9981 | 0.45 | 1.5 | 5.8 | 10.3 |

b) Efecto matriz.

Cuando se trabaja con fuentes de ionización a presión atmosférica en LC-MS, los componentes de la matriz pueden aumentar o disminuir la respuesta analítica de los compuestos objeto de estudio. El problema se origina en la fuente, cuando los constituyentes de la matriz influyen sobre la ionización de los analitos coeluyentes, causando supresión de la ionización. Incluso utilizando un factor de preconcentración de sólo 10:1, los extractos son complejos, observándose una reducción en la respuesta de la mayoría de los fungicidas estudiados. Durante todo el estudio se utilizó una calibración por adición de patrón, al objeto de tener en cuenta estos efectos en la ionización/respuesta de los analitos. Las pendientes de las rectas de calibración en matriz fueron comparadas con las pendientes de las rectas de calibración en disolvente, calculando las relaciones de pendientes matriz/disolvente para cada uno de los plaguicidas. Los resultados se muestran en la **tabla IV.2.4.**, donde la importancia del efecto matriz es visible, teniendo en cuenta el hecho de que la supresión de señal es igual o mayor del 20% de la señal para más de la mitad de los compuestos estudiados. Una mayor dilución de los extractos minimiza el efecto matriz, como se ha comprobado en trabajos anteriores [240], aunque los límites de detección se ven afectados por el factor de dilución aplicado.

Tabla IV.2.4. Evaluación de los efectos matriz: comparación de las pendientes de las curvas de calibrado.

| Analito | Disolvente: Agua/Metanol | | Pte. matriz / Pte. disolvente |
|-----------------------|---|----------------------------------|----------------------------------|
| | Ecuación | Coefficiente de regresión (r) | |
| Carbendazim | $y = 1.43 \cdot 10^5 C + 4.67 \cdot 10^4$ | 0.9999 | 0.68 |
| Thiabendazole | $y = 6.97 \cdot 10^5 C + 2.44 \cdot 10^4$ | 0.9999 | 0.72 |
| Imazalil metabolito | $y = 4.43 \cdot 10^5 C + 2.53 \cdot 10^5$ | 0.9998 | 0.70 |
| Prochloraz metabolito | $y = 2.66 \cdot 10^5 C - 1.18 \cdot 10^4$ | 1.0000 | 0.82 |
| Imazalil | $y = 6.61 \cdot 10^5 C + 2.99 \cdot 10^5$ | 0.9998 | 0.81 |
| Prochloraz | $y = 3.06 \cdot 10^5 C + 1.88 \cdot 10^5$ | 0.9997 | 0.90 |
| Iprodione | $y = 1.04 \cdot 10^4 C + 6.66 \cdot 10^3$ | 0.9998 | 1.00 |

IV.2.3.4. Aplicación a muestras reales.

El método propuesto se aplicó al análisis de 23 muestras de zumos adquiridas en diferentes países europeos y Estados Unidos. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla IV.2.5**. Únicamente fueron encontrados residuos de carbendazim, thiabendazole, imazalil y prochloraz metabolito, a concentraciones relativamente bajas (comparadas con los MRLs establecidos para los plaguicidas en las correspondientes frutas). Alrededor de un 50% de las muestras analizadas contenían residuos de al menos un plaguicida.

Tabla IV.2.5. Residuos de plaguicidas encontrados en las muestras de zumo analizadas. Sólo se incluyen los datos de concentración de las muestras que dieron resultados positivos.

| Muestra No. | Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | | | | |
|-------------|--|---------------|----------|-------------------|---------------------------------|-------|
| | Carbendazim | Thiabendazole | Imazalil | Prochloraz metab. | Resto de plaguicidas estudiados | Total |
| 1 | 17.2 | 1.6 | 4.6 | ND | ND | 23.4 |
| 2 | 3.9 | ND | 1.7 | 2.1 | ND | 7.7 |
| 3 | ND | 1.1 | 10.2 | ND | ND | 11.3 |
| 4 | 12.2 | ND | ND | ND | ND | 12.2 |
| 14 | 1.8 | ND | ND | ND | ND | 1.8 |
| 16 | 4.3 | ND | ND | ND | ND | 4.3 |
| 17 | 4.0 | ND | ND | ND | ND | 4.0 |
| 18 | 5.4 | 4.3 | ND | ND | ND | 9.7 |
| 20 | 5.90 | ND | ND | ND | ND | 5.9 |
| 21 | 15.75 | ND | ND | ND | ND | 15.8 |
| 22 | 10.83 | ND | ND | ND | ND | 10.8 |
| 23 | 2.10 | ND | ND | ND | ND | 2.1 |

Correspondencia de muestras: 1. "Solevita" zumo multivitamina de 11 frutas (Jaén, España) 2. "Solevita" zumo multivitamina de 12 frutas (Jaén, España) 3. Néctar "Compal" de cítricos (Jaén, España) 4. Zumo de naranja y mango "Feel good" (Cambridge, Reino Unido) 5. "Tropicana" Zumo de naranja (Cambridge, Reino Unido) 6. "Tropicana" Zumo de naranja (Edimburgo, Reino Unido) 7. "Tesco" Zumo de naranja (Edimburgo, Reino Unido) 8. "Tropicana" Zumo de naranja (S. Petersburgo, Rusia) 9. "Tropicana" Zumo de naranja (S. Petersburgo, Rusia) 10. "V8-Splash" multi-fruit (Orlando, EEUU) 11. "Sunny delight" (Orlando, EEUU) 12. "Sunny delight" (Orlando, EEUU) 13. "Minute Maid" Zumo de naranja (Orlando, EEUU) 14. "Vivaris" zumo multifruta (Berlin, Alemania) 15. "Libehna" zumo multifruta (Berlin, Alemania) 16. "Tropicana" Zumo de naranja (Jaén, España) 17. "Don Simon" Zumo de naranja (Jaén, España) 18. "Hero fruit 2day" Fresa-Naranja (Jaén, España) 19. "Zumosol" Zumo de naranja (Jaén, España) 20. "KAS Fruit" Zumo de naranja (Jaén, España) 21. "Granini" Zumo de naranja (Jaén, España) 22. "Minute Maid Classic" Zumo de naranja (Jaén, España) 23. "Granini" Zumo de pera (Budapest, Hungría)

A modo de ejemplo, la **figura IV.2.4.** muestra el análisis de una muestra de un zumo de 12 frutas que contenía carbendazim, prochloraz metabolito e imazalil. Los positivos encontrados fueron confirmados a través de medidas de masa exacta mediante LC-TOFMS (obteniendo una exactitud de masa con un error < 3 ppm), demostrando la utilidad de esta técnica para el análisis multi-residuo de fungicidas post-cosecha en muestras de zumo.

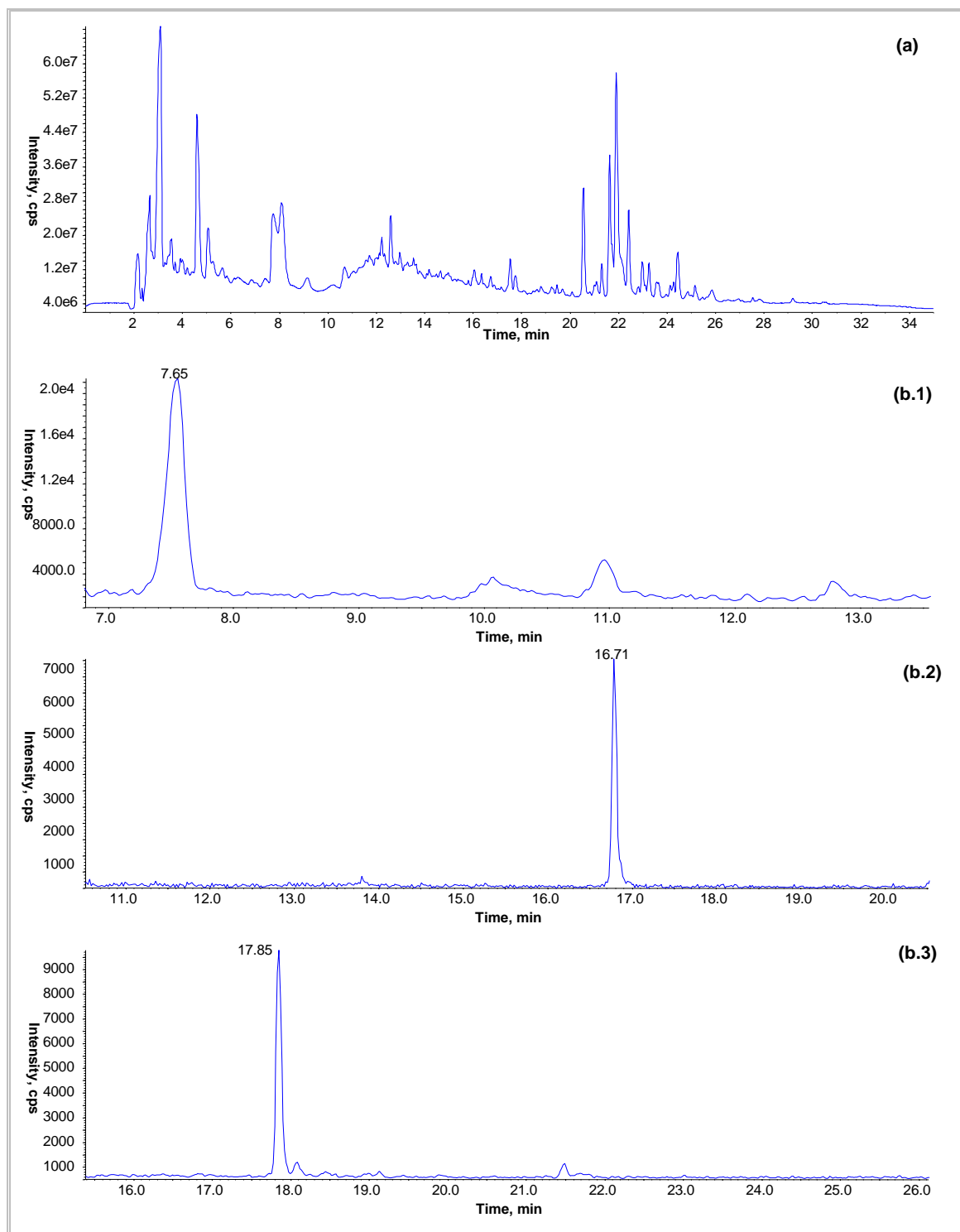


Figura IV.2.4. (a) TIC correspondiente al análisis mediante LC-TOFMS de una muestra de zumo multivitamina de 12 frutas en la que se encontraron residuos de carbendazim ($3.9 \mu\text{g L}^{-1}$), prochloraz metabolito ($1.7 \mu\text{g L}^{-1}$) e imazalil ($2.1 \mu\text{g L}^{-1}$). (b) EIC correspondiente a carbendazim (b.1), prochloraz metabolito (b.2) e imazalil (b.3).

IV.2.4. Conclusiones

En este trabajo se ha descrito un nuevo método basado en la extracción en fase sólida (SPE) y el análisis mediante LC-TOFMS para la determinación cuantitativa de fungicidas post-cosecha en muestras de zumo de frutas. Los resultados muestran que la sensibilidad obtenida con el método propuesto es adecuada para el análisis de residuos de plaguicidas de zumos de frutas. La elevada sensibilidad obtenida mediante LC-TOFMS permite cumplir con los requerimientos de la legislación vigente y es comparable a los métodos LC-MS/MS descritos previamente para el análisis de plaguicidas en zumos de frutas [105,110,234-235]. El potencial del método propuesto fue demostrado mediante el análisis de muestras reales con excelente selectividad y sensibilidad, permitiendo la confirmación inequívoca (mediante medidas de masa exacta) y la cuantificación a bajos niveles de concentración de los plaguicidas estudiados en dichas muestras. El número potencial de compuestos que podrían ser monitorizados en un único análisis es teóricamente ilimitado. El desarrollo de métodos multi-residuo para el análisis de alrededor de 100 plaguicidas en matrices complejas es posible [241,242]. El análisis mediante LC-TOFMS ofrece además la posibilidad de realizar un análisis a posteriori de las muestras en busca de compuestos para los que en principio no se había dirigido el análisis (*non-target analysis*). Esto es posible debido a la adquisición en *full scan* realizada por el instrumento, quedando registrados todos los compuestos susceptibles de ser detectados en las condiciones de extracción e ionización seleccionadas. Todos los datos son registrados y pueden ser reexaminados en busca de compuestos cuya presencia en las muestras previamente no se esperaba o que no eran objeto de control. Esta característica aumenta el potencial de aplicación de este método en cualquier laboratorio de análisis de residuos de plaguicidas.

CAPÍTULO IV.3



Detección de residuos de plaguicidas en refrescos mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas de tiempo de vuelo. Estudio de muestras de varios países.

IV.3. DETECCIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN REFRESCOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO (LC-TOFMS). ESTUDIO DE MUESTRAS DE DISTINTOS PAÍSES.

IV.3.1. Resumen

Se ha realizado en este trabajo el primer estudio a nivel mundial sobre la presencia de residuos de plaguicidas en muestras de refrescos. Aunque existen estrictas normativas y controles exhaustivos de plaguicidas en frutas, vegetales y agua de consumo, se ha prestado escasa atención a aquellos alimentos elaborados que se consumen frecuentemente y que podrían contener estos contaminantes. En el caso de la industria de los refrescos, no existe un marco normativo claro en relación con la presencia de plaguicidas, incluso cuando estos productos son altamente consumidos por grupos vulnerables como los niños. En este capítulo se describe el desarrollo de un método para la búsqueda automática de más de 100 plaguicidas en extractos de refrescos, basado en la aplicación de la cromatografía líquida-espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por electrospray (LC-TOFMS). Los extractos se obtuvieron mediante SPE con cartuchos poliméricos Oasis HLB® y metanol como eluyente. La confirmación de las especies mediante LC-TOFMS se basa en la correspondencia del tiempo de retención y la masa exacta de la molécula protonada ($[M+H]^+$) y los iones fragmento (obteniendo errores de masa exacta inferiores a 2 ppm). Empleando el método propuesto se analizaron más de 100 muestras de bebidas, adquiridas en 15 países diferentes de compañías con marcas distribuidas mundialmente, encontrándose concentraciones de plaguicidas relativamente altas en la mayoría de las muestras analizadas. Los niveles de concentración detectados estaban en el rango de los microgramos por litro, bajos si consideramos los límites establecidos en las normativas europeas (MRLs) para frutas, pero muy elevados si consideramos los MRLs establecidos en agua de consumo. Los plaguicidas detectados (carbendazim, thiabendazole, imazalil y su principal producto de degradación, prochloraz y su principal producto de degradación, malathion e iprodione) son principalmente fungicidas post-cosecha. Este estudio sugiere que se deberían tomar medidas para evitar la presencia de trazas de plaguicidas en estos productos, al objeto de minimizar la exposición de los consumidores a este tipo de contaminantes.

IV.3.2. Experimental

IV.3.2.1. Muestras

Se analizaron 102 muestras de refrescos adquiridas en 15 países distintos y en distinto formato: latas y botellas de PET. Las muestras pertenecían a las siguientes localizaciones: (1) Oporto (Portugal), (2) Madrid (España), (3) Alicante (España), (4) Jaca (España), (5) Jaén (España), (6) Almería (España), (7) Olouron St. Marie (Francia), (8) Lille (Francia), (9) Londres (Reino Unido), (10) Cambridge (Reino Unido), (11) Edimburgo (Reino Unido), (12) St. Andrews (Reino Unido), (13) Londres-Gatwick (Reino Unido), (14) Nador (Marruecos), (15) La Massana (Andorra), (16) Bolonia (Italia), (17) Vevey (Suiza), (18) Frankfurt (Alemania), (19) Berlin (Alemania), (20) Cracovia (Polonia), (21) Hradek Kralové (República Checa), (22) Český Krumlov (República Checa), (23) Bratislava (Eslovaquia), (24) Viena (Austria), (25) Budapest (Hungría), (26) Moscú (Rusia), (27) Orlando (Florida, EEUU). La información detallada de las muestras se incluye en la sección suplementaria (sección IV.3.5) al final de este capítulo. En las **tablas S1** y **S2**, se muestra una lista de las muestras analizadas, incluyendo lugar de origen y fecha de adquisición. Los compuestos detectados y la concentración de los mismos se muestran en la **tabla S3** de la información suplementaria (sección IV.3.5).

IV.3.2.2. Preparación de muestra

Los plaguicidas se extrajeron mediante un proceso de extracción en fase sólida (SPE) “off-line”. Como paso previo a la extracción, unos 20 mL de refresco fueron desgasificados para evitar la formación de canales preferentes en los cartuchos durante el proceso de extracción. El procedimiento SPE seguido aparece esquematizado en la **figura IV.3.1** y consta de las siguientes etapas:

- 1) *Acondicionamiento*: Se acondiciona el cartucho de SPE Oasis HLB® (200 mg/ 6 mL) con 5 mL de metanol (MeOH) seguidos de 5 mL de agua ultrapura, todo ello con un caudal de unos 2 mL min⁻¹.
- 2) *Carga de muestra*: Se pasan 15 mL de refresco desgasificado a través del cartucho, a un flujo de 3 mL min⁻¹.

3) *Elución*: Los analitos retenidos en el cartucho son eluidos con 5 mL de MeOH a un flujo de 1 mL min⁻¹. El eluato se recoge en un tubo de ensayo de 15 mL.

4) El extracto se evapora bajo corriente de N₂ hasta casi sequedad y luego se reconstituye con 1 mL de H₂O ultrapura y 0.5 mL de metanol. De esta forma, tenemos un factor de preconcentración de 10 (15 mL ⇒ 1.5 mL). El último paso es filtrar el extracto con un filtro de HPLC de PTFE de 0.45 µm de poro (PTFE filter, Millex FG, Millipore, Milford, MA) y trasvasar a un vial. Si no se va a realizar el análisis de forma inmediata, conservar en frío a - 20°C.

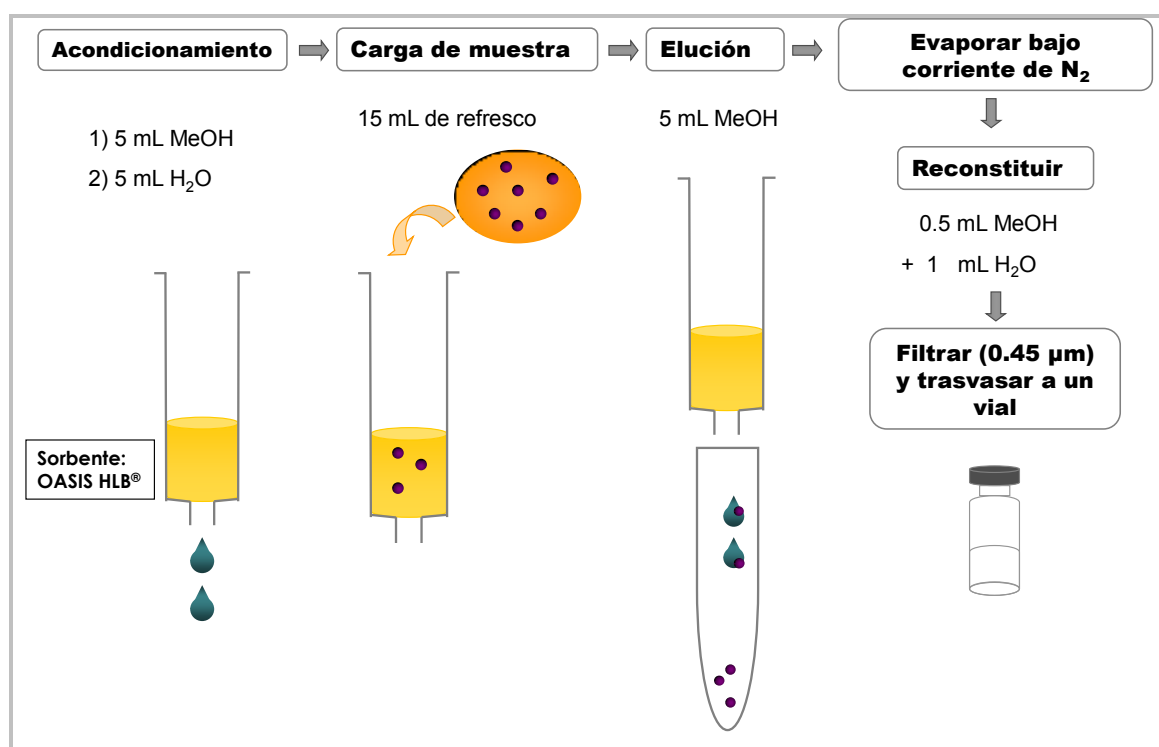


Figura IV.3.1. Esquema de la obtención del extracto de refrescos mediante SPE.

IV.3.2.3. Estudios de recuperación.

Las muestras utilizadas para el estudio de recuperación fueron analizadas previamente para comprobar que no contenían los plaguicidas de interés. Después se tomaron varias alícuotas de dichas muestras y se fortificaron con la disolución de trabajo antes de someterlas al proceso SPE descrito. Como resultado, se obtuvieron recuperaciones próximas al 100% con el método propuesto para la mayoría de los plaguicidas analizados.

IV.3.2.4. *Parámetros instrumentales*

En este estudio se utilizó el equipo HPLC-TOFMS Agilent MSD TOF descrito en el capítulo III. Los valores elegidos como óptimos para los parámetros instrumentales fueron los siguientes:

a) *Condiciones cromatográficas:*

- Fases móviles: A = H₂O (0.1% HCOOH, v/v); B = Acetonitrilo.
- Gradiente: durante 5 min se mantiene constante un 10% de B, seguido de un gradiente lineal hasta el 100% B a los 30 min. Entonces, se mantiene constante (100%B) durante 5 min. Finalmente, se disminuye la velocidad de flujo para volver a las condiciones iniciales (10%B) en 12 min (post-run).
- Velocidad de flujo: 0.6 mL min⁻¹. (0.4 mL min⁻¹ durante el post-run).
- Columna: C8, 150 mm × 4.6 mm i.d. y 5 μm de tamaño de partícula (Zorbax Eclipse XDB-C8, Agilent).
- Volumen de inyección: 50 μL.

b) *Espectrómetro de masas:*

- Fuente: ESI (+)
- Voltaje del capilar: 4000 V
- Temperatura de la fuente: 325 °C
- Presión del gas de secado (N₂): 40 psig
- Flujo del gas de secado: 9 L min⁻¹
- Voltaje de fragmentación en la fuente: 190 V
- Rango de masas: 50 – 1000 m/z
- Resolución: 9700 ± 500

IV.3.3. Resultados y discusión

IV.3.3.1. Detección automática de los plaguicidas de interés mediante LC-TOFMS a partir de medidas de masa exacta y tiempo de retención. Desarrollo del método y resultados del monitoreo.

El procedimiento de detección automática ha sido descrito en trabajos previos [241, 242] y permite el análisis de un gran número de plaguicidas y productos de degradación (por ejemplo, 100-300) en cualquier extracto de alimentos complejo, utilizando LC-TOFMS en modo de ionización positiva con análisis de masa exacta en *full scan*. El punto fuerte del método propuesto es el número teóricamente ilimitado de compuestos que pueden ser analizados simultáneamente a bajos niveles de concentración. De hecho, no se encontraron interferencias en una lista de 100 compuestos (ver **tabla IV.3.1.**). El criterio de búsqueda consistía en una ventana de masa de ± 10 mDa, una ventana de tiempo de retención de ± 0.25 min y un valor mínimo de área de 5000 (aproximadamente el valor de área típica correspondiente al LOD de un gran número de los compuestos estudiados). Este método de monitoreo contenía las masas exactas monoisotópicas de 100 plaguicidas.

Tabla IV.3.1. Medidas de masa exacta de los iones de interés y los tiempos de retención (t_R) de los compuestos incluidos en el método para el monitoreo de plaguicidas en refrescos.

| Plaguicida | Ión seleccionado ([M+H] ⁺) | m/z teórico | t _R (min) |
|------------------------|--|----------------|----------------------|
| Cyromazine | C ₆ H ₁₁ N ₆ | 167.10397 | 3.6 |
| Butoxicarboxin | C ₇ H ₁₅ N ₂ O ₄ S | 223.07470 | 3.9 |
| Carbendazim | C ₉ H ₁₀ N ₃ O ₂ | 192.07675 | 7.0 |
| Thiabendazole | C ₁₀ H ₈ N ₃ S | 202.04334 | 8.6 |
| Oxamyl ^a | C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₃ SNa | 242.05698 | 11.2 |
| Aldicarb-sulfone | C ₇ H ₁₅ N ₂ O ₄ S | 223.0747 | 11.4 |
| Nitenpyram | C ₁₁ H ₁₆ N ₄ O ₂ Cl | 271.09563 | 12.1 |
| Methomyl ^a | C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ SNa | 185.03552 | 12.2 |
| Chloridazon | C ₁₀ H ₉ N ₃ OCl | 222.04286 | 14.7 |
| Ethiofencarb sulfoxide | C ₁₁ H ₁₆ NO ₃ S | 242.08454 | 13.6 |
| Thiofanox-sulfoxide | C ₉ H ₁₉ N ₂ O ₃ S | 235.11109 | 13.7 |
| Thiamethoxam | C ₈ H ₁₁ N ₅ O ₃ ClS | 292.02656 | 13.7 |
| Methiocarb sulfoxide | C ₁₁ H ₁₆ NO ₃ S | 242.08454 | 14.4 |
| Metamitron | C ₁₀ H ₁₁ N ₄ O | 203.09273 | 14.5 |
| Imazalil-Met | C ₁₁ H ₁₁ N ₂ OCl ₂ | 257.02429 | 14.6 |
| Cambendazole | C ₁₄ H ₁₅ N ₄ O ₂ S | 303.09102 | 14.9 |
| Ethiofencarb sulphone | C ₁₁ H ₁₆ NO ₄ S | 258.07945 | 15.1 |
| Imidacloprid | C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₂ Cl | 256.05957 | 15.5 |
| Oxfendazole | C ₁₅ H ₁₄ N ₃ O ₃ S | 316.07503 | 15.5 |

| Plaguicida | Ión seleccionado ([M+H] ⁺) | m/z teórico | t _R (min) |
|---------------------------|--|----------------|----------------------|
| Dimethoate | C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂ | 230.0069 | 16.1 |
| Acetamiprid | C ₁₀ H ₁₂ N ₄ Cl | 223.0745 | 16.3 |
| Thiofanox-sulfone | C ₉ H ₁₉ N ₂ O ₄ S | 251.10600 | 16.4 |
| Prochloraz-Met | C ₁₁ H ₁₅ NOCl ₃ | 282.02137 | 16.8 |
| Cymoxanil | C ₇ H ₁₁ N ₄ O ₃ | 199.08256 | 17.4 |
| Albendazole | C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₂ S | 266.09577 | 17.8 |
| Butocarboxin ^a | C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ SNa | 213.06682 | 17.1/17.6 |
| Methiocarb sulfone | C ₁₁ H ₁₆ NO ₄ S | 258.07945 | 17.3 |
| Thiacloprid | C ₁₀ H ₁₀ N ₄ ClS | 253.03092 | 17.8 |
| Imazalil | C ₁₄ H ₁₅ N ₂ OCl ₂ | 297.0559 | 17.9 |
| Mebendazole | C ₁₆ H ₁₄ N ₃ O ₃ | 296.10296 | 18.0 |
| Aldicarb | C ₇ H ₁₅ N ₂ O ₂ S | 191.08487 | 18.4 |
| Oxadixyl | C ₁₄ H ₁₉ N ₂ O ₄ | 279.13393 | 18.7 |
| Simazine | C ₁₀ H ₈ N ₃ OCl | 202.08539 | 18.7 |
| Fluroxypyr | C ₇ H ₆ N ₂ O ₃ FCl ₂ | 254.9734 | 18.8 |
| Monuron | C ₉ H ₁₁ N ₂ OCl | 199.06306 | 18.8 |
| Flubendazole | C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃ F | 314.09354 | 18.8 |
| Lenacil | C ₁₃ H ₁₉ N ₂ O ₂ | 235.1441 | 19.2 |
| Methyl-Thiophanate | C ₁₂ H ₁₅ N ₄ O ₄ S ₂ | 343.05292 | 19.4 |
| Pyrimethanil | C ₁₂ H ₁₄ N ₃ | 200.11822 | 19.6 |
| Spiroxamine | C ₁₈ H ₃₆ NO ₂ | 298.27405 | 19.8 |
| Ethoxyquin | C ₁₄ H ₂₀ NO | 218.15394 | 19.9 |
| Prometryn | C ₁₀ H ₂₀ N ₅ S | 242.14339 | 20.1 |
| Fenbendazole | C ₁₅ H ₁₄ N ₃ O ₂ S | 300.08012 | 20.2 |
| Carbofuran | C ₁₂ H ₁₆ NO ₃ | 222.11246 | 20.4 |
| Chlorotoluron | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ OCl | 213.07891 | 20.4 |
| Bendiocarb | C ₁₁ H ₁₄ NO ₄ | 224.09173 | 20.6 |
| Spinosyn A | C ₄₁ H ₆₆ NO ₁₀ | 732.46812 | 20.9 |
| Fluometuron | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ OF ₃ | 233.08962 | 21.0 |
| Atrazine | C ₈ H ₁₅ N ₅ Cl | 216.10104 | 21.1 |
| Miconazole | C ₁₈ H ₁₅ N ₂ OCl ₄ | 414.9933 | 21.1 |
| Thiofanox ^a | C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₂ NaS | 241.09812 | 21.1 |
| Metalaxyl | C ₁₅ H ₂₂ NO ₄ | 280.15433 | 21.2 |
| Isoproturon | C ₁₂ H ₁₉ N ₂ O | 207.14918 | 21.2 |
| Diazoxon | C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₄ P | 289.13117 | 21.2 |
| Difenoxuron | C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₃ | 287.13901 | 21.2 |
| Diuron | C ₉ H ₁₁ N ₂ OCl ₂ | 233.02429 | 21.3 |
| Monolinuron | C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₂ Cl | 215.05818 | 21.5 |
| Ethiofencarb | C ₁₁ H ₁₆ NO ₂ S | 226.08944 | 21.6 |
| Spinosyn D | C ₄₂ H ₆₈ NO ₁₀ | 746.48377 | 21.6 |
| Metobromuron | C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₂ Br | 259.00766 | 22.0 |
| Dimethomorph | C ₂₁ H ₂₃ NO ₄ Cl | 388.13101 | 22.1/22.5 |
| Flazasulfuron | C ₁₃ H ₁₃ N ₅ O ₅ F ₃ S | 408.0584 | 22.3 |
| Ioxynil | C ₇ H ₄ NOI ₂ | 371.83769 | 22.6 |
| Triadimenol | C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₂ Cl | 296.11603 | 22.7/23.1 |
| Prochloraz | C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₂ Cl ₃ | 376.03808 | 22.8 |
| Propazine | C ₉ H ₁₇ N ₅ Cl | 230.11669 | 23.0 |
| Cyproconazole | C ₁₅ H ₁₉ N ₃ OCl | 292.12111 | 23.3 |

| Plaguicida | Ión seleccionado ([M+H] ⁺) | m/z teórico | t _R (min) |
|---------------------------|--|----------------|----------------------|
| Methiocarb | C ₁₁ H ₁₆ NO ₂ S | 226.08962 | 23.4 |
| Terbutylazine | C ₉ H ₁₇ N ₅ Cl | 230.11669 | 23.4 |
| Chloroxuron | C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₂ Cl | 291.08948 | 23.5 |
| Bromuconazole | C ₁₃ H ₁₃ N ₃ OBrCl ₂ | 375.96135 | 23.6/24.5 |
| Linuron | C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₂ Cl ₂ | 249.0192 | 23.7 |
| Methidathion ^a | NaC ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃ | 324.95108 | 23.7 |
| Fenamiphos | C ₁₃ H ₂₃ NO ₃ PS | 304.11308 | 23.8 |
| Chlorbromuron | C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₂ BrCl | 292.96869 | 24.0 |
| Azoxystrobin | C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅ | 404.12409 | 24.1 |
| Promecarb | C ₁₂ H ₁₈ NO ₂ | 208.1332 | 24.1 |
| Tebuconazole | C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OCl | 308.15241 | 24.5 |
| Triadimefon | C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₂ Cl | 294.10038 | 24.5 |
| Tetraconazole | C ₁₃ H ₁₂ N ₃ OF ₄ Cl ₂ | 372.0288 | 24.6 |
| Diflubenzuron | C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O ₂ ClF ₂ | 311.03933 | 24.9 |
| Iprodione | C ₁₃ H ₁₄ N ₃ O ₃ Cl ₂ | 330.04067 | 25.3 |
| Triflumizol | C ₁₅ H ₁₆ N ₃ OF ₃ Cl | 346.09285 | 25.5 |
| Malathion | C ₁₀ H ₂₀ O ₆ PS ₂ | 331.04334 | 25.6 |
| Procymidone | C ₁₃ H ₁₂ NO ₂ Cl ₂ | 284.02396 | 25.6 |
| Neburon | C ₁₂ H ₁₇ N ₂ OCl ₂ | 275.07124 | 25.8 |
| Vinclozolin | C ₁₂ H ₁₀ NO ₃ Cl ₂ | 286.00322 | 26.3 |
| Mecarbam | C ₁₀ H ₂₁ NO ₅ PS ₂ | 330.05933 | 26.4 |
| Triflumuron | C ₁₅ H ₁₁ N ₂ O ₃ F ₃ Cl | 359.04048 | 26.5 |
| Dichlofluanid | C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₂ Cl ₂ F ₂ S ₂ | 332.96958 | 26.6 |
| Hexaflumuron | C ₁₆ H ₉ N ₂ O ₃ F ₆ Cl ₂ | 460.98889 | 27.2 |
| Buprofezin | C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS | 306.16346 | 27.2 |
| Diazinon | C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS | 305.10832 | 27.5 |
| Teflubenzuron | C ₁₄ H ₇ N ₂ O ₂ F ₄ Cl ₂ | 380.98152 | 27.6 |
| Thiobencarb | C ₁₂ H ₁₆ NOCIS | 258.07139 | 27.6 |
| Lufenuron | C ₁₇ H ₈ N ₂ O ₃ F ₈ Cl ₂ | 510.98570 | 28.6 |
| Pyriproxyfen | C ₂₀ H ₂₀ NO ₃ | 322.14377 | 29.2 |
| Flufenoxuron | C ₂₁ H ₁₂ N ₂ O ₃ F ₆ Cl | 489.04351 | 29.3 |
| Chlorfluazuron | C ₂₀ H ₁₀ N ₃ O ₃ F ₅ Cl ₃ | 539.97024 | 29.7 |
| Hexythiazox | C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₂ CIS | 353.1085 | 30.0 |

^a aductos de sodio

Una vez se concluye el análisis mediante LC-TOFMS, a partir del archivo generado de la muestra, el software, de forma automática, busca y extrae cada uno de los iones de interés que se han incluido en la base de datos. Para el análisis de 100 plaguicidas, se emplean de 2 a 5 minutos en un ordenador portátil, dependiendo también del tamaño del archivo (un análisis de 30 min genera un archivo de unos 80 MB aprox.). A partir de los datos adquiridos mediante LC-TOFMS, la base de datos de búsqueda automática muestra una lista con los positivos encontrados dentro de los límites de tiempo de retención, masa exacta y área establecidos. La posterior confirmación de estos positivos preliminares se realiza utilizando un valor máximo de tolerancia en el error de masa de 5 ppm.

Los resultados obtenidos utilizando el método de búsqueda automática de los compuestos reveló la presencia de los siguientes plaguicidas en un número considerable de las muestras analizadas (alrededor de 100): carbendazim, thiabendazole, imazalil y su principal producto de degradación (imazalil metabolito), prochloraz y su principal producto de degradación (prochloraz metabolito), y malathion. En estas muestras positivas, cuando era posible, se usaron también las medidas de masa exacta de los fragmentos y los patrones isotópicos, al objeto de proporcionar la confirmación inequívoca de los plaguicidas detectados automáticamente en el proceso de monitoreo. La **tabla IV.3.2.** muestra los resultados del análisis de masa exacta de una muestra de refresco fortificada con los plaguicidas detectados más frecuentemente a un nivel de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Las exactitudes de masa obtenidas para la molécula protonada y los fragmentos estaban en torno a 3 ppm.

Tabla IV.3.2. Identificación y confirmación de residuos de plaguicidas en refrescos mediante LC-TOFMS. Medida de masa exacta de un extracto de refresco fortificado a un nivel de concentración de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ con una muestra de los plaguicidas encontrados a lo largo de todo el estudio.

| Compuesto | t_R | ión | Composiciones elementales | m/z teórica | m/z experimental | Error | |
|-----------------------|-------|-----------------------------------|--|-------------|------------------|-------|-----|
| | | | | | | mDa | ppm |
| Carbendazim | 7.7 | [M+H] ⁺ | C ₉ H ₁₀ N ₃ O ₂ | 192.0767 | 192.0765 | -0.25 | 1.3 |
| | | Frg. | C ₈ H ₆ N ₃ O | 160.0505 | 160.0502 | -0.33 | 2.1 |
| Thiabendazole | 9.8 | [M+H] ⁺ | C ₁₀ H ₈ N ₃ S | 202.0433 | 202.0432 | -0.14 | 0.7 |
| Imazalil metabolito | 14.7 | [M+H] ⁺ | C ₁₁ H ₁₁ N ₂ OCl ₂ | 257.0242 | 257.0245 | 0.20 | 0.8 |
| | | ³⁷ Cl ión | C ₁₁ H ₁₁ N ₂ OCl ³⁷ Cl | 259.0213 | 259.0216 | -0.27 | 1.0 |
| Prochloraz metabolito | 16.7 | [M+H] ⁺ | C ₁₁ H ₁₅ NOCl ₃ | 282.0213 | 282.0211 | -0.27 | 1.0 |
| | | ³⁷ Cl ión | C ₁₁ H ₁₅ NOCl ₂ ³⁷ Cl | 284.0184 | 284.0180 | -0.42 | 1.5 |
| | | ³⁷ Cl ₂ ión | C ₁₁ H ₁₅ NOCl ³⁷ Cl ₂ | 286.0154 | 286.0150 | -0.47 | 1.6 |
| Imazalil | 17.9 | [M+H] ⁺ | C ₁₄ H ₁₅ N ₂ OCl ₂ | 297.0555 | 297.0549 | -0.69 | 2.3 |
| | | ³⁷ Cl ión | C ₁₄ H ₁₅ N ₂ OCl ³⁷ Cl | 299.0526 | 299.0526 | -0.25 | 0.8 |
| Prochloraz | 22.9 | [M+H] ⁺ | C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₂ Cl ₃ | 376.0380 | 376.0384 | 0.31 | 0.8 |
| | | ³⁷ Cl ión | C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₂ Cl ₂ ³⁷ Cl | 378.0351 | 378.0356 | 0.46 | 1.2 |
| | | ³⁷ Cl ₂ ión | C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₂ Cl ³⁷ Cl ₂ | 380.0321 | 380.0326 | 0.41 | 1.1 |
| | | Frg. 1 | C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ Cl ₃ | 308.0006 | 308.0012 | 0.56 | 1.8 |
| | | ³⁷ Cl ión | C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ Cl ₂ ³⁷ Cl | 309.9976 | 309.9983 | 0.61 | 2.0 |
| | | ³⁷ Cl ₂ ión | C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ Cl ³⁷ Cl ₂ | 311.9947 | 311.9953 | 0.66 | 2.1 |
| Malathion | 25.3 | [M+H] ⁺ | C ₁₀ H ₂₀ O ₆ PS ₂ | 331.04334 | 331.0433 | -0.05 | 0.2 |
| | | [M+Na] ⁺ | C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂ Na | 353.0252 | 353.0254 | 0.11 | 0.3 |
| | | Frg. 1 | C ₈ H ₁₄ O ₅ PS ₂ | 285.0015 | 285.0019 | 0.41 | 1.5 |
| | | Frg. 2 | C ₂ H ₈ O ₂ PS ₂ | 158.9698 | 158.9697 | -0.09 | 0.6 |
| | | Frg. 3 | C ₆ H ₇ O ₃ | 127.0389 | 127.0388 | 0.17 | 1.3 |

| | | | | | | | |
|------------------|------|----------------------|---|----------|----------|-------|-----|
| | | Frg. 4 | C ₂ H ₆ O ₂ PS | 124.9821 | 124.9820 | 0.006 | 0.5 |
| | | Frg. 5 | C ₄ H ₃ O ₃ | 99.00767 | 99.0078 | 0.13 | 1.3 |
| Iprodione | 25.5 | [M+H] ⁺ | C ₁₃ H ₁₄ N ₃ O ₃ Cl ₂ | 330.0406 | 330.0412 | -0.52 | 1.6 |
| | | ³⁷ Cl ión | C ₁₃ H ₁₄ N ₃ O ₃ Cl ³⁷ Cl | 332.0377 | 332.0382 | 0.47 | 1.4 |
| | | Frg. 2 | C ₉ H ₇ N ₂ O ₂ Cl ₂ | 244.9879 | 244.9880 | 0.09 | 0.4 |
| | | ³⁷ Cl ión | C ₉ H ₇ N ₂ O ₂ Cl ³⁷ Cl | 246.9849 | 246.9853 | 0.34 | 1.4 |

Se estudiaron las condiciones de la ionización por electrospray para conseguir la mayor sensibilidad y selectividad posible para los plaguicidas estudiados. Se seleccionaron valores por defecto de experiencias previas en métodos multi-residuo [240-241]. El valor del voltaje de fragmentación (fragmentor voltaje), que afecta a la fragmentación a la salida del capilar y por tanto a la sensibilidad, fue fijado en 190 V, como compromiso entre la sensibilidad de la molécula protonada para la cuantificación y la información adicional que proporcionan los fragmentos a efectos de confirmación.

IV.3.3.2. Protocolo de preparación de muestra para los plaguicidas estudiados.

Para el análisis no dirigido de residuos de plaguicidas en refrescos se empleó un tratamiento de muestra genérico, basado en extracción en fase sólida. Con este método se recuperan compuestos con distintas propiedades físico-químicas de forma satisfactoria. Además se analizaron “blancos” de los disolventes y los cartuchos durante todo el estudio para asegurar la ausencia de contaminación entre muestras. La concentración y frecuencia de aparición de algunos compuestos en el estudio preliminar de las muestras nos condujo a la realización de una validación del método de extracción para los compuestos más frecuentemente detectados, al objeto de confirmar la recuperación de los mismos mediante el método SPE general aplicado a las muestras para su monitoreo.

Para la etapa de extracción SPE, se seleccionó un volumen de 15 mL de refresco como volumen de carga de muestra. El factor de preconcentración establecido fue de 10:1 debido a la complejidad de la matriz. Ya que el método propuesto se basa en un protocolo SPE directo sin etapas de purificación adicionales, los extractos eran relativamente sucios para ser inyectados en el instrumento de LC-MS, siendo necesario un factor de preconcentración pequeño. Un factor de preconcentración de 20:1 o mayor implicaba extractos complejos que empeoraban la relación señal/ruido y ensuciaban la entrada del espectrómetro de masas, lo que requería la limpieza y mantenimiento diario de la fuente. Además, en estas condiciones, el efecto matriz

era considerable: alrededor de un 35% de supresión en todos los analitos estudiados. Por el contrario, el uso de un factor de preconcentración de 10:1 (o menor) no afectaba significativamente a la sensibilidad y a la estabilidad de la fuente de ionización durante largos periodos de operación. Además, el efecto matriz se redujo para todos los analitos estudiados (porcentajes de supresión inferiores al 5% en todos los casos), lo que aseguraba la exactitud en la cuantificación de las muestras.

Para evaluar la efectividad del método, se llevaron a cabo distintos estudios de recuperación utilizando una muestra de refresco de naranja de 1L. Varias alícuotas de 20 mL fueron fortificadas a tres niveles de concentración (5, 10 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$) con la disolución de trabajo. Después, las muestras fortificadas se dejaron a temperatura ambiente hasta que perdieron el gas y luego se extrajeron con el método descrito. Finalmente, los extractos se analizaron mediante el método LC-MS desarrollado, obteniendo recuperaciones entre el 74 y el 106%, como puede comprobarse en la **tabla IV.3.3**. Los resultados del estudio y la precisión obtenida muestran la validez del método de extracción estudiado para el análisis de residuos de plaguicidas en refrescos.

Tabla IV.3.3. Estudios de recuperación en refrescos fortificados con los plaguicidas seleccionados a tres niveles de concentración: 5, 10 and 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

| Plaguicida | Nivel de fortificación ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Recuperación (%) | RSD (%) ($n = 5$) |
|-----------------------|--|------------------|------------------------|
| Carbendazim | 5 | 79.5 | 10.2 |
| | 10 | 96.7 | 9.1 |
| | 20 | 91.0 | 8.7 |
| Thiabendazole | 5 | 95.3 | 10.1 |
| | 10 | 104.6 | 9.2 |
| | 20 | 102.1 | 6.9 |
| Imazalil metabolito | 5 | 90.8 | 11.1 |
| | 10 | 85.7 | 9.0 |
| | 20 | 94.1 | 6.7 |
| Prochloraz metabolito | 5 | 78.3 | 11.4 |
| | 10 | 82.0 | 9.8 |
| | 20 | 91.0 | 8.7 |
| Imazalil | 5 | 96.3 | 8.4 |
| | 10 | 105.8 | 7.5 |
| | 20 | 96.1 | 8.9 |
| Prochloraz | 5 | 75.8 | 12.1 |
| | 10 | 81.7 | 7.3 |
| | 20 | 89.1 | 8.7 |
| Malathion | 5 | 79.1 | 12.0 |
| | 10 | 81.7 | 9.9 |
| | 20 | 83.0 | 10.1 |
| Iprodione | 5 | 74.1 | 13.0 |
| | 10 | 76.7 | 11.2 |
| | 20 | 73.7 | 12.3 |

IV.3.3.3. Parámetros analíticos.

Para la identificación y cuantificación de los analitos se utilizaron los cromatogramas extraídos (EICs) con una ventana de masa de 20 mDa ($[M+H]^+ \pm 10$ mDa). La molécula protonada ($[M+H]^+$) se utilizó para la confirmación y cuantificación en la mayoría de los casos, a excepción de prochloraz, para el cual la abundancia relativa del fragmento característico mayoritario (m/z 308) era mayor que la abundancia de la molécula protonada, en las condiciones de análisis seleccionadas. Además, algunos de los plaguicidas estudiados presentaban átomos de cloro (ej: imazalil, imazalil metabolito y prochloraz), los cuales ofrecen un patrón isotópico característico, proporcionando información adicional para la identificación inequívoca de los compuestos de interés.

Las curvas de calibración de los compuestos analizados fueron construidas a diferentes concentraciones en el rango $0.1 - 50 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando extractos de refresco para preparar los patrones en matriz. La linealidad de la respuesta analítica obtenida en el rango estudiado fue excelente teniendo en cuenta que todas las rectas de calibrado de los plaguicidas analizados mostraban coeficientes de correlación mayores de 0.999, como se puede ver en la **tabla IV.3.4.**, donde se muestran también los límites de detección (LODs) y las desviación estándar relativa (RSD%) intra- e inter-día. Los valores de RSD ($n=6$) entre análisis estaban en el rango de 1.2 a 6.3% y los valores inter-día estaban entre 3.4 y 9.9%. Estos resultados demuestran la precisión del método desarrollado. Los límites de detección obtenidos se calcularon inyectando patrones en matriz a niveles de concentración correspondientes a una relación señal-ruido $S/N = 3$. De forma análoga, los límites de cuantificación (LOQs) fueron estimados considerando el criterio $S/N = 10$. Los resultados obtenidos para cada fungicida se muestran en la **tabla IV.3.4.** Los límites de detección obtenidos fueron muy bajos, como por ejemplo 6 ng L^{-1} para prochloraz o imazalil y menores de $0.03 \mu\text{g L}^{-1}$ para el resto de los compuestos estudiados, permitiendo un apropiado monitoreo de las muestras de refrescos a niveles de ultratrazas.

Tabla IV.3.4. Parámetros analíticos para el análisis de los plaguicidas seleccionados en refrescos mediante LC-TOFMS.

| Compuesto | Rango de concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Coeficiente de regresión (r) | LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | RSD (%) ($n=6$) | |
|-----------------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|-----------|
| | | | | | Intra-día | Inter-día |
| Carbendazim | 0.1 – 50 | 0.9990 | 0.03 | 0.1 | 2.9 | 7.8 |
| Thiabendazole | 0.1 – 50 | 0.9996 | 0.009 | 0.03 | 3.7 | 8.2 |
| Imazalil metabolito | 0.1 – 50 | 0.9997 | 0.006 | 0.02 | 1.9 | 6.1 |
| Prochloraz metabolito | 0.1 – 50 | 0.9999 | 0.006 | 0.02 | 3.1 | 4.5 |
| Imazalil | 0.1 – 50 | 0.9991 | 0.006 | 0.02 | 1.2 | 3.4 |
| Prochloraz | 0.1 – 50 | 0.9998 | 0.006 | 0.02 | 2.4 | 4.9 |
| Malathion | 0.1 – 50 | 0.9997 | 0.006 | 0.02 | 4.4 | 9.0 |
| Iprodione | 1 – 50 | 0.9991 | 0.09 | 0.3 | 6.3 | 9.9 |

IV.3.3.4. Resultados del monitoreo y discusión.

Se obtuvieron refrescos de diferentes marcas, de forma que quedaba cubierta una gran parte del mercado global de este tipo de bebidas. Se analizaron 102 muestras de refrescos adquiridas en 15 países distintos y se investigó la presencia de 100 compuestos (ver **tabla IV.3.1.**). Las muestras pertenecían a las siguientes localizaciones: Portugal (1), España (41), Francia (8), Reino Unido (19), Marruecos (2), Italia (5), Suiza (1), Alemania (3), Polonia (1), República Checa (2), Eslovaquia (1), Austria (2), Hungría (1), Rusia (4), Estados Unidos (11) (ver **tablas S1 y S2** de la información suplementaria, sección IV.3.5.).

De las 102 muestras analizadas sólo 17 (16.7%) estaban libres de residuos de los plaguicidas estudiados. El resto de las muestras dieron resultados positivos. Dentro de estas últimas, el 14.6% contenía un plaguicida, el 4% contenían dos plaguicidas, el 65% contenía al menos 3 plaguicidas y el 58% de las muestras estudiadas contenía 4 o más plaguicidas. La concentración encontrada para los plaguicidas encontrados se muestra en la información suplementaria (**tabla S3**). Por ejemplo, se encontraron siete clases distintas de plaguicidas a concentraciones relevantes en una misma muestra. No se debe olvidar que la presencia de más de un

compuesto puede potenciar el efecto tóxico que cada uno de ellos ejerce por separado. El efecto combinado de una mezcla de plaguicidas puede ser más nocivo que la suma de los efectos individuales de los mismos [149].

Hay que destacar que la mayoría de las muestras procedentes de Estados Unidos (11 muestras adquiridas en Orlando, Florida) no contenían plaguicidas. Esto se explica porque dichas muestras, tal y como reflejaba la etiqueta, eran aromatizadas artificialmente y por tanto no contenían extractos de frutas. En las muestras procedentes de Marruecos y Rusia tampoco se encontraron concentraciones significativas de estos compuestos, aunque estos productos sí contenían cierto porcentaje de zumo. En estos casos se pueden dar dos posibilidades: el producto es manufacturado mediante un proceso distinto o las materias primas estaban libres de plaguicidas. Se debería realizar un estudio más detallado de estas muestras que dieron negativo, incluyendo otras clases de plaguicidas menos utilizados (por ejemplo, organoclorados y organofosforados) o incluso prohibidos en la Unión Europea. El resto de las muestras adquiridas en Europa contenían cantidades relativamente elevadas de carbendazim, imazalil, imazalil metabolito, prochloraz, prochloraz metabolito y thiabendazole.

Los plaguicidas detectados más frecuentemente fueron principalmente fungicidas post-cosecha: carbendazim (73% muestras), imazalil (68%), imazalil metabolito (60%), prochloraz (50%), prochloraz metabolito (40%) y thiabendazole (56%); aunque también fueron detectados insecticidas (se detectaron trazas de malathion en un 23% de las muestras). En la **figura IV.3.2.** se muestran los niveles de concentración encontrados de imazalil y thiabendazole en algunas muestras seleccionadas. Los valores individuales de concentración encontrados son mucho mayores que el límite máximo permitido (MRL) para cada uno de estos compuestos en agua de consumo humano según la legislación europea, $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$. En la **tabla IV.3.5.** se muestran los rangos de concentración de los plaguicidas en el total de muestras estudiadas. Por ejemplo, el rango de concentración de imazalil en las muestras positivas oscilaba entre 0.05 y $32.0 \mu\text{g L}^{-1}$ (de 0.5 a 320 veces el MRL europeo para agua de consumo humano). Además, el rango para la concentración de thiabendazole en las muestras positivas variaba entre 0.18 y $9.8 \mu\text{g L}^{-1}$ (de 1.8 a 98 veces el MRL europeo para agua de consumo).

Tabla IV.3.5. Niveles de concentración de los plaguicidas detectados en las muestras de refrescos analizadas.

| Plaguicida | Positivos en las muestras (%) | Rango de concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$) | x MRL |
|-----------------------|-------------------------------|---|------------|
| Carbendazim | 73 | 0.11 – 4.8 | 1.1 – 48 |
| Imazalil | 68 | 0.05 – 32 | 0.5 – 320 |
| Imazalil Metabolito | 60 | 0.025 – 0.74 | 0.25 – 7.4 |
| Thiabendazole | 56 | 0.18 – 9.8 | 1.8 – 98 |
| Prochloraz | 50 | 0.036 – 3.7 | 0.36 – 37 |
| Prochloraz metabolito | 40 | 0.18 – 1.4 | 1.8 – 14 |
| Malathion | 22 | 0.02 – 0.16 | 0.2 – 1.6 |
| Iprodione | 1 | 0.71 | 7.1 |

En la **figura IV.3.3.** se muestra la concentración media de los compuestos detectados en las muestras de refrescos estudiadas, clasificadas por países. Las muestras de España y el Reino Unido eran las que contenían un nivel más elevado de plaguicidas. En la **figura IV.3.4.** se puede ver, a modo de ejemplo, el análisis mediante LC-TOFMS de una muestra del Reino Unido. La concentración media de las muestras del Reino Unido analizadas fue de $17.4 \mu\text{g L}^{-1}$, que es 34.6 veces el MRL para la suma de plaguicidas. La concentración media para el total de plaguicidas encontrados en las muestras españolas fue $12.3 \mu\text{g L}^{-1}$, 25 veces el MRL europeo. Excepto para las muestras de Estados Unidos, Rusia y Marruecos, el MRL se excedía en todas las muestras de cada país. En Alemania, la concentración media fue $8.4 \mu\text{g L}^{-1}$, 17 veces el MRL europeo. En Francia, la concentración media fue $4.9 \mu\text{g L}^{-1}$, 9.8 veces el MRL europeo, y en Austria, $7.0 \mu\text{g L}^{-1}$, 14 veces el MRL europeo.

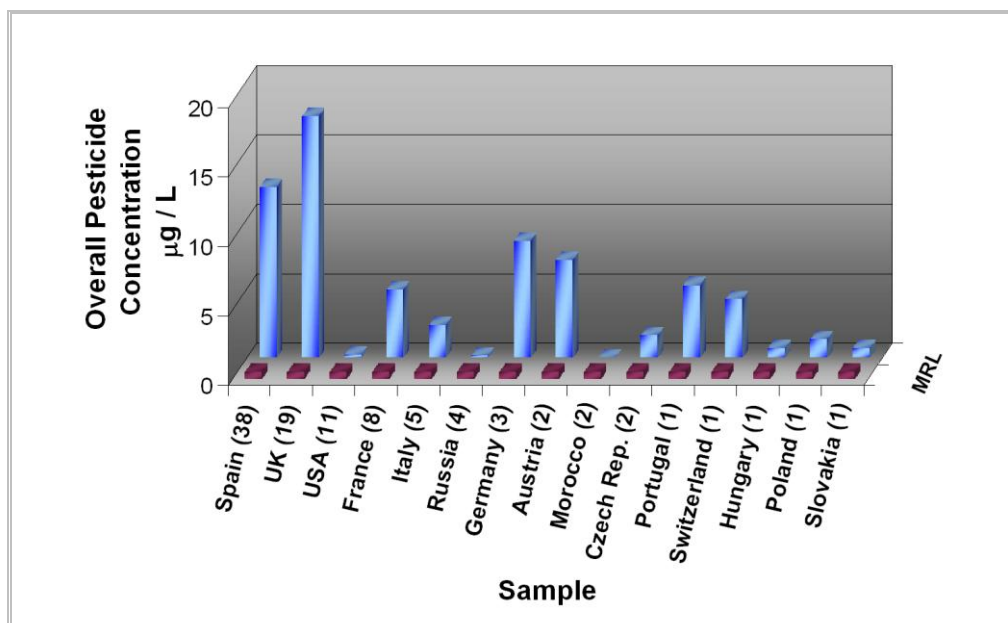


Figura IV.3.3. Concentraciones medias totales (expresadas en $\mu\text{g L}^{-1}$) de los plaguicidas encontrados en las muestras de refrescos, ordenadas por países (en azul) y límite máximo de residuos (MRL) tolerado para la suma de plaguicidas ($0.5 \mu\text{g L}^{-1}$) según el estándar europeo (rojo). El número de muestras aparece entre paréntesis al lado de cada país. Los valores de concentración media total de cada país excedían el MRL establecido para agua de consumo humano en la mayoría de los casos, especialmente en España y el Reino Unido, donde las concentraciones encontradas eran 25 y 35 veces el estándar europeo, respectivamente.

De los resultados obtenidos a partir del estudio de los niveles de concentración detectados en las muestras de refrescos analizadas, se puede deducir que la concentración total de plaguicidas en el extracto o en la(s) fruta(s) utilizadas para aromatizar la bebida, que supone el 5-8% del producto, es realmente alta (por ejemplo, entre 300 y $800 \mu\text{g L}^{-1}$). Esto sugiere que la piel es también usada en el proceso de elaboración del extracto que aromatiza los refrescos. Las pieles contienen cantidades relativamente elevadas de plaguicidas, y esos compuestos son finalmente transferidos al producto. La fuente de contaminación se puede atribuir a malas prácticas durante el proceso de elaboración de los productos: la piel de las frutas (principalmente cítricos) no es eliminada o no es lavada convenientemente antes del exprimido, probablemente para reducir costes. Por lo tanto, no sería difícil reducir esa fuente de contaminación, simplemente habría que cambiar la forma en la que se obtiene el extracto concentrado de fruta.

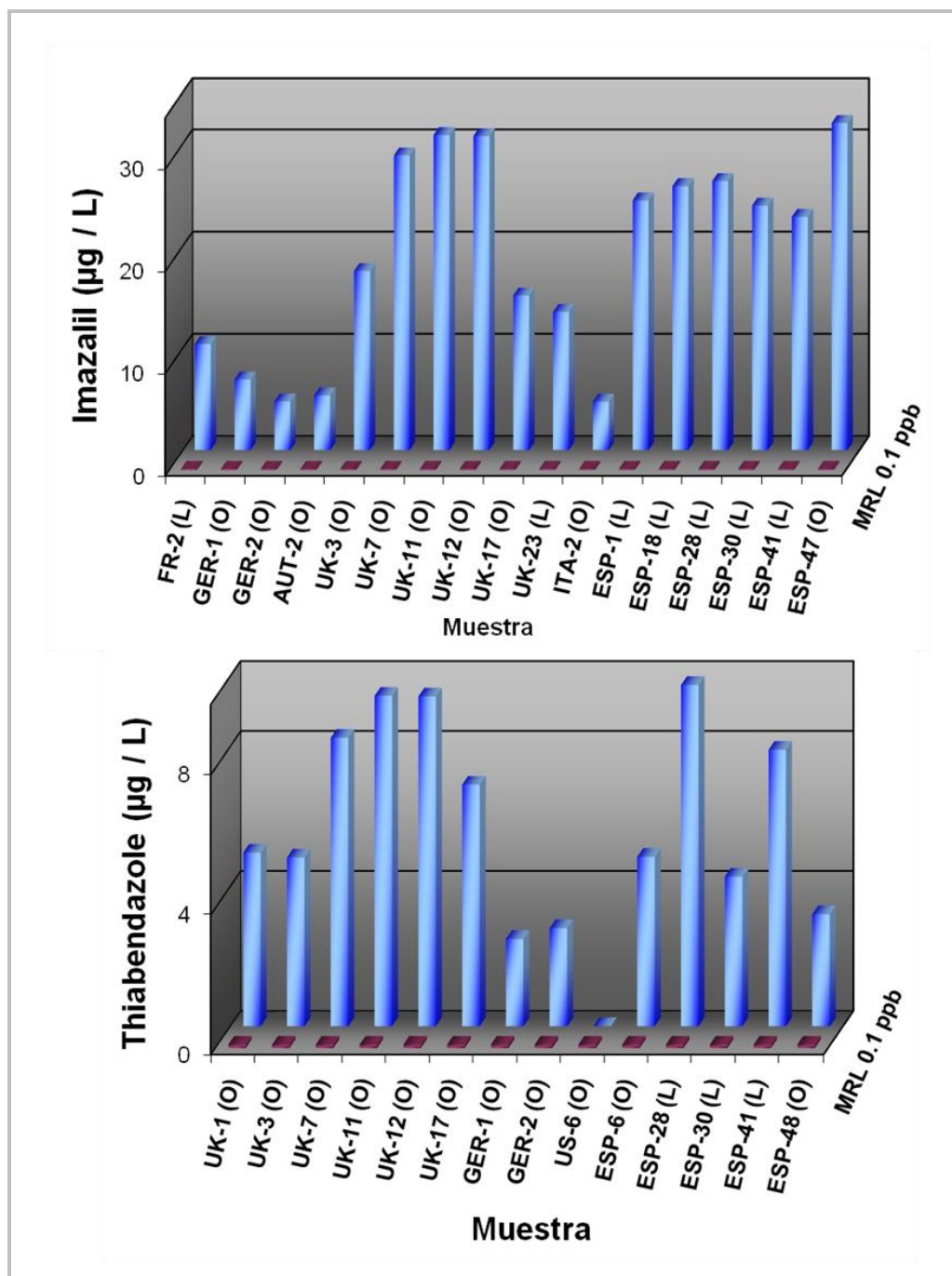


Figura IV.3.2. Concentraciones encontradas de imazalil y thiabendazole (en $\mu\text{g} \text{L}^{-1}$) en algunas muestras seleccionadas de distintos países europeos, donde (O) = sabor a naranja; (L) = sabor a limón. El límite máximo de residuos (MRL) tolerado en agua de consumo por la normativa europea para un plaguicida individual es $0.1 \mu\text{g} \text{L}^{-1}$. Las concentraciones de imazalil y thiabendazole detectadas eran más de 320 veces superiores al MRL europeo.

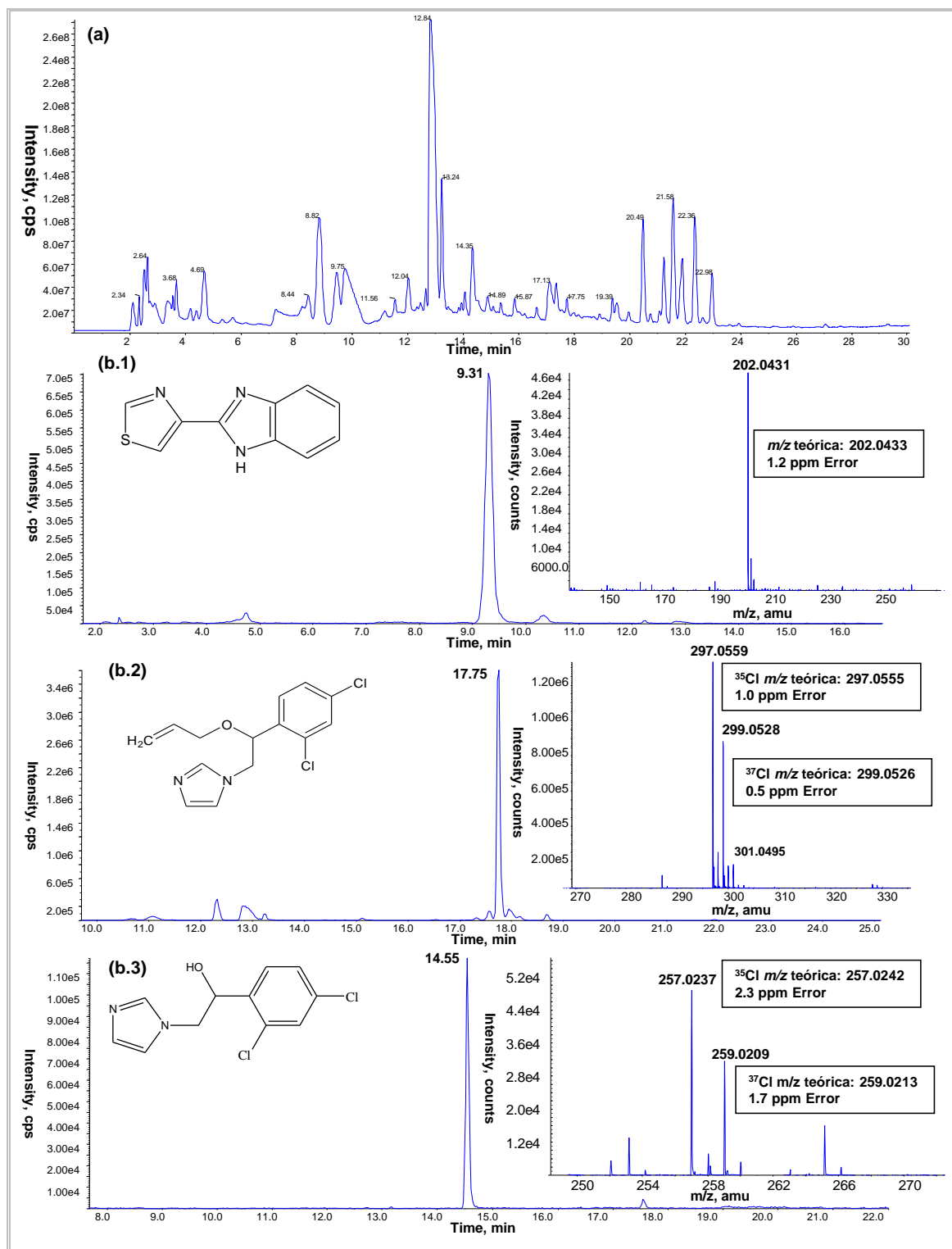


Figura IV.3.4. Análisis mediante LC-TOFMS de los residuos de plaguicidas presentes en una muestra de refresco adquirida en el aeropuerto de Gatwick, en Londres. (a) Cromatograma de iones totales. (b) EICs de los compuestos seleccionados: (b.1) thiabendazole ($9.44 \mu\text{g L}^{-1}$), (b.2) imazalil metabolito ($0.689 \mu\text{g L}^{-1}$) e (b.3) imazalil ($30.8 \mu\text{g L}^{-1}$). La concentración total de plaguicidas detectados fue de $41.5 \mu\text{g L}^{-1}$, 83 veces el límite permitido. Las estructuras y las masas exactas de los plaguicidas están también incluidas en la figura.

En un estudio reciente sobre la presencia de plaguicidas en refrescos, llevado a cabo en India [115], fueron encontrados residuos de plaguicidas organofosforados y organoclorados en bebidas carbonatadas. En este caso, los plaguicidas detectados estaban presentes en el agua utilizada para preparar las bebidas. El *Centre of Science and Environment* en India encontró que el origen de los plaguicidas en los refrescos era el agua utilizada para su elaboración, que representaba el 90% de su composición. Encontraron que las muestras de agua tomadas del interior de la fábrica estaban contaminadas con los mismos plaguicidas que luego se encontraban en los refrescos. Por lo tanto, el origen de esta fuente de contaminación estaba en el agua utilizada para preparar los refrescos, que podría estar contaminada a causa de décadas de uso de estos productos en la agricultura. A diferencia de lo que sucedía en India (donde la presencia de plaguicidas debido a la contaminación ambiental es prácticamente inevitable, a menos que se someta el agua a tratamientos específicos), la fuente de contaminación a la que se enfrenta el mercado europeo podría estar relacionado con la forma en la que los refrescos son elaborados, de manera que los plaguicidas pueden ser transferidos desde la piel de la fruta al producto final.

No obstante, el principal obstáculo que se plantea es la ausencia de regulaciones y estándares, necesarios para decidir si la presencia de estos contaminantes es tolerable o no. En el caso de las bebidas de la India, el comité para la sección de bebidas y bebidas carbonatadas (*the Drinks and Carbonated Beverages Sectional Comitee, FAD14*) del *Bureau of Indian Standards (BIS)*, deliberó sobre el establecimiento de estándares para los residuos de plaguicidas en bebidas. Al final, propusieron la adopción del mismo estándar europeo establecido en agua destinada al consumo humano. Sin embargo, este estándar, por el momento no tiene carácter obligatorio.

Los efectos tóxicos derivados del consumo de estos productos son difíciles de predecir y evaluar. Igualmente, los efectos de las mezclas de plaguicidas presentes en la misma muestra y a concentraciones relevantes (por ejemplo, se encontraron muestras con 6 o 7 plaguicidas distintos) generalmente no son evaluados en ensayos toxicológicos. Este tipo de ensayos sólo presentan datos individuales de compuestos, principalmente pruebas de toxicidad aguda obtenidas de ensayos con animales y donde se aplica un factor de seguridad. Sin embargo, la toxicidad crónica de estos plaguicidas en humanos es difícil de estimar, particularmente cuando los plaguicidas pueden bloquear o activar los receptores de la hormona esteroidea y/o afectar los niveles de las hormonas sexuales, de modo que potencialmente podrían afectar al

desarrollo o la expresión del sistema reproductivo femenino, masculino, o ambos. De acuerdo con recientes estudios, los plaguicidas con grupos azol como imazalil y prochloraz pueden inhibir la actividad de la aromatasa, un daño colateral no deseado que puede causar trastornos endocrinos (supuestos efectos en la biosíntesis de esteroides y el equilibrio de las hormonas sexuales) [245-247]. En estos ensayos, tanto imazalil como prochloraz produjeron un aumento estadísticamente significativo en la inhibición de la actividad de la aromatasa CYP19 en microsomas de placenta humana.

Teniendo en cuenta, por un lado, los elevados niveles de concentración encontrados para los plaguicidas (de acuerdo con la normativa europea de agua de consumo humano, que establece el límite en $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$) en la mayoría de las muestras estudiadas, particularmente en la UE, y por otro lado, las mezclas de plaguicidas (hasta siete compuestos) que frecuentemente se detectaban, con efectos tóxicos difíciles de predecir y evaluar, se deberían emprender acciones encaminadas a verificar la inocuidad de estos productos, especialmente considerando que los niños son los principales consumidores. Aparentemente, se debería cambiar la forma en que estos productos son manufacturados para eliminar la presencia de plaguicidas en este tipo de bebidas. Además, se deberían establecer nuevos estándares de seguridad para regular de forma apropiada el mercado de los refrescos. No obstante, mientras los límites de seguridad no se establezcan, no se puede calificar la situación de insegura, a pesar de que estos productos contienen innecesariamente cantidades relativamente elevadas de plaguicidas.

IV.3.4. Conclusiones

En este trabajo se explotan las características favorables del acoplamiento LC-TOFMS (a saber, alta sensibilidad en la adquisición en full scan y con masa exacta) para el desarrollo de un método de monitoreo para la determinación de 100 plaguicidas en refrescos. El método propuesto se basaba en una extracción SPE seguida del análisis mediante LC-TOFMS utilizando un método de monitoreo basado en una base de datos que incluye información del tiempo de retención y masa exacta de los iones característicos de cada compuesto. El método de barrido (*screening*) automático propuesto ha sido aplicado a la identificación de residuos de plaguicidas en refrescos, una nueva matriz en el campo de análisis de residuos de plaguicidas.

De acuerdo con la bibliografía consultada, éste es el primer método que se desarrolla para la determinación de plaguicidas en esta matriz y la primera vez que se demuestra la presencia de estos compuestos en este tipo de productos derivados. La presencia de plaguicidas en refrescos de frutas puede atribuirse al uso de las pieles en los extractos utilizados para aromatizarlas. Dado que estos compuestos se encuentran principalmente en la piel, podrían ser eliminados completamente mediante el uso de buenas prácticas de producción. Por lo tanto, se deben tomar medidas para evitar la contaminación en estos productos, cambiando la forma de producción de los mismos y estableciendo estándares de calidad apropiados para regular los refrescos de frutas, al objeto de evitar esta fuente de exposición a los plaguicidas, particularmente a grupos vulnerables como los niños.

IV.3.5. Información suplementaria

Tabla S1. Detalle de las muestras de refrescos analizadas.

| Muestra n°. | Sabor | % Zumo | País | Producto | Compañía | Lugar de adquisición |
|-------------|---------|--------|-----------------|----------------|----------|----------------------|
| 1 | Limón | n.a. | República Checa | 2,00 L botella | A | Hradec Králové |
| 2 | Naranja | 5 | República Checa | 0,33L lata | A | Česky Krumlov |
| 3 | Naranja | 5 | Polonia | 0,5 L botella | A | Cracovia |
| 4 | Naranja | 5 | Hungría | 0,5 L botella | A | Budapest |
| 5 | Naranja | n.a. | Suiza | 0,5 L botella | A | Vevey |
| 6 | Naranja | n.a. | Austria | 0,5 L botella | A | Viena |
| 7 | Naranja | n.a. | Austria | 0,5 L botella | A | Viena |
| 8 | Limón | 6 | Andorra | 0,33L lata | A | La Massana |
| 9 | Naranja | 8 | Andorra | 0,33 L lata | A | La Massana |
| 10 | Naranja | 10 | Francia | 0,5 L botella | A | Lille |
| 11 | Limón | 5 | Francia | 0,5 L botella | A | Lille |
| 12 | Naranja | 10 | Francia | 0,33 L lata | I | Olouron St. Marie |
| 13 | Naranja | 12 | Francia | 0,33 L lata | C | Olouron St. Marie |
| 14 | Limón | 6 | Francia | 1,50 L botella | B | Olouron St. Marie |
| 15 | Naranja | 10 | Francia | 1,50 L botella | A | Olouron St. Marie |
| 16 | Limón | 6 | Francia | 0,33 L lata | B | Olouron St. Marie |
| 17 | Naranja | 5 | Eslovaquia | 0,5 L botella | A | Bratislava |
| 18 | Limón | 12 | Italia | 0,33 L lata | D | Bolonia |
| 19 | Naranja | 12 | Italia | 0,50 L botella | A | Bolonia |
| 20 | Naranja | 12 | Italia | 0,33 L lata | A | Bolonia |

| Muestra n°. | Sabor | % Zumos | País | Producto | Compañía | Lugar de adquisición |
|-------------|--------------------|---------|-------------|------------------------|----------|-----------------------|
| 21 | Naranja | 25 | España | 0,50 L botella | B | Jaén |
| 22 | Limón | 6 | España | 0,33 L lata | A | Jaén (Universidad) |
| 23 | Piña | 10 | España | 0,33 L lata | C | Jaén |
| 24 | Limón | 6 | España | 0,33 L lata | C | Jaén |
| 25 | Naranja | 14 | España | 0,33 L lata | C | Jaén |
| 26 | Manzana | 16 | España | 0,33 L lata | C | Jaén |
| 27 | Naranja | 8 | España | 0,50 L botella | A | Jaén |
| 28 | Limón | 6 | España | 0,33 L lata | A | Jaca |
| 29 | Naranja | 8 | España | 0,33 L lata | A | Jaca |
| 30 | Naranja | 8 | España | 0,33 L lata | B | Jaén |
| 31 | Naranja | 8 | España | 0,50 L botella | A | Alicante |
| 32 | Mandarina | 10 | España | 1,50 L botella | E | Jaén |
| 33 | Limón | 6 | España | 0,33 L lata | A | Madrid |
| 34 | Naranja | n.a. | España | 0,33 L lata | C | Jaén |
| 35 | Limón | n.a. | España | 0,33 L lata | C | Jaén |
| 36 | Naranja | 8 | España | 0,33 L lata | A | Jaén |
| 37 | Limón | 1 | España | 0,33 L lata | A | Jaén |
| 38 | Naranja | 5 | Reino Unido | 0,15 L lata | A | Londres |
| 39 | Limón | 6 | Reino Unido | 0,33 L lata | A | Londres |
| 40 | Naranja | 5 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Londres |
| 41 | Limón | 6 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Londres |
| 42 | Naranja | 5 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | St. Andrews (Escocia) |
| 43 | Limón | 6 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | St. Andrews (Escocia) |
| 44 | Naranja | 5 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Cambridge |
| 45 | Limón | 6 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Cambridge |
| 46 | Limón | 6 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Cambridge |
| 47 | Naranja | 5 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Gatwick Aeropuerto |
| 48 | Naranja | 5 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Gatwick Aeropuerto |
| 49 | Naranja | 5 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Cambridge |
| 50 | Mezcla de cítricos | 5 | Reino Unido | 0,50 L botella cristal | A | Cambridge |
| 51 | Naranja | 5 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Edimburgo |
| 52 | Limón | 6 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Edimburgo |
| 53 | Naranja | 5 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Edimburgo |
| 54 | Limón | 6 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Edimburgo |

| Muestra nº. | Sabor | % Zumos | País | Producto | Compañía | Lugar de adquisición |
|-------------|-------------|---------|-------------|-----------------------|----------|----------------------|
| 55 | Naranja | 7 | Portugal | 0,33 L lata | A | Oporto |
| 56 | Naranja | 5 | España | 1,25 L botella | F | Jaén |
| 57 | Sandía | n.a. | España | 0,33 L lata | A | Jaén |
| 58 | Pomelo | 3% | España | 0,33 L lata | A | Jaén |
| 59 | Fruit twist | 3 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Edimburgo |
| 60 | Fruit twist | 3 | Reino Unido | 0,50 L botella | A | Edimburgo |
| 61 | Naranja | 18 | Francia | 0,33 L lata | C | Olouron St. Marie |
| 62 | Limón | 12 | Italia | 0,33 L lata | D | Bolonia |
| 63 | Naranja | 12 | Italia | 0,33 L lata | D | Bolonia |
| 64 | Naranja | n.a. | Marruecos | 0,5 L botella cristal | A | Nador |
| 65 | Naranja | n.a. | Marruecos | 0,5L botella | A | Nador |
| 66 | Naranja | n.a. | Rusia | 0,33 L lata | B | Moscú |
| 67 | Limón | n.a. | Rusia | 0,33 L lata | B | Moscú |
| 68 | Naranja | 3 | Rusia | 0,5L botella | A | Moscú |
| 69 | Naranja | 3 | Rusia | 0,33 L lata | A | Moscú |
| 70 | Naranja | n.a. | Alemania | 0,50 L botella | A | Frankfurt |
| 71 | Limón | 3 | EEUU | 0,591 L botella | A | Orlando |
| 72 | Piña | 0 | EEUU | 0,591 L botella | A | Orlando |
| 73 | Limón | 3 | EEUU | 0,591 L botella | A | Orlando |
| 74 | Fresa | 0 | EEUU | 0,591 L botella | A | Orlando |
| 75 | Naranja | 0 | EEUU | 0,591 L botella | A | Orlando |
| 76 | Piña | 0 | EEUU | 0,591 L botella | A | Orlando |
| 77 | Limón | 3 | EEUU | 0,591 L botella | A | Orlando |
| 78 | Cola | 0 | EEUU | 0,33 L lata | A | Orlando |
| 79 | Cola | 0 | EEUU | 0,33 L lata | A | Orlando |
| 80 | Limón | n.a. | EEUU | 0,591 L botella | A | Orlando |
| 81 | Naranja | 0 | EEUU | 0,355 L lata | A | Orlando |
| 82 | Naranja | 8 | España | 2 L botella | A | Jaén |
| 83 | Naranja | n.a. | Alemania | 0,50 L botella | A | Berlín |
| 84 | Naranja | n.a. | Alemania | 0,50 L botella | A | Berlín |
| 85 | Naranja | 2 | España | 2,00 L botella | B | Jaén |
| 86 | Cola | 0 | España | 0,50 L botella | A | Jaén |
| 87 | Limón | 6 | España | 0,33 L lata | A | Jaén |
| 88 | Naranja | 8 | España | 0,33 L lata | A | Jaén |
| 89 | Limón | 6 | España | 0,33 L lata | A | Jaén |

| Muestra nº. | Sabor | % Zumos | País | Producto | Compañía | Lugar de adquisición |
|-------------|---------|---------|--------|----------------|----------|----------------------|
| 90 | Naranja | 8 | España | 0,50 L botella | G | Jaén |
| 91 | Naranja | 8 | España | 0,33 L lata | B | Jaén |
| 92 | Naranja | 8 | España | 1,00 L botella | A | Jaén |
| 93 | Limón | 6 | España | 1,00 L botella | A | Jaén |
| 94 | Naranja | 8 | España | 0,33 L lata | A | Jaén |
| 95 | Naranja | 8 | España | 0,33 L lata | A | Jaén |
| 96 | Naranja | 8 | España | 0,33 L lata | A | Jaén |
| 97 | Limón | 6 | España | 0,33 L lata | A | Jaén |
| 98 | Naranja | 8 | España | 0,33 L lata | A | Jaén |
| 99 | Naranja | 8 | España | 0,50 L botella | A | Jaén |
| 100 | Limón | 6 | España | 0,50 L botella | A | Almería |
| 101 | Limón | 6 | España | 0,50 L botella | B | Jaén |
| 102 | Naranja | n.a | España | 0,33 L lata | H | Jaén |

n.a.: dato no disponible

Tabla S2. Lista de compañías distribuidoras de las muestras analizadas en este estudio.

| Compañía | |
|----------|--|
| A | Coca Cola Co |
| B | Pepsi Co. |
| C | Schweppes Co. (+ C. Sweppes, Bebidas de España, S.A; Orangina Schweppes) |
| D | San Pellegrino S.p.A (Italia) |
| E | J. García-Carrion, L.M.S.A (España) |
| F | Danone (España) |
| G | Hiperacor (España) |
| H | La Casera, S.A. (España) |
| I | Jeans' orange (Francia) |

Tabla S3. Concentración de los residuos de plaguicidas detectados en las muestras de refrescos analizadas: carbendazim (CBZ), thiabendazole (TBZ), imazalil (IMZ), imazalil metabolito (IMZ-Met), Prochloraz (PRC), Prochloraz metabolito (PRC-Met), Malathion (MLT) and Iprodione (IPR).

| Muestra nº. | CBZ | TBZ | IMZ | IMZ-Met | PRC | PRC-Met | MLT | IPR | Total |
|-------------|-------|-------|------|---------|-----|---------|-----|-----|----------------------|
| | | | | | | | | | $\mu\text{g L}^{-1}$ |
| 1 | 2.14 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 2.14 |
| 2 | 1.06 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 1.06 |
| 3 | 1.34 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 1.34 |
| 4 | 0.696 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.696 |
| 5 | 0.436 | 0.555 | 3.18 | 0.0573 | ND | ND | ND | ND | 4.23 |

| Muestra nº. | CBZ | TBZ | IMZ | IMZ- Met | PRC | PRC- Met | MLT | IPR | Total |
|-----------------|----------------------|-------|--------|-------------|-------|-------------|--------|-------|----------------------|
| | $\mu\text{g L}^{-1}$ | | | | | | | | $\mu\text{g L}^{-1}$ |
| 6 | 0.357 | 1.24 | 4.72 | 0.0969 | ND | ND | ND | ND | 6.41 |
| 7 | 0.5765 | 1.63 | 5.34 | 0.108 | ND | ND | ND | ND | 7.66 |
| 8 ^a | 4.82 | 2.13 | 32.0 | 0.300 | 1.10 | 0.374 | ND | ND | 40.7 |
| 9 ^a | 0.961 | 3.27 | 9.23 | 0.0753 | ND | ND | 0.060 | ND | 13.6 |
| 10 | 0.312 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.312 |
| 11 | 1.01 | ND | 10.4 | 0.244 | 1.09 | 0.588 | ND | ND | 13.7 |
| 12 | 0.213 | 2.80 | 7.71 | 0.0630 | ND | ND | ND | ND | 10.8 |
| 13 | 0.343 | 0.598 | 2.37 | ND | 0.339 | 0.352 | 0.020 | ND | 4.02 |
| 14 | 0.127 | ND | 2.31 | 0.0889 | 0.385 | 0.326 | ND | ND | 3.24 |
| 15 | 1.10 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 1.10 |
| 16 | 0.173 | 0.292 | 2.17 | 0.0762 | 0.377 | 0.301 | ND | ND | 3.40 |
| 17 | 0.709 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.709 |
| 18 | ND | ND | 4.72 | 0.0254 | ND | ND | ND | ND | 4.74 |
| 19 | ND | ND | 0.0552 | ND | ND | ND | ND | ND | 0.055 |
| 20 | ND | ND | 3.74 | 0.0286 | ND | ND | ND | ND | 3.76 |
| 21 | 1.95 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 1.95 |
| 22 | 2.45 | 2.13 | 24.4 | 0.306 | 3.56 | 0.506 | ND | ND | 33.3 |
| 23 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 24 | 0.650 | ND | 0.0564 | ND | ND | ND | ND | ND | 0.706 |
| 25 | 0.352 | 0.344 | 0.0574 | ND | ND | ND | ND | ND | 0.753 |
| 26 | 3.51 | 1.64 | 7.31 | 0.110 | ND | ND | ND | 0.710 | 13.3 |
| 27 | 0.319 | 4.84 | 11.0 | 0.210 | 0.264 | 0.298 | 0.0240 | ND | 17.0 |
| 28 | 3.02 | 1.78 | 15.5 | 0.218 | 1.49 | 0.504 | ND | ND | 22.5 |
| 29 | 0.638 | 3.53 | 8.92 | 0.0928 | ND | ND | ND | ND | 13.2 |
| 30 | 0.107 | ND | 0.0527 | ND | 0.162 | 0.176 | ND | ND | 0.504 |
| 31 | 0.303 | 2.48 | 9.25 | 0.130 | 0.181 | 0.184 | 0.0222 | ND | 12.5 |
| 32 | ND | ND | 0.0535 | ND | 0.342 | 0.295 | 0.020 | ND | 0.709 |
| 33 | 0.781 | 1.43 | 25.7 | 0.278 | 3.70 | 0.686 | ND | ND | 32.6 |
| 34 ^b | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 35 | 0.269 | ND | 3.21 | 0.0615 | 1.34 | 0.375 | ND | ND | 5.26 |
| 36 | 0.642 | 2.18 | 4.94 | 0.0449 | ND | ND | 0.020 | ND | 7.82 |
| 37 | 0.296 | 0.698 | 1.98 | 0.0510 | 0.652 | 0.331 | ND | ND | 4.01 |
| 38 | 0.333 | 4.96 | 14.2 | 0.499 | ND | ND | ND | ND | 20.0 |
| 39 | 0.879 | 0.175 | 8.75 | 0.142 | 0.680 | 0.295 | ND | ND | 10.9 |
| 40 | 0.310 | 4.83 | 17.5 | 0.517 | 0.253 | 0.328 | ND | ND | 23.7 |
| 41 | 1.40 | 0.472 | 6.76 | 0.123 | 0.508 | 0.465 | ND | ND | 9.73 |
| 42 | 0.236 | 2.98 | 12.1 | 0.361 | 0.258 | ND | ND | ND | 16.0 |
| 43 | 0.698 | 0.636 | 3.05 | 0.105 | 0.561 | 0.375 | ND | ND | 5.43 |
| 44 | 0.375 | 8.24 | 28.8 | 0.616 | 0.198 | 0.246 | ND | ND | 38.5 |
| 45 | 1.60 | 0.571 | 6.41 | 0.121 | 0.480 | 0.476 | ND | ND | 9.6 |
| 46 | 1.18 | 0.401 | 10.7 | 0.191 | 0.566 | 0.342 | ND | ND | 13.4 |
| 47 | 0.334 | 2.83 | 19.3 | 0.337 | 0.264 | 0.300 | ND | ND | 23.4 |
| 48 | 0.262 | 9.44 | 30.8 | 0.689 | 0.251 | ND | 0.0390 | ND | 41.5 |
| 49 | 0.310 | 9.42 | 30.8 | 0.612 | 0.155 | ND | 0.0243 | ND | 41.3 |
| 50 | 0.240 | 0.227 | 0.0558 | 0.0344 | 0.313 | 0.317 | ND | ND | 1.19 |
| 51 | 0.432 | 6.90 | 15.1 | 0.429 | 0.250 | 0.294 | 0.0397 | ND | 23.4 |
| 52 | 0.404 | 2.04 | 15.3 | 0.313 | 0.344 | 0.307 | ND | ND | 18.7 |

| Muestra nº. | CBZ | TBZ | IMZ | IMZ- Met | PRC | PRC- Met | MLT | IPR | Total |
|-----------------|----------------------|-------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-----|----------------------|
| | $\mu\text{g L}^{-1}$ | | | | | | | | $\mu\text{g L}^{-1}$ |
| 53 | 0.642 | 4.36 | 11.0 | 0.162 | 0.263 | ND | 0.0569 | ND | 16.5 |
| 54 | 0.418 | 2.01 | 13.5 | 0.280 | 0.335 | 0.304 | ND | ND | 16.9 |
| 55 | 0.166 | 1.32 | 3.42 | 0.0467 | 0.255 | ND | ND | ND | 5.22 |
| 56 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 57 | ND | 1.19 | 3.58 | 0.233 | ND | ND | 0.020 | ND | 5.02 |
| 58 | ND | 0.404 | 0.0586 | ND | ND | ND | ND | ND | 0.463 |
| 59 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 60 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 61 | 0.866 | 0.960 | 0.0647 | 0.0525 | 0.277 | 0.326 | ND | ND | 2.55 |
| 62 | ND | ND | ND | ND | 0.156 | ND | ND | ND | 0.156 |
| 63 | ND | ND | 2.99 | 0.0275 | ND | ND | ND | ND | 3.02 |
| 64 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 65 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 66 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 67 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 68 | 0.297 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.297 |
| 69 | 0.290 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.290 |
| 70 | 0.359 | 2.49 | 6.90 | 0.272 | ND | ND | 0.0413 | ND | 10.1 |
| 71 | 0.508 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.508 |
| 72 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 73 | 0.409 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.409 |
| 74 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 75 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 76 | ND | ND | 0.316 | ND | ND | ND | ND | ND | 0.316 |
| 77 | 0.714 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.714 |
| 78 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 79 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 80 | 0.291 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.291 |
| 81 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 82 | 0.700 | 1.54 | 7.08 | 0.147 | 0.147 | 0.435 | 0.0608 | ND | 10.1 |
| 83 | 0.602 | 2.80 | 4.75 | 0.351 | 0.0165 | 0.365 | 0.156 | ND | 9.04 |
| 84 | 1.04 | 1.56 | 2.85 | 0.224 | 0.0358 | 0.374 | 0.0481 | ND | 6.12 |
| 85 | 1.11 | 1.56 | 2.85 | 0.224 | 0.0360 | 0.375 | 0.0476 | ND | 6.20 |
| 86 ^b | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 87 | 1.75 | 9.75 | 26.3 | 0.736 | 1.34 | 0.673 | ND | ND | 40.6 |
| 88 | 1.16 | 1.40 | 4.70 | 0.0974 | 0.108 | 0.394 | 0.0360 | ND | 7.90 |
| 89 | 2.50 | 4.26 | 23.9 | 0.548 | 3.13 | 1.35 | ND | ND | 35.7 |
| 90 | 1.22 | 0.344 | 2.65 | 0.0850 | 0.0355 | 0.500 | ND | ND | 4.83 |
| 91 | 0.260 | ND | ND | ND | 0.0524 | ND | 0.020 | ND | 0.330 |
| 92 | 1.14 | 2.98 | 6.63 | 0.148 | 0.0306 | 0.378 | 0.0529 | ND | 11.4 |
| 93 | 1.09 | 2.34 | 10.9 | 0.192 | 0.791 | 0.582 | ND | ND | 15.9 |
| 94 | 1.65 | 2.24 | 6.79 | 0.127 | 1.74 | ND | 0.0698 | ND | 12.6 |
| 95 | 1.35 | 2.22 | 4.41 | 0.113 | 1.18 | ND | 0.0529 | ND | 9.32 |
| 96 | 0.985 | 1.83 | 3.44 | 0.0960 | ND | ND | 0.0270 | ND | 6.38 |
| 97 | 1.49 | 2.67 | 11.1 | 0.236 | 0.636 | ND | ND | ND | 16.1 |
| 98 | 1.48 | 2.66 | 6.44 | 0.219 | 0.199 | 0.453 | 0.0688 | ND | 11.5 |
| 99 | ND | ND | 4.67 | 0.120 | 0.274 | 0.424 | ND | ND | 5.49 |

| Muestra nº. | CBZ | TBZ | IMZ | IMZ- Met | PRC | PRC- Met | MLT | IPR | Total |
|------------------------|----------------------|-------|------|-------------|-------|-------------|-----|-----|----------------------|
| | $\mu\text{g L}^{-1}$ | | | | | | | | $\mu\text{g L}^{-1}$ |
| 100 | 2.46 | 7.90 | 22.8 | 0.534 | 3.71 | 1.29 | ND | ND | 38.7 |
| 101 | 1.50 | 0.666 | 4.19 | 0.294 | 0.547 | 0.610 | ND | ND | 7.80 |
| 102^b | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

N.D.: no detectado

^a: Las muestras nº 8 y 9 de Andorra (envasadas en España) fueron incluidas junto con las muestras españolas en los cálculos de la concentración media de los plaguicidas encontrados en las muestras por países.

^b: Las muestras nº 34, 86 y 102 (coca-cola o refrescos aromatizados artificialmente) no fueron incluidos en los cálculos de la concentración media de los plaguicidas encontrados en las muestras por países.

CAPÍTULO IV.4



Desarrollo de un método multi-residuo rápido para el análisis de plaguicidas en refrescos mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas de tiempo de vuelo.

IV.4. DESARROLLO DE UN MÉTODO MULTI-RESIDUO RÁPIDO PARA EL ANÁLISIS DE PESTICIDAS REFRESCOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO (LC-TOFMS).

IV.4.1. Resumen

En este trabajo se presenta un método rápido y fiable para la determinación de 33 plaguicidas en refrescos. El método propuesto consiste en una etapa de preparación de muestra basada en la extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos poliméricos Oasis HLB® y metanol como eluyente, seguida de una identificación y cuantificación de los plaguicidas de interés mediante cromatografía de resolución rápida utilizando una columna corta de C₁₈ (50 mm x 4.6 mm d.i., 1.8 µm de tamaño de partícula) y detección por espectrometría de masas de tiempo de vuelo utilizando una fuente de electrospray (LC-TOFMS). La identificación y confirmación de los compuestos se basa en el tiempo de retención y las medidas de masa exacta de las moléculas protonadas ([M+H]⁺) y sus principales fragmentos. Se llevaron a cabo estudios de recuperación a dos niveles de concentración (10 y 50 µg L⁻¹), obteniéndose recuperaciones entre el 66 y el 124%, con desviaciones estándar relativas (RSD%) inferiores al 14% (n=6). Los límites de cuantificación obtenidos variaban en el rango 0.02 – 2 µg L⁻¹. El método propuesto fue aplicado satisfactoriamente al análisis de 14 muestras de refrescos adquiridas en diferentes países europeos, mostrando su potencial aplicabilidad y revelando la presencia de algunos de los plaguicidas estudiados.

IV.4.2. Experimental

IV.4.2.1. Selección de los analitos.

Los analitos incluidos en este estudio fueron seleccionados teniendo en cuenta nuestra experiencia previa en el análisis de residuos de plaguicidas en bebidas (ver capítulo IV.3. de esta tesis). Se analizará un grupo de 33 plaguicidas pertenecientes a diferentes categorías (acaricidas, alguicidas, repelentes de pájaros, fungicidas, herbicidas, insecticidas, nematocidas, acaricidas, etc), correspondientes a diferentes clases químicas (benzimidazoles, carbamatos, conazoles, nicotinoides, organofosforados, fenilureas, pirimidinas, etc). Algunos de los compuestos seleccionados corresponden al anexo I de la Directiva de la Unión Europea

91/414/CEE. Algunos de ellos también pertenecen a la lista del *European Union Proficiency Test (EUPT)* para frutas y vegetales (www.crl-pesticides.eu) y otros han sido seleccionados de acuerdo a la base de datos www.pesticide-online.com. Finalmente, los productos de degradación de imazalil y prochloraz fueron incluidos por su relevancia y su alta presencia en cítricos.

IV.4.2.2. Muestras.

Se estudiaron 14 muestras de refrescos de cítricos. Las muestras eran botellas o latas de diferentes marcas compradas en España, Francia, Italia, Irlanda, República Checa, Austria, Suiza y Reino Unido durante el año 2009. Los detalles de las muestras y los resultados obtenidos se detallan en el apartado IV.4.3.4.

IV.4.2.3. Preparación de muestra

Los plaguicidas fueron extraídos mediante un proceso de extracción en fase sólida (SPE) “off-line”. Como paso previo a la extracción, unos 20 mL de refresco fueron desgasificados para evitar la formación de canales preferentes en los cartuchos durante el proceso de extracción. El procedimiento SPE seguido aparece esquematizado en la **figura IV.4.1** y consta de las siguientes etapas:

- 1) *Acondicionamiento*: Se acondiciona el cartucho de SPE Oasis HLB® (200 mg/ 6 mL) con 5 mL de metanol (MeOH) seguidos de 5 mL de agua ultrapura, todo ello con un caudal de unos 2 mL min⁻¹.
- 2) *Carga de muestra*: Se pasan 15 mL de refresco desgasificado a través del cartucho, a un flujo de unos 3 mL min⁻¹.
- 3) *Elución*: Los analitos retenidos en el cartucho son eluidos con 5 mL de MeOH a un flujo de 1 mL min⁻¹. El eluato se recoge en un tubo de ensayo de 15 mL.
- 4) El extracto se evapora bajo corriente de N₂ hasta casi sequedad y luego se reconstituye con 1 mL de H₂O ultrapura y 0.5 mL de metanol. De esta forma, tenemos un factor de

preconcentración de 10 (15 mL \Rightarrow 1.5 mL). El último paso es filtrar el extracto con un filtro de HPLC de PTFE de 0.45 μm de poro (PTFE filter, Millex FG, Millipore, Milford, MA) y trasvasar a un vial. Si no se va a realizar el análisis de forma inmediata, conservar en frío a -20°C .

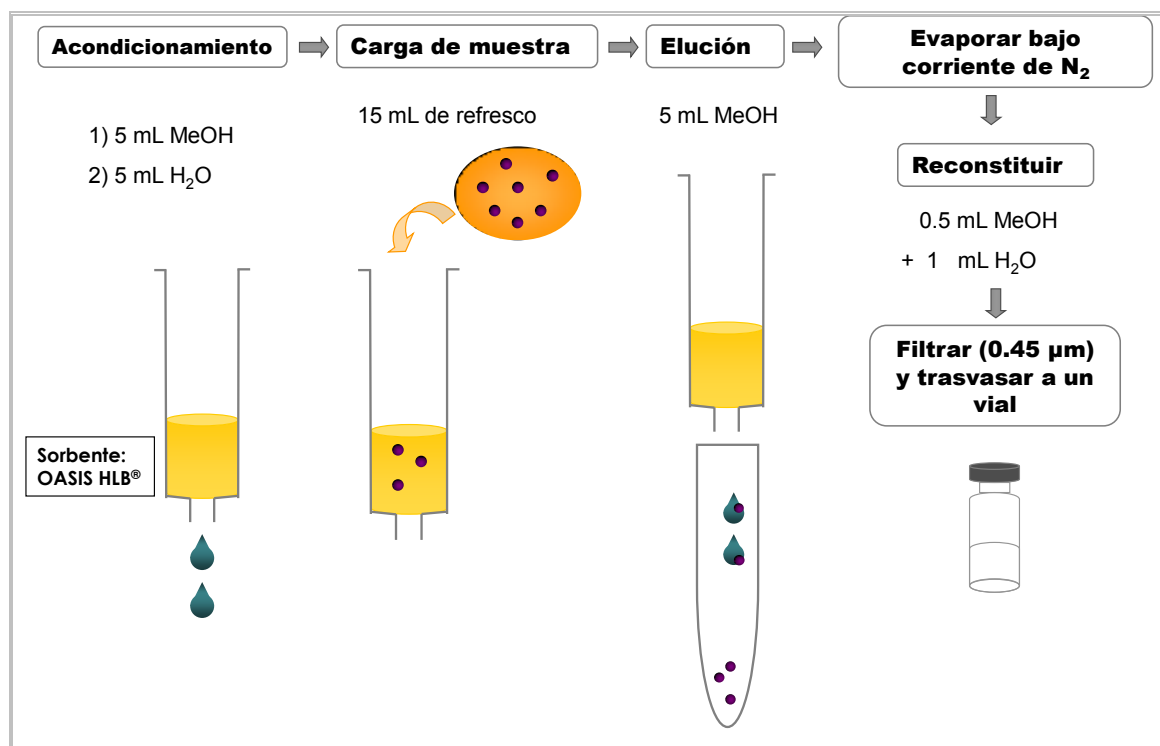


Figura IV.4.1. Esquema de la obtención del extracto de refrescos mediante SPE.

Para la cuantificación y confirmación de los compuestos, se prepararon patrones en matriz mediante la fortificación de los extractos con un volumen adecuado de la disolución de trabajo que contenía la mezcla de los analitos. Para los estudios de recuperación, un refresco de naranja fue fortificado con la mezcla de los compuestos a dos niveles de concentración: 10 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Posteriormente, las muestras fortificadas fueron sometidas al proceso SPE descrito.

IV.4.2.4. Parámetros instrumentales

En este estudio se utilizó el equipo HPLC-TOFMS Agilent MSD TOF descrito en el capítulo III. Los valores óptimos elegidos para los parámetros instrumentales fueron los siguientes:

a) *Condiciones cromatográficas:*

- Fases móviles: A = H₂O (0.1% HCOOH, v/v); B = Acetonitrilo.
- Gradiente: durante 1 min se mantiene constante un 10% de B, seguido de un gradiente lineal hasta el 100% B a los 11 min. Entonces, se mantiene constante (100%B) durante 3 min.
- Velocidad de flujo: 0.5 mL min⁻¹.
- Columna: C₁₈, 50 mm × 4.6 mm i.d. y 1.8 μm de tamaño de partícula (Zorbax Rapid Resolution Eclipse XDB-C18, Agilent).
- Volumen de inyección: 20 μL.

b) *Espectrómetro de masas:*

- Fuente: ESI (+)
- Voltaje del capilar: 4000 V
- Temperatura de la fuente: 325 °C
- Presión del gas de secado (N₂): 40 psig
- Flujo del gas de secado: 9 L min⁻¹
- Voltaje de fragmentación en la fuente: 190 V
- Rango de masas: 50 – 1000 m/z
- Resolución: 9700 ± 500

IV.4.3. Resultados y discusión

IV.4.3.1. Identificación y confirmación de los compuestos de interés mediante LC-ESI TOFMS: fragmentación en la fuente y medidas de masa exacta.

Se establecieron condiciones estándar para la ionización por electrospray de los compuestos de interés. Se encontró que los parámetros de la fuente no afectaban significativamente a la señal de los analitos, por lo que se usaron valores estándar para la temperatura de la fuente, presión y flujo del gas de secado (nitrógeno), y voltaje del capilar. Sin embargo, el voltaje de fragmentación en la fuente (fragmentor voltage) tenía una fuerte influencia en la sensibilidad y abundancia relativa de la molécula protonada. Se estudiaron cuatro valores para el voltaje de fragmentación: 160 V, 190 V, 230 V y 250 V, al objeto de obtener baja, media, alta o muy alta fragmentación de

los compuestos de interés. En la **tabla IV.4.1.** se muestra la fragmentación de los plaguicidas estudiados y la abundancia relativa de las especies que se forman. La fragmentación en la fuente (fragmentación inducida por colisiones – CID) depende principalmente del compuesto en cuestión. Por ejemplo, los plaguicidas organofosforados como monocrotophos, dimethoate, malathion o chlorfenvinphos mostraban varios fragmentos incluso a un voltaje medio, mientras compuestos como imazalil o pyrimethanil son difíciles de fragmentar a menos que se aplique un alto voltaje. Cuando se aplicaba el voltaje más alto (250 V), la mayoría de las moléculas protonadas sufrían una alta fragmentación. Sólo para 7 de los 33 compuestos estudiados la molécula protonada seguía siendo el pico base bajo estas condiciones. Por el contrario, 160 V producían escasa o ninguna fragmentación, por lo que no se conseguía información estructural adicional para la confirmación inequívoca de los analitos. Por lo tanto, se eligió un valor medio de 190 V, como compromiso entre la sensibilidad de la molécula protonada para la cuantificación y la información adicional que proporcionan los fragmentos a efectos de confirmación.

Tabla IV.4.1. Estudio de fragmentación de los 33 plaguicidas seleccionados: efecto del voltaje de fragmentación en la fuente (fragmentación inducida por colisiones – CID).

| Compuesto | Actividad ¹ (clase química) ² | Ión | m/z teórica | Composición elemental | Abundancia relativa (%) | | | |
|---------------|--|---------------------|----------------|--|-------------------------|------|------|------|
| | | | | | 160V | 190V | 230V | 250V |
| Carbendazim | F (III) | [M+H] ⁺ | 192.0767 | C ₉ H ₁₀ N ₃ O ₂ | 100 | 100 | 9 | - |
| | | Frg. 1 | 160.0505 | C ₈ H ₆ N ₃ O | 17 | 71 | 100 | 100 |
| | | Frg. 2 | 132.0556 | C ₇ H ₆ N ₃ | - | - | - | 10 |
| Thiabendazole | F (III) | [M+H] ⁺ | 202.0433 | C ₁₀ H ₈ N ₃ S | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | Frg. 1 | 175.0326 | C ₉ H ₇ N ₂ S | - | 3 | 10 | 35 |
| Monocrotophos | A,I (IX) | [M+Na] ⁺ | 246.0501 | C ₇ H ₁₄ NO ₅ PNa | 100 | 100 | 55 | 57 |
| | | [M+H] ⁺ | 224.0682 | C ₇ H ₁₅ NO ₅ P | 82 | 19 | - | - |
| | | Frg. 1 | 193.0260 | C ₆ H ₁₀ O ₅ P | 17 | 15.4 | - | - |
| | | Frg. 2 | 127.0154 | C ₂ H ₈ O ₄ P | 23 | 83.4 | 100 | 100 |
| | | Frg. 3 | 109.0049 | C ₂ H ₆ O ₃ P | 2 | 5 | 24 | 54 |
| Thiamethoxam | I (VIII) | [M+Na] ⁺ | 314.0085 | C ₈ H ₁₀ N ₅ O ₃ SClNa | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | [M+H] ⁺ | 292.0266 | C ₈ H ₁₁ N ₄ O ₃ SCl | 79 | 20 | 2 | - |
| | | Frg. 1 | 211.0648 | C ₈ H ₁₁ N ₄ OS | 47 | 69 | 20 | 10 |
| | | Frg. 2 | 181.0537 | C ₇ H ₉ N ₄ S | 7 | 12 | 20 | 17 |
| | | Frg. 3 | 152.0275 | C ₆ H ₆ N ₃ S | 4 | 8 | 20 | 36 |
| | | Frg. 4 | 131.9669 | C ₄ H ₃ N ₅ Cl | 17 | 26 | 20 | 23 |
| | | Frg. 5 | 122.0712 | C ₆ H ₈ N ₃ | 2 | 3 | 9 | 16 |

| Compuesto | Actividad ¹ (clase química) ² | Ión | m/z teórica | Composición elemental | Abundancia relativa (%) | | | |
|--------------------------|--|---------------------|----------------|---|-------------------------|------|------|------|
| | | | | | 160V | 190V | 230V | 250V |
| Imazalil metabolito | | [M+H] ⁺ | 257.0242 | C ₁₁ H ₁₁ N ₂ OCl ₂ | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Imidacloprid | I (VIII) | [M+Na] ⁺ | 278.0415 | C ₉ H ₁₀ N ₅ O ₂ ClNa | 31 | 91 | 5 | - |
| | | [M+H] ⁺ | 256.0596 | C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₂ Cl | 100 | 100 | 78 | 49 |
| | | Frg. 1 | 210.0666 | [C ₉ H ₁₁ N ₄ Cl] ⁺⁺ | 9 | 45 | 14 | 10 |
| | | Frg. 2 | 209.0589 | C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₂ Cl | 8 | 44 | 51 | 60 |
| | | Frg. 3 | 175.0978 | C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₂ Cl | 12 | 73 | 100 | 100 |
| | | Frg. 4 | 126.0105 | C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₂ Cl | - | 7 | 7 | 9 |
| Dimethoate | A,I,N (IX) | [M+Na] ⁺ | 251.9888 | C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂ Na | 100 | 10 | - | - |
| | | [M+H] ⁺ | 230.0075 | C ₅ H ₁₃ NO ₃ PS ₂ | 77 | 100 | 45 | 22.4 |
| | | Frg. 1 | 198.9647 | C ₄ H ₈ O ₃ PS ₂ | 41 | 24 | - | - |
| | | Frg. 2 | 170.9698 | C ₃ H ₈ O ₂ PS ₂ | 11 | 25 | 5 | - |
| | | Frg. 3 | 156.9541 | C ₂ H ₆ O ₂ PS | 3 | 8 | 7 | - |
| | | Frg. 4 | 142.9926 | C ₂ H ₈ O ₃ PS | - | 6 | 6 | - |
| | | Frg. 5 | 124.9821 | C ₂ H ₆ O ₂ PS | 28 | 66 | 100 | 100 |
| | | Frg. 6 | 93.0099 | C ₂ H ₆ O ₂ P | - | - | 8 | 32 |
| Butocarboxim | A,I (IV) | [M+Na] ⁺ | 213.0668 | C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ SNa | 100 | 100 | 48 | 10 |
| | | Frg. 1 | 116.0528 | C ₅ H ₁₀ NS | - | 5 | 11 | 7 |
| | | Frg. 2 | 100.0215 | C ₄ H ₆ NS | 2 | 5 | 24 | 54 |
| | | Frg. 3 | 75.0262 | C ₃ H ₇ S | - | - | 5 | 8 |
| Thiacloprid | I,M (VIII) | [M+Na] ⁺ | 275.0128 | C ₁₀ H ₉ N ₄ CISNa | - | 44 | 79 | 75 |
| | | [M+H] ⁺ | 253.0309 | C ₁₀ H ₁₀ N ₄ CIS | 100 | 100 | 22 | 6 |
| | | Frg. 1 | 126.0105 | C ₆ H ₅ NCl | 3 | 9 | 100 | 100 |
| | | Frg. 2 | 98.9996 | C ₅ H ₄ Cl | - | - | 12 | 25 |
| | | Frg. 3 | 90.0338 | C ₆ H ₄ N | - | - | 7 | 15 |
| Prochloraz metabolito | | [M+H] ⁺ | 282.0213 | C ₁₁ H ₁₅ NOCl ₃ | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | | | | | | | |
| Imazalil | F (V) | [M+H] ⁺ | 297.0555 | C ₁₄ H ₁₅ N ₂ OCl ₂ | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | Frg. 1 | 255.0086 | C ₁₁ H ₉ N ₂ OCl ₂ | - | 1 | 4 | 12 |
| | | Frg. 2 | 158.9763 | C ₇ H ₅ Cl ₂ | - | 1 | 9 | 37 |
| | | Frg. 3 | 109.0760 | C ₆ H ₉ N ₂ | - | 1 | 13 | 44 |
| | | Frg. 4 | 81.0447 | C ₄ H ₅ N ₂ | - | - | - | 5 |
| | | Frg. 5 | 69.0447 | C ₃ H ₅ N ₂ | - | 1 | 7 | 30 |

| Compuesto | Actividad ¹ (clase química) ² | Ión | m/z teórica | Composición elemental | Abundancia relativa (%) | | | |
|--|--|---------------------------------|----------------|---|-------------------------|------|------|------|
| | | | | | 160V | 190V | 230V | 250V |
| Pyrimethanil | F (XI) | [M+H] ⁺ | 200.1182 | C ₁₂ H ₁₄ N ₃ | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | Frg. 1 | 183.0916 | C ₁₁ H ₁₁ N ₂ | - | - | 5 | 13 |
| Carbofuran | A,I,N (IV) | [M+Na] ⁺ | 244.0944 | C ₁₂ H ₁₅ NO ₃ Na | 60 | 68 | 69 | 41 |
| | | [M+H] ⁺ | 222.1125 | C ₁₂ H ₁₆ NO ₃ | 100 | 38 | - | - |
| | | Frg. 1 | 165.0910 | C ₁₀ H ₁₃ O ₂ | 33 | 100 | 42 | 9 |
| | | Frg. 2 | 123.0441 | C ₇ H ₇ O ₂ | 9 | 29 | 100 | 100 |
| Spiroxamine | F (0) | [M+H] ⁺ | 298.2741 | C ₁₈ H ₃₆ NO ₂ | 100 | 100 | 100 | 86 |
| | | Frg. 1 | 144.1382 | C ₈ H ₁₈ NO | 3 | 8 | 56 | 100 |
| | | Frg. 2 | 100.1121 | C ₆ H ₁₄ N | - | 3 | 18 | 62 |
| Metalaxyl | F (I) | [M+Na] ⁺ | 302.1362 | C ₁₅ H ₂₁ NO ₄ Na | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | [M+H] ⁺ | 280.1543 | C ₁₅ H ₂₂ NO ₄ | 50 | 63 | 6 | - |
| | | Frg. 1 | 248.1281 | C ₁₄ H ₁₈ NO ₃ | 8 | 4 | 2 | - |
| | | Frg. 2 | 220.1332 | C ₁₃ H ₁₈ NO ₂ | 18 | 6 | 19 | 11 |
| | | Frg. 3 | 192.1383 | C ₁₂ H ₁₈ NO | 10 | 3 | 21 | 15 |
| Diuron | Al,H (X) | [M+Na] ⁺ | 255.0062 | C ₉ H ₁₀ N ₂ OCl ₂ Na | 16 | 16 | 8 | 2 |
| | | [M+H] ⁺ | 233.0243 | C ₉ H ₁₁ N ₂ OCl ₂ | 100 | 100 | 36 | 9 |
| | | Frg. 1 | 72.0444 | C ₃ H ₆ NO | 4 | 20 | 100 | 100 |
| Spinosad ^a Spinosyn A ^b Spinosyn D | I (II) | ^a [M+H] ⁺ | 732.4681 | C ₄₁ H ₆₆ NO ₁₀ | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | Frg. 1 | 544.3633 | C ₃₂ H ₅₀ NO ₆ | 4 | 4 | 3 | 3 |
| | | Frg. 2 | 142.1226 | C ₈ H ₁₆ NO | - | - | 2 | 4 |
| | | ^b [M+H] ⁺ | 746.4838 | C ₄₂ H ₆₈ NO ₁₀ | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | Frg. 1 | 558.3789 | C ₃₃ H ₅₂ NO ₆ | 5 | 5 | 4 | 3 |
| | | Frg. 2 | 142.1226 | C ₈ H ₁₆ NO | - | - | 3 | 5 |
| Prochloraz | F (I) | [M+H] ⁺ | 376.0380 | C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₂ Cl ₃ | 100 | 42 | 3 | 1 |
| | | Frg. 1 | 308.0006 | C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ Cl ₃ | 25 | 100 | 100 | 100 |
| | | Frg. 2 | 265.9536 | C ₉ H ₇ NO ₂ Cl ₃ | 1 | 6 | 26 | 88 |
| Cyproconazole | F (V) | [M+H] ⁺ | 292.1211 | C ₁₅ H ₁₉ N ₃ OCl | 100 | 100 | 70 | 14 |
| | | Frg. 1 | 125.0153 | C ₇ H ₆ Cl | - | 3 | 28 | 31 |
| | | Frg. 2 | 70.0401 | C ₂ H ₄ N ₃ | 3 | 9 | 100 | 100 |
| Methiocarb | A,B,I,M (IV) | [M+Na] ⁺ | 248.0715 | C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ Na | 57 | 40 | 100 | 100 |
| | | [M+H] ⁺ | 226.0896 | C ₁₁ H ₁₆ NO ₂ | 96 | 8 | - | - |
| | | Frg. 1 | 169.0896 | C ₉ H ₁₃ OS | 100 | 100 | 61 | 63 |
| Azoxystrobin | F (XII) | [M+Na] ⁺ | 426.1060 | C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅ Na | 48 | 78 | 83 | 100 |
| | | [M+H] ⁺ | 404.1241 | C ₂₂ H ₁₈ N ₃ O ₅ | 100 | 100 | 16 | 4 |
| | | Frg. 1 | 372.0979 | C ₂₁ H ₁₄ N ₃ O ₄ | 14 | 48 | 100 | 89 |
| Triflumizole | F (V) | [M+H] ⁺ | 346.0929 | C ₁₅ H ₁₆ N ₃ OF ₃ Cl | 100 | 27 | 23 | 9 |
| | | Frg. 1 | 278.0554 | C ₁₂ H ₁₂ NOF ₃ Cl | 40 | 100 | 100 | 30 |
| | | Frg. 2 | 69.0447 | C ₃ H ₅ N ₂ | - | 5 | 91 | 100 |

| Compuesto | Actividad ¹ (clase química) ² | Ión | m/z teórica | Composición elemental | Abundancia relativa (%) | | | |
|-----------------|--|---------------------|----------------|--|-------------------------|------|------|------|
| | | | | | 160V | 190V | 230V | 250V |
| Malathion | A,I (IX) | [M+Na] ⁺ | 353.0252 | C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂ Na | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | [M+H] ⁺ | 331.0433 | C ₁₀ H ₂₀ O ₆ PS ₂ | 60 | 17 | - | - |
| | | Frg. 1 | 285.0015 | C ₈ H ₁₄ O ₅ PS ₂ | 16 | 19 | - | - |
| | | Frg. 2 | 257.0066 | C ₇ H ₁₄ O ₄ PS ₂ | 3 | 9 | 3 | - |
| | | Frg. 3 | 127.0389 | C ₆ H ₇ O ₃ | 6 | 18 | 3 | - |
| | | Frg. 4 | 124.9821 | C ₂ H ₆ O ₂ PS ₂ | 9 | 11 | 20 | 23 |
| | | Frg. 6 | 99.0077 | C ₄ H ₃ O ₃ | 11 | 33 | 43 | 26.7 |
| Chlorfenvinphos | A,I (IX) | [M+Na] ⁺ | 380.9587 | C ₁₂ H ₁₄ O ₄ PCl ₃ Na | 47 | 84 | 46 | 42 |
| | | [M+H] ⁺ | 358.9768 | C ₁₂ H ₁₅ O ₄ PCl ₃ | 100 | 100 | 4 | - |
| | | Frg. 1 | 330.9819 | C ₁₁ H ₁₅ O ₃ PCl ₃ | 3 | 6 | - | - |
| | | Frg. 2 | 204.9373 | C ₈ H ₄ Cl ₃ | 6 | 22 | 21 | 15 |
| | | Frg. 3 | 169.9684 | [C ₈ H ₄ Cl ₂] ⁺⁺ | 2 | 8 | 13 | 21 |
| | | Frg. 4 | 155.0468 | C ₄ H ₁₂ O ₄ P | 20 | 54 | 17 | 4 |
| | | Frg. 5 | 127.0155 | C ₂ H ₈ O ₄ P | 5 | 23 | 19 | 6 |
| | | Frg. 6 | 98.9841 | H ₄ O ₄ P | 14 | 60 | 100 | 100 |
| Difenoconazole | F (V) | [M+H] ⁺ | 406.0720 | C ₉ H ₁₈ N ₃ O ₃ Cl ₂ | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | Frg. 1 | 337.0392 | C ₁₇ H ₁₅ O ₃ Cl ₂ | - | 2 | 10 | 23 |
| | | Frg. 2 | 251.0024 | C ₁₃ H ₉ OCl ₂ | 1 | 4 | 20 | 68 |
| Benalaxyl | F (I) | [M+Na] ⁺ | 348.1570 | C ₂₀ H ₂₃ NO ₃ Na | 58 | 95 | 100 | 100 |
| | | [M+H] ⁺ | 326.1751 | C ₂₀ H ₂₄ NO ₃ | 100 | 100 | 11 | - |
| | | Frg. 1 | 294.1489 | C ₁₉ H ₂₀ NO ₂ | 5 | 15 | 7 | - |
| | | Frg. 2 | 208.1332 | C ₁₂ H ₁₈ NO ₂ | 7 | 26 | 42 | 16 |
| | | Frg. 3 | 148.1121 | C ₁₀ H ₁₄ N | 5 | 21 | 70 | 76 |
| Hexaflumuron | I (VI) | [M+Na] ⁺ | 482.9708 | C ₁₆ H ₈ N ₂ O ₃ F ₆ Cl ₂ Na | 36 | 49 | 25 | 13 |
| | | [M+H] ⁺ | 460.9888 | C ₁₆ H ₉ N ₂ O ₃ F ₆ Cl ₂ | 100 | 100 | 19.5 | 4 |
| | | Frg. 1 | 158.0412 | C ₇ H ₆ NOF ₂ | 10 | 32.5 | 100 | 100 |
| Diazinon | A,B,I (IX) | [M+H] ⁺ | 305.1083 | C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₃ PS | 100 | 100 | 100 | 56 |
| | | Frg. 1 | 169.0794 | C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₃ PS | 2 | 5 | 45 | 100 |
| | | Frg. 2 | 153.1021 | C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₃ PS | 1 | 3 | 25 | 54 |
| Pyriproxyfen | I (VI) | [M+H] ⁺ | 322.1438 | C ₂₀ H ₂₀ NO ₃ | 100 | 100 | 15 | - |
| | | Frg. 1 | 227.1067 | C ₁₅ H ₂₀ O ₂ | 3 | 17 | 52 | 17 |
| | | Frg. 2 | 185.0597 | C ₁₂ H ₉ O ₂ | 1 | 5 | 33 | 32 |
| | | Frg. 3 | 134.0726 | C ₉ H ₁₀ O | - | 1 | 13 | 44 |
| | | Frg. 4 | 119.0491 | C ₈ H ₇ O | - | 2 | 12 | 11 |
| | | Frg. 5 | 96.0444 | C ₅ H ₆ NO | 6 | 39 | 100 | 100 |
| | | Frg. 6 | 78.0338 | C ₅ H ₄ N | 2 | 8 | 41 | 61 |

| Compuesto | Actividad ¹ (clase química) ² | Ión | m/z teórica | Composición elemental | Abundancia relativa (%) | | | |
|--------------|--|---------------------------------|----------------|---|-------------------------|------|------|------|
| | | | | | 160V | 190V | 230V | 250V |
| Spiromesifen | I (XIII) | [M+Na] ⁺ | 393.2036 | C ₂₃ H ₃₀ O ₄ Na | 37 | 40 | 47 | 63 |
| | | [M+H] ⁺ | 371.2271 | C ₂₃ H ₃₁ O ₄ | 9 | 5 | - | 1 |
| | | Frg. 1 | 295.1328 | C ₁₇ H ₂₁ O ₃ Na | 2 | 5 | 33 | 100 |
| | | Frg. 2 | 273.1485 | C ₁₇ H ₂₁ O ₃ | 100 | 100 | 100 | 97 |
| | | Frg. 3 | 227.1430 | C ₁₆ H ₁₉ O | 1 | 2 | 11 | 23 |
| | | Frg. 4 | 211.1481 | C ₁₆ H ₁₉ | - | 1 | 5 | 10 |
| | | Frg. 5 | 209.1324 | C ₁₆ H ₁₇ | - | 1 | 8 | 21 |
| | | Frg. 6 | 199.1481 | C ₁₅ H ₁₉ | - | 1 | 6 | 15 |
| | | Frg. 7 | 187.0753 | C ₁₂ H ₁₁ O ₂ | 1 | 2 | 8 | 14 |
| Frg. 8 | 131.0855 | C ₁₀ H ₁₁ | - | 1 | 5 | 17 | | |

¹ A: acaricida, Al: alguicida, B: repelente de aves, F: fungicida, H: herbicida, I: insecticida, M: molusquicida, N: nematocida.

² O: grupo "spiroketalamine", I: amida, II: insecticida antibiótico (subclase spynosin), III: benzimidazol, IV: carbamato, V: conazol, VI: inhibidor de la síntesis de quitina / regulador del crecimiento de los insectos, VII: morfolina, VIII: nicotinoide, IX: organofosforado, X: fenilurea, XI: pirimidina, XII: fungicida antibiótico (subclase: estrobilurina), XIII: ácido tetrónico.

Aunque la fragmentación inducida por colisiones (CID) que ocurre en la fuente de ionización no es tan efectiva y selectiva como la CID (producida en una cámara de colisión en un experimento MS/MS) es una característica interesante para añadir información específica del analito para la confirmación inequívoca de los positivos encontrados en muestras reales. Bajo las condiciones seleccionadas, 25 de los 33 compuestos (el 76%) mostraban una fragmentación útil. La primera identificación de los compuestos de interés se lleva a cabo mediante las respectivas coincidencias del tiempo de retención y la medida de la masa exacta del principal ión característico, típicamente mejor de 3 ppm. La fragmentación en la fuente fue caracterizada como una herramienta complementaria para la confirmación de los compuestos. Mediante el uso de datos de espectrometría de masa de alta resolución con gran exactitud de masa, como los mostrados en la **tabla IV.4.2.**, se puede llevar a cabo la identificación inequívoca de los compuestos de interés aunque algunos de ellos no presenten iones fragmento.

Además de la fragmentación en la fuente, se utilizaron para la identificación de los compuestos los patrones isotópicos característicos de átomos como cloro o azufre, presentes en la estructura de algunos de los compuestos de interés. Considerando ambos criterios, 32 de los 33 compuestos estudiados (con la excepción de pyrimethanil) presentaban fragmentación en la fuente, perfil isotópico, o ambos. Esto es indicativo del alto grado de confirmación que puede obtenerse con los instrumentos LC-TOFMS, aunque no se realizan experimentos MS/MS reales.

La identificación de las especies de interés se realizó teniendo en cuenta la coincidencia de los tiempos de retención con los de los respectivos patrones puros, junto con las medidas de masa exacta de las moléculas protonadas y, cuando era posible, los iones fragmento y los patrones isotópicos. En este sentido, la combinación de la fragmentación en la fuente con la comparación entre los patrones isotópicos teóricos y experimentales (a partir de la composición elemental de las especies) es una herramienta útil para la identificación de la mayoría de las especies de interés. La medida de masa exacta de las señales isotópicas características y la distancia entre ellas en el eje m/z pueden ser combinadas por el software para crear un coeficiente que estime la similitud entre el espectro experimental de la muestra y el de los patrones. En la **tabla IV.4.2.** se muestran los resultados obtenidos para el análisis de masa exacta de los plaguicidas seleccionados en un patrón en matriz de un nivel de concentración de $2 \mu\text{g L}^{-1}$. A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que el método ofrece un alto grado de confirmación debido a su alta exactitud de masa, permitiendo medidas de masa exacta de los iones de interés con 2 ppm de error en la mayoría de los casos.

Tabla IV.4.2. Medidas de masa exacta mediante LC-TOFMS de las moléculas protonadas y los principales fragmentos (voltaje de fragmentación en la fuente: 190 V) de los plaguicidas estudiados en un patrón en matriz fortificado a un nivel de concentración de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

| Compuesto | RT (min) | ión | Composiciones Elementales | m/z teórica | m/z experimental | Error | |
|---------------------|----------|----------------------|---|-------------|------------------|--------|------|
| | | | | | | mDa | ppm |
| Carbendazim | 3.52 | [M+H] ⁺ | C ₉ H ₁₀ N ₃ O ₂ | 192.0767 | 192.0763 | -0.45 | 2.4 |
| | | Frg. 1 | C ₈ H ₆ N ₃ O | 160.0505 | 160.0504 | -0.13 | 0.86 |
| Thiabendazole | 4.37 | [M+H] ⁺ | C ₁₀ H ₈ N ₃ S | 202.0433 | 202.0427 | 0.25 | 1.3 |
| | | ³⁴ S ión | C ₁₀ H ₈ N ₃ ³⁴ S | 204.0391 | 204.0397 | -0.56 | 2.7 |
| Monocrotophos | 4.91 | [M+Na] ⁺ | C ₇ H ₁₅ NO ₅ PNa | 246.0501 | 246.0499 | -0.28 | 1.1 |
| | | Frg. 1 | C ₂ H ₈ O ₄ P | 127.0154 | 127.0156 | 0.13 | 1.0 |
| Thiamethoxam | 5.53 | [M+H] ⁺ | C ₈ H ₁₁ N ₅ O ₃ SCl | 292.0265 | 292.0264 | -0.16 | 0.56 |
| | | Frg. 1 | C ₄ H ₃ N ₅ Cl | 131.9669 | 131.9669 | -0.025 | 0.19 |
| Imazalil metabolito | 5.87 | [M+H] ⁺ | C ₁₁ H ₁₁ N ₂ OCl ₂ | 257.0242 | 257.0246 | 0.41 | 1.5 |
| | | ³⁷ Cl ión | C ₁₁ H ₁₁ N ₂ OCl ³⁷ Cl | 259.0213 | 259.0210 | 0.35 | 1.1 |
| Imidacloprid | 6.27 | [M+H] ⁺ | C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₂ Cl | 256.0596 | 256.0595 | -0.08 | 0.31 |
| | | Frg. 1 | C ₉ H ₁₁ N ₄ | 175.0978 | 175.0983 | 0.37 | 2.1 |
| Dimethoate | 6.44 | [M+H] ⁺ | C ₅ H ₁₃ NO ₃ PS ₂ | 230.0069 | 230.0072 | 0.30 | 1.3 |
| | | Frg. 1 | C ₄ H ₈ O ₃ PS ₂ | 198.9647 | 198.9652 | 0.50 | 2.5 |
| | | Frg. 2 | C ₂ H ₆ O ₂ PS | 124.9821 | 124.9819 | -0.16 | 1.3 |
| Acetamiprid | 6.55 | [M+H] ⁺ | C ₁₀ H ₁₂ N ₄ Cl | 223.0745 | 223.0746 | 0.1 | 0.44 |
| | | Frg. 1 | C ₆ H ₅ NCl | 126.0105 | 126.0102 | -0.3 | 2.4 |

| Compuesto | RT (min) | ión | Composiciones Elementales | m/z | | Error | |
|--------------------------|---------------|---|---|----------|--------------|--------|------|
| | | | | teórica | experimental | mDa | ppm |
| Butocarboxim | 7.08 | [M+Na] ⁺ Frg. 1 | C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ SNa | 213.0665 | 213.0666 | 0.059 | 0.27 |
| | | | C ₃ H ₇ S | 75.0263 | 75.0266 | 0.30 | 4.0 |
| Thiacloprid | 7.18 | [M+H] ⁺ Frg. 1 | C ₁₀ H ₁₀ N ₄ ClS | 253.0309 | 253.0311 | 0.18 | 0.7 |
| | | | C ₆ H ₅ ClN | 126.0105 | 126.0104 | -0.10 | 0.8 |
| Prochloraz Metabolito | 7.28 | [M+H] ⁺ ³⁷ Cl ión | C ₁₁ H ₁₅ NOCl ₃ | 282.0213 | 282.0209 | -0.47 | 1.6 |
| | | | C ₁₁ H ₁₅ NOCl ₂ ³⁷ Cl | 284.0184 | 284.0181 | -0.32 | 1.1 |
| Imazalil | 7.41 | [M+H] ⁺ ³⁷ Cl ión | C ₁₄ H ₁₅ N ₂ OCl ₂ | 297.0555 | 297.0562 | 0.61 | 2.0 |
| | | | C ₁₄ H ₁₅ N ₂ OCl ³⁷ Cl | 299.0526 | 299.0530 | 0.35 | 1.2 |
| Pyrimethanil | 8.24 | [M+H] ⁺ | C ₁₂ H ₁₄ N ₃ | 200.1182 | 200.1185 | 0.28 | 1.1 |
| Spiroxamine | 8.29 | [M+H] ⁺ Frg. 1 | C ₁₈ H ₃₆ NO ₂ | 298.2741 | 298.2744 | 0.34 | 1.2 |
| | | | C ₈ H ₁₈ NO | 144.1382 | 144.1380 | -0.3 | 2.0 |
| Carbofuran | 8.30 | [M+H] ⁺ Frg. 1 Frg. 2 | C ₁₂ H ₁₆ NO ₃ | 222.1124 | 222.1126 | 0.13 | 0.58 |
| | | | C ₁₀ H ₁₃ O ₂ | 165.0910 | 165.0912 | 0.19 | 1.2 |
| | | | C ₇ H ₇ O ₂ | 123.0440 | 123.0441 | 0.044 | 0.35 |
| Metalaxyl | 8.74 | [M+H] ⁺ Frg. 1 | C ₁₅ H ₂₂ NO ₄ | 280.1543 | 280.1547 | -0.32 | 1.1 |
| | | | C ₁₃ H ₁₈ NO ₂ | 220.1332 | 220.1329 | -0.30 | 1.4 |
| Diuron | 8.77 | [M+H] ⁺ ³⁷ Cl ión | C ₁₄ H ₁₅ N ₂ OCl ₂ | 233.0242 | 233.0246 | 0.30 | 1.3 |
| | | | C ₁₄ H ₁₅ N ₂ OCl ³⁷ Cl | 235.0213 | 235.0216 | 0.25 | 1.1 |
| <i>Spinosad:</i> | | | | | | | |
| Spinosyn A + | 9.16 | [M+H] ⁺ Frg. 1 | C ₄₁ H ₆₆ NO ₁₀ | 732.4681 | 732.4686 | 0.48 | 0.67 |
| | | | C ₃₂ H ₅₀ NO ₆ | 544.3632 | 544.3630 | -0.26 | 0.48 |
| Spinosyn D | 9.53 | [M+H] ⁺ Frg. 1 | C ₄₂ H ₆₈ NO ₁₀ | 746.4837 | 746.4832 | -0.57 | 0.77 |
| | | | C ₃₃ H ₅₂ NO ₆ | 558.3789 | 558.3787 | -0.21 | 0.38 |
| Dimethomorph | 9.24/ 9.42 | [M+H] ⁺ Frg. 1 | C ₂₁ H ₂₃ NO ₄ Cl | 388.1310 | 388.1313 | 0.27 | 0.69 |
| | | | C ₁₇ H ₁₃ O ₃ Cl | 301.0626 | 301.0625 | -0.09 | 0.32 |
| Prochloraz | 9.45 | [M+H] ⁺ Frg. | C ₁₅ H ₁₉ N ₃ OCl | 376.0380 | 376.0383 | 0.38 | 1.3 |
| | | | C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ Cl ₃ | 308.0010 | 308.0012 | 0.13 | 0.4 |
| Cyproconazole | 9.66 | [M+H] ⁺ Frg. | C ₁₅ H ₁₉ N ₃ OCl | 292.1211 | 292.1215 | 0.38 | 1.3 |
| | | | C ₂ H ₄ N ₃ | 70.0401 | 70.0400 | 0.026 | 0.38 |
| Methiocarb | 9.70 | [M+Na] ⁺ [M+H] ⁺ Frg. 1 | C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ SNa | 248.0715 | 248.0716 | 0.028 | 0.11 |
| | | | C ₁₁ H ₁₆ NO ₂ S | 226.0896 | 226.0894 | -0.23 | 1.0 |
| | | | C ₉ H ₁₃ OS | 169.0682 | 169.0681 | -0.063 | 0.37 |
| Azoxystrobin | 10.00 | [M+H] ⁺ Frg. 1 | C ₂₂ H ₁₈ N ₃ O ₅ | 404.1241 | 404.1243 | 0.20 | 0.50 |
| | | | C ₂₁ H ₁₄ N ₃ O ₄ | 372.0979 | 372.0978 | -0.083 | 0.22 |
| Triflumizol | 10.52 | [M+H] ⁺ Frg. 1 | C ₁₅ H ₁₆ N ₃ OClF ₃ | 346.0928 | 346.0932 | 0.35 | 1.0 |
| | | | C ₁₂ H ₁₂ NOClF ₃ | 278.0554 | 278.0560 | 0.60 | 2.1 |
| Malathion | 10.60 | [M+Na] ⁺ [M+H] ⁺ | C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂ Na | 353.0252 | 353.0256 | 0.31 | 0.87 |
| | | | C ₁₀ H ₂₀ O ₆ PS ₂ | 331.0433 | 331.0431 | -0.25 | 0.75 |

| Compuesto | RT (min) | ión | Composiciones Elementales | m/z | | Error | |
|-----------------|----------|--------------------------------------|---|----------|--------------|--------|------|
| | | | | teórica | experimental | mDa | ppm |
| | | Frg. 1 | C ₈ H ₁₄ O ₅ PS ₂ | 285.0014 | 285.0021 | 0.61 | 2.1 |
| | | Frg. 2 | C ₆ H ₇ O ₂ | 127.0389 | 127.0391 | 0.13 | 1.0 |
| Chlorfenvinphos | 11.00 | [M+Na] ⁺ | C ₁₂ H ₁₄ O ₄ ³⁵ Cl ₃ PNa | 380.9587 | 380.9593 | 0.55 | 1.4 |
| | | [M+H] ⁺ | C ₁₂ H ₁₅ O ₄ ³⁵ Cl ₃ P | 358.9768 | 358.9771 | 0.29 | 0.81 |
| | | Cl ₂ ³⁷ Cl ión | C ₁₂ H ₁₅ O ₄ ³⁵ Cl ₂ ³⁷ Cl P | 360.9738 | 360.9743 | 0.48 | 1.3 |
| Difenoconazole | 11.15 | [M+H] ⁺ | C ₁₉ H ₁₈ N ₃ O ₃ Cl ₂ | 406.0719 | 406.0726 | 0.62 | 1.5 |
| | | Cl ³⁷ Cl ión | C ₁₉ H ₁₈ N ₃ O ₃ ³⁵ Cl ³⁷ Cl | 408.0690 | 408.0698 | 0.77 | 1.9 |
| Benalaxyl | 11.23 | [M+Na] ⁺ | C ₂₀ H ₂₃ NO ₃ Na | 348.1570 | 348.1576 | 0.58 | 1.7 |
| | | [M+H] ⁺ | C ₂₀ H ₂₄ NO ₃ | 326.1751 | 326.1756 | 0.53 | 1.6 |
| | | Frg. 1 | C ₁₂ H ₁₈ NO ₂ | 208.1331 | 208.1332 | -0.10 | 0.50 |
| Buprofezin | 11.44 | [M+H] ⁺ | C ₁₆ H ₂₄ N ₃ OS | 306.1634 | 306.1639 | 0.44 | 1.4 |
| | | Frg. 1 | C ₉ H ₁₇ N ₂ OS | 201.1056 | 201.1058 | 0.19 | 0.94 |
| Hexaflumuron | 11.51 | [M+Na] ⁺ | C ₁₆ H ₈ N ₂ O ₃ F ₆ Cl ₂ Na | 482.9708 | 482.9702 | -0.63 | 1.3 |
| | | [M+H] ⁺ | C ₁₆ H ₉ N ₂ O ₃ F ₆ Cl ₂ | 460.9888 | 460.9896 | 0.70 | 1.5 |
| Diazinon | 11.64 | [M+H] ⁺ | C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₃ PS | 305.1083 | 305.1083 | 0.47 | 1.5 |
| | | Frg. 1 | C ₈ H ₁₃ N ₂ S | 169.0793 | 169.0799 | 0.50 | 3.0 |
| | | Frg. 2 | C ₈ H ₁₃ N ₂ O | 153.1022 | 153.1023 | 0.06 | 0.4 |
| Pyriproxyfen | 12.61 | [M+H] ⁺ | C ₂₀ H ₂₀ NO ₃ | 322.1437 | 322.1440 | 0.23 | 0.71 |
| | | Frg. 1 | C ₁₅ H ₁₂ O ₂ | 227.1066 | 227.1071 | 0.44 | 1.9 |
| | | Frg. 2 | C ₅ H ₆ NO | 96.0443 | 96.0445 | 0.11 | 1.1 |
| Spiromesifen | 13.36 | [M+Na] ⁺ | C ₂₃ H ₃₀ O ₁₀ Na | 393.2038 | 393.2036 | 0.17 | 0.43 |
| | | [M+H] ⁺ | C ₂₃ H ₃₁ O ₁₀ | 371.2217 | 371.2216 | -0.086 | 0.23 |
| | | Frg. 1 | C ₁₇ H ₂₁ O ₃ | 273.1485 | 273.1483 | 0.38 | 1.4 |

Para la identificación y cuantificación de los analitos se utilizaron los cromatogramas extraídos (EICs) con una ventana de masa de 20 mDa ($[M+H]^+ \pm 10$ mDa). La molécula protonada ($[M+H]^+$) se utilizó para la confirmación y cuantificación en la mayoría de los casos, a excepción de aquellos compuestos que presentaban aductos de sodio (ej: thiametoxam) o fragmentos característicos (ej: prochloraz) más intensos. A modo de ejemplo, en la **figura IV.4.2.** se muestra el cromatograma de iones totales obtenido tras el análisis mediante LC-TOFMS de un extracto de refresco fortificado con 2 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, junto con los cromatogramas extraídos de los analitos de interés (EICs).

La separación de las especies se conseguía en menos de 14 minutos en una columna corta de tamaño de partícula reducido, obteniendo una resolución satisfactoria con picos medios de 10 segundos (con las columnas analíticas típicas se consiguen picos de una anchura media de

entre 20 – 40 segundos a la altura de la línea base). Comparado con el método publicado anteriormente para el análisis de residuos de plaguicidas en refrescos (ver capítulo IV.3), el uso de columnas de menor tamaño de partícula proporciona varias ventajas: 1) el tiempo total de análisis se reduce a la mitad (de 47 min a menos de 20 min, incluyendo el lavado y re-equilibración de la columna); 2) el uso de disolventes orgánicos (acetonitrilo) se reduce cerca de un 60%, reduciéndose la generación de residuos tóxicos perjudiciales para el medio ambiente; 3) la anchura de pico a la altura de la línea base se reduce a la mitad, lo que implica una mejor relación señal-ruido (S/N) a bajas concentraciones, mejorándose los límites de detección. Finalmente se debe destacar que el uso de estas columnas es perfectamente compatible con sistemas HPLC convencionales, ya que su presión de trabajo es inferior a 100 bares.

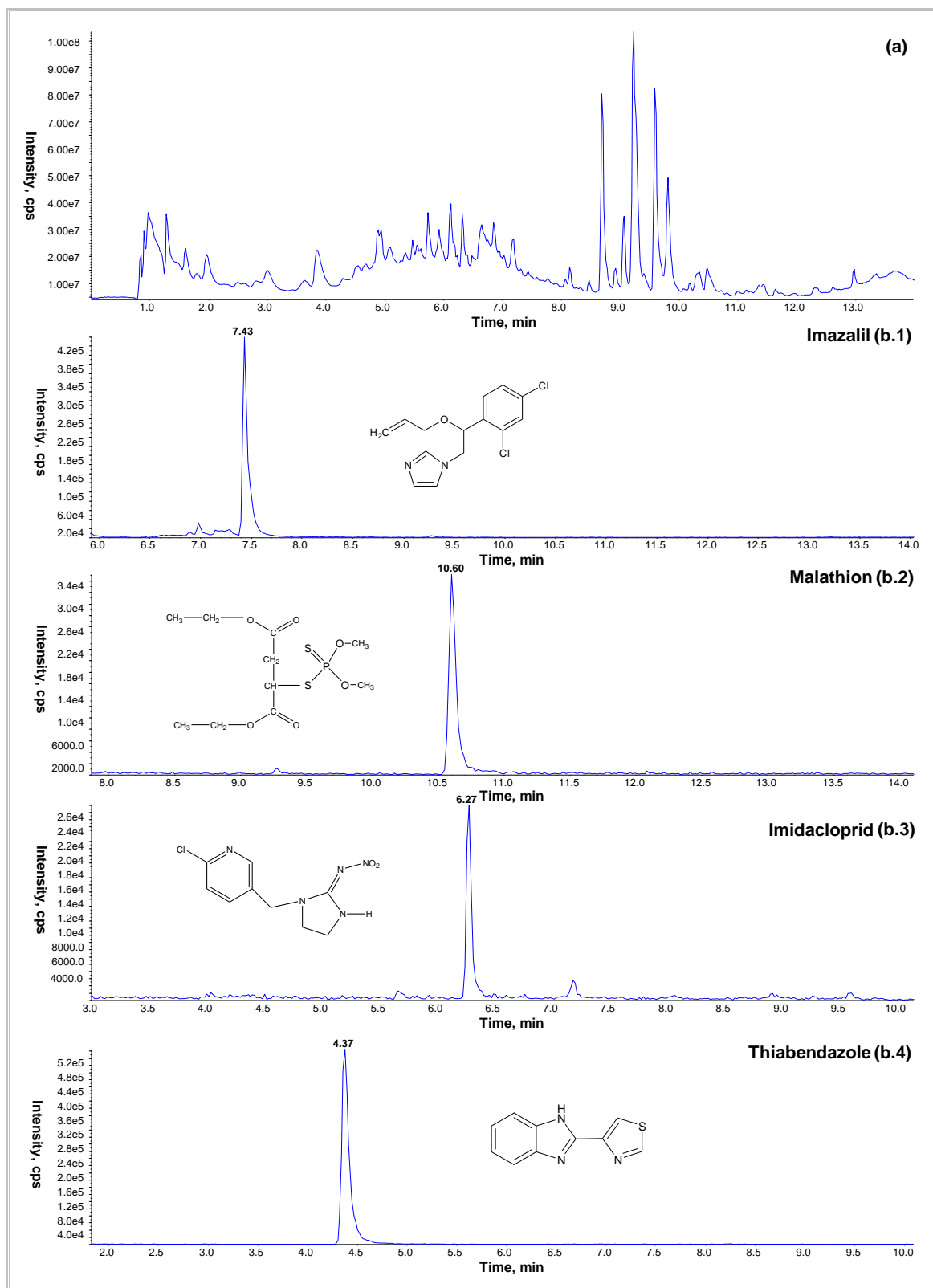


Figura IV.4.2. (a) Cromatograma total de iones (TIC) de un extracto de refresco fortificado con la mezcla de plaguicidas a analizar. (b) Cromatogramas extraídos de algunos compuestos: (b.1.) imazalil, $2 \mu\text{g L}^{-1}$, (b.2.) malathion, $2 \mu\text{g L}^{-1}$, (b.3.) imidacloprid, $10 \mu\text{g L}^{-1}$, (b.4.) thiabendazole, $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

IV.4.3.2. Tratamiento de la muestra y estudios de recuperación.

A partir de la experiencia previa en la misma matriz (ver capítulo IV.3), y los problemas relacionados con el efecto matriz y la limpieza del instrumento, se eligió un factor de preconcentración de los extractos de 10:1 y un volumen de carga de muestra en los cartuchos SPE de 15 mL. Un factor de preconcentración de 20:1 o mayor implicaba extractos complejos que empeoraban la relación señal/ruido y ensuciaban la entrada del espectrómetro de masas, siendo necesarios la limpieza y mantenimiento diario de la fuente. Además, en estas condiciones, el efecto matriz era considerable: alrededor de un 35% de supresión para la mayoría de los compuestos estudiados. Por el contrario, el uso de un factor de preconcentración de 10:1 (o menor) no afectaba significativamente a la sensibilidad y a la estabilidad de la fuente de ionización durante largos periodos de operación. Además, el efecto matriz también se veía reducido (ver sección IV.4.3.3.).

Como alternativa a la dilución de los extractos se podría haber optado por añadir una etapa de *clean-up* al método, pero se consideró que la sensibilidad y los límites de detección eran suficientes para la aplicación ensayada. Además, evitando el uso de una etapa de *clean-up* el método es más directo y se disminuye el uso de disolventes orgánicos. El método de extracción descrito podría ser fácilmente automatizado utilizando el acoplamiento SPE-LC-MS, incrementando el grado de productividad y automatización del proceso.

Para evaluar la efectividad del método de extracción, se llevaron a cabo distintos estudios de recuperación utilizando una muestra de refresco de naranja que se evaluó previamente para asegurarnos de que no contenía los analitos de interés. Varias alícuotas de este refresco fueron fortificadas a dos niveles de concentración (10 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) con la disolución de trabajo. Estos niveles de concentración fueron elegidos teniendo en cuenta los niveles de concentración de plaguicidas encontrados en este tipo de muestras en estudios anteriores (por encima de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$) y el valor por defecto del MRL establecido por la UE para el contenido de plaguicidas en alimentos (10 $\mu\text{g L}^{-1}$). Después, las muestras fortificadas se dejaron a temperatura ambiente hasta que perdieron el gas y luego se extrajeron con el método descrito. Finalmente, los extractos se analizaron mediante el método LC-MS desarrollado, obteniendo recuperaciones entre el 64 y el 123% para los 33 plaguicidas estudiados, con desviaciones estándar (RSD%) inferiores al 10% en la mayoría de los casos, como puede verse

en la **tabla IV.4.3**. Los resultados muestran la fiabilidad del método de extracción estudiado para el análisis de residuos de plaguicidas en refrescos.

Tabla IV.4.3. Recuperaciones obtenidas en extractos de refrescos fortificados con la mezcla de 33 plaguicidas a dos niveles de concentración: 10 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

| Compuesto | Nivel de conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Recuperación (%) | RSD (%) ^a |
|---------------------------------|--|---------------------|----------------------|
| Carbendazim | 10 | 101.5 | 8.5 |
| | 50 | 102.0 | 4.5 |
| Thiabendazole | 10 | 88.6 | 8.0 |
| | 50 | 104.7 | 3.4 |
| Monocrotophos | 10 | 102.8 | 7.5 |
| | 50 | 101.6 | 3.5 |
| Thiametoxam | 10 | 103.4 | 5.5 |
| | 50 | 93.8 | 4.6 |
| Imazalil metabolito | 10 | 78.6 | 7.5 |
| | 50 | 82.2 | 5.2 |
| Imidacloprid | 10 | 122.6 | 5.5 |
| | 50 | 84.2 | 6.2 |
| Dimethoate | 10 | 115.7 | 4.1 |
| | 50 | 96.2 | 4.1 |
| Acetamiprid | 10 | 66.5 | 3.9 |
| | 50 | 79.0 | 2.5 |
| Butocarboxim | 10 | 107.2 | 7.9 |
| | 50 | 100.8 | 4.1 |
| Thiacloprid | 10 | 101.2 | 4.8 |
| | 50 | 105.9 | 1.5 |
| Prochloraz metabolito | 10 | 72.8 | 5.7 |
| | 50 | 78.9 | 4.1 |
| Imazalil | 10 | 75.8 | 10.0 |
| | 50 | 96.9 | 3.6 |
| Pyrimethanil | 10 | 109.9 | 5.7 |
| | 50 | 101.2 | 6.5 |
| Carbofuran | 10 | 90.5 | 6.7 |
| | 50 | 100.5 | 2.9 |
| Spiroxamine | 10 | 101.7 | 9.1 |
| | 50 | 100.2 | 3.4 |
| Metalaxyl | 10 | 96.6 | 5.4 |
| | 50 | 110.2 | 3.3 |
| Diuron | 10 | 98.4 | 3.9 |
| | 50 | 95.0 | 4.8 |
| Spinosad (Spinosyn A + D) | 10 | 83.9 | 8.5 |
| | 50 | 92.1 | 5.6 |
| Dimethomorph (Z + E isomers) | 10 | 100.0 | 10.9 |
| | 50 | 122.9 | 2.6 |
| Prochloraz | 10 | 85.1 | 7.1 |
| | 50 | 93.2 | 4.7 |
| Cyproconazole | 10 | 94.2 | 4.6 |
| | 50 | 98.8 | 2.6 |
| Methiocarb | 10 | 96.5 | 8.9 |
| | 50 | 96.5 | 2.1 |
| Azoxystrobin | 10 | 83.9 | 7.3 |
| | 50 | 110.6 | 2.3 |
| Triflumizol | 10 | 71.2 | 10.7 |
| | 50 | 73.3 | 12.2 |

| Compuesto | Nivel de conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Recuperación (%) | RSD (%) ^a |
|-----------------|---|------------------|----------------------|
| Malathion | 10 | 88.1 | 4.9 |
| | 50 | 100.2 | 2.3 |
| Chlorfenvinphos | 10 | 84.9 | 5.0 |
| | 50 | 90.4 | 2.5 |
| Difenoconazole | 10 | 75.3 | 13.7 |
| | 50 | 79.9 | 4.2 |
| Benalaxyl | 10 | 97.0 | 7.7 |
| | 50 | 93.9 | 2.2 |
| Buprofezin | 10 | 101.7 | 5.9 |
| | 50 | 94.8 | 2.1 |
| Hexaflumuron | 10 | 64.3 | 11.5 |
| | 50 | 65.8 | 7.7 |
| Diazinon | 10 | 79.8 | 9.9 |
| | 50 | 65.0 | 2.2 |
| Pyriproxyfen | 10 | 72.8 | 5.7 |
| | 50 | 82.1 | 4.8 |
| Spiromesifen | 10 | 72.3 | 4.4 |
| | 50 | 68.1 | 5.6 |

^a (n = 6)

IV.4.3.3. Parámetros analíticos.

Para evaluar los parámetros analíticos del método desarrollado se construyeron curvas de calibrado para cada uno de los 33 analitos de interés, fortificando extractos de refresco a diferentes concentraciones comprendidas en el rango de 1 – 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (esto supondría concentraciones de 0.1 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ en la muestra de refresco original, teniendo en cuenta el factor de preconcentración 10:1). Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla IV.4.4.**, donde están reflejadas las ecuaciones de las rectas de calibración en disolvente junto con los límites de cuantificación, el efecto matriz y la RSD(%). La linealidad de la respuesta analítica en el rango estudiado es excelente teniendo en cuenta que se obtuvieron coeficientes de correlación mayores de 0.995 para la mayoría de los plaguicidas analizados. La desviación estándar relativa (RSD%) entre análisis estaban en el rango de 1.4 a 5.9% y los valores inter-día (semanales) estaban entre el 5 y el 15%. Estos resultados demuestran la precisión del método desarrollado. Los límites de cuantificación (LOQs) fueron estimados como la mínima concentración de analito que daba una señal correspondiente a una relación señal-ruido S/N = 10. Por lo tanto, los LOQs fueron calculados experimentalmente a partir del análisis de patrones en matriz fortificados a bajos niveles de concentración, utilizando la señal del cromatograma extraído con una estrecha ventana de masa para el ión más abundante de cada compuesto. Los resultados obtenidos para cada plaguicida también se muestran en la **tabla**

IV.4.4. Los límites de detección son tan bajos como $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ para diazinon y pyriproxyfen, y menores de $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ para la mayoría de los compuestos estudiados. Comparado con las concentraciones encontradas en muestras de bebidas (más de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ para un compuesto individual, y típicamente en el rango $2\text{-}30 \mu\text{g L}^{-1}$), los LOQs obtenidos son muy satisfactorios para la aplicación de interés, sobre todo teniendo en cuenta que actualmente no existen normativas que establezcan límites máximos de residuos (MRLs) para plaguicidas en este tipo de productos derivados. La normativa más exigente de la UE establece un MRL de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para residuos de plaguicidas en alimentos infantiles y para compuestos no autorizados. Utilizando este estándar, el método desarrollado cumpliría los requerimientos.

El efecto de la matriz, que puede tener un importante impacto en la calidad de los datos cuantitativos generados por el método, también fue estudiado. Los componentes de la matriz pueden aumentar o reducir (incluso suprimir) la señal de los analitos. El problema se origina en la fuente de ionización, cuando los constituyentes de la matriz influyen sobre la ionización de un analito coeluyente, causando la supresión de la ionización del mismo. El protocolo de tratamiento de muestra fue diseñado con el objetivo de minimizar el efecto matriz potencial, utilizando un factor de preconcentración pequeño. Para evaluar el impacto de la matriz en el aumento o disminución de la señal de los analitos (comparada con la señal de de los mismos en patrones preparados en disolvente), las pendientes de las rectas de calibración por adición de patrón (patrones en matriz) se compararon con las pendientes de las rectas de calibrado en disolvente, calculando relaciones pendiente calibrado matriz/pendiente calibrado disolvente para cada uno de los 33 compuestos analizados. Los resultados aparecen recogidos en la **tabla IV.4.4**. Una supresión de la señal superior al 25% sólo se observó para 4 de los 33 compuestos estudiados (12%), mientras que alrededor del 60% de los compuestos mostró un efecto matriz menor del 15%. Estos valores son lo suficientemente bajos como para proporcionar datos cuantitativos de masa exacta si se usa una calibración en matriz para minimizar los errores debidos a este efecto. Una mayor dilución de los extractos minimizaría el efecto matriz, pero sin embargo empeoraría los límites de detección.

Tabla IV.4.4. Parámetros analíticos obtenidos para el análisis de plaguicidas en refrescos mediante el método LC-TOFMS desarrollado.

| Compuesto | Rango de conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Ecuación de la recta | Efecto matriz ^a (Δ %) | Coefficiente de regresión (r) | LOQ $\mu\text{g L}^{-1}$ | RSD (%) ^b (n=6) |
|-----------------------|---|---|--|-------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Carbendazim | 1 - 50 | $y = 1.49 \cdot 10^3 C - 5.45 \cdot 10^2$ | 0.89 (-11 %) | 0.99880 | 0.1 | 5.8 |
| Thiabendazole | 0.1 - 50 | $y = 5.07 \cdot 10^4 C + 5.24 \cdot 10^5$ | 0.87 (-13 %) | 0.99870 | 0.05 | 4.6 |
| Monocrotophos | 2 - 50 | $y = 2.16 \cdot 10^3 C + 3.76 \cdot 10^4$ | 0.69 (-31 %) | 0.99830 | 1.2 | 5.3 |
| Thiametoxam | 2 - 50 | $y = 1.09 \cdot 10^3 C - 6.33 \cdot 10^3$ | 0.77 (-23 %) | 0.99985 | 1.6 | 5.9 |
| Imazalil metabolito | 0.1 - 50 | $y = 3.61 \cdot 10^4 C + 2.27 \cdot 10^5$ | 0.82 (-18 %) | 0.99980 | 0.06 | 4.2 |
| Imidacloprid | 0.1 - 50 | $y = 2.99 \cdot 10^3 C - 6.24 \cdot 10^4$ | 0.61 (-39 %) | 0.99760 | 0.8 | 3.4 |
| Dimethoate | 0.1 - 50 | $y = 1.09 \cdot 10^3 C - 3.13 \cdot 10^4$ | 0.83 (-17 %) | 0.99690 | 1.2 | 6.7 |
| Acetamiprid | 0.1 - 50 | $y = 1.06 \cdot 10^4 C - 7.33 \cdot 10^4$ | 0.84 (-16 %) | 0.99985 | 0.2 | 5.1 |
| Butocarboxim | 2 - 50 | $y = 4.52 \cdot 10^3 C - 6.81 \cdot 10^4$ | 0.68 (-32 %) | 0.99980 | 2 | 4.7 |
| Thiacloprid | 0.1 - 50 | $y = 1.02 \cdot 10^4 C - 1.79 \cdot 10^4$ | 1.07 (+7 %) | 0.99995 | 0.3 | 2.8 |
| Prochloraz metabolito | 0.1 - 50 | $y = 3.03 \cdot 10^4 C - 1.28 \cdot 10^4$ | 0.97 (-3 %) | 0.99999 | 0.04 | 3.3 |
| Imazalil | 0.1 - 50 | $y = 5.29 \cdot 10^4 C + 1.00 \cdot 10^6$ | 0.84 (-16 %) | 0.99514 | 0.03 | 2.1 |
| Pyrimethanil | 0.1 - 50 | $y = 1.26 \cdot 10^5 C + 7.86 \cdot 10^4$ | 0.88 (-12 %) | 0.99549 | 0.05 | 1.9 |
| Spiroxamine | 0.1 - 50 | $y = 1.26 \cdot 10^5 C + 2.00 \cdot 10^6$ | 0.78 (-22 %) | 0.99212 | 0.03 | 1.4 |
| Carbofuran | 0.1 - 50 | $y = 7.20 \cdot 10^3 C + 1.18 \cdot 10^5$ | 0.98 (-2 %) | 0.99725 | 0.2 | 4.1 |
| Metalaxyl | 0.1 - 50 | $y = 2.70 \cdot 10^4 C + 3.75 \cdot 10^5$ | 0.93 (-7 %) | 0.99855 | 0.05 | 2.1 |
| Diuron | 0.1 - 50 | $y = 1.07 \cdot 10^4 C + 5.29 \cdot 10^3$ | 0.90 (-10 %) | 1.00000 | 0.2 | 3.2 |
| Spinosad | 0.1 - 50 | $y = 4.77 \cdot 10^4 C - 2.54 \cdot 10^5$ | 0.84 (-16 %) | 0.99980 | 0.07 | 1.9 |
| Dimethomorph | 0.1 - 50 | $y = 1.69 \cdot 10^4 C + 3.36 \cdot 10^5$ | 0.78 (-22 %) | 0.99975 | 0.5 | 2.6 |
| Prochloraz | 0.1 - 50 | $y = 2.99 \cdot 10^4 C - 3.21 \cdot 10^5$ | 1.01 (+1 %) | 0.99941 | 0.03 | 2.9 |
| Cyproconazole | 0.1 - 50 | $y = 5.67 \cdot 10^4 C - 4.26 \cdot 10^4$ | 0.90 (-10 %) | 0.99960 | 0.07 | 3.1 |
| Methiocarb | 0.1 - 50 | $y = 1.05 \cdot 10^3 C + 1.27 \cdot 10^4$ | 1.01 (+1 %) | 0.99965 | 0.1 | 3.2 |
| Azoxystrobin | 0.1 - 50 | $y = 2.61 \cdot 10^4 C + 4.64 \cdot 10^5$ | 0.96 (-4 %) | 0.99710 | 0.08 | 2.0 |
| Triflumizol | 0.1 - 50 | $y = 3.62 \cdot 10^3 C + 5.94 \cdot 10^3$ | 0.61 (-39 %) | 0.99995 | 0.1 | 2.7 |
| Malathion | 0.1 - 50 | $y = 3.23 \cdot 10^3 C + 5.01 \cdot 10^4$ | 1.05 (+5 %) | 0.99815 | 0.05 | 3.1 |
| Chlorfenvinphos | 1 - 50 | $y = 9.90 \cdot 10^3 C + 2.80 \cdot 10^4$ | 0.93 (-7 %) | 0.99970 | 0.2 | 4.6 |
| Difenoconazole | 0.1 - 50 | $y = 3.93 \cdot 10^4 C + 4.06 \cdot 10^5$ | 0.99 (-1 %) | 0.99649 | 0.05 | 2.9 |
| Benalaxyl | 0.1 - 50 | $y = 5.43 \cdot 10^4 C + 2.45 \cdot 10^5$ | 0.96 (-4 %) | 0.99875 | 0.1 | 2.8 |
| Buprofezin | 0.1 - 50 | $y = 1.62 \cdot 10^5 C + 1.00 \cdot 10^6$ | 1.00 (0 %) | 0.99358 | 0.05 | 3.0 |
| Hexaflumuron | 2 - 50 | $y = 1.23 \cdot 10^3 C + 5.10 \cdot 10^3$ | 0.96 (-4 %) | 0.99915 | 1.5 | 5.1 |
| Diazinon | 0.1 - 50 | $y = 2.14 \cdot 10^5 C + 3.00 \cdot 10^6$ | 0.79 (-21 %) | 0.98919 | 0.02 | 2.6 |
| Pyriproxyfen | 0.1 - 50 | $y = 2.49 \cdot 10^5 C + 5.91 \cdot 10^4$ | 1.04 (+4 %) | 0.99965 | 0.02 | 1.7 |
| Spiromesifen | 0.1 - 50 | $y = 3.92 \cdot 10^4 C + 5.41 \cdot 10^4$ | 1.17 (+17%) | 0.99880 | 0.1 | 3.7 |

^a Relación de pendientes: pte. calibración matriz / pte. calibración disolvente^b Nivel de concentración: $20 \mu\text{g L}^{-1}$

IV.4.3.4. Aplicación del método desarrollado al análisis de muestras reales de refrescos.

El método desarrollado fue aplicado al análisis de 14 muestras de refrescos adquiridas en diferentes países europeos. A modo de ejemplo, en la **figura IV.4.3.** se muestra el análisis de una muestra de refresco de naranja que contenía thiabendazole ($0.6 \mu\text{g L}^{-1}$) e imazalil ($3.2 \mu\text{g L}^{-1}$). Los positivos detectados en las muestras fueron confirmados a través de medidas de masa exacta mediante LC-TOFMS, obteniendo unos errores de masa inferiores a 3 ppm. Esto demuestra la utilidad de la técnica LC-TOFMS para el análisis multi-residuo de plaguicidas en refrescos. Los resultados obtenidos en las 14 muestras estudiadas se muestran en la **tabla IV.4.5.** Trece de las catorce muestras analizadas contenían al menos residuos de un plaguicida, con niveles de concentración total de plaguicidas en el rango $2.3 - 21.5 \mu\text{g L}^{-1}$. Los analitos detectados fueron carbendazim, thiabendazole, imazalil y su principal metabolito, y prochloraz y su principal metabolito. Los resultados muestran la capacidad del método propuesto para el análisis de plaguicidas y la cuantificación de los mismos en muestras de refrescos a bajos niveles de concentración.

Tabla IV.4.5. Aplicación del método LC-TOFMS propuesto al análisis de muestras de refrescos de cítricos adquiridas en Europa durante el año 2009. Las concentraciones halladas de los compuestos estudiados están expresadas en $\mu\text{g L}^{-1}$.

| M. N°. | Carbendazim | Thiabendazole | Imazalil | Imazalil metab. | Prochloraz | Prochloraz metab. | Resto comp. | Total |
|--------|-------------|---------------|----------|-----------------|------------|-------------------|-------------|-------|
| 1 | 2.3 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 2.3 |
| 2 | 0.48 | 0.60 | 3.2 | 0.06 | ND | ND | ND | 4.2 |
| 3 | 0.60 | 1.6 | 5.3 | 0.15 | ND | ND | ND | 7.6 |
| 4 | 1.8 | 2.1 | 16.1 | 0.30 | 1.1 | 0.40 | ND | 21.5 |
| 5 | 1.1 | ND | 10.4 | 0.20 | 1.0 | 0.59 | ND | 13.3 |
| 6 | ND | ND | 4.7 | 0.09 | ND | ND | ND | 4.8 |
| 7 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 8 | 1.40 | 0.47 | 6.8 | 0.12 | 0.58 | 0.49 | ND | 9.9 |
| 9 | ND | ND | 4.1 | ND | 1.8 | 0.28 | ND | 6.2 |
| 10 | ND | ND | 1.3 | ND | 0.2 | ND | ND | 1.5 |
| 11 | 0.85 | 0.5 | 2.5 | ND | 0.4 | 0.16 | ND | 4.4 |
| 12 | ND | 0.56 | 6.3 | ND | 1.9 | ND | ND | 8.8 |
| 13 | ND | 5.5 | 11.2 | <LOQ | LOD | 0.10 | ND | 16.8 |
| 14 | ND | < LOQ | 2.0 | ND | ND | ND | ND | 2.0 |

Muestras analizadas: 1. Refresco de limón (LF), República Checa; 2. Refresco de naranja (OF) Suiza; 3. OF, Austria; 4. LF, España (6% zumo); 5. LF, Francia (5% zumo); 6. LF, Italia (12% zumo); 7. Refresco de piña, España (10% zumo); 8. LF, Reino Unido (6% zumo); 9. OF, España (6% zumo); 10. LF, España (1% zumo); 11. OF, España (8% zumo); 12. LF, Irlanda (6% zumo); 13. OF, Francia (14% zumo); 14. OF, Francia (12% zumo).

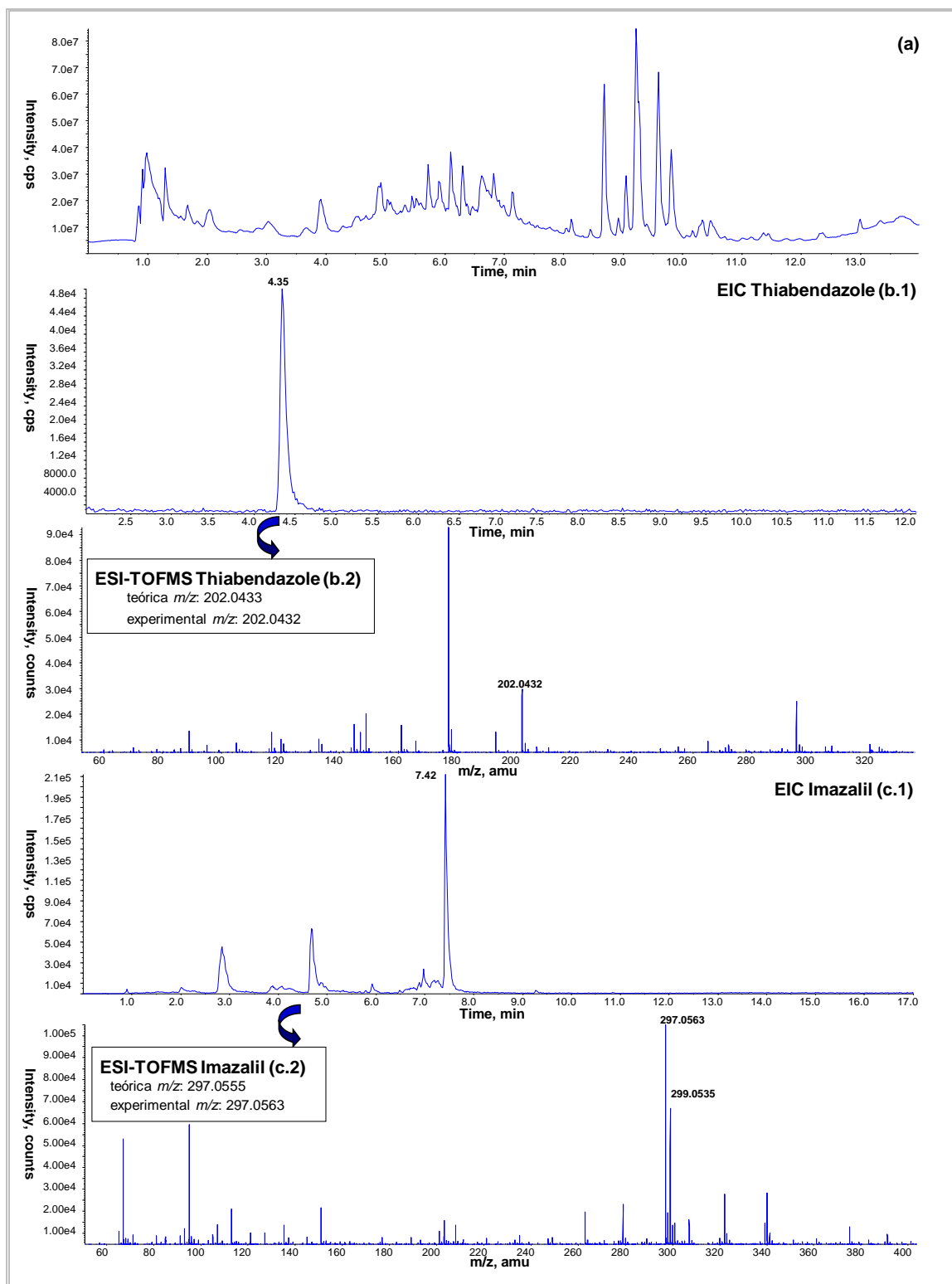


Fig. IV.4.3. Ejemplo de una muestra de refresco de naranja que contenía imazalil ($3.2 \mu\text{g L}^{-1}$) y thiabendazole ($0.6 \mu\text{g L}^{-1}$). a) Cromatograma total de iones de la muestra; b.1.) Cromatograma extraído de thiabendazole; b.2.) Identificación de thiabendazole en la muestra a un tiempo de retención de 4.35 min debido al espectro de masa exacta obtenido en dicho punto del EIC (masa teórica: 202.0433; masa experimental: 202.0432); c.1.) Cromatograma extraído de imazalil; c.2.) Identificación de imazalil en la muestra a un tiempo de retención de 7.42 min debido al espectro de masa exacta obtenido en dicho punto del EIC (masa teórica: 297.0555; masa experimental: 297.0563).

IV.4.4. Conclusiones

En este trabajo se describe el desarrollo y validación del primer método multi-residuo para la determinación de plaguicidas en refrescos. El método emplea SPE con cartuchos poliméricos y detección mediante LC-TOFMS utilizando una columna de tamaño de partícula reducido (1.8 μm), que mejora el rendimiento del método. Se obtuvieron recuperaciones satisfactorias para diferentes clases de plaguicidas estudiados, por lo que el método podría ser ampliado para su aplicación a más de un centenar de plaguicidas. Los resultados muestran que la sensibilidad obtenida con el método propuesto es apropiada para el análisis multi-residuo de plaguicidas en las muestras ensayadas. La alta sensibilidad obtenida mediante LC-TOFMS de resolución rápida (ej: LOQ = 0.02 $\mu\text{g L}^{-1}$ para diazinon y pyriproxifen) cumple con los requerimientos para la aplicación ensayada, y con los niveles de concentración encontrados en las muestras. El potencial del método propuesto fue demostrado mediante el análisis de 14 muestras reales con excelente sensibilidad y selectividad. El método LC-TOFMS propuesto también ofrece la posibilidad de realizar un análisis a posteriori (no dirigido) de las muestras. Todos los archivos guardados pueden ser reexaminados en busca de compuestos que previamente no se esperaban o que no estaban sujetos a control.

CAPÍTULO IV.5



Desarrollo de un método multi-residuo para el análisis de plaguicidas en aceite de oliva mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas de tiempo de vuelo.

IV.5. DESARROLLO DE UN MÉTODO MULTI-RESIDUO PARA EL ANÁLISIS DE PESTICIDAS EN ACEITE DE OLIVA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO (LC-TOFMS).

IV.5.1. Resumen

Se ha llevado a cabo una comparación de dos metodologías de preparación de muestra para el desarrollo de métodos multi-residuo para el análisis de plaguicidas en aceite de oliva. Las metodologías propuestas se basan en a) extracción líquido-líquido con acetonitrilo seguida de una etapa de limpieza o *clean-up* mediante extracción en fase sólida dispersiva con carbón grafitizado (GCB), amina primaria-secundaria (PSA) y C₁₈; b) extracción líquido-líquido con acetonitrilo (saturado con éter de petróleo), seguida de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) utilizando como fase sólida aminopropil, y cartuchos de Florisil para una etapa final de limpieza o *clean-up*. Para evaluar las metodologías de tratamiento de muestra propuestas, 105 plaguicidas representativos de diferentes clases fueron estudiados haciendo uso de cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas de tiempo de vuelo empleando como fuente de ionización electrospray (LC-TOFMS). Para la validación del método se llevaron a cabo estudios de recuperación a dos niveles de concentración (10 y 100 µg kg⁻¹), obteniéndose recuperaciones en el rango 70-130% para el 72% de los analitos cuando se utilizó el procedimiento líquido-líquido, y para el 57% de los analitos cuando se utilizó el método MSPD. El método LC-MS mostró linealidad, precisión y exactitud satisfactorias. Los límites de detección obtenidos eran inferiores a 10 µg kg⁻¹ para más del 85% de los compuestos utilizando ambos métodos de preparación de muestra. Por otra parte, el efecto matriz observado era mínimo (aumento o supresión de señal ≤ 20%) para alrededor del 70% de los compuestos estudiados. Los datos obtenidos muestran que ambas metodologías de preparación de muestra pueden ser aplicadas satisfactoriamente para el análisis multi-residuo de un gran número de plaguicidas en muestras de aceite de oliva, mostrando la capacidad para detectar a niveles de trazas más de un centenar de especies con diferentes propiedades fisicoquímicas, sin que se requiera una instrumentación costosa para la etapa de tratamiento de muestra ni un consumo elevado de disolventes y reactivos (generando por lo tanto pocos residuos).

IV.5.2. Experimental

IV.5.2.1. Selección de los analitos

Se incluyeron un total de 105 plaguicidas pertenecientes a diferentes clases (fungicidas, herbicidas, insecticidas, etc), seleccionados por estar incluidos en las diferentes normativas vigentes o por haber dado resultados positivos en muestras de aceite de oliva analizadas previamente [48]. Los plaguicidas seleccionados pueden clasificarse en cuatro grupos (ver **tabla IV.5.1**), aunque algunos compuestos están incluidos en más de un grupo:

Grupo 1. Veinte plaguicidas polares fueron elegidos del anexo I de la Directiva de la Unión Europea 91/414/CEE.

Grupo 2. Trece plaguicidas con importantes implicaciones para la salud fueron seleccionados. Estos compuestos no están autorizados en la Unión Europea pero sí en terceros países.

Grupo 3. Cuarenta de los plaguicidas seleccionados pertenecen a la lista del *European Union Proficiency Test (EUPT)* para frutas y vegetales (www.crl-pesticides.eu).

Grupo 4. Cincuenta y cinco compuestos fueron seleccionados de acuerdo a la base de datos www.pesticide-online.com. Dichos compuestos fueron encontrados en muestras de frutas y vegetales durante el periodo 2000-2007.

El Reglamento (CE) 396/2005 de la UE establece (anexos II y III) límites máximos permitidos de residuos (MRLs) para algunos de los plaguicidas estudiados en aceitunas de producción. Estos valores aparecen recogidos en la **tabla IV.5.1**. El MRL por defecto se estableció a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para los compuestos que no estaban incluidos en los anexos II y III. Sin embargo, no existen actualmente MRLs armonizados para aceite de oliva. El Codex Alimentarius sólo ha establecido MRLs, superiores a $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ en todos los casos, para tres plaguicidas (carbaryl, kresoxim-methyl, methidathion) en aceite de oliva virgen.

IV.5.2.2. Preparación de muestra

Protocolo 1.- Extracción líquido-líquido con acetonitrilo seguida de una etapa de limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS modificado para matrices grasas [46]).

El procedimiento propuesto para este estudio constaba de los siguientes pasos: una porción representativa de la muestra de 3 g fue pesada en un tubo de centrífuga de plástico de 50 mL de capacidad, junto con 7 mL de agua ultrapura. Acto seguido fueron añadidos 10 mL de acetonitrilo (MeCN) y el tubo se agitó manualmente durante 1 minuto. Después se añadieron 4 g de sulfato de magnesio anhidro y 1 g de cloruro sódico (NaCl). Inmediatamente después (para evitar la coagulación del sulfato de magnesio anhidro) el tubo se agitó de nuevo enérgicamente durante 1 minuto y posteriormente la mezcla se centrifugó a 3700 revoluciones por minuto (rpm) durante otro minuto. Una vez separadas las fases, se tomaron 5 mL del sobrenadante (extracto de acetonitrilo) que fueron transferidos a un tubo de centrífuga de plástico de 15 mL de capacidad al que se habían añadido previamente 750 mg de $MgSO_4$, 250 mg de PSA (amina primaria-secundaria), 250 mg de carbón grafitizado (GCB) y 250 mg de C_{18} . El segundo tubo fue agitado durante 30 s y después se centrifugó a 3700 rpm durante 1 min. Un volumen de 3 mL de dicho extracto fue evaporado en un tubo de ensayo de vidrio hasta casi sequedad bajo una corriente de nitrógeno, para posteriormente ser reconstituido con 0.2 mL de metanol (MeOH) y 0.8 mL de agua ultrapura (milli Q). De este modo se obtuvo un extracto que contenía el equivalente de 1 g de muestra por mililitro de extracto. Finalmente, el extracto fue filtrado a través de un filtro de 0.45 μm y transferido a un vial para su análisis mediante HPLC-MS. En la **figura IV.5.1.** se puede ver un esquema de este procedimiento. Al objeto de conseguir muestras más limpias, los extractos fueron diluidos 1:2 con agua ultrapura antes de su análisis (500 μL extracto + 500 μL disolución acuosa con un 20% MeOH), de forma que la muestra inyectada en el HPLC-MS contenía un 20% de MeOH y un 80% de agua.

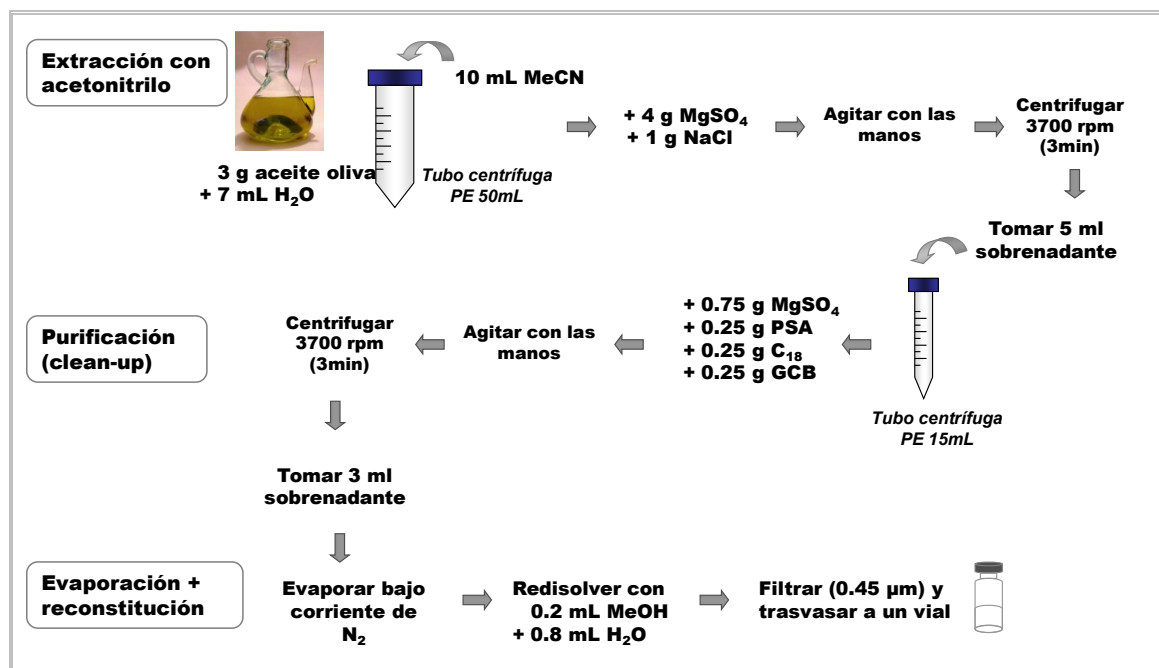


Figura IV.5.1. Esquema del protocolo QuEChERS utilizado para obtener los extractos de aceite.

Protocolo 2.- Procedimiento basado en la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD).

Este proceso se esquematiza en la figura IV.5.2 e implica una extracción líquido-líquido preliminar para eliminar los triglicéridos usando acetonitrilo saturado con éter de petróleo seguida de MSPD con aminopropil como fase sólida y una etapa final de limpieza o *clean-up* con una columna de Florisil [48]. El procedimiento comienza con la pesada de 5 g de aceite de oliva en un vaso de precipitados de 50 mL. Se le añaden 15 mL de éter de petróleo saturado con acetonitrilo (preparado con 500 mL éter de petróleo + 100 mL MeCN) y se transfiere la mezcla a un embudo de decantación de 100 mL. Se añaden 25 mL de acetonitrilo saturado con éter de petróleo (preparado con 500 mL MeCN + 100 mL éter de petróleo) y se agita vigorosamente durante 3 min. Luego tras el proceso de decantación se recoge la fase de acetonitrilo. Justo después se añaden otros 10 mL de acetonitrilo saturado con éter de petróleo al embudo que contiene la fase de éter y se vuelve a realizar la extracción agitando de nuevo durante 3 min. Tras la decantación, la fase de acetonitrilo se recoge en el mismo recipiente donde estaba la fase de acetonitrilo anterior. Entonces se toman 7 mL de este extracto combinado y se transfieren a un tubo de ensayo de vidrio para su reducción de volumen bajo corriente de N₂, hasta que queden 2 mL de extracto aproximadamente. Este volumen de extracto es apropiado para su procesamiento mediante MSPD, de forma que esos 2 mL se transfieren a un mortero de vidrio, donde son homogeneizados con 2 g de aminopropil

(Bondesil-NH₂). Tras el proceso de homogeneización resulta un polvo fino y seco que se transfiere a un cartucho SPE comercial de 12 mL relleno con 2 g de Florisil. La elución se realiza con 2 x 5 mL de acetonitrilo, utilizándose la primera alícuota para limpiar el mortero. El extracto final se recoge en un tubo de ensayo de vidrio y se evapora hasta casi sequedad bajo una corriente de nitrógeno, para posteriormente ser reconstituido con 0.5 mL de metanol (MeOH) y 0.5 mL de agua ultrapura (milli Q). De este modo se obtuvo un extracto que contenía el equivalente de 1 g de muestra por mililitro de extracto. Finalmente, el extracto fue filtrado a través de un filtro de 0.45 μm y transferido a un vial para su análisis mediante HPLC-MS. Al objeto de conseguir muestras más limpias, los extractos fueron diluidos 1:2 con agua ultrapura antes de su análisis (500 μL extracto + 500 μL H₂O), de forma que la muestra inyectada en el HPLC-MS contenía aproximadamente un 25% de MeOH y un 75% de agua.

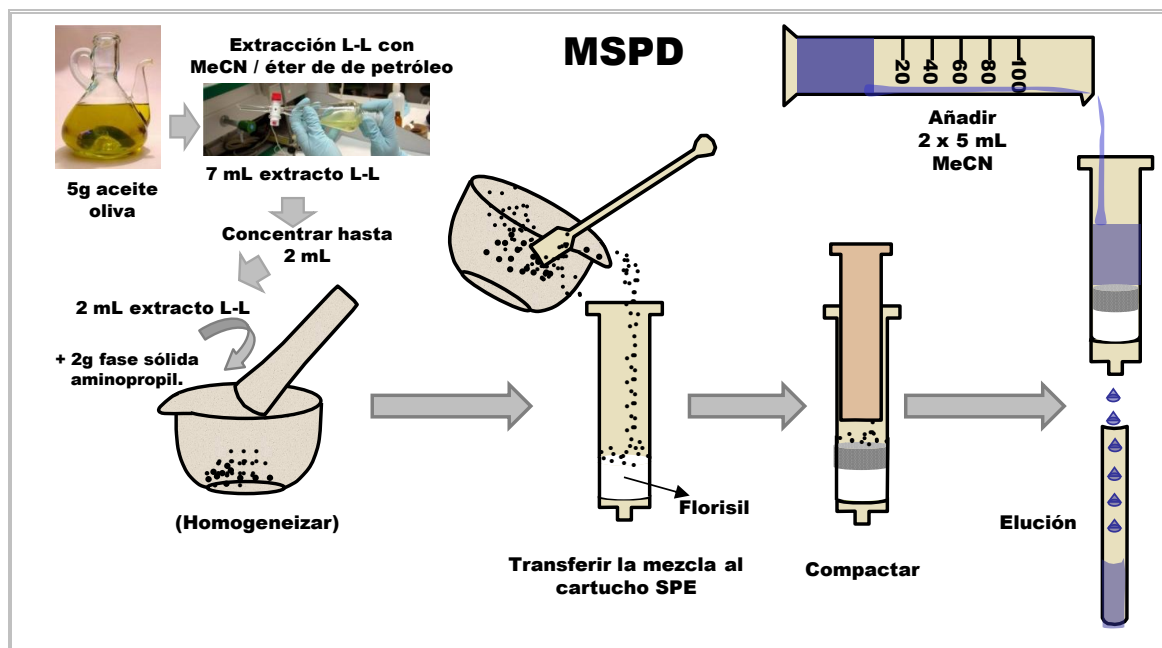


Figura IV.5.2. Esquema del protocolo MSPD utilizado para obtener los extractos de aceite.

Preparación de las curvas de calibración.

Se prepararon patrones de calibración en matriz, de forma que a los extractos de aceite de oliva obtenidos usando los dos métodos de extracción ensayados se le añadieron los volúmenes apropiados de la disolución de trabajo (que contenía la mezcla de plaguicidas) para conseguir el nivel de concentración deseado (rango: 2-2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$). También se analizaron extractos no fortificados.

Fortificación de las muestras para los estudios de recuperación.

Para los estudios de recuperación las muestras fueron fortificadas antes de la extracción. Se tomó una porción representativa de aceite de oliva y se pesaron 200 g que posteriormente fueron fortificados con la cantidad apropiada de la disolución de trabajo para conseguir $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ de la mezcla de plaguicidas en la muestra fortificada. Esta muestra fue agitada durante una hora para su homogeneización; acto seguido se dejó incubar a temperatura ambiente durante seis horas para que el disolvente se evaporase. Después se realizaron 6 extracciones siguiendo el *protocolo 1 (QuEChERS)* y otras 6 siguiendo el *protocolo 2 (MSPD)*.

También se realizaron estudios de recuperación a un nivel de concentración de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ y se procedió de manera análoga a la descrita para el nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Teniendo en cuenta la etapa de dilución que se lleva a cabo al final de la etapa de tratamiento de muestra, independientemente del método de extracción utilizado, los extractos inyectados en el instrumento LC-MS/MS contenían, respectivamente, 5 y $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de los plaguicidas estudiados.

IV.5.2.3. Parámetros instrumentales

En este estudio se utilizó el equipo HPLC-TOFMS Agilent MSD TOF descrito en la sección III. Los valores óptimos elegidos para los parámetros instrumentales fueron los siguientes:

a) *Condiciones cromatográficas:*

- Fases móviles ESI(+): A = H_2O (0.1% HCOOH , v/v); B = Acetonitrilo.
- Fases móviles ESI(-): A = H_2O (HCOONH_4 , 10 mM); B = Acetonitrilo.
- Gradiente: durante 1 min se mantiene constante un 10% de B, seguido de un gradiente lineal hasta el 100% B a los 11 min. Entonces, se mantiene constante (100% B) durante 6 min.
- Velocidad de flujo: 0.5 mL min^{-1} .
- Columna: C_{18} , 50 mm \times 4.6 mm i.d. y $1.8 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula (Zorbax Rapid Resolution Eclipse XDB-C18, Agilent).

- Volumen de inyección: 20 μL .

b) *Espectrómetro de masas:*

- | | |
|---|---|
| - Fuente: ESI(+) | - Fuente: ESI(-) |
| - Voltaje del capilar: 4000 V | - Voltaje del capilar: 2500 V |
| - Temperatura de la fuente: 325 °C | - Temperatura de la fuente: 325 °C |
| - Presión del gas de secado (N_2): 40 psig | - Presión del gas de secado (N_2): 40 psig |
| - Flujo del gas de secado: 9 L min^{-1} | - Flujo del gas de secado: 9 L min^{-1} |
| - V. fragmentación en la fuente: 190 V | - V. fragmentación en la fuente: 190 V |
| - Rango de masas: 50 – 1000 m/z | - Rango de masas: 50 – 1000 m/z |
| - Resolución: 9700 \pm 500 | - Resolución: 9700 \pm 500 |

Al objeto de comparar la limpieza de los extractos, también se realizaron análisis mediante la técnica de GC-MS utilizando el GC-MS Varian 300MS descrito en la sección III. Los valores óptimos elegidos para los parámetros instrumentales fueron los siguientes:

a) *Condiciones cromatográficas:*

- Gradiente: durante 2 min se mantiene constante una temperatura de 70°C. Transcurrido ese tiempo, aumenta hasta 180 °C a 10 °C/min (5 min) y luego aumenta hasta 260 °C a 6 °C/min. Finalmente, aumenta hasta 300 °C a 4 °C/min (2 min).
- Velocidad de flujo de He: 1.0 mL min^{-1} .
- Columna: 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano. 30 m \times 0.25 mm d.i. y 0.25 μm de espesor de película (Varian FactorFour VF-5ms).
- Volumen de inyección: 4 μL . (splitless)
- Liner: fritado, desactivado, siltek, 54 mm x 5 mm d.e. x 3.4 mm d.i. (Varian Inc.)
- Temperatura del inyector: 280 °C en el momento de la inyección, manteniéndose constante durante 2 min. Luego aumentaba a 40 °C/min hasta 325 °C.

b) *Espectrómetro de masas:*

- Temperatura de la línea de transferencia: 280 °C
- Fuente: EI (+)
- Energía de los electrones generados en la fuente: 70 eV
- Temperatura de la fuente: 250 °C
- Corriente del filamento: 50 μ A
- Tiempo de retardo para el encendido del filamento y el detector: 6.4 min
- Temperatura del analizador: 40 °C
- Voltaje del multiplicador: 1200 V
- Modo de adquisición: full scan.

IV.5.3. Resultados y discusión

IV.5.3.1. Identificación y cuantificación de las especies de interés mediante LC-TOFMS.

El método cromatográfico utilizado en este trabajo fue adaptado de un trabajo anterior [206]. El uso de una columna de resolución rápida, más corta y con menor tamaño de partícula (1.8 μ m) que las columnas analíticas estándar, conduce a tiempos de análisis más cortos (de 35-45 min a 15 min). El gradiente cromatográfico de 15 min proporcionaba suficiente resolución para la mayoría de las especies, obteniendo picos estrechos con una anchura media de 8 s, frente a los 20 – 40 s de anchura media (a la altura de la línea base) obtenidos con las columnas analíticas convencionales. Por tanto, la anchura media de pico se reduce a la mitad a la altura de la línea base, lo que implica un aumento en la relación S/N a bajas concentraciones, mejorando los límites de detección. Además, el consumo de disolvente orgánico (acetonitrilo) se reduce en un 60%, siendo el método más respetuoso con el medio ambiente.

Se establecieron condiciones estándar para la ionización por electrospray de los compuestos de interés, por lo que se usaron valores estándar para la temperatura de la fuente, presión y flujo del gas de secado (nitrógeno), y voltaje del capilar. En cambio, el voltaje de fragmentación en la fuente (*fragmentor voltage*) puede tener una gran influencia en la abundancia relativa de las moléculas protonadas, como ha sido descrito anteriormente [202]. Para este parámetro se eligió un valor medio de 190 V, como compromiso entre la sensibilidad de la molécula

protonada para la cuantificación y la información adicional que proporcionan los fragmentos a efectos de confirmación.

La identificación de los compuestos de interés se basó en el tiempo de retención y la medida de la masa exacta del principal ión característico. Para la identificación y cuantificación de los analitos se utilizaron los cromatogramas extraídos (EICs) con una ventana de masa estrecha. A modo de ejemplo, en la **figura IV.5.1** se muestran los cromatogramas extraídos para algunos de los analitos estudiados. Los EICs de cada analito se extrajeron con una ventana de masa de ± 5 mDa, al objeto de mejorar la sensibilidad y la relación señal-ruido (S/N), y para reducir la posibilidad de encontrar falsos positivos. La molécula protonada ($[M+H]^+$) se utilizó para la confirmación y cuantificación en la mayoría de los casos, a excepción de aquellos compuestos que presentaban aductos de sodio ($[M+Na]^+$) más intensos (aldicarb, butocarboxim, oxamyl, methomyl, metolcarb, methidathion, propargite) en las condiciones seleccionadas. En el caso de bromuconazole y dimethomorph los patrones contenían dos isómeros, por lo que para las curvas de calibración de estos compuestos se utilizó la suma de las dos áreas.

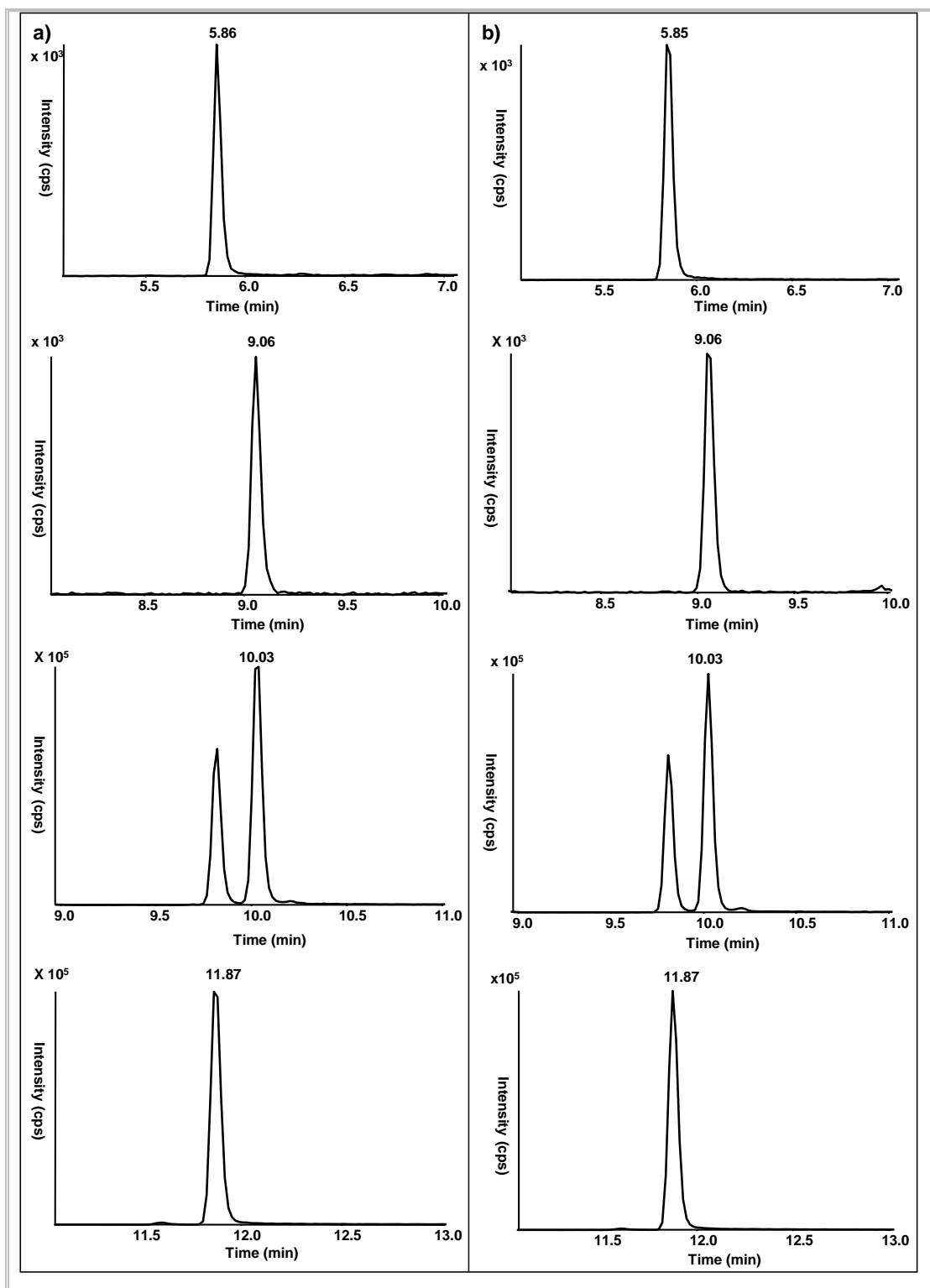


Figura IV.5.3. a) Cromatograma de ión extraído (ventana de masa: 10 mDa) para las moléculas protonadas de pirimicarb (5.81 min), diuron (9.06 min), terbuthylazine (10.00 min) y diazinon (11.87 min), obtenidos a partir de una muestra de aceite de oliva fortificada con los plaguicidas estudiados ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$, QuEChERS). b) Cromatograma de ión extraído (ventana de masa: 10 mDa) para las moléculas protonadas de pirimicarb (5.81 min), diuron (9.06 min), terbuthylazine (10.00 min) y diazinon (11.87 min), obtenidos a partir de una muestra de aceite de oliva fortificada con los plaguicidas estudiados ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$, MSPD).

IV.5.3.2. Evaluación de los procedimientos de extracción seleccionados.

Los protocolos de tratamiento de muestra seleccionados, (a) extracción líquido-líquido con acetonitrilo seguida de una etapa de limpieza o *clean-up* mediante extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS modificado para matrices grasas) [46], y (b) extracción líquido-líquido con acetonitrilo saturado con éter de petróleo seguida de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) [48], han sido utilizados para el análisis de residuo de plaguicidas en aceite de oliva, aunque la validación de estos estudios previos estaba limitada, respectivamente a 8 y 5 compuestos. En este estudio se evalúan y comparan por primera vez ambas metodologías para un análisis multi-residuo de amplio alcance (incluyendo más de 100 compuestos). El estudio que se presenta aquí cubre alrededor de un centenar de plaguicidas de diferentes clases en una matriz tan compleja como el aceite de oliva virgen extra. La SPE dispersiva propuesta para la etapa de limpieza o *clean-up* del método QuEChERS difiere del protocolo “clásico” utilizado para frutas y vegetales [40]. Debido a la composición grasa de la matriz, es necesario el uso de fases sólidas adicionales al sulfato de magnesio anhidro y la amina primaria-secundaria (PSA). Por esto motivo, el método incluye la adición de carbón grafitizado (GCB) y sílice-C₁₈ [46]. En el caso del método basado en MSPD, es necesaria una extracción líquido-líquido preliminar para obtener extractos de aceite de oliva más limpios [48].

La limpieza de los extractos obtenida con los dos métodos de tratamiento de muestra se estudió mediante la comparación de los cromatogramas de iones totales (TICs) obtenidos para la misma muestra de aceite de oliva con cada uno de los métodos ensayados, tanto mediante LC-MS con ionización por electrospray en modos positivo y negativo, como mediante GC-MS con ionización por impacto electrónico (modo positivo). En la **figura IV.5.4** se muestran los TICs obtenidos mediante LC-MS y GC-MS en modo full scan para la misma muestra de aceite oliva extraída con cada uno de los protocolos estudiados. En un trabajo previo [48] se encontró que los extractos MSPD eran claramente más limpios que los extractos obtenidos mediante GPC.

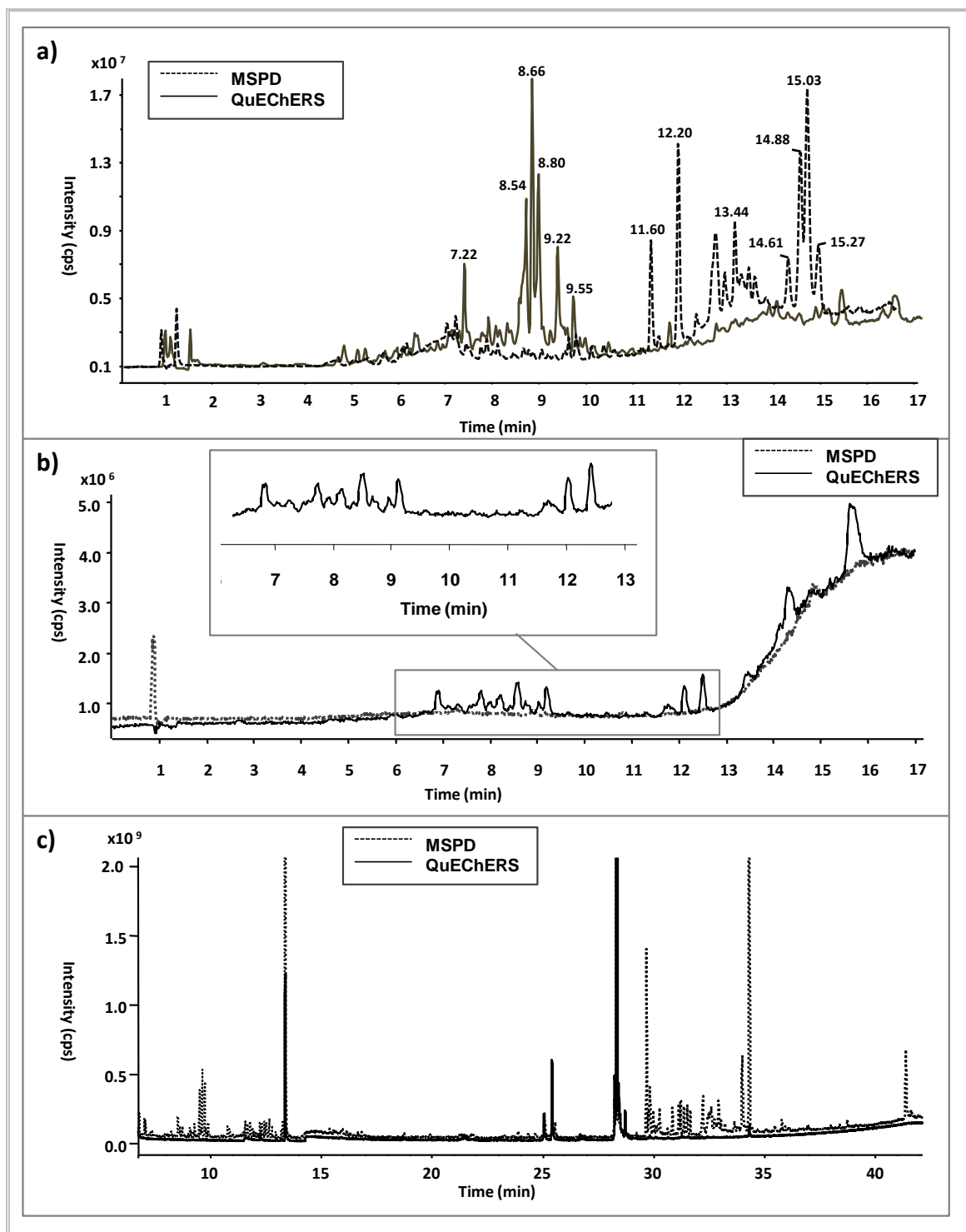


Figura IV.5.4. Comparación de la limpieza de los extractos usando los cromatogramas de iones totales (TICs) obtenidos mediante análisis por LC-ESI MS en modo *full scan* (en polaridad positiva y negativa) y mediante análisis por GC-MS (*Full scan*, ionización por impacto electrónico (EI)). La señal correspondiente al extracto obtenido mediante el procedimiento QuEChERS aparece representada por una línea continua, mientras que la línea discontinua corresponde al extracto obtenido mediante el procedimiento MSPD. **a)** TICs de los extractos de aceite de oliva analizados mediante LC-ESI(+) TOFMS. **b)** TICs de los extractos de aceite de oliva analizados mediante LC-ESI(-) TOFMS. **c)** TICs de los extractos de aceite de oliva analizados mediante GC-EI-MS.

En la comparación de los TICs obtenidos mediante LC-MS(+) se observa que ambos métodos co-extraen otras especies junto con los analitos de interés (Fig. IV.5.4.a). Como puede verse, el método QuEChERS (línea continua) puede co-extraer especies moderadamente polares presentes en el aceite de oliva que podrían interferir en la determinación, mientras que el método MSPD (línea discontinua) co-extrae principalmente especies interferentes no polares (las cuales aparecen al final del cromatograma, eluyendo con altos porcentajes de disolvente orgánico). Estas especies interferentes pueden competir por la ionización en la fuente ESI con los analitos, originando supresión de la ionización (efecto matriz), de tal forma que la señal de los analitos en los patrones en matriz disminuirá con respecto a la señal de los mismos en los patrones preparados en disolvente. Por ejemplo, en torno a los 8 minutos de análisis cromatográfico los plaguicidas muestran un mayor efecto matriz cuando se usa el método de extracción QuEChERS (ej.: se obtuvieron relaciones de pendientes 0.57, 0.71 y 0.77 para bendiocarb, carbofuran y chlorotoluron, respectivamente) que cuando se utiliza el método de extracción MSPD (ej.: se obtuvieron relaciones de pendientes 0.82, 0.97 y 0.92 para bendiocarb, carbofuran y chlorotoluron, respectivamente). Para la mayoría de los plaguicidas estudiados se observa un efecto matriz inferior o igual a $\pm 20\%$ (en términos de aumento o disminución de la señal), aunque en general se observa un menor efecto matriz cuando se utiliza el método de extracción MSPD (ver apartado IV.5.3.3).

En la comparación de los TICs obtenidos mediante LC-MS(-) se observan resultados similares en cuanto a limpieza de los extractos (Fig. IV.5.4.b). Utilizando el método QuEChERS (línea continua) se extraían principalmente componentes de la matriz medianamente polares, observándose picos cromatográficos en el tiempo comprendido entre los 6.5 y 9.5 min de análisis. Por el contrario, no se observan picos cromatográficos significativos cuando se utiliza el método MSPD para la extracción de la misma muestra. Teniendo en cuenta los cromatogramas obtenidos en modo de adquisición full scan tanto en modo positivo como en modo negativo, podemos concluir que cualquiera de los dos métodos de extracción ensayados es potencialmente apropiado para el análisis multi-residuo de plaguicidas en aceite de oliva mediante LC-MS.

Para hacer una evaluación más exhaustiva de los extractos, éstos fueron analizados también mediante GC-MS con ionización por impacto electrónico en modo full scan (**Fig. IV.5.4.c**). En esta ocasión, los extractos fueron reconstituidos con una mezcla de acetato de etilo/hexano

(20:80). En términos generales, los cromatogramas obtenidos tanto para el extracto del método QuEChERS como para el extracto del método MSPD eran relativamente limpios y adecuados para el análisis mediante GC-MS. No obstante, al contrario de lo que sucedía en el análisis LC-ESI-MS, los resultados del análisis mediante GC-MS mostraron un TIC más sucio para MSPD (línea discontinua), con la presencia de picos cromatográficos al final del análisis.

Para evaluar la eficiencia de cada uno de los procedimientos de extracción propuestos se llevaron a cabo estudios de recuperación a dos niveles de concentración: 10 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Los resultados se detallan en la **tabla IV.5.1** y demuestran un rendimiento satisfactorio para un amplio rango de plaguicidas con diferentes propiedades fisicoquímicas. Para los plaguicidas con estructuras planas, como thiabendazole y pyrimethanil, no se obtuvieron recuperaciones satisfactorias con el método QuEChERS, probablemente porque debido a sus estructuras planas quedaron retenidos en el carbón grafitizado utilizado en la etapa de limpieza o *clean-up* de los extractos, como fue publicado por Cunha y col. [46] para otros compuestos de similares características. Sin embargo, hay un gran número de plaguicidas para los que se obtienen buenas recuperaciones con el método QuEChERS, incluso para algunos compuestos que presentan pobres recuperaciones con el método MSPD (13 de 105). En cambio, en el caso de diuron, éste no fue completamente retenido en el carbón grafitizado, obteniéndose una recuperación media del 50% con el método QuEChERS, mientras que era totalmente recuperado con el método MSPD.

En general, se observan mejores porcentajes de recuperación cuando se utiliza el protocolo QuEChERS para la extracción de los plaguicidas de interés. Como se puede ver en la **figura IV.5.5**, en la que se incluyen los resultados derivados de los estudios de recuperación para los dos métodos de extracción ensayados y a los dos niveles de fortificación estudiados, se obtienen mejores recuperaciones cuando se utiliza el método QuEChERS. Considerando un valor promedio entre los dos niveles de concentración estudiados, el 72% de los analitos se recuperan entre un 70-130% con el método QuEChERS, mientras que usando el procedimiento basado en la MSPD el porcentaje de analitos recuperados en el mismo rango fue del 57%. Teniendo en cuenta que la mayoría de los plaguicidas estudiados son representativos de alguna familia de compuestos con propiedades fisicoquímicas no muy similares, podemos concluir que ambos tratamientos de muestra se pueden usar para el análisis multi-residuo de

un gran número de plaguicidas en aceite de oliva, pudiendo cubrir un número de compuestos aún mayor que el presentado en este trabajo.

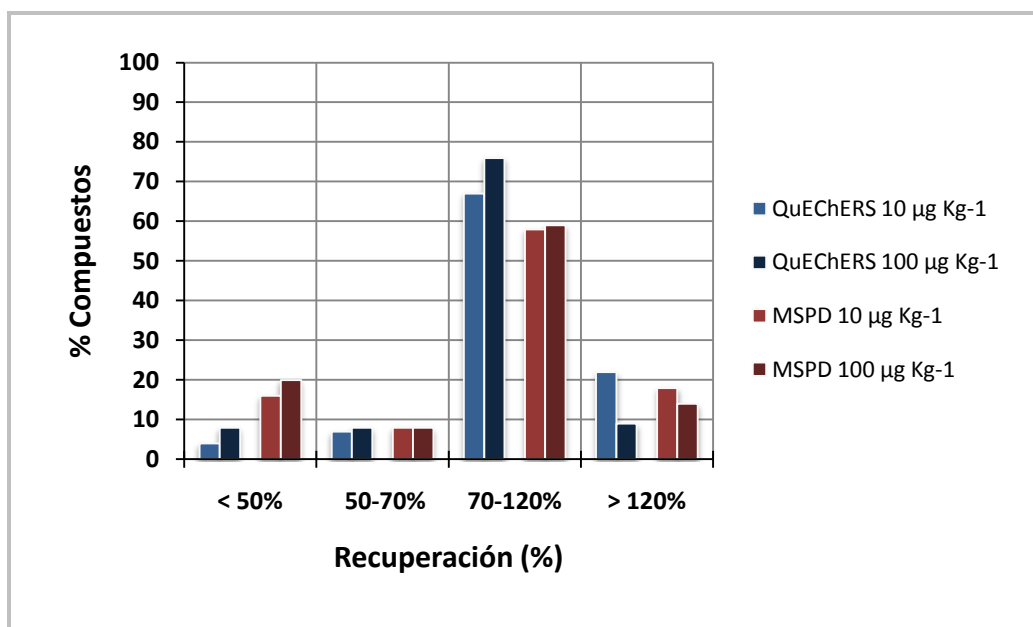


Figura IV.5.5. Distribución de los porcentajes de recuperación medios de los plaguicidas estudiados en muestras de aceite de oliva fortificadas, utilizando los dos métodos de tratamiento de muestra ensayados a dos niveles de concentración (10 y 100 µg kg⁻¹).

Paralelamente al estudio de recuperación se llevó a cabo un estudio de precisión de las metodologías propuestas (tratamiento de muestra + LC-TOFMS). La desviación estándar relativa (n=6) obtenida para ambos métodos y a los dos niveles de concentración estudiados se muestra tanto en la **tabla IV.5.1** como en la **figura IV.5.6**. Como se puede ver, para el nivel más alto de concentración se obtienen buenos resultados de precisión con ambos métodos de preparación de muestra (más del 95% de los compuestos con RSD% ≤ 10%). Sin embargo, al nivel más bajo de concentración (10 µg kg⁻¹) las RSD% obtenidas con el método MSPD son significativamente mayores, obteniéndose desviaciones comprendidas entre el 10 y el 15% para más del 50% de los compuesto estudiados. También se puede observar (a ambos niveles de concentración) que las desviaciones estándar de los estudios de recuperación son menores cuando se emplea el método QuEChERS. Nótese que los coeficientes de variación fueron menores para el nivel de concentración más alto ensayado con ambos métodos de preparación de muestra.

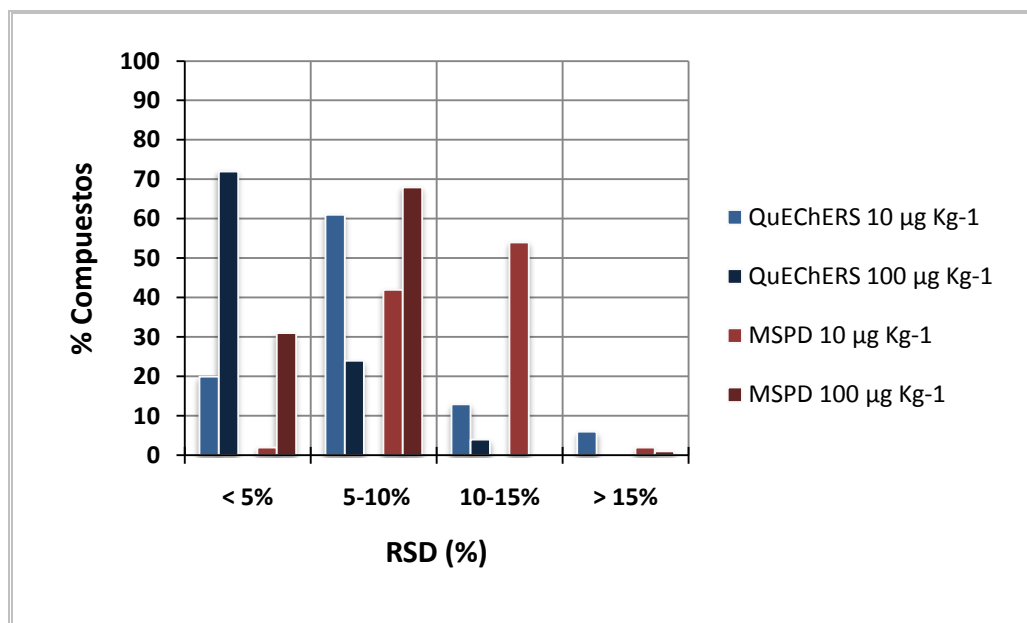


Figura IV.5.6. Estudio de precisión. Distribución de los valores medios de la desviación estándar relativa (RSD %) para los 104 plaguicidas estudiados en muestras de aceite de oliva fortificadas, utilizando los dos métodos de tratamiento de muestra ensayados a dos niveles de concentración (10 y 100 µg kg⁻¹).

Tabla IV.5.1. Parámetros identificativos de las especies de interés y MRLs europeos establecidos en aceite de oliva y aceituna. También se incluyen los estudios de recuperación y el efecto matriz obtenido con las dos metodologías de tratamiento de muestra propuestas. La primera línea en el estudio de recuperación corresponde a un nivel de concentración de 10 µg kg⁻¹ y la segunda línea corresponde a un nivel de concentración de 100 µg kg⁻¹.

| | Plaguicida | Grupo ^(b) | t _R (min) | m/z masa exacta | Formula ion [M+H] ⁺ / [M+Na] ⁺ | MRL EU ^(b) (µg kg ⁻¹) | Efecto matriz QuEChERS (Δ%) ^(d) | Efecto matriz MSPD (Δ%) ^(d) | QuEChERS Rec.% (RSD%) | MSPD Rec.% (RSD%) |
|----|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------|--|--|--|--|----------------------------------|---------------------------------|
| 1 | Thiocyclam | 2 | 1.18 | 182.0126 | C5H12NS3 | 20 (*) | 2.74 (+174%) | 0.96 (-4%) | 98.44 (15.66) 71.16 (5.59) | 59.70 (5.23) 55.30 (8.70) |
| 2 | Acephate | 3,4 | 1.18 | 184.0191 | C4H11N1O3PS1 | | 2.12 (+112%) | 1.06 (+6%) | < LOD 94.43 (4.27) | < LOQ 53.81 (9.32) |
| 3 | Methamidophos | 1,3,4 | 1.18 | 142.0086 | C2H9NO2PS | | 2.77(+177%) | 1.03 (+3%) | 126.88 (19.60) 105.61 (11.84) | < LOQ 20.46 (8.76) |
| 4 | Omethoate | 4 | 1.23 | 214.0297 | C5H13NO4PS | | 3.05 (+205%) | 1.19 (+19%) | 114.08 (13.06) 115.89 (4.20) | < LOD -- |
| 5 | Thiabendazole | 1,3 | 4.50 | 202.0433 | C10H8N3S | | 0.95 (-5%) | 0.35 (-65%) | -- -- | LOD 96.26 (18.54) |
| 6 | Oxamyl | 1,3 | 4.74 | 242.0569 | C7H13N3O3SNa | 10 (*) | 1.21 (+21%) | 0.66 (-34%) | 85.48 (7.13) 119.24 (4.06) | < LOD <LOQ |
| 7 | Methomyl | 3 | 4.96 | 185.0355 | C5H10N2O2NaS | | 0.95 (-5%) | 0.73 (-27%) | LOD 141.12 (2.52) | < LOD < LOQ |
| 8 | Thiamethoxam | 1 | 5.78 | 292.0265 | C8H11ClN5O3S | | 0.92 (-8%) | 0.83 (-17%) | LOD 106.19 (4.41) | LOD 147.89 (4.22) |
| 9 | Pirimicarb | 1,3,4 | 5.85 | 239.1502 | C11H19N4O2 | 1000 (**) | 1.00 (0%) | 0.95 (-5%) | 68.06 (8.92) 59.14 (2.65) | 148.40 (2.51) 125.28 (3.50) |
| 10 | Methiocarb sulfoxide | 3 | 6.06 | 242.0845 | C11H16NO3S | | 0.79 (-21%) | 0.42 (-58%) | < LOQ 106.12 (13.23) | -- -- |
| 11 | Metamitron | 4 | 6.21 | 203.0927 | C10H11N4O | | 1.02 (+2%) | 0.94 (-6%) | 94.28 (8.54) 81.47 (3.80) | < LOQ 122.89 (4.72) |
| 12 | Fenuron | 4 | 6.39 | 165.1022 | C9H13N2O | | 0.90 (-10%) | 0.92 (-8%) | < LOD 111.87 (3.29) | < LOQ 150.20 (2.91) |
| 13 | Chloridazon | 1 | 6.50 | 222.0428 | C10H9ClN3O | 500 | 0.88 (-12%) | 0.91 (-9%) | 119.25 (27.57) 111.49 (2.58) | 141.20 (11.96) 137.36 (4.25) |
| 14 | Imidacloprid | 3 | 6.57 | 256.0595 | C9H11ClN5O2 | | 1.23 (+23%) | 0.91 (-9%) | 109.37 (15.31) 129.42 (4.27) | 143.12 (3.46) 133.39 (5.04) |

| | Plaguicida | Grupo ^(a) | t _R (min) | m/z masa exacta | Formula ion [M+H] ⁺ / [M+Na] ⁺ | MRL EU (^b) (µg kg ⁻¹) | Efecto matriz QuEChERS (Δ%) ^(d) | Efecto matriz MSPD (Δ%) ^(d) | QuEChERS Rec.% (RSD%) | MSPD Rec.% (RSD%) |
|----|---------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|--|--|---|---|---------------------------------|---------------------------------|
| 15 | Dimethoate | 1,3 | 6.72 | 230.0069 | C5H13NO3PS2 | 2000 (**) | 1.09 (+9%) | 1.05 (+5%) | < LOD 143.15 (6.33) | < LOQ 146.51 (6.73) |
| 16 | Acetamiprid | 1,3 | 6.83 | 223.0745 | C10H12ClN4 | | 0.89 (-11%) | 0.92 (-8%) | < LOD 123.96 (5.36) | 159.24 (7.75) 160.38 (4.20) |
| 17 | Butocarboxim | 4 | 7.35 | 213.0668 | C7H14N2O2SNa | | 0.38 (-62%) | 0.52 (-48%) | < LOD 95.37 (6.13) | LOD 149.06 (2.19) |
| 18 | Thiacloprid | 1 | 7.49 | 253.0309 | C10H10ClN4S | 20 (*) | 0.98 (-2%) | 0.92 (-8%) | 137.02 (11.81) 123.17 (2.11) | 148.59 (3.35) 133.33 (1.99) |
| 19 | Imazalil | 1,3 | 7.52 | 297.0555 | C14H15Cl2N2O | | 0.99 (-1%) | 0.93 (-7%) | 119.31 (8.67) 87.65 (2.13) | 57.81 (3.00) 48.93 (6.34) |
| 20 | Aldicarb | 3 | 7.63 | 191.0848 | C7H15N2O2S | 20 (*) (**) | 0.56 (-44%) | 0.58 (-42%) | 101.31 (8.47) 125.95 (3.96) | 118.89 (10.73) 156.25 (4.34) |
| 21 | Bromacil | 4 | 7.80 | 261.0233 | C9H14BrN2O2 | | 0.86 (-14%) | 0.89 (-11%) | < LOD 133.89 (9.78) | < LOQ <LOQ |
| 22 | Oxadixyl | 4 | 7.93 | 279.1339 | C14H19N2O4 | | 1.03 (+3%) | 0.98 (-2%) | LOD 122.57 (5.36) | LOD 137.05 (3.62) |
| 23 | Monuron | 4 | 7.93 | 199.0632 | C9H12ClN2O | | 1.1 (+10%) | 1.05 (+5%) | LOD 87.07 (1.09) | LOD 136.09 (3.16) |
| 24 | Cymoxanil | 4 | 7.93 | 199.0825 | C7H11N4O3 | | 1.05 (+5%) | 1.04 (+4%) | < LOQ 90.64 (4.20) | 110.34 (5.00) 138.78 (2.31) |
| 25 | Simazine | 4 | 7.96 | 202.0853 | C7H13N5Cl | 100 | 1.01 (+1%) | 0.82 (-18%) | 92.33 (2.98) 82.34 (2.54) | 94.17 (13.01) 124.40 (5.72) |
| 26 | Metolcarb | 4 | 8.06 | 188.0681 | C9H11NO2Na | | 0.66 (-34%) | 0.83 (-17%) | < LOD 124.18 (5.03) | < LOQ 103.56 (8.53) |
| 27 | Dichlorvos | 3,4 | 8.11 | 220.9531 | C4H8Cl2O4P | | 1.08 (+8%) | 1.06 (+6%) | 150.55 (2.76) 125.74 (4.73) | -- -- |
| 28 | Desethyl terbutylazine | 4 | 8.12 | 202.0853 | C7H13ClN5 | | 1.15 (+15%) | 1.12 (+12%) | 144.70 (2.74) 123.06 (2.22) | 129.28 (1.90) 128.08 (7.95) |
| 29 | Pyrimethanil | 1,3 | 8.47 | 200.1182 | C12H14N3 | 50 (*) | 1.06 (+6%) | 0.99 (-1%) | -- -- | 102.49 (8.98) 94.27 (7.20) |
| 30 | Bendiocarb | 4 | 8.55 | 224.0917 | C11H14NO4 | | 0.57 (-43%) | 0.82 (-18%) | < LOD < LOQ | < LOD 84.11 (9.62) |
| 31 | Carbofuran | 3 | 8.58 | 222.1124 | C12H16NO3 | 20 (*) (**) | 0.71 (-29%) | 0.97 (-3%) | < LOD < LOQ | 111.89 (8.93) 123.56 (5.25) |
| 32 | Ethoxyquin | 4 | 8.60 | 218.1539 | C14H20NO | | 0.66 (-34%) | No lineal | < LOQ 98.73 (12.00) | -- -- |
| 33 | Chlorotoluron | 1 | 8.71 | 213.0789 | C10H14N2OCl | | 0.77 (-23%) | 0.92 (-8%) | 91.29 (12.21) 64.70 (4.89) | 141.26 (2.97) 132.99 (4.68) |
| 34 | Fluometuron | 4 | 8.79 | 233.0896 | C10H12F3N2O | | 0.99 (-1%) | 0.93 (-7%) | 114.25 (2.65) 119.85 (2.01) | 149.97 (2.44) 129.12 (2.05) |
| 35 | Atrazine | 4 | 8.95 | 216.1010 | C8H15ClN5 | | 0.99 (-1%) | 0.88 (-12%) | 117.76 (4.36) 103.60 (2.74) | 136.50 (13.07) 116.07 (5.27) |
| 36 | Isoproturon | 1 | 8.98 | 207.1491 | C12H19N2O | 50 (*) | 1.02 (+2%) | 0.96 (-4%) | 117.21 (10.22) 114.18 (2.37) | 147.62 (3.07) 123.21 (3.16) |
| 37 | Deet | 2 | 9.01 | 192.1382 | C12H18NO | | 1.07 (+7%) | 0.89 (-11%) | 157.44 (6.64) 129.49 (1.19) | 137.08 (4.04) 116.50 (6.54) |
| 38 | Metalaxyl | 3 | 9.02 | 280.1543 | C15H22NO4 | 50 (*) (**) | 1.09 (+9%) | 0.88 (-12%) | 100.10 (10.33) 85.10 (2.97) | 83.16 (3.38) 80.98 (5.65) |
| 39 | Diuron | 4 | 9.07 | 233.0242 | C9H11Cl2N2O | 200 (**) | 1.13 (+13%) | 1.14 (+14%) | 54.23 (9.82) 41.21 (4.53) | 123.67 (4.98) 121.02 (4.03) |
| 40 | Difenoxuron | 4 | 9.08 | 287.1390 | C16H19N2O3 | | 1.09 (+9%) | 0.95 (-5%) | 112.52 (9.68) 88.26 (3.63) | 130.36 (7.18) 125.30 (1.26) |
| 41 | Monolinuron | 4 | 9.12 | 215.0581 | C9H12ClN2O2 | | 1.03 (+3%) | 1.08 (+8%) | < LOQ 103.51 (4.49) | < LOQ 135.50 (4.24) |
| 42 | Isoprocab | 2 | 9.32 | 194.1175 | C11H16NO2 | | 0.86 (-14%) | 0.81 (-19%) | < LOD 131.89 (5.88) | LOD 122.18 (2.11) |
| 43 | Metobromuron | 4 | 9.37 | 259.0076 | C9H12BrN2O2 | | 1.08 (+8%) | 0.98 (-2%) | 123.48 (1.33) 106.18 (5.14) | 135.51 (5.42) 125.45 (3.91) |
| 44 | Flazasulfuron | 1 | 9.49 | 408.0584 | C13H13F3N5O5S | 10 (*) | 1.06 (+6%) | 1.13 (+13%) | 80.63 (3.82) 75.36 (2.88) | -- -- |
| 45 | Dimethomorph | 1,3 | 9.53 y 9.69 | 388.1310 | C21H23ClNO4 | | 1.07 (+7%) | 1.15 (+15%) | 86.72 (4.25) 129.13 (2.27) | 86.38 (4.97) 118.57 (2.83) |
| 46 | Bupirimate | 3 | 9.58 | 317.1641 | C13H25N4O3S | | 1.04 (+4%) | 0.96 (-4%) | 115.75 (7.48) 84.51 (3.50) | 109.36 (8.47) 88.91 (9.12) |
| 47 | Prochloraz | 3 | 9.68 | 376.0380 | C15H17Cl3N3O2 | 50 (*) (**) | 1.17 (+17%) | 1.17 (+17%) | 72.09 (18.85) 43.62 (3.52) | 70.47 (6.82) 70.10 (7.79) |
| 48 | Triadimenol | 3,4 | 9.70 | 296.1160 | C14H19ClN3O2 | 100(*) (**) | 1.39 (+39%) | 1.19 (+19%) | < LOQ 126.45 (3.25) | LOD 110.63 (8.79) |
| 49 | Propazine | 4 | 9.82 | 230.1167 | C9H17ClN5 | | 1.01 (+1%) | 0.93 (-7%) | 143.37 (2.18) 112.95 (1.79) | 122.31 (3.33) 108.84 (7.40) |

| | Plaguicida | Grupo ^(a) | t _R (min) | m/z masa exacta | Formula ion [M+H] ⁺ / [M+Na] ⁺ | MRL EU (^b) (µg kg ⁻¹) | Efecto matriz QuEChERS (Δ%) ^(d) | Efecto matriz MSPD (Δ%) ^(d) | QuEChERS Rec.% (RSD%) | MSPD Rec.% (RSD%) |
|----|-----------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|--|--|---|---|---------------------------------|---------------------------------|
| 50 | Ethiprole | 2 | 9.83 | 396.9898 | C13H10Cl2F3N4OS | | 1.09 (+9%) | 0.90 (-10%) | 179.61 (3.41) 139.60 (2.83) | 116.45 (8.07) 112.07 (7.03) |
| 51 | Isocarbophos | 2 | 9.88 | 312.0429 | C11H16NO4PSNa | | 0.25 (-75%) | 0.48 (-52%) | 125.60 (7.24) 142.62 (1.95) | 122.46 (4.19) 127.06 (1.49) |
| 52 | Cyproconazole | 4 | 9.93 | 292.1211 | C15H19ClN3O | | 1.23 (+23%) | 1.19 (+19%) | 100.43 (4.53) 132.62 (2.03) | 81.06 (5.93) 109.04 (9.85) |
| 53 | Fenobucarb | 2 | 9.99 | 208.1332 | C12H18NO2 | | 1.02 (+2%) | 0.89 (-11%) | LOD 129.84 (2.38) | < LOQ 123.91 (3.69) |
| 54 | Terbutylazine | 4 | 10.03 | 230.1167 | C9H17ClN5 | 50 (*) | 1.14 (+14%) | 1.08 (+8%) | 122.66 (5.19) 106.79 (2.24) | 91.20 (8.06) 96.21 (8.07) |
| 55 | Methidathion | 3 | 10.11 | 324.9510 | C6H11N2O4NaPS3 | 1000 (^c) | 0.32 (-68%) | 0.64 (-36%) | 117.85 (3.48) 126.61 (5.27) | 125.16 (5.04) 112.33 (4.38) |
| 56 | Diethofencarb | 4 | 10.13 | 268.1543 | C14H22NO4 | | 0.98 (-2%) | 0.85 (-15%) | LOD 67.71 (3.48) | LOD 114.29 (5.96) |
| 57 | Linuron | 1,3 | 10.14 | 249.0192 | C9H11Cl2N2O2 | 50 (*) | 0.90 (-10%) | 0.85 (-15%) | 97.81 (7.91) 67.07 (1.91) | 122.91 (11.80) 111.70 (7.23) |
| 58 | Fenarimol | 1,3,4 | 10.15 | 331.0399 | C17H13Cl2N2O | | 1.18 (+18%) | 1.16 (+16%) | 116.86 (3.61) 115.28 (7.04) | 97.43 (7.40) 81.58 (9.96) |
| 59 | Fenamiphos | 1 | 10.18 | 304.1130 | C13H23NO3PS | 20 (*) (**) | 1.03 (+3%) | 0.91 (-9%) | 106.82 (9.84) 88.21 (1.34) | 110.14 (6.83) 100.14 (9.05) |
| 60 | Propaphos | 2 | 10.18 | 305.0970 | C13H22O4PS | | 1.16 (+16%) | 1.14 (+14%) | < LOQ 86.83 (1.98) | 74.12 (7.51) 91.01 (8.45) |
| 61 | Bromuconazole | 4 | 10.19 y 10.57 | 375.9613 | C13H13BrCl2N3O | | 1.02 (+2%) | 0.96 (-4%) | 139.00 (6.56) 109.32 (2.42) | 135.09 (11.41) 114.61 (1.71) |
| 62 | Myclobutanil | 3,4 | 10.23 | 289.1214 | C15H18ClN4 | 20 (*) | 1.25 (+25%) | 1.12 (+12%) | 136.64 (1.55) 134.30 (2.10) | 133.64 (7.33) 103.59 (9.55) |
| 63 | Promecarb | 4 | 10.26 | 208.1332 | C12H18NO2 | | 1.17 (+17%) | 0.82 (-18%) | < LOQ 129.75 (7.89) | < LOQ 125.23 (3.22) |
| 64 | Azoxystrobin | 1,3 | 10.27 | 404.1240 | C22H18N3O5 | | 1.32 (+32%) | 1.15 (+15%) | 87.84 (7.48) 124.33 (1.88) | 123.17 (7.66) 112.81 (7.28) |
| 65 | Dimethylvinphos | 2 | 10.30 | 330.9455 | C10H11Cl3O4P | | 0.85 (-15%) | 0.93 (-7%) | 116.45 (8.03) 118.80 (1.00) | 108.76 (6.87) 119.51 (3.21) |
| 66 | Chlorbromuron | 4 | 10.32 | 292.9686 | C9H11BrClN2O2 | | 1.03 (+3%) | 0.96 (-4%) | 69.77 (10.57) 51.62 (5.62) | 127.95 (6.17) 107.66 (8.09) |
| 67 | Triadimefon | 3,4 | 10.41 | 294.1003 | C14H17ClN3O2 | 100(*)(**) | 1.18 (+18%) | 1.18 (+18%) | 134.77 (1.35) 128.72 (1.95) | 104.98 (8.85) 103.80 (7.12) |
| 68 | Fenhexamid | 1,3 | 10.45 | 302.0709 | C14H18Cl2N2O2 | 50 (*) | 0.91 (-9%) | 1.00 (0%) | 87.73 (7.47) 73.38 (1.40) | -- -- |
| 69 | Pyridaphenthion | 4 | 10.46 | 341.0719 | C14H18N2O4PS | | 1.13 (+13%) | 1.15 (+15%) | 127.33 (5.12) 102.11 (2.72) | 125.82 (8.99) 103.99 (7.65) |
| 70 | Fluquinconazole | 4 | 10.54 | 376.0162 | C16H9Cl2FN5O | | 0.97 (-3%) | 0.92 (-8%) | 109.33 (6.62) 94.34 (7.81) | 93.14 (9.47) 101.98 (9.72) |
| 71 | Tebuconazole | 3 | 10.55 | 308.1524 | C16H23ClN3O | | 1.07 (+7%) | 0.94 (-6%) | 97.85 (9.22) 82.83 (2.22) | 103.64 (3.99) 103.94 (7.14) |
| 72 | Methoxyfenozide | 1,4 | 10.66 | 369.2172 | C22H29N2O3 | 20 (*) | 1.01 (+1%) | 0.99 (-1%) | 108.74 (3.49) 126.40 (1.86) | 116.41 (5.30) 112.07 (6.40) |
| 73 | Triflumizole | 4 | 10.71 | 346.0928 | C15H16ClF3N3O | | 1.01 (+1%) | 0.91 (-9%) | 92.80 (7.45) 86.67 (2.23) | 40.19 (5.54) 44.44 (5.36) |
| 74 | Penconazole | 3 | 10.83 | 284.0715 | C13H16Cl2N3 | | 1.04 (+4%) | 0.93 (-7%) | 127.01 (3.16) 108.50 (3.41) | 90.47 (8.54) 91.88 (6.86) |
| 75 | Iprodione | 1,3 | 10.83 | 330.0406 | C13H14Cl2N3O3 | | 0.51 (-49%) | 0.87 (-13%) | 110.78 (16.76) 110.49 (8.58) | LOD -- |
| 76 | Chromafenozide | 2 | 10.86 | 395.2329 | C24H31N2O3 | | 0.98 (-2%) | 0.96 (-4%) | 139.83 (3.45) 125.98 (1.65) | 121.13 (9.19) 103.27 (5.21) |
| 77 | Malathion | 3 | 10.86 | 331.0433 | C10H20O6PS2 | | 0.81 (-19%) | 0.97 (-3%) | 106.75 (4.18) 139.64 (2.18) | 86.84 (10.12) 87.04 (3.42) |
| 78 | Fenoxycarb | 4 | 10.88 | 302.1386 | C17H20NO4 | 1000 | 0.97 (-3%) | 0.89 (-11%) | 122.17 (6.19) 111.25 (4.36) | 81.10 (6.11) 82.62 (9.16) |
| 79 | Triazophos | 3 | 10.89 | 314.0722 | C12H17N3O3PS | | 1.02 (+2%) | 0.93 (-7%) | 73.48 (2.98) 62.36 (1.27) | 96.95 (9.01) 96.02 (7.19) |
| 80 | Procymidone | 1,3,4 | 10.99 | 284.0239 | C13H12Cl2N2O2 | 20 (*) | 1.02 (+2%) | 0.95 (-5%) | 141.03 (5.84) 111.13 (4.12) | < LOQ 117.14 (6.67) |
| 81 | Alanycarb | 2 | 11.00 | 400.1359 | C17H26N3O4S2 | | 0.79 (-21%) | 1.03 (+3%) | < LOQ 91.12 (6.34) | 86.56 (6.34) 90.85 (5.51) |
| 82 | Metolachlor | 4 | 11.06 | 284.1411 | C15H23ClNO2 | 50 (*) (**) | 0.93 (-7%) | 0.92 (-8%) | 148.84 (0.54) 119.56 (1.64) | 115.27 (8.24) 111.37 (8.73) |
| 83 | Alachlor | 4 | 11.07 | 270.1255 | C14H21ClNO2 | | 1.03 (+3%) | 0.95 (-5%) | < LOD 113.31 (2.68) | LOD 101.99 (4.36) |
| 84 | Neburon | 4 | 11.16 | 275.0712 | C12H17Cl2N2O | | 1.22 (+22%) | 1.2 (+20%) | 35.78 (7.55) 25.48 (6.11) | 79.46 (9.01) 69.91 (6.64) |

| | Plaguicida | Grupo ^(a) | t _R (min) | m/z masa exacta | Formula ion [M+H] ⁺ / [M+Na] ⁺ | MRL EU (*) (µg kg ⁻¹) | Efecto matriz QuEChERS (Δ%) ^(d) | Efecto matriz MSPD (Δ%) ^(d) | QuEChERS Rec.% (RSD%) | MSPD Rec.% (RSD%) |
|-----|-------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|--|---|---|---|--------------------------------|-------------------------------|
| 85 | Tebufenozide | 4 | 11.16 | 353.2223 | C22H29N2O2 | | 1.25 (+25%) | 1.05 (+5%) | < LOD 119.80 (3.29) | < LOQ 121.07 (9.70) |
| 86 | Edifenphos | 2 | 11.24 | 311.0323 | C14H16O2PS2 | | 0.90 (-10%) | 0.9 (-10%) | 103.19 (4.70) 100.34 (2.63) | 47.60 (9.07) 29.85 (9.36) |
| 87 | Chlorfenvinphos | 3 | 11.25 | 358.9768 | C12H15Cl3O4P | | 1.09 (+9%) | 1.10 (+10%) | 119.88 (4.48) 112.27 (2.73) | 111.60 (6.84) 95.25 (8.59) |
| 88 | Aclonifen | 4 | 11.33 | 265.0374 | C12H10ClN2O3 | | 0.86 (-14%) | 0.79 (-21%) | < LOQ 44.52 (9.81) | < LOQ 53.02 (7.04) |
| 89 | Triflumuron | 4 | 11.38 | 359.0404 | C15H11ClF3N2O3 | | 0.90 (-10%) | 0.80 (-20%) | 63.71 (4.64) 39.27 (7.91) | 63.84 (9.09) 63.01 (6.39) |
| 90 | Kresoxim-methyl | 1,3,4 | 11.38 | 314.1386 | C18H20NO4 | 50 (*) (**) | 0.98 (-2%) | 1.20 (+20%) | < LOD 103.56 (6.08) | LOD 84.31 (2.98) |
| 91 | Difenoconazole | 4 | 11.41 | 406.0719 | C19H18Cl2N3O3 | 100 | 1.01 (+1%) | 0.99 (-1%) | 77.06 (10.83) 64.95 (5.51) | 57.22 (9.33) 46.98 (8.32) |
| 92 | Benalaxyl | 1 | 11.49 | 326.1750 | C20H24NO3 | | 1.03 (+3%) | 0.98 (-2%) | 133.68 (1.70) 109.91 (0.78) | 91.00 (9.54) 93.61 (9.38) |
| 93 | Quinalphos | 4 | 11.50 | 299.0613 | C12H16N2O3PS | | 0.92 (-8%) | 0.94 (-6%) | 54.80 (7.34) 36.54 (5.27) | 73.43 (9.94) 66.32 (8.67) |
| 94 | Parathion | 3 | 11.54 | 292.0403 | C10H15NO5PS | | 0.88 (-12%) | 0.81 (-19%) | < LOQ 90.06 (1.59) | LOD 81.50 (7.36) |
| 95 | Buprofezin | 3 | 11.59 | 306.1634 | C16H24N3OS | 2000 | 1.01 (+1%) | 0.9 (-10%) | 86.07 (5.81) 74.09 (4.30) | -- -- |
| 96 | Anilofos | 2 | 11.61 | 368.0305 | C13H20ClNO3PS2 | | 1.32 (+32%) | 1.15 (+15%) | 138.30 (6.88) 125.42 (9.35) | 86.51 (8.50) 68.82 (3.54) |
| 97 | Pirimiphos-methyl | 1,3,4 | 11.86 | 306.1035 | C11H21N3O3PS | | 0.87 (-13%) | 1.03 (+3%) | 73.21 (5.11) 65.61 (2.66) | 45.37 (6.87) 46.88 (9.88) |
| 98 | Diazinon | 3 | 11.88 | 305.1083 | C12H22N2O3PS | 10 (*) | 0.96 (-4%) | 0.93 (-7%) | 134.74 (3.76) 103.37 (2.80) | 70.84 (9.40) 75.53 (8.53) |
| 99 | Indoxacarb | 1,3,4 | 12.02 | 528.0779 | C22H18ClF3N3O7 | | 1.09 (+9%) | 0.93 (-7%) | 135.96 (1.47) 89.85 (6.17) | -- -- |
| 100 | Trifloxystrobin | 1,3,4 | 12.15 | 409.1369 | C20H20F3N2O4 | | 1.27 (+27%) | 1.09 (+9%) | 77.99 (7.80) 97.72 (3.05) | 28.18 (9.89) 40.32 (6.28) |
| 101 | Fluacrypyrim | 2 | 12.16 | 427.1475 | C20H22F3N2O5 | | 1.13 (+13%) | 1.05 (+5%) | 110.67 (3.80) 114.80 (1.32) | 61.20 (9.23) 60.56 (5.04) |
| 102 | Ethion | 4 | 12.98 | 384.9949 | C9H23O4P2S4 | | 0.77 (-23%) | 0.62 (-38%) | LOD 90.09 (11.54) | -- -- |
| 103 | Hexythiazox | 3 | 13.09 | 353.1085 | C17H22ClN2O2S | 500 | 1.05 (+5%) | 0.98 (-2%) | LOD 78.55 (2.21) | < LOQ -- |
| 104 | Propargite | 3,4 | 13.22 | 373.1444 | C19H26O4NaS | | 0.48 (-52%) | 0.60 (-40%) | < LOD 91.44 (9.42) | < LOD -- |
| 105 | Spiromesifen | 4 | 13.62 | 371.2216 | C23H31O4 | | 0.61 (-39%) | 0.80 (-20%) | LOD 96.27 (2.03) | LOD -- |

(a) Grupo 1. Plaguicidas polares seleccionados del anexo I de la Directiva europea 91/414/CEE.

Grupo 2. Plaguicidas seleccionados con altas implicaciones en la salud. No están autorizados en la Unión Europea pero su uso sí está permitido en otros países.

Grupo 3. Cuarenta plaguicidas polares incluidos en la lista del actual "European Union Proficiency Test (EUPT)" para frutas y vegetales (www.crl-pesticides.eu).

Grupo 4. Cincuenta y cinco compuestos que dieron positivo en los análisis de frutas y vegetales durante el periodo 2000-2007 (www.pesticide-online.com).

(b) MRL establecido para aceitunas de producción en los anexos II y III del Reglamento (CE) 839/2008 (última actualización del Reglamento (CE) 396/2005).

(c) MRL establecido en aceite de oliva para los siguientes plaguicidas: 2000 µg kg⁻¹ para methidathion y 700 µg kg⁻¹ para kresoxim-methyl.

(d) Relaciones de las pendientes de calibración matriz/disolvente y porcentaje de aumento (+) o disminución (-) de la señal.

(*) Indica el límite mínimo de la determinación analítica (Reglamento (CE) 396/2005).

(**) MRL establecido para la suma de varios plaguicidas relacionados, incluyendo el indicado en la tabla.

IV.5.3.3. Parámetros analíticos.

La linealidad del método fue evaluada con patrones en matriz preparados con los extractos obtenidos mediante los dos métodos de extracción ensayados a nueve niveles de concentración comprendidos en el rango 2 – 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Las rectas de calibración mostraron coeficientes de correlación mejores que 0.998 para el 94% de los analitos de interés cuando se usó el método QuEChERS, y para el 88.8% de los analitos cuando se usó el método MSPD. Los rangos lineales (LDRs) se muestran en la **tabla IV.5.2**. Los límites de detección (LODs) se estimaron mediante la inyección de patrones en matriz a un nivel de concentración de 0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Los LODs y LOQs se establecieron teniendo en cuenta el criterio de la relación señal-ruido ($S/N=3$ para los límites de detección y $S/N=10$ para los límites de cuantificación) y también están recogidos en la **tabla IV.5.2**. Los LODs obtenidos fueron inferiores a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para el 85% de los compuestos, destacándose valores como 0.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para pirimiphos-methyl, y diazinon, usando ambos tratamientos de muestra. Además, los plaguicidas más usados (y detectados) en el cultivo del olivar pueden ser detectados a niveles tan bajos como 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (simazine, terbuthylazine, desethyl-terbuthylazine, diuron). Estos resultados demuestran una sensibilidad suficiente de los dos métodos ensayados para ser aplicados al análisis cuantitativo de plaguicidas en aceite de oliva a nivel de trazas.

Tabla IV.5.2. Rango dinámico lineal (LDR), límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) de los plaguicidas estudiados en aceite de oliva en las condiciones seleccionadas.

| Plaguicida | QuEChERS | | | MSPD | | |
|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
| Thiocyclam | 6.00 | 19.80 | 6 – 1000 | 5.00 | 16.50 | 5 – 500 |
| Acephate | 15.20 | 50.16 | 15.2 -1000 | 8.40 | 27.72 | 8.4 –2000 |
| Methamidophos | 6.00 | 19.80 | 6 – 1000 | 4.00 | 13.20 | 4 – 1000 |
| Omethoate | 3.00 | 9.90 | 3 – 500 | 14.00 | 46.20 | 14 – 125 |
| Thiabendazole | 0.26 | 0.86 | 0.3 –1000 | 10.00 | 33.00 | 10 – 2000 |
| Oxamyl | 1.40 | 4.62 | 1.4 –1000 | 50.00 | 165.00 | 50 – 500 |
| Methomyl | 10.00 | 33.00 | 10 – 1000 | 40.00 | 132.00 | 40 – 1000 |
| Thiamethoxam | 10.00 | 33.00 | 10 – 1000 | 10.00 | 33.00 | 10 – 2000 |
| Pirimicarb | 1.40 | 4.62 | 1.4 – 500 | 0.60 | 1.98 | 0.6 –2000 |
| Methiocarb sulfoxide | 6.00 | 19.80 | 6 – 2000 | 4.00 | 13.20 | 4 – 2000 |
| Metamitron | 0.60 | 1.98 | 0.6 –1000 | 0.60 | 1.98 | 0.6 –2000 |
| Fenuron | 15.00 | 49.50 | 15 – 1000 | 2.00 | 6.60 | 2 – 1000 |
| Chloridazon | 0.60 | 1.98 | 0.6 –1000 | 0.26 | 0.86 | 0.26 -1000 |
| Imidacloprid | 10.00 | 33.00 | 10 – 2000 | 2.00 | 6.60 | 2 – 500 |

| Plaguicida | QuEChERS | | | MSPD | | |
|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
| Dimethoate | 12.00 | 39.60 | 12 - 2000 | 8.00 | 26.40 | 8 - 2000 |
| Acetamiprid | 12.00 | 39.60 | 12 - 2000 | 2.00 | 6.60 | 2 - 2000 |
| Butocarboxim | 30.00 | 99.00 | 30 - 2000 | 8.00 | 26.40 | 8 - 1000 |
| Thiacloprid | 3.00 | 9.90 | 3 - 2000 | 1.60 | 5.28 | 1.6 - 2000 |
| Imazalil | 0.30 | 0.99 | 0.3 - 500 | 0.40 | 1.32 | 0.4 - 1000 |
| Aldicarb | 2.00 | 6.60 | 2 - 2000 | 3.00 | 9.90 | 3 - 2000 |
| Bromacil | 24.00 | 79.20 | 24 - 2000 | 50.00 | 165.00 | 50 - 1000 |
| Oxadixyl | 10.00 | 33.00 | 10 - 2000 | 10.00 | 33.00 | 10 - 2000 |
| Monuron | 10.00 | 33.00 | 10 - 1000 | 10.00 | 33.00 | 10 - 1000 |
| Cymoxanil | 6.00 | 19.80 | 6 - 1000 | 2.00 | 6.60 | 2 - 1000 |
| Simazine | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 500 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1000 |
| Metolcarb | 15.0 | 49.50 | 15 - 1000 | 8.00 | 26.40 | 8 - 1000 |
| Dichlorvos | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 500 | 1.20 | 3.96 | 1.2 - 1000 |
| Desethyl terbutylazine | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 | 2.00 | 6.60 | 2 - 1000 |
| Pyrimethanil | 0.40 | 1.32 | 0.4 - 500 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 500 |
| Bendiocarb | 84.00 | 277.20 | 84 - 2000 | 24.00 | 79.20 | 24 - 1000 |
| Carbofuran | 75.00 | 247.50 | 75 - 1000 | 2.00 | 6.60 | 2 - 500 |
| Ethoxyquin | 3.60 | 11.88 | 10 - 1000 | - | - | - |
| Chlorotoluron | 3.20 | 10.56 | 10 - 2000 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 2000 |
| Fluometuron | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1000 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 2000 |
| Atrazine | 0.30 | 0.99 | 0.3 - 500 | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 500 |
| Isoproturon | 3.00 | 9.90 | 3 - 500 | 1.00 | 3.30 | 1 - 500 |
| Deet | 0.20 | 0.66 | 0.2 - 500 | 0.16 | 0.53 | 0.16 - 1000 |
| Metalaxyl | 1.20 | 3.96 | 1.2 - 500 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1000 |
| Diuron | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1000 |
| Difenoxuron | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 |
| Monolinuron | 4.60 | 15.18 | 4.6 - 2000 | 4.00 | 13.20 | 4 - 1000 |
| Isoprocab | 20.00 | 66.00 | 20 - 2000 | 10.00 | 33.00 | 10 - 2000 |
| Metobromuron | 2.00 | 6.60 | 2 - 2000 | 2.00 | 6.60 | 2 - 2000 |
| Flazasulfuron | 0.40 | 1.32 | 0.4 - 2000 | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 |
| Dimethomorph | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 2000 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1000 |
| Bupirimate | 1.20 | 3.96 | 1.2 - 500 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 500 |
| Prochloraz | 1.00 | 3.30 | 1 - 1000 | 1.00 | 3.30 | 1 - 1000 |
| Triadimenol | 7.00 | 23.10 | 7 - 500 | 10.00 | 33.00 | 10 - 1000 |
| Propazine | 0.50 | 1.65 | 0.5 - 500 | 2.00 | 6.60 | 2 - 500 |
| Ethiprole | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1000 | 1.60 | 5.28 | 1.6 - 2000 |
| Isocarbophos | 1.40 | 4.62 | 1.4 - 500 | 2.00 | 6.60 | 2 - 200 |
| Cyproconazole | 0.40 | 1.32 | 0.4 - 1000 | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 |
| Fenobucarb | 10.00 | 33.00 | 10 - 2000 | 4.20 | 13.86 | 4.2 - 2000 |
| Terbutylazine | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 700 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 600 |
| Methidathion | 2.40 | 7.92 | 2.4 - 600 | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 |
| Diethofencarb | 10.00 | 33.00 | 10 - 700 | 10.00 | 33.00 | 10 - 1000 |

| Plaguicida | QuEChERS | | | MSPD | | |
|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
| Linuron | 3.00 | 9.90 | 3 - 1000 | 2.00 | 6.60 | 2 - 1000 |
| Fenarimol | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1400 | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 |
| Fenamiphos | 0.50 | 1.65 | 0.5 - 600 | 1.50 | 4.95 | 1.5 - 1000 |
| Propaphos | 4.20 | 13.86 | 4.2 - 1000 | 1.50 | 4.95 | 1.5 - 1000 |
| Bromuconazole | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 2000 | 1.00 | 3.30 | 1 - 2000 |
| Myclobutanil | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 700 | 1.00 | 3.30 | 1 - 1000 |
| Promecarb | 7.00 | 23.10 | 7 - 500 | 5.20 | 17.16 | 5.2 - 1000 |
| Azoxystrobin | 0.40 | 1.32 | 0.4 - 900 | 1.00 | 3.30 | 1 - 1000 |
| Dimethylvinphos | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 2000 | 1.20 | 3.96 | 1.2 - 2000 |
| Chlorbromuron | 3.00 | 9.90 | 3 - 2000 | 1.00 | 3.30 | 1 - 2000 |
| Triadimefon | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 | 1.00 | 3.30 | 1 - 1000 |
| Fenhexamid | 2.00 | 6.60 | 2 - 1000 | 1.00 | 3.30 | 1 - 1000 |
| Pyridaphenthion | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 | 1.00 | 3.30 | 1 - 1000 |
| Fluquinconazole | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 2000 | 1.00 | 3.30 | 1 - 2000 |
| Tebuconazole | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 500 | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 |
| Methoxyfenozide | 1.20 | 3.96 | 1.2 - 1000 | 3.00 | 9.90 | 3 - 1000 |
| Triflumizole | 1.00 | 3.30 | 1 - 2000 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 2000 |
| Penconazole | 0.40 | 1.32 | 0.4 - 500 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1000 |
| Iprodione | 10.00 | 33.00 | 10 - 1000 | 10.00 | 33.00 | 10 - 250 |
| Chromafenozide | 2.00 | 6.60 | 2 - 1000 | 2.00 | 6.60 | 2 - 1000 |
| Malathion | 3.00 | 9.90 | 3 - 500 | 2.00 | 6.60 | 2 - 250 |
| Fenoxycarb | 1.80 | 5.94 | 1.8 - 500 | 3.00 | 9.90 | 3 - 1000 |
| Triazophos | 0.50 | 1.65 | 0.5 - 700 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1000 |
| Procymidone | 3.00 | 9.90 | 3 - 2000 | 4.00 | 13.20 | 4 - 500 |
| Alanycarb | 5.00 | 16.50 | 5 - 2000 | 3.00 | 9.90 | 3 - 250 |
| Metolachlor | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1000 | 0.80 | 2.64 | 2 - 1000 |
| Alachlor | 20.00 | 66.00 | 20 - 500 | 10.00 | 33.00 | 10 - 500 |
| Neburon | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 |
| Tebufenozide | 20.00 | 66.00 | 20 - 2000 | 6.00 | 19.80 | 6 - 2000 |
| Edifenphos | 0.50 | 1.65 | 0.5 - 1000 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1000 |
| Chlorfenvinphos | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1200 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1000 |
| Aclonifen | 5.20 | 17.16 | 5.2 - 500 | 4.00 | 13.20 | 4 - 1000 |
| Triflumuron | 0.66 | 2.18 | 0.66 - 500 | 3.00 | 9.90 | 3 - 1000 |
| Kresoxim-methyl | 30.00 | 99.00 | 30 - 500 | 10.00 | 33.00 | 10 - 250 |
| Difenoconazole | 0.16 | 0.53 | 0.16 - 1000 | 0.50 | 1.65 | 0.5 - 500 |
| Benalaxyl | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 500 | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 500 |
| Quinalphos | 0.50 | 1.65 | 0.5 - 1000 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1000 |
| Parathion | 6.00 | 19.80 | 6 - 500 | 10.00 | 33.00 | 10 - 1000 |
| Buprofezin | 0.16 | 0.53 | 0.16 - 500 | 0.50 | 1.65 | 0.5 - 500 |
| Anilofos | 0.26 | 0.86 | 0.26 - 500 | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 |
| Pirimiphos-methyl | 0.12 | 0.40 | 0.12 - 250 | 0.18 | 0.59 | 0.18 - 100 |
| Diazinon | 0.16 | 0.53 | 0.16 - 250 | 0.18 | 0.59 | 0.18 - 250 |

| Plaguicida | QuEChERS | | | MSPD | | |
|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
| Indoxacarb | 0.50 | 1.65 | 0.5 - 2000 | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 2000 |
| Trifloxystrobin | 0.50 | 1.65 | 0.5 - 500 | 0.80 | 2.64 | 0.8 - 1000 |
| Fluacrypyrim | 1.00 | 3.30 | 1 - 1000 | 0.60 | 1.98 | 0.6 - 1000 |
| Ethion | 10.00 | 33.00 | 10 - 500 | 3.00 | 9.90 | 3 - 2000 |
| Hexythiazox | 10.00 | 33.00 | 10 - 2000 | 8.00 | 26.40 | 8 - 1000 |
| Propargite | 20.00 | 66.00 | 20 - 1000 | 20.00 | 66.00 | 20 - 2000 |
| Spiromesifen | 10.00 | 33.00 | 10 - 2000 | 10.00 | 33.00 | 10-1000 |

El efecto matriz, que puede influir en la calidad de los datos cuantitativos generados por el método, también fue estudiado. Los componentes de la matriz pueden aumentar o reducir (incluso suprimir) la señal de los analitos. El problema se origina en la fuente de ionización, cuando los constituyentes de la matriz influyen sobre la ionización de los analitos con los que coeluyen, causando la supresión de la ionización de los mismos. Para evaluar el impacto de la matriz en el aumento o disminución de la señal de los analitos (comparada con la señal de los mismos en patrones preparados en disolvente), las pendientes de las rectas de calibración por adición de patrón (patrones en matriz) se compararon con las pendientes de las rectas de calibrado en disolvente, calculando relaciones pendiente calibrado matriz/pendiente calibrado disolvente para cada uno de los 104 compuestos analizados. Como se puede ver en la **tabla IV.5.1**, la señal de los analitos se veía afectada en la mayoría de los casos (relación de pendientes $\neq 1$), usando ambos protocolos de tratamiento de muestra.

Cuando se utilizaba el método QuEChERS, sólo unos pocos compuestos polares que eran poco retenidos en la columna mostraron un fuerte efecto matriz (ver **tabla IV.5.1**). Estos compuestos (thiocyclam, acephate, methamidophos y omethoate) mostraron un aumento de su señal del doble o más (relaciones de pendientes con valores superiores a 2, o efecto matriz $> 100\%$ cuando se expresa en porcentaje). Sin embargo, cuando se utilizaba el método MSPD no se veían afectados, probablemente debido a la efectividad de la etapa de limpieza con cartuchos de Florisil (silicato de magnesio básico) para eliminar sustancias interferentes polares (pigmentos, polifenoles, etc). Las fases sólidas utilizadas en la etapa de *clean-up* del método QuEChERS parecen ser menos eficientes para eliminar este tipo de interferentes polares presentes en el aceite de oliva.

Los resultados obtenidos para el efecto matriz también se muestran en términos de porcentaje absoluto de incremento o disminución de la señal en la **tabla IV.5.1**. El incremento o disminución de la señal se calculó mediante la operación:

$$(\text{pte. calibrado matriz}/\text{pte. calibrado disolvente}) \times 100 - 100.$$

Resultados negativos indican supresión de la señal (en relación a la señal obtenida con patrones puros), mientras que los resultados positivos indican un incremento de la misma. Para la mayoría de los plaguicidas estudiados se observa un efecto matriz suave, inferior o igual a $\pm 20\%$ (lo que se traduce en relaciones de pendientes comprendidas entre 0.80 y 1.20), aunque existen diferencias entre los métodos de extracción QuEChERS (73% de los compuestos) y MSPD (92% de los compuestos), como se refleja en la **figura IV.5.7**. Por lo tanto, de manera global, el protocolo MSPD parece ser más efectivo a la hora de eliminar interferentes del aceite de oliva.

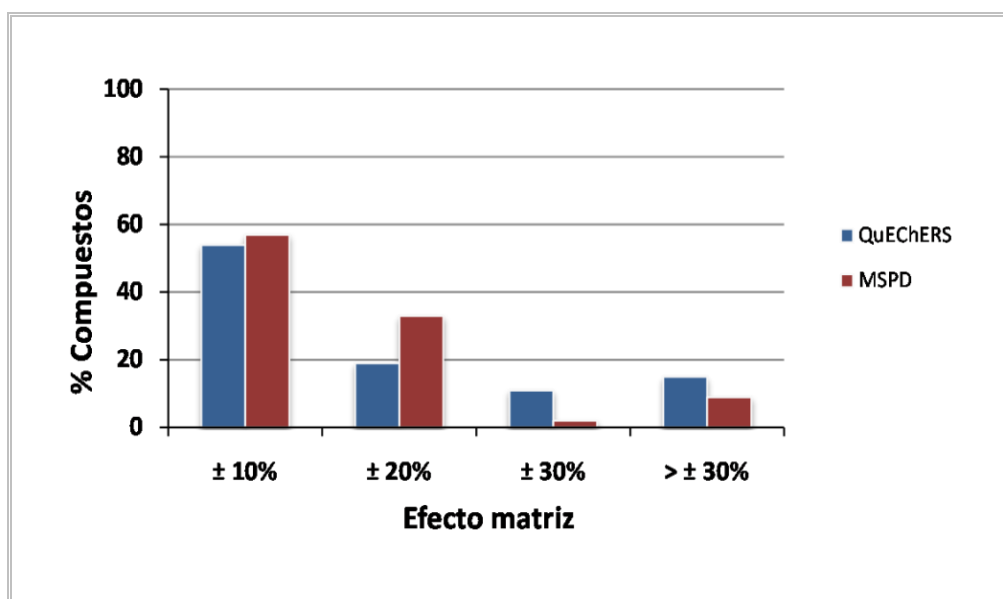


Figura IV.5.7. Distribución del efecto matriz (expresado en términos de porcentaje de incremento o disminución de la señal) obtenido para los 105 plaguicidas analizados en aceite de oliva, utilizando los dos métodos ensayados.

Finalmente, el método propuesto fue aplicado a dos muestras de aceite de oliva virgen extra. Se encontraron resultados positivos para simazine, terbuthylazine y desethyl terbuthylazine, usando ambos métodos de preparación de muestra. El herbicida diuron fue encontrado usando el método de extracción MSPD, mientras que no fue detectado cuando se usó el método QuEChERS. Esto puede ser debido a la retención del diuron en el carbón grafitizado

debido a su estructura plana. Las concentraciones de estos plaguicidas encontradas en las muestras fueron muy bajas, por debajo del MRL establecido en la normativa europea para aceitunas de producción [13]. Se tomaron estos MRLs como referencia debido a que actualmente no existen MRLs establecidos para aceite de oliva en la normativa europea.

IV.5.4. Conclusiones

Se han estudiado dos métodos de preparación de muestra rápidos y respetuosos con el medio ambiente (QuEChERS y MSPD) para el análisis multi-residuo de gran alcance de plaguicidas en muestras de aceite de oliva. Esta es la primera vez en la que estos dos métodos se evalúan y comparan para una gran variedad de plaguicidas en aceite de oliva. Para ambos métodos de preparación de muestra se desarrolló un método multi-residuo para el análisis de un total de 105 plaguicidas en aceite de oliva empleando LC-TOFMS. La linealidad, precisión, exactitud, efecto matriz y límites de detección obtenidos ilustran el potencial de la técnica LC-TOFMS para el análisis rápido de plaguicidas en muestras vegetales con alto contenido graso. Además, los límites de detección alcanzados eran adecuados para el análisis de residuos de plaguicidas en aceitunas destinadas a la producción de aceite, así como en aceite de oliva virgen, teniendo en cuenta los MRLs establecidos en la normativa europea y el Codex Alimentarius, respectivamente. Con respecto a la comparación de los métodos de extracción, los resultados mostraron un menor efecto matriz cuando se combinaba la MSPD con LC-TOFMS, pero se obtenían mejores recuperaciones cuando se usaba el método QuEChERS. Teniendo en cuenta que el uso de calibración por adición de patrón minimiza el problema del efecto matriz, junto con el mayor rendimiento del método QuEChERS, éste ofrece una ligera ventaja sobre el método MSPD.

CAPÍTULO IV.6



Desarrollo de un método multi-residuo para el análisis de plaguicidas en aceituna mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS).

IV.6. DESARROLLO DE UN MÉTODO MULTI-RESIDUO PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN ACEITUNA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA/ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS). VENTAJAS DEL MRM NO SEGMENTADO.

IV.6.1 Resumen

Se ha llevado a cabo una comparación detallada de dos metodologías de preparación de muestra para el desarrollo de métodos multi-residuo de gran alcance para el análisis de plaguicidas en aceituna mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Las metodologías propuestas se basan en: a) extracción líquido-líquido con acetonitrilo seguida de una etapa de limpieza o *clean-up* mediante extracción en fase sólida dispersiva con carbón grafitizado (GCB), amina primaria-secundaria (PSA) y C₁₈ (método QuEChERS para matrices grasas); b) dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) utilizando como fase sólida aminopropil y cartuchos de Florisil para la etapa final de limpieza o *clean-up*. Para evaluar las metodologías de tratamiento de muestra propuestas, 104 plaguicidas representativos de diferentes clases fueron estudiados haciendo uso de LC-MS/MS empleando como fuente de ionización electrospray. La separación de los compuestos presentes en los extractos de aceituna se llevó a cabo en una columna corta (50 mm x 4.6 mm d.i.) de C₁₈ con un tamaño de partícula de 1.8 µm. La identificación y confirmación de los compuestos se basaba en el tiempo de retención y la relación entre dos transiciones MRM específicas para cada compuesto. Los límites de detección obtenidos eran inferiores a 10 µg kg⁻¹ para más del 89% de los compuestos utilizando ambos métodos de preparación de muestra. Para la validación del método se llevaron a cabo estudios de recuperación a dos niveles de fortificación: 10 y 100 µg kg⁻¹, obteniéndose recuperaciones en el rango 70-120% para la mayoría de los analitos cuando se utilizó el método QuEChERS. Cuando el procedimiento de extracción elegido fue la MSPD, las recuperaciones para la mayoría de los analitos estaban comprendidas en el rango 50-70%. Los métodos descritos fueron aplicados satisfactoriamente al análisis de muestras reales de aceitunas, revelando la presencia de algunas de las especies de interés en el rango de los µg kg⁻¹. Además de la evaluación de las dos metodologías de tratamiento de muestra, también se discute el uso de un nuevo software para el desarrollo de métodos MRM, de forma que se eliminan algunas limitaciones y desventajas asociadas a los métodos MS/MS convencionales (pérdida de analitos que eluyen en los extremos de los segmentos de tiempo, programación manual del método y limitaciones asociadas al tiempo de barrido o scan). Esta herramienta (software) recientemente desarrollada por varias firmas

comerciales está basada en un algoritmo que, a partir del tiempo de retención para cada transición MS/MS, maximiza el número de transiciones que se monitorizan simultáneamente a lo largo de todo el análisis cromatográfico.

IV.6.2 Experimental

IV.6.3.1 Preparación de muestra

Protocolo 1.- Método QuEChERS modificado para matrices grasas [46].

El procedimiento propuesto para este estudio constaba de los siguientes pasos: 10 g de una porción homogénea de pasta de aceituna (ver proceso de molienda en capítulo III) fueron pesados en un tubo de centrifuga de plástico de 50 mL de capacidad. Seguidamente se añadieron 10 mL de acetonitrilo (MeCN) y el tubo se agitó manualmente durante 1 minuto. Después, se añadieron 4 g de sulfato de magnesio anhidro y 1 g de cloruro sódico (NaCl). Inmediatamente después (para evitar la coagulación del sulfato de magnesio anhidro) el tubo se agitó de nuevo enérgicamente durante 1 minuto y posteriormente la mezcla se centrifugó a 3700 revoluciones por minuto (rpm) durante otro minuto. Una vez separadas las fases, se tomaron 5 mL del sobrenadante (extracto de acetonitrilo) que fueron transferidos a un tubo de centrifuga de plástico de 15 mL de capacidad al que se habían añadido previamente 750 mg de $MgSO_4$, 250 mg de PSA (amina primaria-secundaria), 250 mg de carbón grafitizado (GCB) y 250 mg de C_{18} . El segundo tubo fue inmediatamente agitado durante 30 s y después se centrifugó a 3700 rpm durante 1 min. Un volumen de 1 mL de dicho extracto fue evaporado en un tubo de ensayo de vidrio hasta casi sequedad bajo una corriente de nitrógeno, para posteriormente ser reconstituido con 0.5 mL de metanol (MeOH) y 0.5 mL de agua ultrapura (milli Q). De este modo se obtuvo un extracto que contenía el equivalente de 1 g de muestra por mililitro de extracto. Finalmente, el extracto fue filtrado a través de un filtro de 0.45 μm y transferido a un vial para su análisis mediante HPLC-MS. Los extractos fueron diluidos 1:2 con agua ultrapura antes de su análisis (500 μL extracto + 500 μL H_2O), de forma que la muestra inyectada en el HPLC-MS contenía aproximadamente un 25% de MeOH y un 75% de agua. En la **figura IV.6.1.** se puede ver un esquema de este procedimiento.

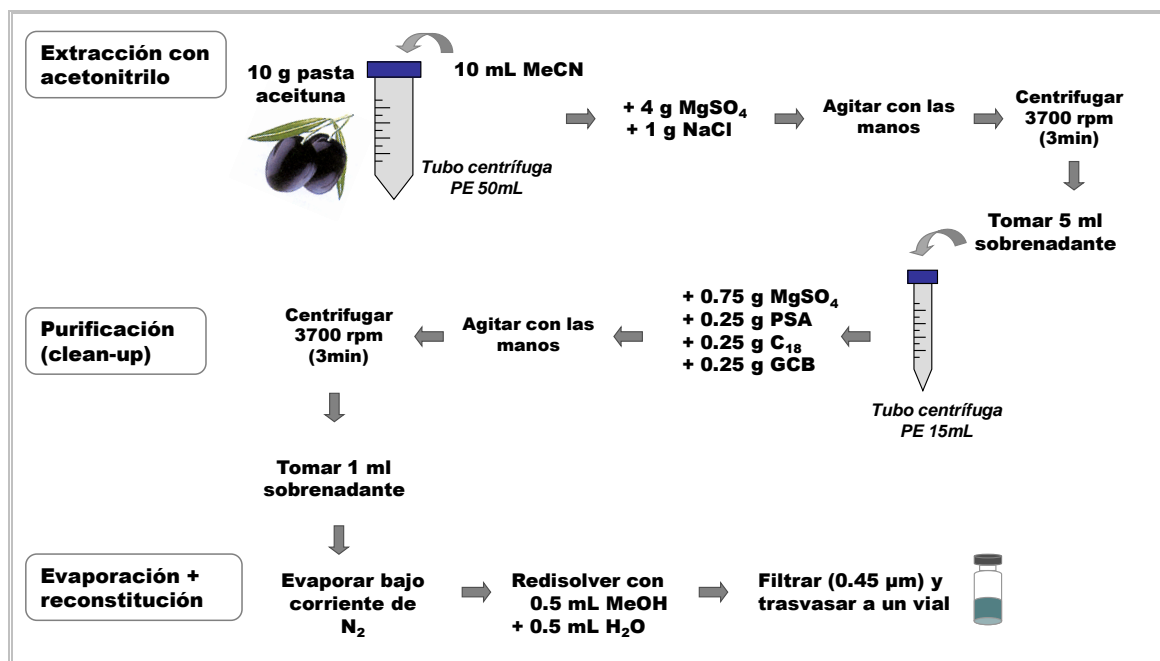


Figura IV.6.1. Esquema del protocolo QuEChERS utilizado para obtener los extractos de aceituna.

Protocolo 2.- Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD).

Este proceso se esquematiza en la figura IV.6.2 y comienza con la pesada de 1 g de pasta de aceituna (ver proceso de molienda en capítulo III) en un mortero de vidrio, donde se homogeneiza con 2 g de aminopropil (Bondesil-NH₂). Tras el proceso de homogeneización resulta un polvo fino y seco que se transfiere a un cartucho SPE comercial de 12 mL relleno con 2 g de Florisil. La elución se realiza con 2 x 5 mL de acetonitrilo, utilizándose la primera alícuota para limpiar el mortero. El extracto final se recoge en un tubo de ensayo de vidrio y se evapora hasta casi sequedad bajo una corriente de nitrógeno, para posteriormente ser reconstituido con 0.5 mL de metanol (MeOH) y 0.5 mL de agua ultrapura (milli Q). De este modo se obtuvo un extracto que contenía el equivalente de 1 g de muestra por mililitro de extracto. Finalmente, el extracto fue filtrado a través de un filtro de 0.45 μm y transferido a un vial para su análisis mediante HPLC-MS. Los extractos fueron diluidos 1:2 con agua ultrapura antes de su análisis (500 μL extracto + 500 μL H₂O), de forma que la muestra inyectada en el HPLC-MS contenía aproximadamente un 25% de MeOH y un 75% de agua.

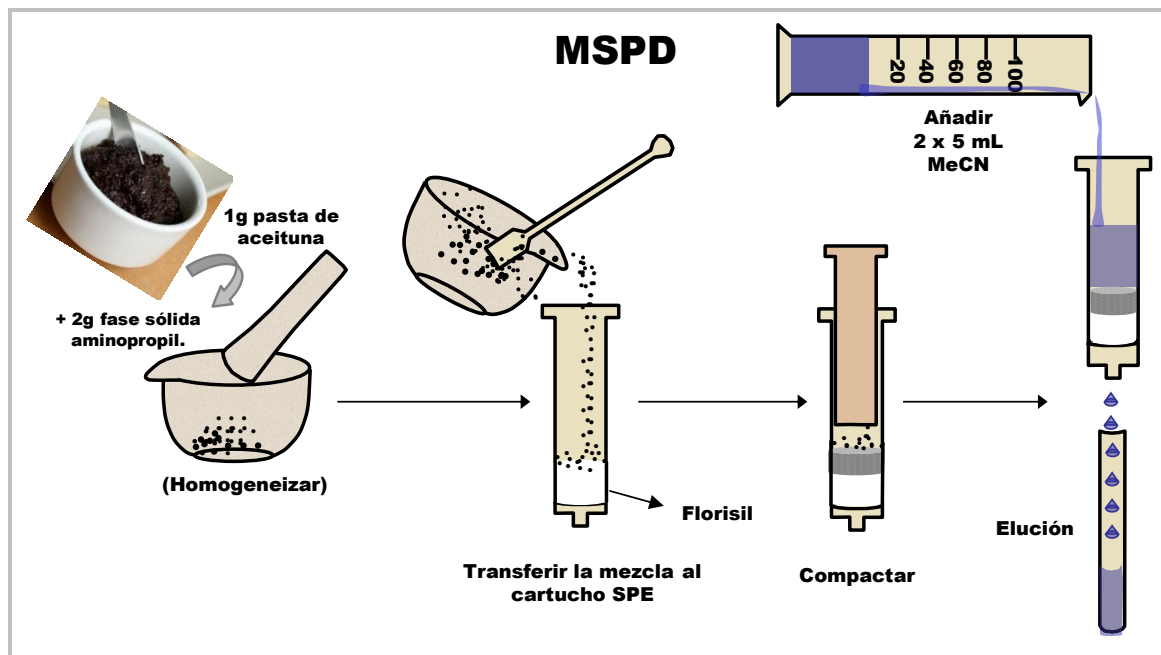


Figura IV.6.2. Esquema del protocolo MSPD utilizado para obtener los extractos de aceituna.

Preparación de las curvas de calibración.

Se prepararon patrones de calibración en matriz, de forma que a los extractos de aceituna obtenidos usando los dos métodos de extracción ensayados se le añadieron los volúmenes apropiados de la disolución de trabajo (que contenía la mezcla de plaguicidas) para conseguir el nivel de concentración deseado (rango: 2-2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$). También se analizaron extractos no fortificados, "blancos", para asegurar que no contenían los compuestos estudiados.

Fortificación de las muestras para los estudios de recuperación.

Para los estudios de recuperación las muestras fueron fortificadas antes de la extracción. Se tomó una porción representativa de pasta de aceituna y se pesaron 100 g que posteriormente fueron fortificados con la cantidad apropiada de la disolución de trabajo para conseguir 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de la mezcla de plaguicidas en la muestra fortificada. Esta muestra fue agitada durante una hora para su homogeneización; acto seguido se dejó incubar a temperatura ambiente durante seis horas para asegurar la eliminación del disolvente. Después se extrajeron seis porciones de 10 g siguiendo el *protocolo 1 (QuEChERS)* descrito anteriormente, y seis porciones de 1 g siguiendo el *protocolo 2 (MSPD)* también descrito anteriormente.

También se realizaron estudios de recuperación a un nivel de concentración de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ y se procedió de manera análoga a la descrita para el nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Teniendo en cuenta la etapa de dilución que se lleva a cabo al final de la etapa de tratamiento de muestra, indistintamente del método de extracción utilizado, los extractos inyectados en el instrumento LC-MS/MS contenían, respectivamente, 5 y $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de los plaguicidas estudiados.

IV.6.3.2 Parámetros instrumentales

En este estudio se utilizó el equipo HPLC-MS Agilent 6410 Triple Quad descrito en el capítulo III. Los valores óptimos elegidos para los parámetros instrumentales fueron los siguientes:

a) Condiciones cromatográficas:

- Fases móviles ESI(+): A = H_2O (0.1% HCOOH , v/v); B = Acetonitrilo.
- Gradiente: durante 1 min se mantiene constante un 10% de B, seguido de un gradiente lineal hasta el 100% B a los 11 min. Entonces, se mantiene constante (100%B) durante 4 min.
- Velocidad de flujo: 0.6 mL min^{-1} .
- Columna: C_{18} , $50 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$ y $1.8 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula (Zorbax Rapid Resolution Eclipse XDB-C18, Agilent).
- Volumen de inyección: $10 \mu\text{L}$.

b) Espectrómetro de masas:

- | | |
|--|--|
| - Fuente: ESI(+) | - Transiciones MRM: ver tabla IV.6.1 |
| - Voltaje del capilar: 5000 V | - Voltaje de fragmentación en Q2: optimizado para cada transición |
| - Temperatura de la fuente: $325 \text{ }^\circ\text{C}$ | - Energía de colisión (CE): optimizada para cada transición |
| - Presión del gas de secado (N_2): 50 psig | |
| - Flujo del gas de secado: 12 L min^{-1} | |

IV.6.3 Resultados y discusión

IV.6.3.1 Desarrollo del método LC-MS.

a) Separación e identificación de las especies de interés mediante LC-ESI-MS/MS.

La separación de las especies de interés se llevó a cabo en 16 minutos con una columna de resolución rápida y tamaño de partícula reducido, obteniendo una anchura de pico media de 10 s, lo que mejora la resolución en comparación con el uso de columnas analíticas típicas (ej: 150 mm x 4.6 mm d.i. x 5 μm tamaño partícula), con las que se suelen obtener anchuras de pico (a la altura de la línea base) comprendidas entre 20-40 s. Por lo tanto, la anchura de pico a la altura de la línea base se reduce a la mitad, lo que supone un aumento de la relación señal-ruido (S/N) del analito a bajas concentraciones, mejorando los límites de detección del método. Además, el consumo de disolvente orgánico (acetonitrilo) se reduce cerca de un 60% cuando se usan columnas cortas, lo que conlleva el desarrollo de métodos cromatográficos más respetuosos con el medio ambiente.

Se establecieron condiciones convencionales para la ionización por electrospray de los compuestos de interés. De esta forma, se usaron valores estándar para la temperatura de la fuente, presión y flujo del gas de secado (nitrógeno), y voltaje del capilar. Sin embargo, los parámetros fuertemente dependientes del analito (transiciones MRM, voltaje de fragmentación y energía de colisión) se estudiaron en detalle y de forma individual para cada analito. En la mayoría de los casos la molécula protonada ($[M+H]^+$) fue elegida como ión precursor, excepto cuando la intensidad relativa del aducto de sodio ($[M+Na]^+$) era mayor que la de la molécula protonada en las condiciones ESI+ seleccionadas (methidathion, methomyl, oxamyl). Además, en la medida de lo posible, se eligieron para cada compuesto las dos transiciones MRM que implicaban la formación de iones producto con mayor relación m/z y mayor intensidad relativa. La optimización se llevó a cabo mediante la inyección de 1 μL de una disolución individual de cada plaguicida (1-3 mg L^{-1} en acetonitrilo) directamente en el espectrómetro de masas con un flujo constante de una mezcla 50:50 de acetonitrilo/agua con una velocidad de flujo de 0.2 mL min^{-1} . El voltaje de fragmentación se estudió en el rango 60 – 150 V (60, 90, 120 y 150 V), mientras que la energía de colisión (CE) se estudió en el rango 5 – 20 eV (5, 10, 15 y 20 eV). Al objeto de establecer las mejores condiciones para el análisis, se

ensayaron de forma automática diferentes combinaciones voltaje de fragmentación/energía de colisión, mediante la herramienta de software MassHunter Optimizer (Agilent Technologies). Los valores óptimos se muestran en la **tabla IV.6.1**.

La identificación de los residuos de plaguicidas en extractos de aceituna se basó en el tiempo de retención y la utilización de dos transiciones MRM específicas, de forma que la más intensa se empleó para la cuantificación (Q) y la otra se empleó para la confirmación (q). La relación entre estas dos transiciones (Q/q) también fue usada a efectos de confirmación, considerando un 20% de variabilidad (tolerancia). Este criterio está de acuerdo con las directrices de control de calidad recogidas en la Guía SANCO de la Unión Europea [32], basadas en la estadística de la relación de los iones de las transiciones monitorizadas. En el caso de iprodione, kresoxim-methyl y methomyl no fue posible el cálculo de la relación Q/q debido a la baja intensidad de la transición “cualificadora” (q). El resto de los compuestos estudiados presentaba una variabilidad inferior al 20% en el rango lineal de concentración. A modo de ejemplo, en la **figura IV.6.3** se muestran los picos cromatográficos obtenidos para dimethoate, simazine, terbuthylazine y tebuconazole en patrones en matriz a un nivel de concentración bajo ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$).

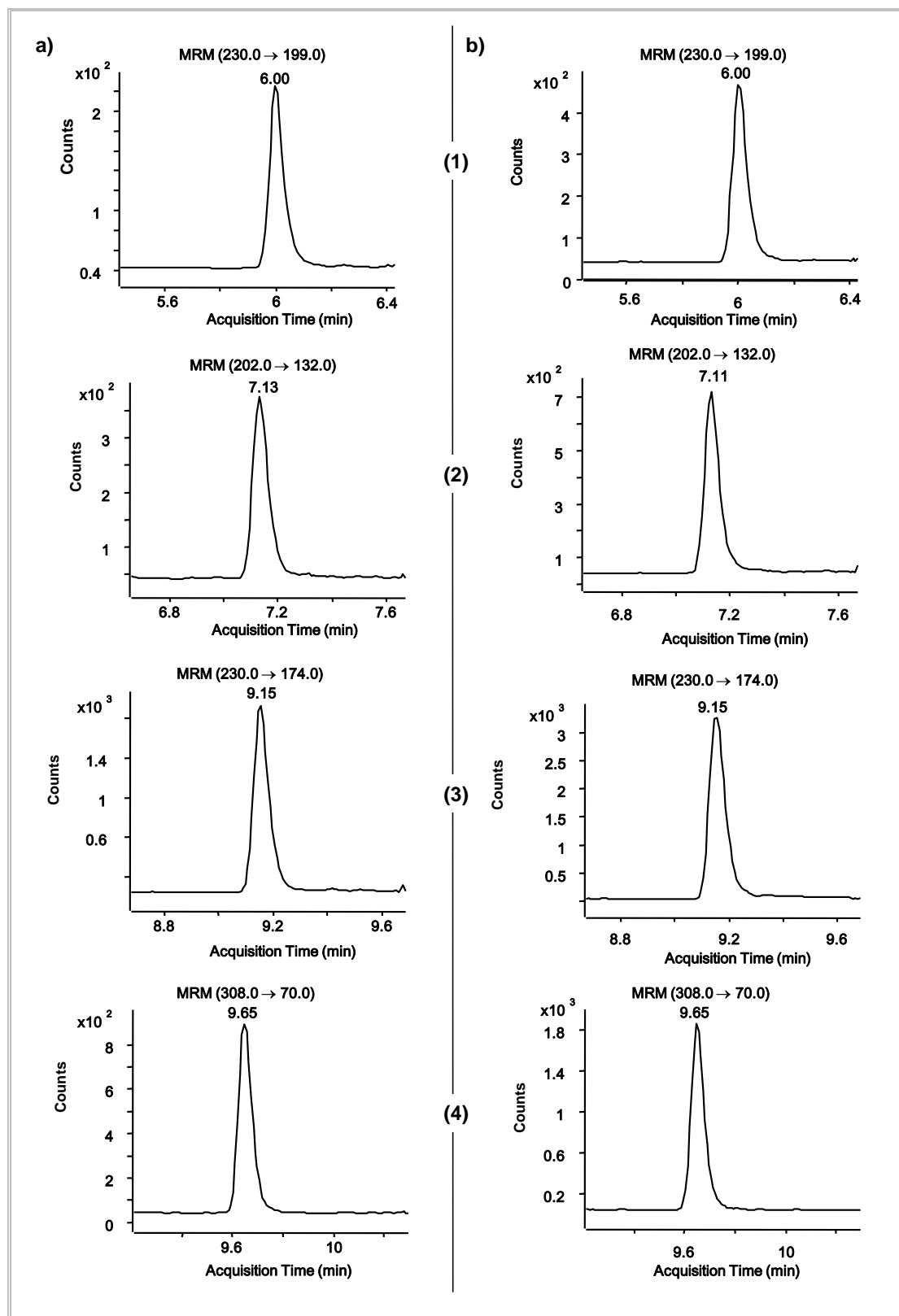


Figura IV.6.3. Cromatogramas MRM correspondientes a la transición cuantificadora elegida (en modo DMRM) para: (1) dimethoate, (2) simazine, (3) terbutylazine y (4) tebuconazole, en (a) un extracto QuEChERS fortificado a un nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, y (b) un extracto MSPD fortificado a un nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabla IV.6.1. Parámetros MRM para el método LC-MS/MS desarrollado para 104 plaguicidas, incluyendo las transiciones cuantificadora (Q) (en negrita) y cualificadora (q) junto con los valores optimizados para el voltaje de fragmentación (fragmentor) y la energía de colisión (CE).

| Plaguicida | Composición elemental ión padre | m/z ión padre | m/z fragmentos (Q/q) | fragmentor (V) | CE (eV) | t _R (min) |
|------------------------|---------------------------------|---------------|-----------------------|----------------|----------|----------------------|
| Methamidophos | C2H9NO2PS | 142.1 | 125.0 94.1 | 90 | 10 | 1.28 |
| Acephate | C4H11N1O3PS1 | 184.1 | 143.0 125.0 | 90 | 5 15 | 1.49 |
| Thiocyclam | C5H12NS3 | 182.0 | 137.0 73.0 | 90 | 15 20 | 1.59 |
| Omethoate | C5H13NO4PS | 214.1 | 183.0 125.0 | 90 | 5 20 | 1.77 |
| Carbendazim | C9H10N3O2 | 192.0 | 160.0 132.0 | 150 | 15 20 | 2.66 |
| Butoxycarboxim | C7H15N2O4S | 223.0 | 166.0 106.0 | 90 | 5 | 3.33 |
| Aldicarb sulfone | C7H15N2O4S | 223.0 | 148.0 86.0 | 120 | 5 10 | 3.73 |
| Oxamyl | C7H13N3O3SNa | 237.0 | 72.0 90.0 | 60 | 10 5 | 3.75 |
| Methomyl | C5H10N2O2NaS | 185.0 | 128.0 99.0 | 90 | 5 10 | 4.20 |
| Monocrotophos | C7H15NO5P | 224.0 | 127.0 98.0 | 60 | 10 15 | 4.25 |
| Thiamethoxam | C8H11ClN5O3S | 292.0 | 211.0 181.0 | 90 | 10 20 | 5.00 |
| Pirimicarb | C11H19N4O2 | 239.2 | 182.1 72.2 | 150 | 15 20 | 5.28 |
| Metamitron | C10H11N4O | 203.0 | 175.0 104.0 | 120 | 15 20 | 5.45 |
| Fenuron | C9H13N2O | 165.0 | 120.0 72.0 | 90 | 15 20 | 5.60 |
| Chloridazon | C10H9ClN3O | 222.0 | 104.0 92.0 | 120 | 20 | 5.70 |
| Imidacloprid | C9H11ClN5O2 | 256.0 | 209.0 175.0 | 90 | 15 | 5.77 |
| Dimethoate | C5H13NO3PS2 | 230.0 | 199.0 171.0 | 90 | 5 10 | 5.94 |
| Acetamiprid | C10H12ClN4 | 223.0 | 126.0 56.0 | 120 | 20 15 | 6.05 |
| Thiacloprid | C10H10ClN4S | 253.0 | 126.0 186.0 | 120 | 20 10 | 6.68 |
| Aldicarb | C7H15N2O2S | 213.0 | 116.0 89.0 | 120 | 10 15 | 6.83 |
| Bromacil | C9H14BrN2O2 | 261.0 | 205.0 188.0 | 90 | 10 20 | 6.99 |
| Imazalil | C14H15Cl2N2O | 297.0 | 255.0 159.0 | 150 | 15 20 | 6.99 |
| Monuron | C9H12ClN2O | 199.0 | 126.0 72.0 | 120 | 20 15 | 7.11 |
| Oxadixyl | C14H19N2O4 | 279.0 | 219.0 133.0 | 90 | 5 20 | 7.11 |
| Simazine | C7H13N5Cl | 202.0 | 132.0 124.0 | 120 | 20 | 7.15 |
| Desethyl terbutylazine | C7H13ClN5 | 202.0 | 146.0 110.0 | 120 | 15 20 | 7.30 |
| Dichlorvos | C4H8Cl2O4P | 221.1 | 144.9 109.0 | 150 | 10 15 | 7.30 |
| Lenacil | C13H19N2O2 | 235.0 | 153.0 136.0 | 90 | 10 20 | 7.37 |
| Carbofuran | C12H16NO3 | 222.0 | 165.0 | 90 | 10 | 7.75 |

| Plaguicida | Composición elemental ión padre | m/z ión padre | m/z fragmentos (Q/q) | fragmentor (V) | CE (eV) | t _R (min) |
|---------------|---------------------------------|---------------|-----------------------|----------------|----------|----------------------|
| | | | 123.0 | | 20 | |
| XMC | C10H14NO2 | 180.1 | 123.0 95.1 | 60 | 5 20 | 7.91 |
| Chlorotoluron | C10H14N2OCl | 213.0 | 72.0 140.0 | 120 | 20 | 7.96 |
| Fluometuron | C10H12F3N2O | 233.0 | 72.0 160.0 | 120 | 20 | 7.96 |
| Carbaryl | C12H12NO2 | 202.0 | 145.0 127.0 | 140 | 10 20 | 8.02 |
| Pyrimethanil | C12H14N3 | 200.0 | 107.0 183.0 | 120 | 20 | 8.03 |
| Atrazine | C8H15ClN5 | 216.0 | 174.0 146.0 | 120 | 15 20 | 8.11 |
| Isoproturon | C12H19N2O | 207.0 | 72.0 165.0 | 120 | 20 10 | 8.14 |
| Deet | C12H18NO | 192.1 | 119.0 91.1 | 120 | 15 20 | 8.17 |
| Metalaxyl | C15H22NO4 | 280.0 | 220.0 160.0 | 120 | 10 20 | 8.17 |
| Diuron | C9H11Cl2N2O | 233.0 | 160.0 72.0 | 120 | 20 | 8.21 |
| Ethiofencarb | C11H16NO2S | 226.0 | 164.0 107.0 | 60 | 5 15 | 8.21 |
| Difenofoxuron | C16H19N2O3 | 287.0 | 123.0 72.0 | 90 | 20 | 8.23 |
| Monolinuron | C9H12ClN2O2 | 215.0 | 148.0 126.0 | 120 | 15 | 8.26 |
| Isoprocarb | C11H16NO2 | 194.1 | 95.1 152.0 | 90 | 15 5 | 8.47 |
| Metobromuron | C9H12BrN2O2 | 260.0 | 149.0 171.0 | 120 | 10 20 | 8.51 |
| Flazasulfuron | C13H13F3N5O5S | 408.0 | 182.0 301.0 | 120 | 20 10 | 8.63 |
| Dimethomorph | C21H23ClNO4 | 388.0 | 301.0 165.0 | 150 | 20 | 8.65, 8.81 |
| Triadimenol | C14H19ClN3O2 | 296.2 | 227.0 70.2 | 60 | 5 10 | 8.79 |
| Ethiprole | C13H10Cl2F3N4OS | 396.9 | 351.0 255.1 | 120 | 15 20 | 8.90 |
| Propazine | C9H17ClN5 | 230.0 | 188.0 146.0 | 120 | 20 | 8.90 |
| Cyproconazole | C15H19ClN3O | 292.0 | 125.0 70.0 | 120 | 20 | 9.04 |
| Prochloraz | C15H17Cl3N3O2 | 376.0 | 308.0 266.0 | 90 | 10 15 | 9.12 |
| Terbutylazine | C9H17ClN5 | 230.0 | 174.0 146.0 | 120 | 15 20 | 9.19 |
| Fenobucarb | C12H18NO2 | 208.1 | 95.0 152.1 | 90 | 10 5 | 9.20 |
| Methidathion | C6H11N2O4NaPS3 | 303.0 | 145.0 85.0 | 60 | 5 15 | 9.25 |
| Diethofencarb | C14H22NO4 | 268.2 | 226.2 180.2 | 90 | 5 15 | 9.29 |
| Bupirimate | C13H25N4O3S | 317.0 | 166.0 108.0 | 150 | 20 | 9.30 |
| Fenamiphos | C13H23NO3PS | 304.0 | 217.0 234.0 | 120 | 20 15 | 9.30 |
| Fenarimol | C17H13Cl2N2O | 331.1 | 268.2 259.1 | 150 | 20 | 9.30 |
| Linuron | C9H11Cl2N2O2 | 249.0 | 160.0 182.0 | 90 | 20 15 | 9.30 |

| Plaguicida | Composición elemental ión padre | m/z ión padre | m/z fragmentos (Q/q) | fragmentor (V) | CE (eV) | t _R (min) |
|-----------------|---------------------------------|---------------|-----------------------|----------------|----------|----------------------|
| Bromuconazole | C13H13BrCl2N3O | 378.0 | 159.0 70.0 | 120 | 20 | 9.32, 9.68 |
| Myclobutanil | C15H18ClN4 | 289.2 | 125.1 70.2 | 150 | 20 15 | 9.35 |
| Promecarb | C12H18NO2 | 208.0 | 151.0 109.0 | 60 | 5 15 | 9.35 |
| Azoxystrobin | C22H18N3O5 | 404.0 | 372.0 344.0 | 120 | 10 20 | 9.40 |
| Dimethylvinphos | C10H11Cl3O4P | 330.9 | 127.1 205.0 | 90 | 10 20 | 9.42 |
| Chlorbromuron | C9H11BrClN2O2 | 293.0 | 204.0 182.0 | 120 | 20 15 | 9.43 |
| Triadimefon | C14H17ClN3O2 | 294.2 | 225.0 197.1 | 150 | 10 | 9.54 |
| Fenhexamid | C14H18Cl2NO2 | 302.0 | 97.0 55.0 | 90 | 25 30 | 9.57 |
| Pyridaphenthion | C14H18N2O4PS | 341.1 | 205.1 189.2 | 120 | 20 | 9.58 |
| Tebuconazole | C16H23ClN3O | 308.0 | 70.0 125.0 | 90 | 20 | 9.64 |
| Methoxyfenozide | C22H29N2O3 | 369.3 | 149.2 133.1 | 90 | 15 20 | 9.79 |
| Diflubenzuron | C14H10ClF2N2O2 | 311.0 | 158.0 141.0 | 120 | 10 20 | 9.80 |
| Penconazole | C13H16Cl2N3 | 284.0 | 159.0 70.0 | 90 | 20 15 | 9.93 |
| Iprodione | C13H14Cl2N3O3 | 330.0 | 245.0 101.0 | 90 | 15 20 | 9.95 |
| Chromafenozide | C24H31N2O3 | 395.2 | 175.1 339.2 | 90 | 10 5 | 9.97 |
| Malathion | C10H20O6PS2 | 331.0 | 127.0 99.0 | 90 | 10 20 | 10.01 |
| Triazophos | C12H17N3O3PS | 314.1 | 286.2 162.2 | 150 | 10 20 | 10.03 |
| Fenoxycarb | C17H20NO4 | 302.2 | 116.2 88.2 | 90 | 5 20 | 10.10 |
| Metolachlor | C15H23ClNO2 | 284.0 | 252.0 176.0 | 120 | 10 20 | 10.10 |
| Alachlor | C14H21ClNO2 | 270.0 | 238.0 162.0 | 90 | 15 | 10.20 |
| Triflumizole | C15H16ClF3N3O | 346.0 | 278.0 73.0 | 90 | 5 10 | 10.20 |
| Azinphos-ethyl | C12H17N3O3PS2 | 368.1 | 160.2 132.2 | 150 | 10 15 | 10.30 |
| Neburon | C12H17Cl2N2O | 275.0 | 88.0 114.0 | 120 | 15 10 | 10.30 |
| Tebufenozide | C22H29N2O2 | 353.2 | 296.9 133.1 | 150 | 5 15 | 10.30 |
| Edifenphos | C14H16O2PS2 | 311.0 | 283.1 173.0 | 120 | 10 5 | 10.35 |
| Chlorfenvinphos | C12H15Cl3O4P | 359.0 | 155.1 126.9 | 120 | 10 15 | 10.40 |
| Aclonifen | C12H10ClN2O3 | 265.1 | 248.1 218.1 | 120 | 15 20 | 10.50 |
| Difenoconazole | C19H18Cl2N3O3 | 406.0 | 337.0 251.0 | 120 | 15 20 | 10.50 |
| Kresoxim-methyl | C18H20NO4 | 336.2 | 246.2 229.2 | 150 | 15 20 | 10.50 |
| Triflumuron | C15H11ClF3N2O3 | 359.0 | 156.0 139.0 | 120 | 15 20 | 10.50 |
| Benalaxyl | C20H24NO3 | 326.0 | 294.0 208.0 | 120 | 5 15 | 10.60 |

| Plaguicida | Composición elemental ión padre | m/z ión padre | m/z fragmentos (Q/q) | fragmentor (V) | CE (eV) | t _R (min) |
|-------------------|---------------------------------|---------------|-----------------------|----------------|----------|----------------------|
| Quinalphos | C12H16N2O3PS | 299.1 | 163.2 147.2 | 150 | 20 | 10.60 |
| Anilofos | C13H20ClNO3PS2 | 368.0 | 199.0 171.0 | 120 | 10 20 | 10.80 |
| Isofenphos methyl | C14H23NO4PS | 231.0 | 199.0 121.0 | 90 | 15 | 10.93 |
| Diazinon | C12H22N2O3PS | 305.0 | 169.0 153.0 | 120 | 15 20 | 10.99 |
| Indoxacarb | C22H18ClF3N3O7 | 528.1 | 249.1 150.2 | 150 | 15 | 11.20 |
| Pirimiphos-methyl | C11H21N3O3PS | 306.2 | 164.2 108.2 | 150 | 20 | 11.20 |
| Fluacrypyrim | C20H22F3N2O5 | 427.1 | 145.1 205.1 | 90 | 20 5 | 11.30 |
| Triclocarban | C13H10Cl3N2O | 315.0 | 162.0 128.0 | 120 | 20 15 | 11.30 |
| Trifloxystrobin | C20H20F3N2O4 | 409.2 | 206.2 186.2 | 120 | 10 20 | 11.30 |
| Buprofezin | C16H24N3OS | 306.0 | 201.0 116.0 | 120 | 10 15 | 11.40 |
| Flufenoxuron | C21H12ClF6N2O3 | 489.0 | 306.0 158.0 | 120 | 15 | 11.90 |
| Ethion | C9H23O4P2S4 | 385.1 | 199.0 171.0 | 90 | 5 10 | 12.20 |
| Hexythiazox | C17H22ClN2O2S | 353.1 | 228.2 168.2 | 120 | 10 20 | 12.30 |
| Fenazaquin | C20H23N2O | 307.3 | 161.3 147.2 | 150 | 15 | 12.50 |

b) *Uso de la herramienta de software para el desarrollo de métodos MRM con ventana dinámica.*

Con el uso de esta herramienta de software MRM no es necesario el establecimiento de segmentos de tiempo para un grupo de transiciones, teniendo en cuenta el número de iones totales y la relación “*dwell time/duty cycle*”. Este software construye automáticamente segmentos de tiempo “virtuales” durante el análisis (como una ventana de tiempo en continuo movimiento durante el curso del análisis). El software “MRM dinámico (DMRM)” construye automáticamente tablas DMRM basadas en el tiempo de retención de los analitos, con una ventana de detección (Δt_R) que previene la pérdida de los compuestos debido a pequeños desplazamientos en el tiempo de retención, y en un tiempo constante de scan o barrido (para asegurar un número suficiente de puntos a lo largo del pico cromatográfico) [220-222]. En nuestro estudio se estableció $\Delta t_R = 1$ min, mientras que el tiempo de barrido o scan no es un parámetro definido por el usuario, sino que es calculado por el software. El software MRM dinámico (DMRM) agrupa automáticamente las transiciones en tablas basadas en el tiempo de

retención del analito, la ventana de detección y el tiempo constante de barrido por transición. Estas tablas son similares a los segmentos de tiempo MRM convencionales, pero contienen menos transiciones. El software permite más de 4000 transiciones de iones en un método MRM dinámico. En cada tabla DMRM el tiempo de scan o barrido permanece constante, mientras que el *dwell time* varía para asegurar que todos los analitos son analizados cuantitativamente (con un número mínimo de puntos de un pico cromatográfico de por ejemplo 10).

Los inconvenientes de los análisis MRM convencionales, relacionados con la adición de nuevos compuestos a un método MRM existente, o el riesgo de perder analitos debido a pequeñas variaciones en el tiempo de retención de los mismos (especialmente aquellos que eluyen en las proximidades de dos segmentos de tiempo diferentes) son eliminados con la nueva herramienta propuesta. De hecho, el número de compuestos que eluyen en las proximidades de dos segmentos diferentes aumenta con el número de compuestos que se monitorizan en el método MRM, incrementándose la posibilidad de perder analitos. Por ejemplo, en un método LC-MS para la determinación de 46 plaguicidas en vino, el 10.9% de los analitos eluían en las proximidades de distintos segmentos [243], mientras que para la determinación de 160 plaguicidas en frutas y vegetales ese porcentaje aumentaba hasta el 26.9% de los analitos estudiados [170]. La práctica común para minimizar la pérdida de analitos que eluyen en las proximidades de los segmentos en los métodos MRM convencionales es duplicar las transiciones en segmentos consecutivos, en algunos casos parcialmente solapados [244]. Sin embargo, duplicar las transiciones no es una solución en muchos casos para las pequeñas variaciones en los tiempos de retención de los analitos, implicando una pérdida de tiempo del instrumento en analizar transiciones que conducen a picos no integrables o falsos negativos. No obstante, el software MRM dinámico también presenta inconvenientes, ya que un pequeño cambio en el método (por ejemplo la adición o eliminación de un analito) puede cambiar todos los parámetros analíticos del mismo, particularmente las pendientes de las rectas de calibración, siendo necesaria por tanto una nueva calibración cuando se produce un cambio en los parámetros de adquisición. Esto sólo pasaría en el segmento de tiempo afectado por la transición que se añade o elimina en un método MRM convencional. El resto de las características del nuevo software son ventajosas, haciendo más fácil el desarrollo y la optimización del método.

IV.6.3.2 Evaluación de los métodos de tratamiento de muestra.

Para evaluar la efectividad de cada uno de los procedimientos de extracción propuestos se llevaron a cabo estudios de recuperación a dos niveles de concentración: 10 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Los resultados se detallan en la **tabla IV.6.2**. En general, se observaron mejores porcentajes de recuperación cuando se utiliza el protocolo QuEChERS para la extracción de los plaguicidas de interés. Como se puede ver en la **figura IV.6.4**, en la que se incluyen los resultados derivados de los estudios de recuperación para los dos métodos de extracción ensayados y a los dos niveles de fortificación estudiados, se obtienen mejores recuperaciones cuando se utiliza el método QuEChERS. Considerando un valor medio entre los niveles de concentración estudiados, el 86% de los analitos se recuperan entre un 70-120% con el método QuEChERS, mientras que usando el procedimiento basado en la MSPD el porcentaje de analitos recuperados en el mismo rango fue del 20%. La mayoría de los plaguicidas estudiados (65%) fueron recuperados en el rango 50-70% cuando la MSPD fue la técnica de preparación de muestra elegida.

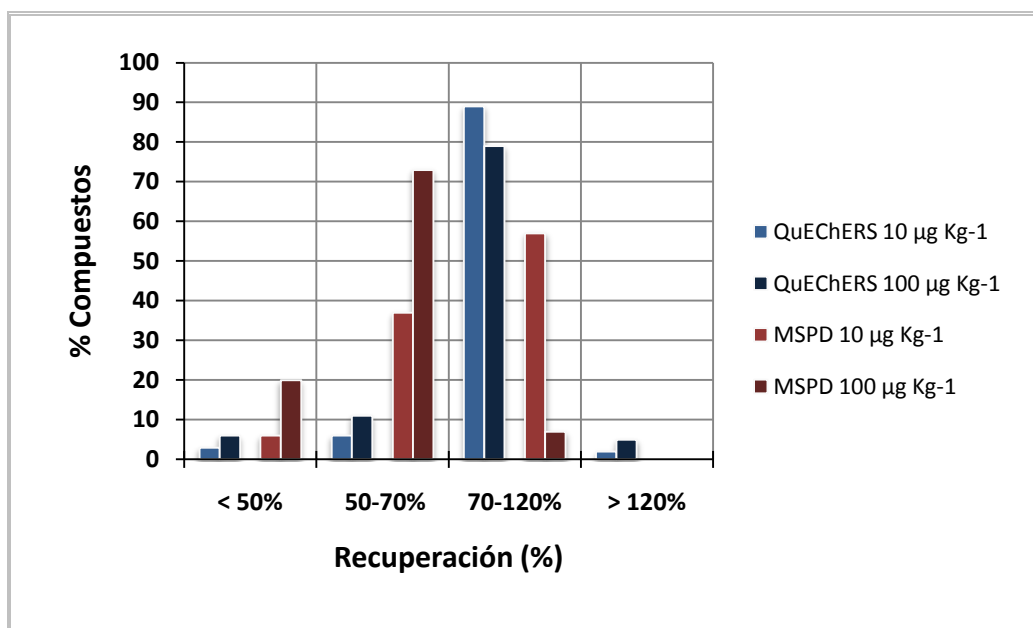


Figura IV.6.4. Distribución de los porcentajes de recuperación medios de los plaguicidas estudiados en aceitunas fortificadas, utilizando los dos métodos de tratamiento de muestra ensayados a dos niveles de concentración (10 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Por otro lado, ni flufenoxuron ni fenazaquin fueron recuperados con el método QuEChERS, probablemente porque debido a sus estructuras planas quedaron retenidos en el carbón grafitizado utilizado en la etapa de limpieza o *clean-up* de los extractos. Utilizando la

metodología MSPD, las recuperaciones para ambos compuestos están alrededor de un 60%. Por el contrario, acephate, dichlorvos, fenhexamid e iprodione no fueron recuperados con el método de extracción basado en la MSPD, mientras que fueron recuperados cuantitativamente mediante el método QuEChERS. A la vista de estos resultados, la metodología QuEChERS parece ser más apropiada como método de extracción para el análisis multi-residuo de un gran número de plaguicidas en aceituna.

Paralelamente al estudio de recuperación se llevó a cabo un estudio de precisión de las metodologías propuestas (tratamiento de muestra + LC-MS/MS). La desviación estándar relativa (n=6) obtenida para ambos métodos y a los dos niveles de concentración estudiados se muestra tanto en la **tabla IV.6.2** como en la **figura IV.6.5**. Como se puede ver, se obtienen mejores resultados de precisión cuando se utiliza el método QuEChERS (85-90% de los compuestos con $RSD\% \leq 10\%$). En general los coeficientes de variación fueron menores para el nivel de concentración más alto ensayado con ambos métodos de preparación de muestra.

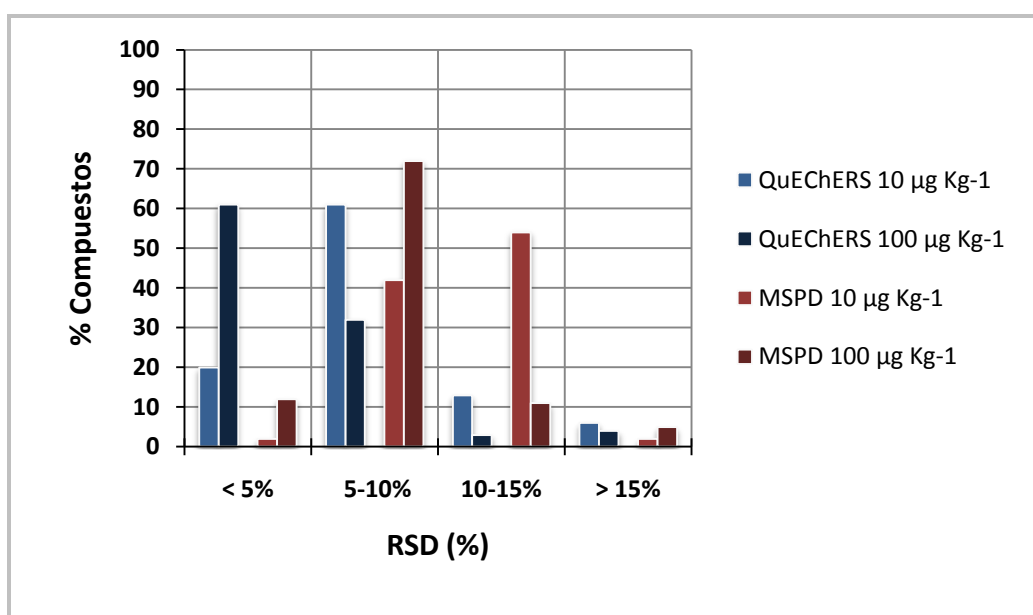


Figura IV.6.5. Estudio de precisión. Distribución de los valores medios de la desviación estándar relativa (RSD %) de los 104 plaguicidas estudiados en aceitunas fortificadas, utilizando los dos métodos de tratamiento de muestra ensayados a dos niveles de concentración (10 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Tabla IV.6.2. Evaluación del rendimiento de los tratamientos de muestra ensayados: estudios de recuperación y efecto matriz. La primera línea en el estudio de recuperación corresponde a un nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, y la segunda a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

| Plaguicida | t_R (min) | Efecto matriz QuEChERS* ($\Delta\%$) | Efecto matriz MSPD* ($\Delta\%$) | Recuperaciones QuEChERS# %Rec (RSD%) | Recuperaciones MSPD# %Rec (RSD%) |
|------------------|----------------|--|---------------------------------------|--|--|
| Methamidophos | 1.28 | 0.76 (-24%) | 1.03 (+3%) | 89.24 (6.86) 92.38 (5.57) | < LOQ 92.04 (10.76) |
| Acephate | 1.49 | 1.00 (0%) | 3.24 (+224%) | 92.96 (6.94) 87.69 (9.46) | LOD -- |
| Thiocyclam | 1.59 | 1.09 (+9%) | 0.54 (-46%) | 70.80 (16.22) 77.15 (4.45) | 75.18 (11.25) 61.25 (12.60) |
| Omethoate | 1.77 | 0.87 (-13%) | 1.61 (+61%) | 89.52 (5.97) 96.30 (14.64) | < LOQ 60.44 (18.58) |
| Carbendazim | 2.66 | 0.64 (-36%) | 0.82 (+18%) | 54.94 (4.61) 52.57 (7.70) | 53.46 (8.88) 41.19 (19.52) |
| Butoxycarboxim | 3.33 | 0.83 (-17%) | 1.05 (+5%) | 116.25 (9.00) 121.27 (5.67) | 71.23 (8.56) 62.26 (9.83) |
| Thiabendazole | 3.68 | 0.72 (-28%) | 1.10 (+10%) | < LOD 44.09 (19.00) | < LOD 40.81 (8.40) |
| Aldicarb sulfone | 3.90 | 0.96 (-4%) | 1.30 (+30%) | 122.26 (8.43) 119.33 (4.51) | 74.04 (7.23) 62.86 (9.09) |
| Oxamyl | 3.80 | 1.18 (+18%) | 1.62 (+62%) | 117.87 (7.05) 111.54 (5.20) | 69.43 (9.38) 62.24 (8.57) |
| Methomyl | 4.20 | 0.30 (-70%) | 0.39 (-61%) | LOD 99.92 (5.88) | 69.52 (4.68) 72.21 (4.17) |
| Monocrotophos | 4.30 | 0.86 (-14%) | 1.13 (+13%) | < LOD 108.40 (4.19) | < LOD 58.81 (9.49) |
| Thiamethoxam | 5.00 | 0.44 (-56%) | 0.55 (-45%) | 86.22 (7.01) 92.68 (3.30) | 61.27 (7.29) 51.59 (2.43) |
| Pirimicarb | 5.28 | 0.72 (-28%) | 0.80 (-20%) | 92.61 (7.41) 92.65 (4.03) | 79.88 (11.30) 65.07 (8.17) |
| Metamitron | 5.45 | 0.53 (-47%) | 0.75 (-25%) | 87.67 (15.6) 71.75 (8.10) | 55.13 (8.69) 35.02 (6.58) |
| Fenuron | 5.60 | 0.42 (-58%) | 0.79 (-21%) | 70.13 (8.73) 79.41 (9.26) | 61.48 (8.39) 55.22 (5.00) |
| Chloridazon | 5.70 | 0.34 (-66%) | 0.50 (-50%) | 82.96 (8.01) 75.58 (6.68) | 57.75 (10.24) 48.62 (2.75) |
| Imidacloprid | 5.77 | 0.33 (-67%) | 0.52 (-48%) | < LOQ 85.08 (4.44) | 51.61 (9.77) 43.67 (2.86) |
| Dimethoate | 5.94 | 0.45 (-55%) | 0.60 (-40%) | 91.96 (9.55) 91.75 (4.01) | 65.69 (11.67) 55.73 (3.50) |
| Acetamiprid | 6.05 | 0.42 (-58%) | 0.74 (-26%) | 87.75 (5.08) 85.14 (3.99) | 63.27 (10.93) 51.70 (1.66) |
| Thiacloprid | 6.68 | 0.84 (-16%) | 0.54 (-46%) | < LOQ 75.06 (1.75) | 59.01 (12.30) 45.83 (2.62) |
| Aldicarb | 6.83 | 0.3 (-70%) | 0.40 (-60%) | < LOD 60.82 (9.31) | < LOD 48.95 (7.46) |
| Bromacil | 6.99 | 0.41 (-59%) | 0.71 (-29%) | 97.72 (4.08) 92.55 (6.75) | 66.99 (9.86) 53.29 (7.96) |
| Imazalil | 6.99 | 0.66 (-34%) | 0.83 (-17%) | 55.61 (11.66) 54.33 (7.19) | 36.56 (18.04) 24.41 (7.92) |

| Plaguicida | t _R (min) | Efecto matriz QuEChERS* (Δ%) | Efecto matriz MSPD* (Δ%) | Recuperaciones QuEChERS# %Rec (RSD%) | Recuperaciones MSPD# %Rec (RSD%) |
|---------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--|--|
| Monuron | 7.11 | 0.54 (-46%) | 0.72 (-28%) | 89.99 (9.66) 93.58 (5.69) | 68.42 (11.94) 58.70 (5.65) |
| Oxadixyl | 7.11 | 0.68 (-32%) | 0.90 (-10%) | 108.94 (6.71) 111.64 (5.63) | 72.68 (12.20) 61.31 (7.09) |
| Simazine | 7.15 | 0.50 (-50%) | 0.95 (-5%) | 98.81 (5.13) 98.43 (4.86) | 69.02 (10.69) 53.60 (4.46) |
| Desethyl terbutylazine | 7.30 | 0.58 (-42%) | 0.70 (-30%) | 105.76 (8.72) 94.74 (3.79) | 72.48 (10.95) 52.47 (6.02) |
| Dichlorvos | 7.30 | 1.01 (+1%) | 2.87 (+187%) | 87.60 (3.81) 94.93 (4.63) | -- -- |
| Lenacil | 7.37 | 0.53 (-47%) | 0.87 (-13%) | 93.10 (7.64) 94.32 (5.51) | 68.79 (10.81) 53.98 (6.96) |
| XMC | 7.91 | 1.79 (+79%) | 2.11 (+111%) | 106.20 (7.12) 110.94 (4.62) | 72.88 (8.21) 70.29 (5.52) |
| Chlorotoluron | 7.96 | 0.44 (-56%) | 0.95 (-5%) | 98.52 (3.97) 99.88 (4.37) | 64.27 (8.93) 56.59 (7.24) |
| Fluometuron | 7.96 | 0.54 (-46%) | 0.74 (-26%) | 106.66 (6.87) 110.96 (3.34) | 68.75 (10.06) 59.87 (8.42) |
| Carbaryl | 8.02 | 1.80 (+80%) | 4.79 (+379%) | 95.08 (8.82) 107.76 (4.65) | 68.86 (11.72) 61.65 (5.93) |
| Pyrimethanil | 8.03 | 0.55 (-45%) | 0.85 (-15%) | < LOD 49.25 (4.43) | < LOQ 53.20 (9.44) |
| Atrazine | 8.11 | 0.61 (-39%) | 0.84 (-16%) | 96.74 (11.78) 105.56 (4.75) | 77.43 (9.20) 55.65 (7.69) |
| Isoproturon | 8.14 | 0.57 (-43%) | 0.94 (-6%) | 111.10 (5.79) 113.43 (2.90) | 67.64 (13.14) 56.90 (6.86) |
| Deet | 8.12 | 0.68 (-32%) | 0.72 (-28%) | 104.07 (4.18) 106.47 (6.32) | 89.78 (7.83) 66.99 (4.93) |
| Metalaxyl | 8.17 | 0.63 (-37%) | 0.82 (-18%) | 109.14 (9.97) 127.66 (3.58) | 74.57 (9.73) 59.74 (8.17) |
| Diuron | 8.21 | 0.25 (-75%) | 0.33 (-67%) | < LOD 105.22 (3.85) | 73.13 (7.54) 58.21 (6.83) |
| Ethiofencarb | 8.21 | 0.87 (-13%) | 1.12 (+12%) | 88.32 (5.74) 88.04 (4.87) | 52.77 (8.26) 45.02 (6.64) |
| Difenoxuron | 8.23 | 0.50 (-50%) | 0.65 (+33%) | 108.67 (9.97) 114.58 (3.96) | 66.55 (10.45) 56.20 (3.51) |
| Monolinuron | 8.26 | 0.49 (-51%) | 0.47 (-53%) | 107.89 (3.52) 116.83 (6.77) | 75.19 (6.25) 56.58 (4.80) |
| Isoprocarb | 8.47 | 0.49 (-51%) | 0.71 (-29%) | 101.10 (7.71) 107.93 (6.61) | 87.37 (11.66) 70.66 (10.77) |
| Metobromuron | 8.51 | 0.65 (-35%) | 1.25 (+25%) | < LOD 102.05 (13.20) | LOD 56.97 (6.36) |
| Flazasulfuron | 8.63 | 1.52(+52%) | 2.38 (+138%) | 98.00 (11.24) 77.99 (17.84) | 28.50 (8.29) 21.39 (12.41) |
| Dimethomorph | 8.65 y 8.81 | 0.77 (-23%) | 1.04 (+4%) | 109.34 (9.04) 108.62 (3.25) | 77.36 (12.27) 56.95 (8.58) |
| Triadimenol | 8.79 | 0.65 (-35%) | 0.78 (-22%) | LOD 104.20 (4.00) | 82.40 (9.39) 63.26 (7.52) |
| Ethiprole | 8.90 | 0.53 (-47%) | 0.75 (-25%) | 104.80 (6.29) 108.34 (2.70) | 84.47 (12.65) 64.71 (7.06) |

| Plaguicida | t _R (min) | Efecto matriz QuEChERS* (Δ%) | Efecto matriz MSPD* (Δ%) | Recuperaciones QuEChERS# %Rec (RSD%) | Recuperaciones MSPD# %Rec (RSD%) |
|-----------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---|---|
| Propazine | 8.90 | 0.57 (-43%) | 0.85 (-15%) | 95.35 (13.17) 85.99 (3.96) | 72.89 (11.25) 53.43 (9.10) |
| Cyproconazole | 9.04 | 0.50 (-50%) | 0.86 (-14%) | 101.61 (4.45) 102.10 (4.74) | 69.75 (9.46) 54.11 (9.67) |
| Prochloraz | 9.12 | 0.62 (-38%) | 0.94 (-6%) | 91.54 (9.65) 71.07 (4.62) | 70.54 (14.64) 54.04 (5.94) |
| Terbutylazine | 9.19 | 0.46 (-54%) | 0.93 (-7%) | 92.58 (2.10) 87.00 (3.43) | 73.25 (14.39) 54.05 (7.62) |
| Fenobucarb | 9.20 | 0.56 (-44%) | 0.71 (-29%) | 100.42 (7.57) 110.80 (4.81) | 81.40 (7.40) 67.58 (6.42) |
| Methidathion | 9.25 | 1.17 (+17%) | 1.47 (+47%) | 115.22 (7.62) 121.59 (7.55) | 69.21 (7.18) 61.79 (6.05) |
| Diethofencarb | 9.29 | 0.52 (-48%) | 0.85 (-15%) | 102.98 (8.16) 111.56 (3.32) | 89.83 (14.59) 69.43 (6.42) |
| Bupirimate | 9.30 | 0.74 (-26%) | 1.02 (+2%) | 101.82 (3.26) 89.82 (5.78) | 73.58 (11.37) 53.94 (7.74) |
| Fenamiphos | 9.30 | 0.60 (-40%) | 0.83 (-17%) | 118.11 (5.29) 108.54 (2.23) | 71.92 (9.19) 59.73 (8.09) |
| Fenarimol | 9.30 | 0.51 (-49%) | 0.53 (-47%) | 80.71 (12.61) 84.04 (5.41) | 78.68 (10.66) 60.02 (7.29) |
| Linuron | 9.30 | 0.49 (-51%) | 0.71 (-29%) | 121.08 (13.89) 107.37 (4.69) | 69.54 (12.49) 63.08 (8.60) |
| Bromuconazole | 9.32 y 9.68 | 0.67 (-33%) | 0.82 (-18%) | 109.43 (20.07) 100.35 (2.56) | 72.75 (8.86) 57.40 (9.85) |
| Myclobutanil | 9.35 | 0.70 (-30%) | 0.76 (-24%) | 103.67 (9.53) 106.58 (4.79) | 85.47 (10.32) 61.05 (6.27) |
| Promecarb | 9.35 | 0.87 (-13%) | 1.30 (+30%) | 121.14 (8.83) 115.36 (3.64) | 74.10 (8.89) 61.72 (8.79) |
| Azoxystrobin | 9.40 | 0.80 (-20%) | 0.39 (-61%) | 125.81 (6.84) 128.89 (2.04) | 76.08 (9.99) 62.55 (5.75) |
| Dimethylvinphos | 9.42 | 1.04 (+4%) | 1.08 (+8%) | 93.60 (9.47) 104.95 (1.53) | 77.77 (6.90) 62.62 (9.49) |
| Chlorbromuron | 9.43 | 0.76 (-24%) | 1.15 (+15%) | 116.26 (8.87) 104.24 (5.86) | 68.27 (10.05) 63.61 (7.67) |
| Triadimefon | 9.54 | 0.82 (-18%) | 0.80 (-20%) | 112.30 (11.20) 106.41 (4.65) | 86.01 (8.61) 66.01 (10.21) |
| Fenhexamid | 9.57 | 0.68 (-32%) | 0.91 (-9%) | 104.31 (7.65) 95.46 (2.44) | -- -- |
| Pyridaphenthion | 9.58 | 0.92 (-8%) | 1.00 (0%) | 98.26 (9.05) 105.38 (2.49) | 84.34 (9.07) 66.01 (10.21) |
| Tebuconazole | 9.64 | 0.68 (-32%) | 0.85 (-15%) | 97.68 (2.45) 93.90 (1.99) | 75.48 (9.78) 54.60 (8.21) |
| Methoxyfenozide | 9.79 | 0.83 (-17%) | 0.89 (-11%) | 115.26 (9.32) 110.57 (1.75) | 84.53 (12.30) 63.73 (7.92) |
| Diflubenzuron | 9.80 | 0.64 (-36%) | 0.79 (-21%) | 77.06 (18.86) 71.00 (5.63) | 67.23 (14.71) 47.45 (3.10) |
| Penconazole | 9.93 | 0.59 (-41%) | 0.89 (-11%) | 98.79 (8.10) 95.59 (3.57) | 69.88 (12.06) 51.19 (8.91) |
| Iprodione | 9.95 | 1.20 (+20%) | 1.07 (+7%) | 123.92 (20.72) 150.24 (8.85) | -- -- |
| Chromafenozide | 9.97 | 0.86 (-14%) | 0.93 (-7%) | 107.12 (12.03) 103.53 (1.47) | 81.36 (11.26) 62.06 (6.89) |

| Plaguicida | t _R (min) | Efecto matriz QuEChERS* (Δ%) | Efecto matriz MSPD* (Δ%) | Recuperaciones QuEChERS# %Rec (RSD%) | Recuperaciones MSPD# %Rec (RSD%) |
|-------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---|--|
| Marathon | 10.01 | 1.19 (+19%) | 1.60 (+60%) | 44.40 (6.11) 61.87 (4.96) | 28.12 (13.08) 26.27 (12.24) |
| Triazophos | 10.03 | 0.92(-8%) | 0.79 (-21%) | 103.42 (3.14) 100.05 (3.22) | 82.64 (9.69) 67.61 (7.52) |
| Fenoxycarb | 10.10 | 0.73 (-27%) | 1.33 (+33%) | 92.31 (2.55) 85.82 (4.93) | 73.46 (5.83) 59.15 (7.52) |
| Metolachlor | 10.10 | 0.72 (-28%) | 0.94 (-6%) | 107.66 (5.78) 105.27 (3.34) | 71.56 (10.63) 57.90 (6.43) |
| Alachlor | 10.20 | 0.74 (-26%) | 1.07 (+7%) | < LOD 106.20 (5.66) | < LOQ 54.64 (9.74) |
| Triflumizole | 10.20 | 3.02 (+202%) | 4.20 (+320%) | 66.43 (5.58) 57.03 (6.59) | 67.65 (9.30) 47.08 (7.61) |
| Azinphos-ethyl | 10.30 | 0.17 (-83%) | 0.31 (-69%) | < LOQ 56.07 (2.47) | < LOQ 47.61 (7.76) |
| Neburon | 10.30 | 0.71 (-29%) | 0.95 (-5%) | 77.30 (9.92) 84.22 (2.54) | 66.98 (14.54) 53.69 (11.57) |
| Tebufenozide | 10.30 | 0.56 (-44%) | 0.60 (-40%) | 106.02 (13.87) 109.09 (4.64) | 88.22 (10.75) 70.13 (7.63) |
| Edifenphos | 10.35 | 2.42 (142%) | 2.62 (+162%) | 93.25 (4.66) 89.66 (4.42) | 58.80 (5.90) 53.27 (9.19) |
| Chlorfenvinphos | 10.40 | 0.58 (-42%) | 0.76 (-24%) | 105.01 (6.36) 99.13 (3.20) | 78.36 (14.54) 60.55 (8.60) |
| Aclonifen | 10.50 | 0.63 (-37%) | 0.85 (-15%) | < LOQ 60.35 (5.29) | 72.38 (4.57) 61.75 (15.19) |
| Difenoconazole | 10.50 | 0.74 (-26%) | 0.87 (-13%) | 88.49 (3.19) 72.25 (7.31) | 72.02 (10.19) 51.52 (6.51) |
| Kresoxim-methyl | 10.50 | 1.04 (4%) | 1.61 (+61%) | < LOD < LOQ | LOD 61.11 (18.76) |
| Triflumuron | 10.50 | 0.52 (-48%) | 0.84 (-16%) | 79.57 (8.52) 66.71 (6.36) | 64.12 (14.65) 47.50 (7.21) |
| Benalaxyl | 10.60 | 0.73 (-27%) | 0.93 (-7%) | 109.68 (4.22) 98.01 (2.58) | 71.27 (13.64) 60.11 (10.14) |
| Quinalphos | 10.60 | 0.87 (-13%) | 0.82 (-8%) | 81.35 (10.27) 80.98 (2.51) | 77.18 (10.07) 70.95 (7.86) |
| Anilofos | 10.80 | 0.48 (-52%) | 0.62 (-38%) | 97.53 (6.71) 82.47 (5.78) | 80.09 (9.64) 63.22 (8.65) |
| Isofenphos methyl | 10.93 | 0.59 (-41%) | 0.84 (-16%) | 98.89 (8.91) 107.74 (3.37) | 72.18 (11.76) 59.31 (8.54) |
| Diazinon | 10.99 | 0.81 (-19%) | 1.19 (+19%) | 105.40 (3.98) 97.34 (1.93) | 75.29 (11.42) 57.67 (8.28) |
| Indoxacarb | 11.20 | 1.21 (+21%) | 1.21 (+21%) | 94.68 (9.24) 80.18 (10.43) | 68.81 (8.54) 57.75 (11.49) |
| Pirimiphos-methyl | 11.20 | 0.83 (-17%) | 0.96 (-4%) | 91.14 (6.00) 68.10 (3.78) | 74.34 (12.42) 58.58 (7.92) |
| Fluacrypyrim | 11.30 | 0.51 (-49%) | 0.54 (-46%) | 96.31 (3.73) 82.75 (2.91) | 81.98 (11.32) 65.55 (7.58) |
| Trifloxystrobin | 11.30 | 0.94 (-6%) | 0.84 (-16%) | 84.61 (6.43) 69.63 (5.26) | 79.28 (9.47) 64.46 (6.44) |
| Buprofezin | 11.40 | 0.61 (-39%) | 0.81 (-19%) | 63.97 (3.32) 50.92 (9.49) | 59.25 (11.89) 43.05 (9.75) |

| Plaguicida | t _R (min) | Efecto matriz QuEChERS* (Δ%) | Efecto matriz MSPD* (Δ%) | Recuperaciones QuEChERS# %Rec (RSD%) | Recuperaciones MSPD# %Rec (RSD%) |
|--------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--|--|
| Flufenoxuron | 11.90 | 0.70 (-30%) | 0.76 (-24%) | < LOD -- | LOD 41.66 (10.28) |
| Ethion | 12.20 | 0.75 (-25%) | 0.82 (-18%) | 56.21 (7.28) 40.11 (19.97) | 72.15 (14.26) 57.68 (5.64) |
| Hexythiazox | 12.30 | 0.89 (-11%) | 0.82 (-18%) | 41.48 (11.69) 31.46 (17.02) | 65.05 (15.40) 42.07 (6.95) |
| Fenazaquin | 12.50 | 0.61 (-39%) | 0.81 (-19%) | -- -- | 75.39 (9.49) 52.63 (15.07) |

* El efecto matriz fue estimado calculando relaciones pendiente calibración matriz/ pendiente calibración disolvente.

Los estudios de recuperación se llevaron a cabo analizando 6 réplicas de las muestras fortificadas según el método descrito.

Finalmente, con respecto a la limpieza de los extractos y efecto matriz, no se observaron diferencias significativas entre los extractos obtenidos mediante los dos métodos de extracción ensayados. Con los extractos diluidos (0.5 g matriz/mL extracto) no se produjeron problemas durante largas secuencias de análisis ni con la limpieza de la fuente de ionización, ni con la estabilidad o sensibilidad de la señal de los analitos.

IV.6.3.3 Parámetros analíticos.

La linealidad del método fue evaluada con patrones en matriz preparados con los extractos obtenidos mediante los dos métodos de extracción ensayados a nueve niveles de concentración comprendidos en el rango 2 – 2000 µg kg⁻¹. Las rectas de calibración mostraron coeficientes de correlación mayores de 0.995 para el 79.8% de los analitos de interés cuando se usó el método QuEChERS, y para el 81.7% de los analitos cuando se usó el método MSPD. Los rangos lineales (LDRs) se muestran en la **tabla IV.6.3**. En el caso de dimethomorph y bromuconazole, los patrones contenían dos isómeros. Por lo tanto, para esos compuestos las curvas de calibración se obtuvieron representando la suma de las áreas de los dos isómeros frente a la concentración.

Los límites de detección (LODs) se estimaron mediante la inyección de patrones en matriz a un nivel de concentración de 0.5 µg kg⁻¹. LODs y LOQs se establecieron teniendo en cuenta el criterio de la relación señal-ruido (S/N=3 para los límites de detección y S/N=10 para los límites de cuantificación) en la transición “cualificadora” (q). Los resultados obtenidos para cada

plaguicida se muestran en la **tabla IV.6.3**. Los límites de detección obtenidos eran inferiores a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el 89% de los compuestos, llegando a $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ para pirimiphos-methyl, diazinon o buprofezin, usando ambos tratamientos de muestra. Además, los plaguicidas más usados (y detectados) en el cultivo del olivar mostraron límites de detección inferiores a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (simazine, terbuthylazine, desethyl-terbuthylazine). Estos resultados demuestran una sensibilidad suficiente de los dos métodos ensayados para ser aplicados al análisis cuantitativo de plaguicidas en aceitunas a nivel de trazas. Se debe tener en cuenta que recientes mejoras en las etapas de ionización y transmisión de los iones de los instrumentos LC-MS de nueva generación pueden multiplicar la sensibilidad conseguida con el instrumento utilizado en este estudio por un factor de 10.

Tabla IV.6.3. Parámetros analíticos de los métodos LC-MS/MS propuestos: rango lineal (LDR), límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) expresados en $\mu\text{g kg}^{-1}$.

| Plaguicida | QuEChERS | | | MSPD | | |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
| Methamidophos | 3.00 | 9.90 | 3-500 | 6.00 | 19.80 | 6-250 |
| Acephate | 2.00 | 6.60 | 2-500 | 10.00 | 33.00 | 10-250 |
| Thiocyclam | 2.00 | 6.60 | 2-2000 | 2.00 | 6.60 | 2-500 |
| Omethoate | 0.40 | 1.32 | 0.4-2000 | 6.00 | 19.80 | 6-500 |
| Carbendazim | 4.00 | 13.20 | 4-2000 | 0.50 | 1.65 | 0.5-2000 |
| Butoxycarboxim | 4.00 | 13.20 | 4-500 | 2.00 | 6.60 | 2-500 |
| Thiabendazole | 20.00 | 66.00 | 20-500 | 20.00 | 66.00 | 20-2000 |
| Aldicarb sulfone | 2.00 | 6.60 | 2-500 | 1.00 | 3.30 | 1-500 |
| Oxamyl | 1.00 | 3.30 | 1-2000 | 1.00 | 3.30 | 1-2000 |
| Methomyl | 10.00 | 33.00 | 10-500 | 2.00 | 6.60 | 2-500 |
| Monocrotophos | 30.00 | 99.00 | 30-500 | 20.00 | 66.00 | 20-500 |
| Thiamethoxam | 1.40 | 4.62 | 1.4-500 | 0.50 | 1.65 | 0.5-2000 |
| Pirimicarb | 0.40 | 1.32 | 0.4-2000 | 0.16 | 0.53 | 0.16-2000 |
| Metamitron | 3.00 | 9.90 | 3-2000 | 2.00 | 6.60 | 2-2000 |
| Fenuron | 2.40 | 7.92 | 2.4-2000 | 1.00 | 3.30 | 1-500 |
| Chloridazon | 1.00 | 3.30 | 1-500 | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 |
| Imidacloprid | 4.00 | 13.20 | 4-2000 | 1.00 | 3.30 | 1-2000 |
| Dimethoate | 1.40 | 4.62 | 1.4-2000 | 0.60 | 1.98 | 0.6-2000 |
| Acetamiprid | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 | 0.40 | 1.32 | 0.4-250 |
| Thiacloprid | 3.60 | 11.88 | 3.6-2000 | 1.00 | 3.30 | 1-2000 |

| Plaguicida | QuEChERS | | | MSPD | | |
|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
| Aldicarb | 20.00 | 66.00 | 20-500 | 14.00 | 46.20 | 14-500 |
| Bromacil | 3.00 | 9.90 | 3-2000 | 1.40 | 4.62 | 1.4-500 |
| Imazalil | 2.00 | 6.60 | 2-2000 | 1.00 | 3.30 | 1-2000 |
| Monuron | 1.60 | 5.28 | 1.6-500 | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 |
| Oxadixyl | 1.20 | 3.96 | 1.2-500 | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 |
| Simazine | 0.50 | 1.65 | 0.5-2000 | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 |
| Desethyl terbutylazine | 0.20 | 0.66 | 0.2-2000 | 0.10 | 0.33 | 0.1-2000 |
| Dichlorvos | 5.00 | 16.50 | 5-2000 | 1.00 | 3.30 | 1-100 |
| Lenacil | 1.00 | 3.30 | 1-2000 | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 |
| Carbofuran | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-1000 |
| XMC | 4.00 | 13.20 | 4-500 | 4.00 | 13.20 | 4-250 |
| Chlorotoluron | 1.00 | 3.30 | 1-500 | 1.00 | 3.30 | 1-100 |
| Fluometuron | 1.00 | 3.30 | 1-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 |
| Carbaryl | 2.00 | 6.60 | 2-500 | 2.00 | 6.60 | 2-50 |
| Pyrimethanil | 14.00 | 46.20 | 14-2000 | 6.00 | 19.80 | 6-1000 |
| Atrazine | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 |
| Isoproturon | 2.00 | 6.60 | 2-500 | 0.40 | 1.32 | 0.4-250 |
| Deet | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 |
| Metalaxyl | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 | 2.00 | 6.60 | 2-500 |
| Diuron | 14.00 | 46.20 | 14-500 | 2.00 | 6.60 | 2-500 |
| Ethiofencarb | 4.00 | 13.20 | 4-500 | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 |
| Difenoxuron | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 |
| Monolinuron | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 | 0.50 | 1.65 | 0.5-2000 |
| Isoprocab | 2.00 | 6.60 | 2-2000 | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 |
| Metobromuron | 20.00 | 66.00 | 20-2000 | 10.00 | 33.00 | 10-250 |
| Flazasulfuron | 1.00 | 3.30 | 1-2000 | 0.50 | 1.65 | 0.5-1000 |
| Dimethomorph | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 |
| Triadimenol | 10.00 | 33.00 | 10-2000 | 0.50 | 1.65 | 0.5-1000 |
| Ethiprole | 1.00 | 3.30 | 1-2000 | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 |
| Propazine | 0.50 | 1.65 | 0.5-2000 | 0.20 | 0.66 | 0.2-1000 |
| Cyproconazole | 0.50 | 1.65 | 0.5-2000 | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 |
| Prochloraz | 2.00 | 6.60 | 2-2000 | 1.40 | 4.62 | 1.4-1000 |
| Terbutylazine | 0.20 | 0.66 | 0.2-2000 | 0.06 | 0.20 | 0.06-500 |
| Fenobucarb | 6.00 | 19.80 | 6-500 | 1.00 | 3.30 | 1-250 |
| Methidathion | 1.00 | 3.30 | 1-500 | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 |
| Diethofencarb | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-100 |
| Bupirimate | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 |
| Fenamiphos | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 |
| Fenarimol | 2.00 | 6.60 | 2-2000 | 1.00 | 3.30 | 1-500 |
| Linuron | 1.00 | 3.30 | 1-500 | 1.00 | 3.30 | 1-250 |

| Plaguicida | QuEChERS | | | MSPD | | |
|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
| Bromuconazole | 2.00 | 6.60 | 2-2000 | 0.40 | 1.32 | 0.4-2000 |
| Myclobutanil | 1.00 | 3.30 | 1-2000 | 0.20 | 0.66 | 0.2-2000 |
| Promecarb | 0.60 | 1.98 | 0.6-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-250 |
| Azoxystrobin | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 |
| Dimethylvinphos | 2.00 | 6.60 | 2-500 | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 |
| Chlorbromuron | 2.00 | 6.60 | 2-500 | 2.00 | 6.60 | 2-250 |
| Triadimefon | 2.00 | 6.60 | 2-2000 | 2.00 | 6.60 | 2-2000 |
| Fenhexamid | 1.60 | 5.28 | 1.6-500 | 0.60 | 1.98 | 0.6-500 |
| Pyridaphenthion | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 |
| Tebuconazole | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 | 0.50 | 1.65 | 0.5-1000 |
| Methoxyfenozide | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-1000 |
| Diflubenzuron | 1.00 | 3.30 | 1-2000 | 2.00 | 6.60 | 2-1000 |
| Penconazole | 0.30 | 0.99 | 0.3-2000 | 0.20 | 0.66 | 0.2-1000 |
| Iprodione | 2.00 | 6.60 | 2-1000 | 2.00 | 6.60 | 2-1000 |
| Chromafenozide | 2.00 | 6.60 | 2-500 | 6.00 | 19.80 | 6-500 |
| Malathion | 1.60 | 5.28 | 1.6-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 |
| Triazophos | 2.00 | 6.60 | 2-500 | 1.00 | 3.30 | 1-2000 |
| Fenoxycarb | 2.00 | 6.60 | 2-500 | 6.00 | 19.80 | 6-1000 |
| Metolachlor | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 | 0.06 | 0.20 | 0.06-500 |
| Alachlor | 20.00 | 66.00 | 20-500 | 6.00 | 19.80 | 6-250 |
| Triflumizole | 1.00 | 3.30 | 1-2000 | 4.00 | 13.20 | 4-1000 |
| Azinphos-ethyl | 6.00 | 19.80 | 6-500 | 6.00 | 19.80 | 6-100 |
| Neburon | 1.40 | 4.62 | 1.4-500 | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 |
| Tebufenozide | 1.00 | 3.30 | 1-500 | 2.00 | 6.60 | 2-500 |
| Edifenphos | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 |
| Chlorfenvinphos | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 |
| Aclonifen | 6.00 | 19.80 | 6-2000 | 2.00 | 6.60 | 2-500 |
| Difenoconazole | 1.00 | 3.30 | 1-2000 | 0.20 | 0.66 | 0.2-2000 |
| Kresoxim-methyl | 50.00 | 165.00 | 50-500 | 10.00 | 33.00 | 10-250 |
| Triflumuron | 1.00 | 3.30 | 1-500 | 0.60 | 1.98 | 0.6-250 |
| Benalaxyl | 0.50 | 1.65 | 0.5-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 |
| Quinalphos | 0.40 | 1.32 | 0.4-2000 | 0.20 | 0.66 | 0.2-2000 |
| Anilofos | 0.20 | 0.66 | 0.2-2000 | 0.20 | 0.66 | 0.2-500 |
| Isufenphos methyl | 1.00 | 3.30 | 1-2000 | 0.50 | 1.65 | 0.5-1000 |
| Diazinon | 0.06 | 0.20 | 0.06-500 | 0.06 | 0.20 | 0.06-500 |
| Indoxacarb | 1.00 | 3.30 | 1-2000 | 0.40 | 1.32 | 0.4-2000 |
| Pirimiphos-methyl | 0.06 | 0.20 | 0.06-2000 | 0.06 | 0.20 | 0.06-1000 |
| Fluacrypyrim | 0.10 | 0.33 | 0.1-500 | 0.06 | 0.20 | 0.06-500 |
| Trifloxystrobin | 0.20 | 0.66 | 0.2-250 | 0.20 | 0.66 | 0.2-1000 |
| Buprofezin | 0.06 | 0.20 | 0.06-500 | 0.06 | 0.20 | 0.06-500 |

| Plaguicida | QuEChERS | | | MSPD | | |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
| Flufenoxuron | 20.00 | 66.00 | 20-2000 | 10.00 | 33.00 | 10-2000 |
| Ethion | 1.00 | 3.30 | 1-1000 | 0.40 | 1.32 | 0.4-1000 |
| Hexythiazox | 1.00 | 3.30 | 1-1000 | 1.00 | 3.30 | 1-1000 |
| Fenazaquin | 0.10 | 0.33 | 0.1-500 | 0.20 | 0.66 | 0.2-250 |

El efecto matriz, que puede tener un importante impacto en la calidad de los datos cuantitativos generados por el método, también fue estudiado. Los componentes de la matriz pueden aumentar o reducir (incluso suprimir) la señal de los analitos. El problema se origina en la fuente de ionización, cuando los constituyentes de la matriz influyen sobre la ionización de los analitos con los que coeluyen, causando la supresión de la ionización de los mismos. Para evaluar el impacto de la matriz en el aumento o disminución de la señal de los analitos (comparada con la señal de los mismos en patrones preparados en disolvente), las pendientes de las rectas de calibración por adición de patrón (patrones en matriz) se compararon con las pendientes de las rectas de calibrado en disolvente, calculando relaciones pendiente calibrado matriz/pendiente calibrado disolvente para cada uno de los 104 compuestos analizados. Como se puede ver en la **tabla IV.6.2**, la señal de los analitos se veía afectada en la mayoría de los casos (relación de pendientes $\neq 1$), usando ambos protocolos de tratamiento de muestra.

La mayoría de los compuestos analizados mostraron supresión de la señal con ambos métodos de extracción. Sin embargo, se observaron diferencias entre los dos métodos de extracción ensayados en cuanto a intensidad del efecto matriz. En la **figura IV.6.6** aparece el efecto matriz representado en porcentaje. Como se puede ver en la misma, cuando se emplea la MSPD el 51% de los compuestos presentaba un efecto matriz suave ($\leq 20\%$, lo que se corresponde con relaciones de pendientes comprendidas entre 0.80 y 1.20 en la tabla IV.6.2). Por otro lado, el 24% de los analitos mostraban un efecto matriz del 50% o mayor, lo que significa que la señal aumenta al doble o disminuye a la mitad (o más) en los patrones en matriz, comparado con la señal obtenida en disolvente. Cuando se utiliza la metodología QuEChERS para preparar los extractos, los valores del efecto matriz son los contrarios: se observa un efecto matriz suave

para el 26% de los compuestos y un efecto matriz acusado (del 50% o mayor) para el 41% de los analitos.

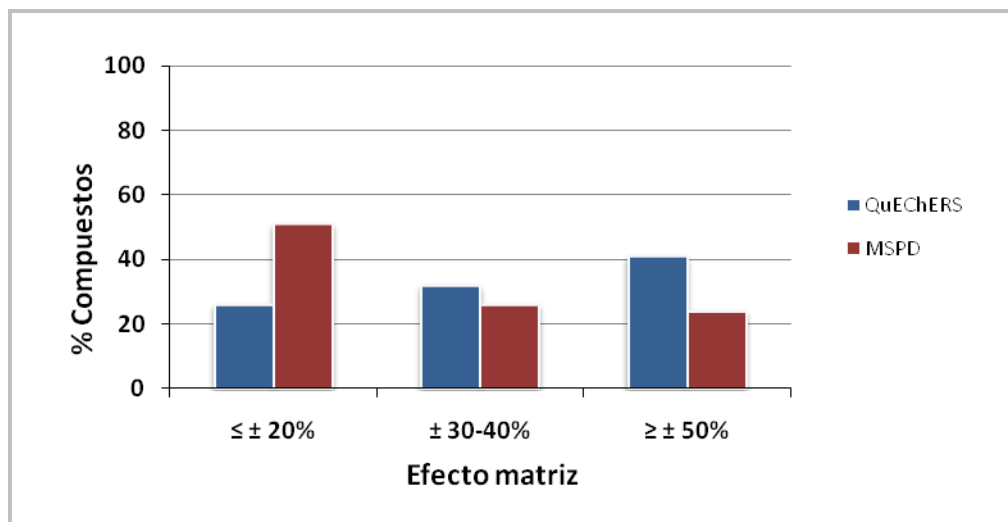


Figura IV.6.6. Distribución del efecto matriz (expresado en términos de porcentaje absoluto de incremento o disminución de la señal) obtenido para los 104 plaguicidas seleccionados, utilizando los dos métodos ensayados.

Finalmente, el método propuesto fue aplicado a dos muestras de aceitunas recogidas en diferentes zonas de la provincia de Jaén. Se encontraron resultados positivos para simazine, terbuthylazine y desethyl terbuthylazine, usando ambos métodos de preparación de muestra.

IV.6.4 Conclusiones

Teniendo en cuenta la escasez de métodos multi-residuo de gran alcance para la determinación de plaguicidas en aceituna (dada la complejidad de la matriz), dos de los protocolos de tratamiento de muestra ampliamente usados para la extracción de plaguicidas en frutas y vegetales (y previamente validados para un reducido número de compuestos en aceite de oliva y aceituna) han sido comparados: QuEChERS y MSPD. A la vista de los resultados obtenidos para los estudios de recuperación y el efecto matriz, el método QuEChERS se encontró más apropiado que la MSPD para el análisis multi-residuo de gran alcance de plaguicidas en aceitunas. Los dos métodos propuestos fueron aplicados satisfactoriamente al análisis de muestras reales de aceituna, revelando la presencia de algunas de las especies de interés a niveles de concentración de $\mu\text{g kg}^{-1}$. Teniendo en cuenta

que la mayoría de los plaguicidas estudiados son representativos de familias de compuestos con propiedades fisicoquímicas similares, la metodología propuesta podría ser adecuada para la extracción de un gran número de compuestos (p.ej: 250-300).

En este trabajo también se incluye la evaluación de un nuevo software que permite agilizar el desarrollo de métodos MRM. Está basado en el uso de los llamados “segmentos de tiempo dinámicos” (DMRM), presentando diferentes ventajas con respecto al método clásico basado en la elaboración de diferentes segmentos de tiempo con transiciones duplicadas para los compuestos próximos al cambio de segmento. El uso de MRM dinámico supone una gran mejora en el desarrollo de métodos LC-MS/MS cuantitativos. La creación y optimización del método se simplifica y se agiliza, ya que no es necesaria la creación de segmentos de tiempo fijos que contengan grupos de transiciones MRM. Los inconvenientes asociados al monitoreo de especies que coeluyen o a la inclusión de nuevas transiciones en el método también son eliminadas con el uso de DMRM. Además, se evita el riesgo de pérdida de analitos debido a pequeños cambios en su tiempo de retención. En este estudio se ha utilizado esta herramienta de software para el desarrollo de un método multi-residuo para la determinación de más de un centenar de plaguicidas en una matriz tan complicada como la de aceituna.

CAPÍTULO IV.7



Desarrollo de un método multi-residuo automático para el análisis de compuestos volátiles aromáticos monocíclicos (BTEXS) mediante la técnica de espacio de cabeza combinada cromatografía de gases/espectrometría de masas (HS-GC-MS).

IV.7. DESARROLLO DE UN MÉTODO MULTI-RESIDUO AUTOMÁTICO PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES AROMÁTICOS MONOCÍCLICOS (BTEXS) EN ACEITE DE OLIVA Y ACEITUNA MEDIANTE LA TÉCNICA DE ESPACIO DE CABEZA COMBINADA CON CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS (HS-GC-MS).

IV.7.1. Resumen

Se ha desarrollado un método automático, directo y rápido para la determinación de BTEXS (benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-, *m*- y *p*-xileno, estireno) en aceite de oliva y, por primera vez, en aceituna. La separación, identificación y cuantificación de los compuestos se llevó a cabo mediante espacio de cabeza/cromatografía de gases/espectrometría de masas (HS-GC-MS) en modo SIM (*selected ion monitoring*). Para aceite de oliva no fue necesaria ninguna etapa de tratamiento de muestra. La muestra de aceite de oliva se coloca directamente en un vial y es procesada automáticamente mediante HS-GC-MS. Para el análisis de aceituna se propone una preparación de muestra mínima, que consiste en una molienda y la adición de agua y cloruro potásico. Las variables químicas (adición de disolventes y sales como modificadores) e instrumentales fueron optimizadas utilizando muestras de aceite de oliva y aceituna fortificadas a un nivel de concentración de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (de cada uno de los compuestos de interés). El método fue validado para asegurar la calidad de los resultados. La precisión fue satisfactoria, con desviaciones estándar (RSD%) en el rango 1.6-5.2 % y 10.3-14.2 % para aceite de oliva y aceituna, respectivamente. Los límites de detección obtenidos estaban en el rango 0.1-7.4 y 0.4-4.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para aceite de oliva y aceituna, respectivamente. El método propuesto fue aplicado al análisis de muestras reales tanto de aceite de oliva como de aceituna, encontrando varios de los compuestos estudiados, con concentraciones totales de BTEXS en el rango 23-332 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 4.2-87 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para aceite de oliva y aceituna, respectivamente.

IV.7.2. Experimental

IV.7.2.1. Parámetros instrumentales

En este estudio se utilizó el equipo GC-MS Varian 300MS descrito en el capítulo III. Los valores óptimos elegidos para los parámetros instrumentales fueron los siguientes:

a) *Condiciones del espacio de cabeza:*

- Tiempo de incubación: 30 min
- Temperatura de incubación: 90 °C
- Velocidad de agitación: 700 r.p.m.

b) *Condiciones cromatográficas:*

- Gradiente: durante 10 min se mantiene constante una temperatura de 30 °C. Transcurrido ese tiempo, aumenta hasta 60 °C a 5 °C/min, se mantiene constante un minuto y luego aumenta hasta 200 °C a 20 °C/min. Finalmente, se mantiene constante a 200 °C durante 2 min.
- Velocidad de flujo de He: 1.5 mL min⁻¹.
- Columna: 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano. 30 m × 0.25 mm d.i. y 0.25 µm de espesor de película (Varian FactorFour VF-5ms).
- Volumen de inyección: 1 mL del espacio de cabeza del vial. (splitless)
- Liner: abierto, desactivado, 54 mm x 5 mm d.e. x 3.4 mm d.i. (Varian Inc.)
- Temperatura del inyector: 200 °C

c) *Espectrómetro de masas:*

- Temperatura de la línea de transferencia: 280 °C
- Fuente: EI (+)
- Energía de los electrones generados en la fuente: 70 eV
- Temperatura de la fuente: 250 °C
- Corriente del filamento: 50 µA
- Tiempo de retardo para el encendido del filamento y el detector: 2.3 min
- Temperatura del analizador: 40 °C
- Voltaje del multiplicador: 1300 V

IV.7.2.2. Procedimiento general

- *Determinación de BTEXS en aceite de oliva y aceituna mediante HS-GC-MS:*

Muestreo de aceite. Se pesaron 12.5 g de aceite de oliva (15 mL aprox.) en un vial de 20 mL que contenía un imán recubierto de teflón para su posterior agitación. El vial fue inmediatamente tapado con un sello magnético que contenía un septum de silicona/PTFE.

Muestreo de aceitunas. Aproximadamente 500 g de aceitunas fueron trituradas en un molino especialmente diseñado para la molienda de aceituna (ver capítulo III). Como resultado se obtiene una pasta homogénea que es recogida en un recipiente apropiado. La molienda se realizó a temperatura ambiente y no se observó un calentamiento de la pasta durante el proceso.

Se pesan 5 g de pasta de aceituna en un vial de 20 mL que contenía un imán recubierto de teflón para su posterior agitación. Se añaden 10 mL de agua ultrapura y 1.5 g de KCl. El vial fue inmediatamente tapado con un sello magnético que contenía un septum de silicona/PTFE.

Una vez que el vial que contenía la muestra (bien de aceite o de aceituna) fue sellado, se situó en el muestreador automático. El brazo robótico colocaba automáticamente el vial en el horno para su calentamiento (con agitación a 700 r.p.m.) a 90°C durante 30 min. Este tiempo era suficiente para que se produjera una situación de equilibrio entre la muestra y la fase gas que quedaba en la parte superior del vial (espacio de cabeza). Posteriormente, se inyectaba (también sin intervención del operador) 1 mL del espacio de cabeza en el GC-MS para su análisis en modo SIM (*selected ion monitoring*).

- *Calibración por adición de patrón:*

Calibrado en matriz para aceite de oliva. Se prepararon muestras de aceite de oliva fortificadas con la mezcla de compuestos a diferentes concentraciones: 5, 10, 20, 30, 50, 80, 100 y 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para ello, se pesaban 12.5 g de aceite de oliva en un vial y se le añadía el volumen apropiado de la disolución de trabajo que contenía la mezcla de BTEXS en metanol.

Calibrado en matriz para aceituna. Porciones representativas de la pasta de aceituna homogeneizada se fortificaron añadiendo el volumen apropiado de la disolución de trabajo para conseguir 5, 10, 20, 30, 50, 80, 100 y 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de la mezcla de BTEXS. Cada una de las muestras fortificadas se agitó durante 30 minutos para conseguir una mezcla homogénea.

Luego se conservaron a + 4 °C durante una noche. Finalmente se analizaron 3 réplicas (de 5 g cada una) de cada nivel de concentración mediante el método HS-GC-MS propuesto.

- **Fortificación de las muestras para el estudio de precisión:**

Una porción representativa y homogénea de la muestra de aceite de oliva o de pasta de aceituna (según el análisis correspondiente) se pesó y se fortificó con la cantidad apropiada de disolución de trabajo para conseguir 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de la mezcla de BTEXS en la muestra fortificada. Después se agitó durante 30 minutos para conseguir una mezcla homogénea. Luego se conservaron a + 4°C durante una noche. Finalmente se analizaron 8 réplicas mediante el método HS-GC-MS propuesto.

Un procedimiento análogo al descrito se llevó a cabo para el estudio de precisión a un nivel de concentración de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

IV.7.3. Resultados y discusión

IV.7.3.1. Optimización del método GC-MS.

La optimización y selección de los parámetros cromatográficos (flujo de gas portador, temperatura del inyector, modo de inyección, gradiente de temperatura y volumen de inyección del espacio de cabeza) se llevó a cabo mediante el análisis de una muestra de aceite de oliva fortificada a un nivel de concentración de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Se estudiaron diferentes condiciones para la temperatura del horno y del inyector, así como para el *split*, al objeto de obtener una buena separación de los picos cromatográficos correspondientes a los BTEXS. Un resumen de las condiciones ensayadas se muestra en la **tabla IV.7.1**. La mejor separación de los picos y la mayor sensibilidad se consiguieron con el método FS-3, aunque dos coeluciones fueron inevitables: 1) *m*-xileno y *p*-xileno (11.3 min); 2) *o*-xileno y estireno (12.6 min). La primera no se puede resolver mediante el espectro de masas puesto que se trata de dos isómeros con la misma relación masa-carga (*m/z*). Sin embargo, el par *o*-xileno/estireno se resuelve mediante la monitorización de iones específicos para cada compuesto (*m/z* 91, 105 y 106 para *o*-xileno, y *m/z* 78, 103 y 104 para estireno), obteniendo cromatogramas SIM bien

diferenciados que permiten la correcta identificación y cuantificación de los compuestos (ver **figura IV.7.1**). El solapamiento de los isómeros de xileno ha sido previamente descrito por otros autores [248], pudiendo ser resuelto mediante el uso de una columna más larga [249] o una columna quiral [250]. Para nuestro estudio se decidió desarrollar un método estándar que pudiera implementarse en cualquier laboratorio, utilizando una columna capilar estándar y cuantificando las muestras mediante la suma de los dos isómeros. Una vez que se establecieron los valores óptimos para los parámetros cromatográficos, se eligieron los iones más abundantes de cada uno de los compuestos de interés para establecer el método de adquisición. Los iones SIM elegidos para los BTEXS, así como sus abundancias relativas y tiempos de retención en las condiciones cromatográficas óptimas se muestran en la **tabla IV.7.2**.

Tabla IV.7.1. Parámetros cromatográficos estudiados para la optimización de la separación de BTEXS. Las condiciones FS-3 fueron las seleccionadas para el procedimiento final, correspondiendo el parámetro “delay” al tiempo que el detector permanece apagado al comienzo del análisis para evitar que se dañe con la llegada del frente del disolvente.

| Método | Flujo columna (mL/min) | Temperatura del inyector (°C) | Split | Temperatura del horno (°C) | Volumen de inyección (HS) (mL) | “Delay” (min) |
|--------|------------------------|-------------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------|
| FS-1 | 1.5 | PTV-1 ⁽¹⁾ | S-1 ⁽²⁾ | R-1 ⁽⁴⁾ | 1 | 1.6 |
| FS-2 | 1.5 | 180 | 1:15 | R-2 ⁽⁵⁾ | 1 | 2.0 |
| FS-3 | 1.5 | 200 | S-2 ⁽³⁾ | R-3 ⁽⁶⁾ | 1 | 2.3 |
| FS-4 | 1.5 | 200 | S-2 ⁽³⁾ | R-4 ⁽⁷⁾ | 1 | 2.3 |

⁽¹⁾ **PTV-1:** comienza a 70°C (1 min cte.), aumenta a 150°C/min hasta alcanzar 200 °C. Luego permanece constante durante 10 min.

⁽²⁾ **S-1:** comienza a 1:80 durante 0.5 min, seguido de 1:20 durante 4.5 min; finalmente 1:100.

⁽³⁾ **S-2:** Al inicio está en posición “off” (splitless), seguido de 1:0.01 durante 15 min; finalmente 1:100.

⁽⁴⁾ **R-1:** comienza a 35 °C (constante 3 min), aumenta a 5.0 °C/min hasta alcanzar 60 °C y permanece constante durante 1 min. Finalmente aumenta hasta 200 °C a 20°C/min, y se mantuvo durante 2 min.

⁽⁵⁾ **R-2:** comienza a 30 °C (constante 3 min), aumenta a 5.0 °C/min hasta alcanzar 60 °C y permanece constante durante 1 min. Finalmente aumenta hasta 200 °C a 20°C/min, y se mantuvo durante 2 min.

⁽⁶⁾ **R-3:** comienza a 35 °C (constante 10 min), aumenta a 5.0 °C/min hasta alcanzar 60 °C y permanece constante durante 1 min. Finalmente aumenta hasta 200 °C a 20°C/min, y se mantuvo durante 2 min.

⁽⁷⁾ **R-4:** comienza a 27 °C (constante 10 min), aumenta a 5.0 °C/min hasta alcanzar 60 °C y permanece constante durante 1 min. Finalmente aumenta hasta 200 °C a 20°C/min, y se mantuvo durante 2 min.

A modo de ejemplo, en la **figura IV.7.1** se muestra el cromatograma de iones totales (TIC) y los cromatogramas SIM para a) una muestra de aceite de oliva fortificada con la mezcla de BTEXS a un nivel de concentración de 20 µg kg⁻¹ y b) una muestra de aceituna fortificada al mismo nivel de concentración (20 µg kg⁻¹).

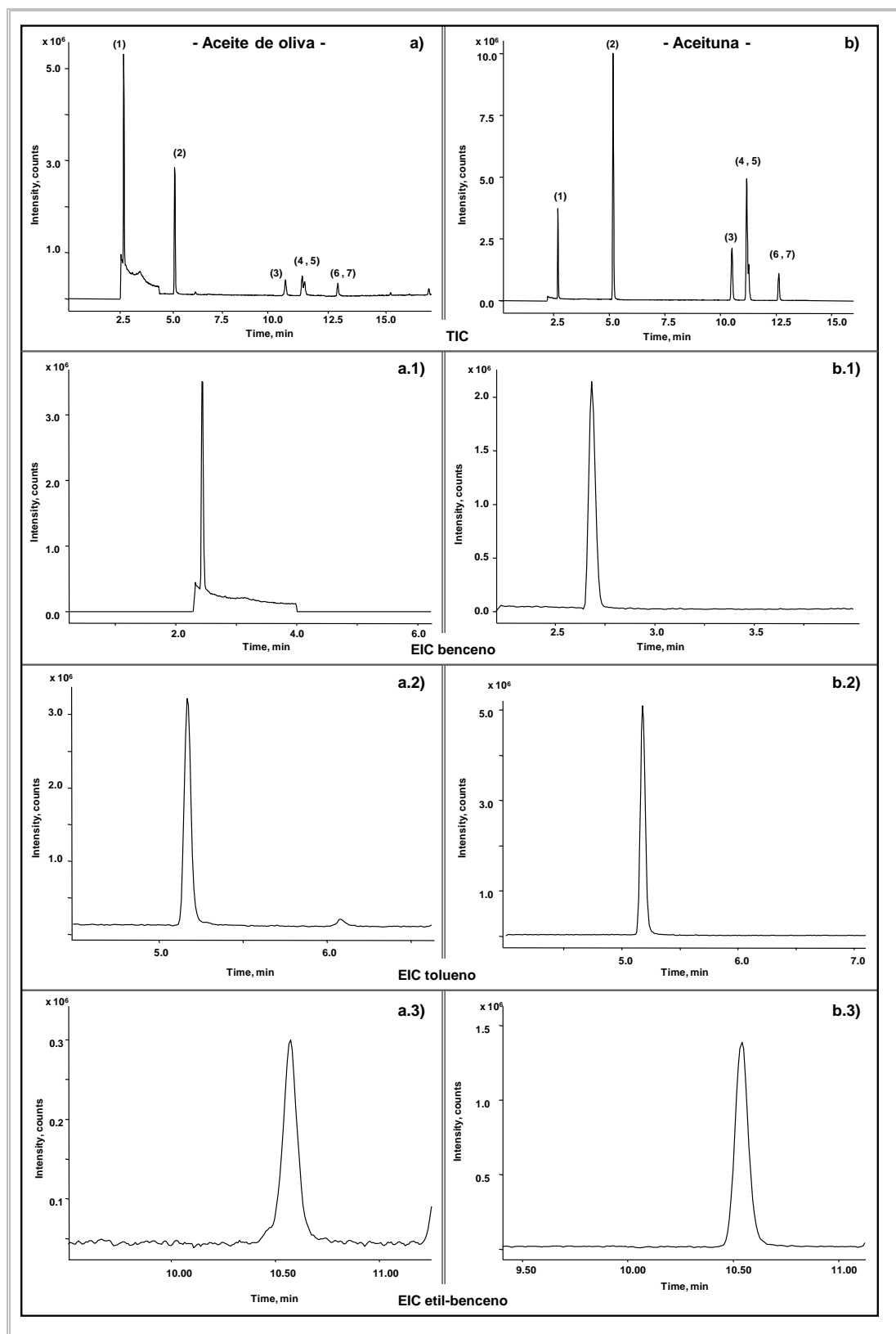


Figura IV.7.1. Cromatograma de iones totales (TIC) y cromatogramas SIM de **(a)** un aceite de oliva fortificado con $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de la mezcla de BTEXS y **(b)** una muestra de pasta de aceituna fortificada con la mezcla de BTEXS al mismo nivel de concentración ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$).

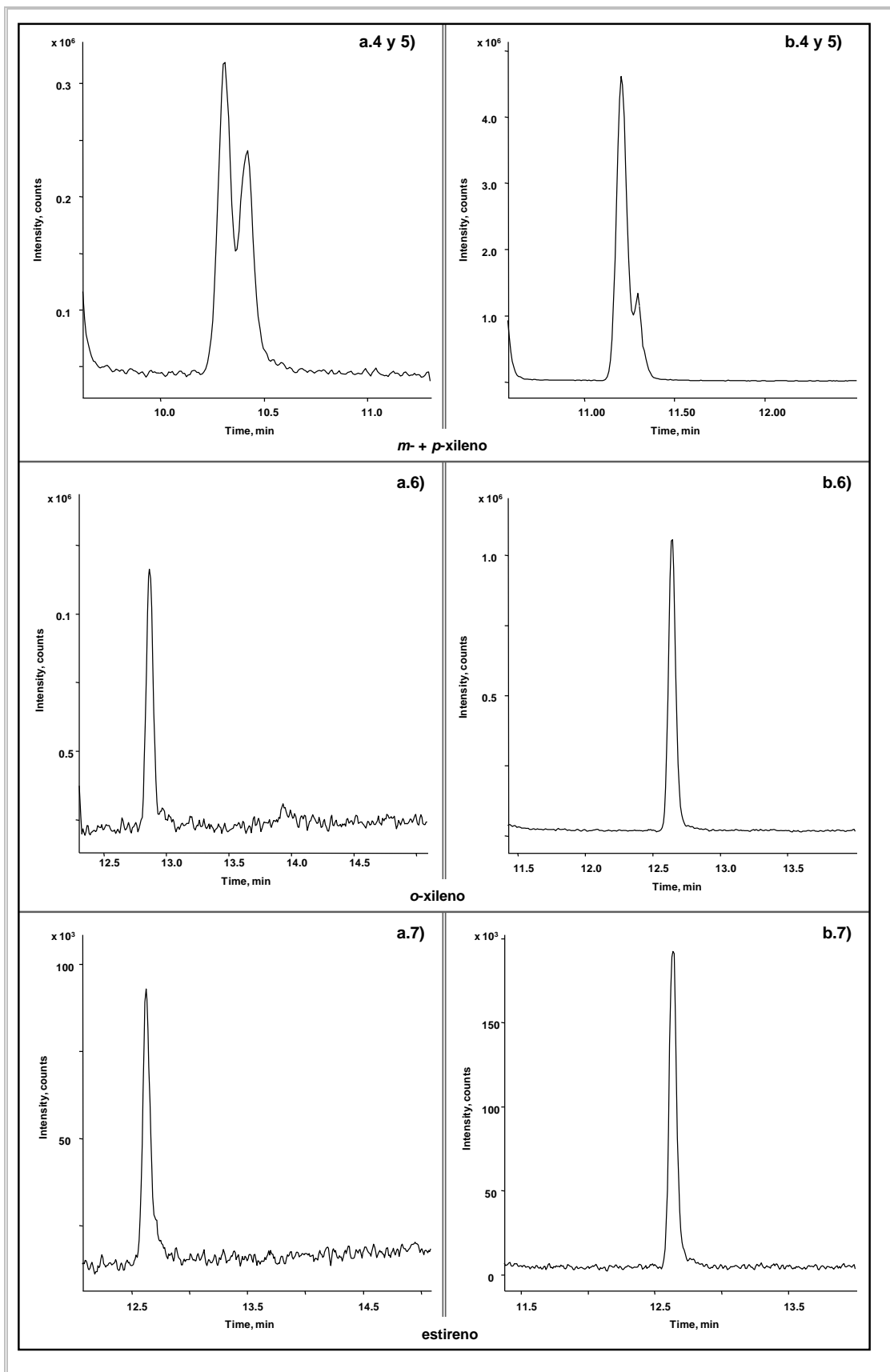


Figura IV.7.1. (cont.)

Tabla IV.7.2. Tiempos de retención, iones SIM seleccionados para BTEXS y abundancia relativa.

| Compuesto | MW ¹ | t _R (min) | Iones SIM (Abundancia rel. %) | | |
|-------------|-----------------|-------------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------|
| | | | Cuantificación | Confirmación (Cualificadores) | |
| Benceno | 78 | 2.7 | 78 (100) | 77 (23) | 51 (30) |
| Tolueno | 92 | 5.2 | 91 (100) | 92 (66) | 65 (13) |
| Etilbenceno | 106 | 10.5 | 91 (100) | 106 (36) | 56 (29) |
| m-Xileno | 106 | 11.2 | 91 (100) | 106 (67) | 105 (27) |
| p-Xileno | 106 | 11.3 | 91 (100) | 106 (68.5) | 105 (46) |
| o-Xileno | 106 | 12.6 | 91 (100) | 106 (50) | 105 (21.5) |
| Estireno | 104 | 12.6 | 104 (100) | 103 (64) | 78 (15) |

¹ Masa molecular

IV.7.3.2. Optimización de las variables del espacio de cabeza y la adición de modificadores químicos.

La optimización de las variables del espacio de cabeza (HS) se llevó a cabo con un módulo de muestreo del espacio de cabeza acoplado al cromatógrafo, de modo que el método HS-GC-MS está completamente automatizado (calentamiento, agitación, inyección, etc). Los principales parámetros de la técnica de espacio de cabeza que tienen que ser estudiados cuidadosamente son el volumen o peso de muestra, temperatura y tiempo de calentamiento o incubación, y la velocidad de agitación magnética. Además, se deben añadir algunos modificadores para adquirir una mayor sensibilidad.

a) Aceite de oliva. La optimización de las variables del espacio de cabeza se llevó a cabo con una muestra fortificada con 50 µg kg⁻¹ de los compuestos estudiados. En los estudios preliminares se utilizaron 10 g de muestra.

- El *tiempo de incubación* se evaluó en el rango 20-40 min. La señal aumentaba con el tiempo de equilibrado de la muestra dentro del horno, pero valores de tiempo mayores de 30 min conducían a un descenso en la señal analítica (ver **figura IV.7.2**).

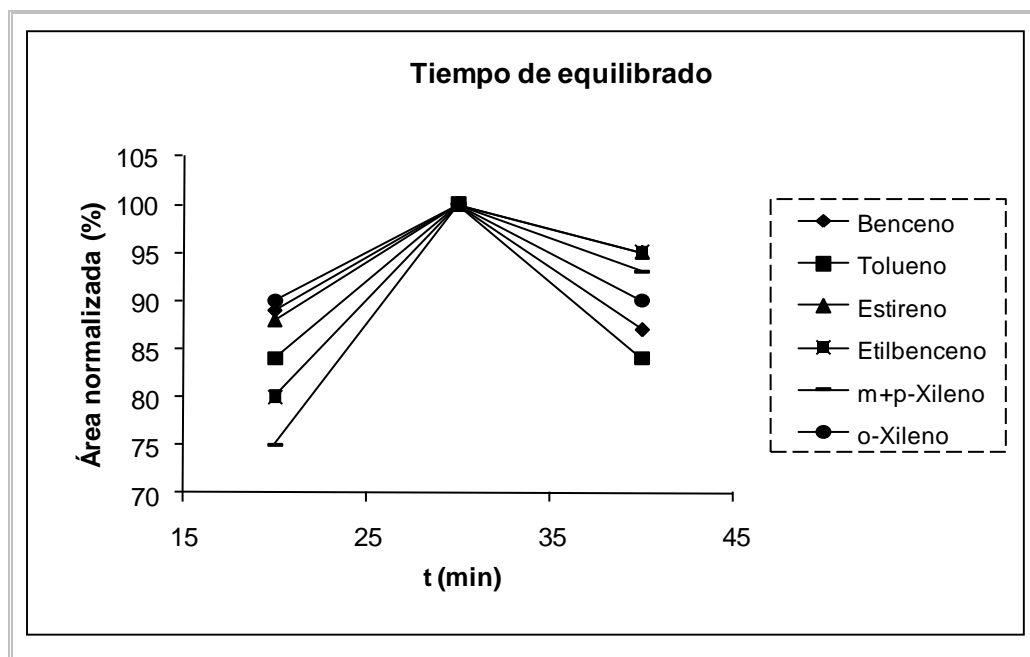


Figura IV.7.2. Optimización del tiempo de equilibrio utilizando un aceite de olive fortificado con $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de la mezcla de BTEXS.

- La *temperatura de incubación* se estudió en el rango 75 - 90 °C y la señal aumentaba con la temperatura del horno. Por lo tanto, se estableció 90 °C como el valor óptimo.
- La *velocidad de agitación magnética* fue estudiada en el rango 600-750 rpm. La señal aumentaba ligeramente a medida que aumentaba la velocidad de agitación pero valores por encima de 700 rpm mantenían la señal constante, por lo que se eligió 700 rpm como valor óptimo.
- La *cantidad de muestra* se estudió en el intervalo 5 – 12.5 g, observándose un incremento de la señal con el volumen de muestra. Por tanto, 12.5 g se consideró como valor óptimo.
- Finalmente se evaluó el efecto de la *adición de modificadores* como *disolventes orgánicos*. Metanol, n-hexano y acetato de etilo fueron añadidos (800 μL) a las muestras de aceite de oliva y los resultados fueron comparados con los obtenidos para muestras “no modificadas”. La respuesta de benceno aumentaba ligeramente (< 10%) cuando se añadía n-hexano a la muestra como modificador. Sin embargo, para el resto de analitos se obtenían mejores sensibilidades cuando no se añadía ningún modificador. Por lo tanto, no se añadió ningún modificador para los siguientes análisis de aceite de oliva.

b) Aceitunas. Para el análisis de las muestras de aceituna se usaron los parámetros de espacio de cabeza optimizados para aceite de oliva, excepto la cantidad de muestra y los aditivos

(tiempo de incubación: 30 min; temperatura de incubación: 90°C; velocidad de agitación magnética: 700 rpm). Para llevar a cabo la optimización de los aditivos se usó una muestra de pasta de aceituna fortificada con la mezcla de BTEXS a un nivel de concentración de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Se usó una porción representativa de 5 g para llevar a cabo los experimentos. Sin embargo, las muestras sólidas son difíciles de agitar con un imán, por lo que se estudió la adición de agua ultrapura para facilitar un calentamiento y agitación de la muestra homogéneos. Como resultado, se obtuvo una mejor sensibilidad y precisión cuando la pasta de aceituna se mezclaba con agua.

- Se estudió la *adición de agua* en el rango 2.5 – 10 mL (para 5 g de aceituna) y se observó que la señal aumentaba a medida que lo hacía el volumen de agua añadida. Por lo tanto, se seleccionaron 10 mL de agua ultrapura como valor óptimo.
- El efecto de la adición de ácido (ácido nítrico) y KCl también fueron estudiados. El uso de *ácido nítrico* 0.1 M no provocaba ninguna mejora. Por el contrario, la adición de *cloruro potásico* provocaba un aumento en la señal de los analitos (ver **figura IV.7.3**) y una mejor reproducibilidad entre réplicas de la misma muestra debido a que la concentración de KCl (fuerza iónica) fomenta la transferencia de moléculas relativamente apolares a la fase gaseosa, mejorándose el método analítico. Como se muestra en la **figura IV.7.3**, este efecto es ligeramente más acusado en el benceno. La adición de KCl se evaluó en el rango 0.5 – 2 g. La señal aumentaba con la cantidad de sal, pero por encima de 1.5 g el aumento no era significativo, por lo que se eligió 1.5 g como valor óptimo.

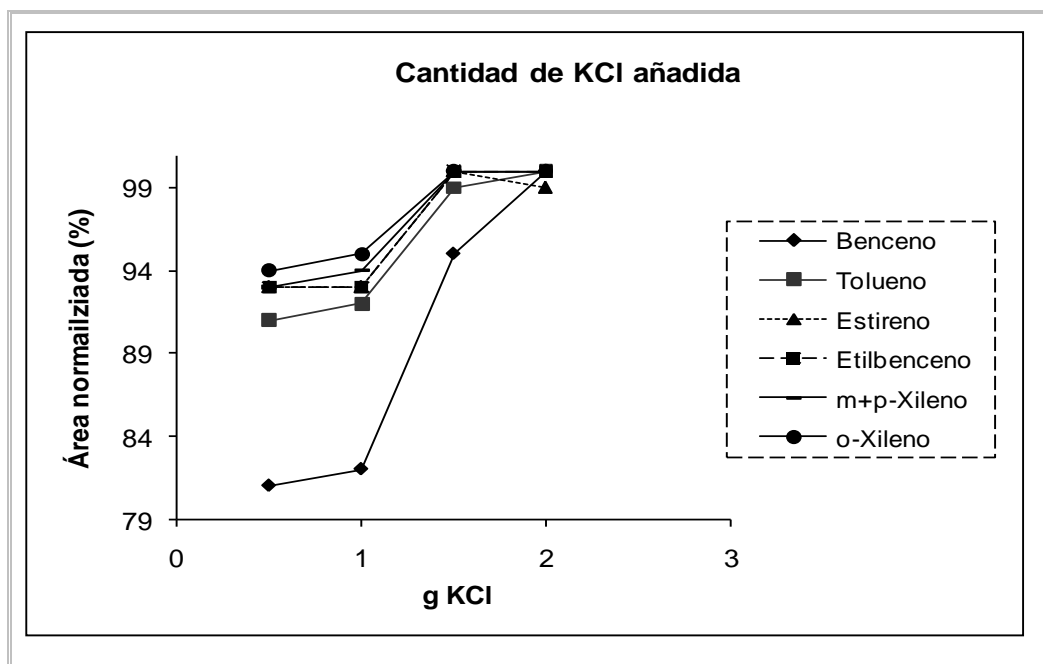


Figura IV.7.3. Optimización de la adición de KCl a una muestra homogeneizada de pasta de aceituna fortificada a un nivel de concentración de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

IV.7.3.3. Parámetros analíticos.

Todos los patrones en matriz se analizaron por triplicado y las curvas de calibración fueron construidas utilizando el área promedio de cada nivel de concentración. Las curvas de calibración se obtuvieron representando para cada analito el área del pico frente a la concentración del mismo, excepto en el caso de *m*- y *p*-xileno, que fueron identificados y cuantificados juntos debido a que sus picos cromatográficos estaban parcialmente solapados. Las curvas de calibración se construyeron en el rango $10 - 500 \mu\text{g kg}^{-1}$, obteniéndose coeficientes de correlación entre 0.9961 y 0.9994 en aceite de oliva, y mayores de 0.997 para todos los analitos en aceituna. Los límites de detección y cuantificación fueron estimados utilizando el criterio de la señal/ruido ($S/N = 3$ para LOD y $S/N = 10$ para LOQ) a partir de muestras de aceite de oliva y aceituna fortificadas a bajos niveles de concentración ($5 - 10 \mu\text{g kg}^{-1}$). El rango lineal y los coeficientes de regresión se muestran en la **tabla IV.7.3**, así como los límites de detección y cuantificación.

Tabla IV.7.3. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), e intervalo lineal (LDR) obtenidos en aceite de oliva y aceituna mediante el método propuesto.

| Compuesto | LODs ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | LOQs ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | LDR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | Coeficiente de regresión (r) | |
|---------------------|--------------------------------|--------------|--------------------------------|--------------|-------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|
| | Aceituna | Aceite oliva | Aceituna | Aceite oliva | Aceituna | Aceite oliva | Aceituna | Aceite oliva |
| Benceno | 6.1 | 0.5 | 20.0 | 2.2 | 10-500 | 10-500 | 0.9975 | 0.9994 |
| Tolueno | 7.4 | 0.4 | 24.4 | 1.25 | 10-500 | 10-500 | 0.9993 | 0.9979 |
| Etilbenceno | 0.1 | 3.7 | 0.4 | 14.4 | 10-500 | 10-500 | 0.9997 | 0.9972 |
| m-Xileno + p-Xileno | 0.3 | 4.4 | 1.0 | 15.0 | 10-500 | 10-500 | 0.9998 | 0.9974 |
| o-Xileno | 1.0 | 2.6 | 3.3 | 10.0 | 10-500 | 10-500 | 0.9997 | 0.9993 |
| Estireno | 0.6 | 3.5 | 2.1 | 13.3 | 10-500 | 10-500 | 0.9998 | 0.9961 |

Se realizó un test de precisión tanto en muestras de aceite de oliva como de aceitunas. El estudio se llevó a cabo a dos niveles de concentración, 10 y 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=8), siguiendo el proceso de fortificación descrito en el apartado IV.7.2.2. La precisión fue satisfactoria, con desviaciones estándar (RSD%) en el rango 1.6 – 5.2% para aceite de oliva y 10.3 – 14.2% para aceituna (ver **tabla IV.7.4**). Los valores de desviación estándar obtenidos para aceituna eran mayores que los obtenidos para aceite de oliva debido a la dificultad de homogeneización de la pasta de aceituna con los huesos, lo que provoca una mayor incertidumbre.

Tabla IV.7.4. Estudios de reproducibilidad en aceite de oliva y aceituna.

| Compuesto | 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (RSD%) | | 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (RSD%) | |
|---------------------|---------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------|
| | Aceituna | Aceite oliva | Aceituna | Aceite oliva |
| Benceno | 13.30 | 5.23 | 12.71 | 4.55 |
| Tolueno | 10.09 | 3.05 | 12.48 | 2.39 |
| Etilbenceno | 13.54 | 4.84 | 10.32 | 4.21 |
| m-Xileno + p-Xileno | 14.20 | 3.71 | 10.41 | 4.42 |
| o-Xileno | 12.40 | 3.95 | 11.68 | 4.41 |
| Estireno | 10.91 | 2.36 | 11.81 | 1.61 |

IV.7.3.4. Aplicación del método desarrollado a muestras reales.

El método propuesto fue aplicado al análisis de 13 muestras de aceite de oliva virgen adquiridas en supermercados locales. Las muestras se analizaron por triplicado, mostrándose la concentración media en la **tabla IV.7.5**. La concentración total de BTEXS encontrada en las muestras de aceite de oliva variaba en el rango 11.2 – 332.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

El método también fue aplicado a 10 muestras de aceitunas de la provincia de Jaén durante la época de recogida de la cosecha en 2009 (Diciembre de 2009 - Enero de 2010). Los niveles de concentración total de BTEXS encontrados en las muestras de aceituna oscilaban entre 2.4 y 79.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ver **tabla IV.7.5**). Los niveles de concentración de BTEXS encontrados en aceitunas fueron menores que los encontrados en aceite de oliva, como se puede comprobar en la **tabla IV.7.5**. Esto se puede deber a que las aceitunas se recogieron después de un periodo de intensas lluvias e incluso tras una importante nevada, lo que podría haber ocasionado la pérdida de estos compuestos por el lavado del fruto. Por otro lado, los BTEXS son compuestos liposolubles y se podría producir una preconcentración de los mismos en el aceite durante el proceso de producción, ya que para obtener 1 kg de aceite se necesitan entre 3 y 4 kg de aceitunas.

Tabla IV.7.5. Resultados de las muestras de aceite de oliva y aceituna analizadas ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

| Compuesto / Muestra | Benceno | Tolueno | Etilbenceno | m-Xileno + p-Xileno | o-Xileno | Estireno | ΣBTEX |
|----------------------------|----------------|----------------|--------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|
| Aceite de oliva | | | | | | | |
| A-01 | 2.9 | 21.5 | ND | <LOQ | <LOQ | 22.3 | 46.7 |
| A-02 | <LOQ | 15.9 | ND | <LOQ | <LOQ | 16.2 | 32.1 |
| A-03 | <LOQ | 11.2 | ND | <LOQ | <LOQ | ND | 11.2 |
| A-04 | 3.6 | 19.9 | 15.0 | 25.8 | 11.8 | 16.4 | 92.5 |
| A-05 | 6.1 | 14.7 | <LOQ | <LOQ | <LOQ | 37.9 | 58.7 |
| A-06 | <LOQ | 12.8 | ND | <LOQ | ND | 18.4 | 31.3 |
| A-07 | <LOQ | 6.7 | ND | LOD | ND | 16.5 | 23.2 |
| A-08 | 18.4 | 20.9 | <LOQ | <LOQ | <LOQ | 15.0 | 54.3 |
| A-09 | <LOQ | 21.7 | 15.8 | 22.9 | 13.3 | 20.4 | 94.0 |
| A-10 | 6.4 | 123.0 | 36.7 | 56.3 | 47.4 | 62.3 | 332.2 |
| A-11 | <LOQ | 21.9 | <LOQ | 20.7 | 13.3 | 105.9 | 161.7 |
| A-12 | <LOQ | 19.6 | 31.2 | 53.1 | 28.8 | ND | 132.7 |
| A-13 | 3.6 | 51.6 | 15.7 | 30.1 | 21.1 | 39.8 | 161.9 |
| Aceituna | | | | | | | |
| O-01 | ND | ND | 0.9 | 2.1 | < LOQ | 5.4 | 8.4 |
| O-02 | ND | ND | ND | 1.4 | LOD | 4.2 | 5.6 |
| O-03 | ND | < LOQ | 1.5 | 3.3 | < LOQ | 75.0 | 79.8 |
| O-04 | ND | ND | 1.0 | 2.9 | < LOQ | 24.3 | 28.2 |
| O-05 | ND | ND | 0.7 | 1.4 | ND | 2.1 | 4.2 |
| O-06 | ND | ND | ND | 1.0 | ND | 17.2 | 18.2 |
| O-07 | ND | < LOQ | 1.1 | 2.6 | < LOQ | 5.4 | 9.1 |
| O-08 | ND | < LOQ | 0.5 | 1.9 | < LOQ | < LOQ | 2.4 |
| O-09 | ND | < LOQ | 0.6 | 2.1 | < LOQ | 4.8 | 7.5 |
| O-10 | ND | < LOQ | 1.2 | 3.9 | < LOQ | 4.0 | 9.1 |

No se ha encontrado en la bibliografía ningún trabajo anterior que presente resultados de BTEXS en aceituna. En la **figura IV.7.4** se muestran algunos ejemplos de resultados positivos para BTEXS en muestras de aceite de oliva y aceituna, a bajas concentraciones ($< 15 \mu\text{g kg}^{-1}$). Estos cromatogramas muestran claramente la capacidad del método propuesto para controlar estos contaminantes a nivel de trazas en las muestras estudiadas.

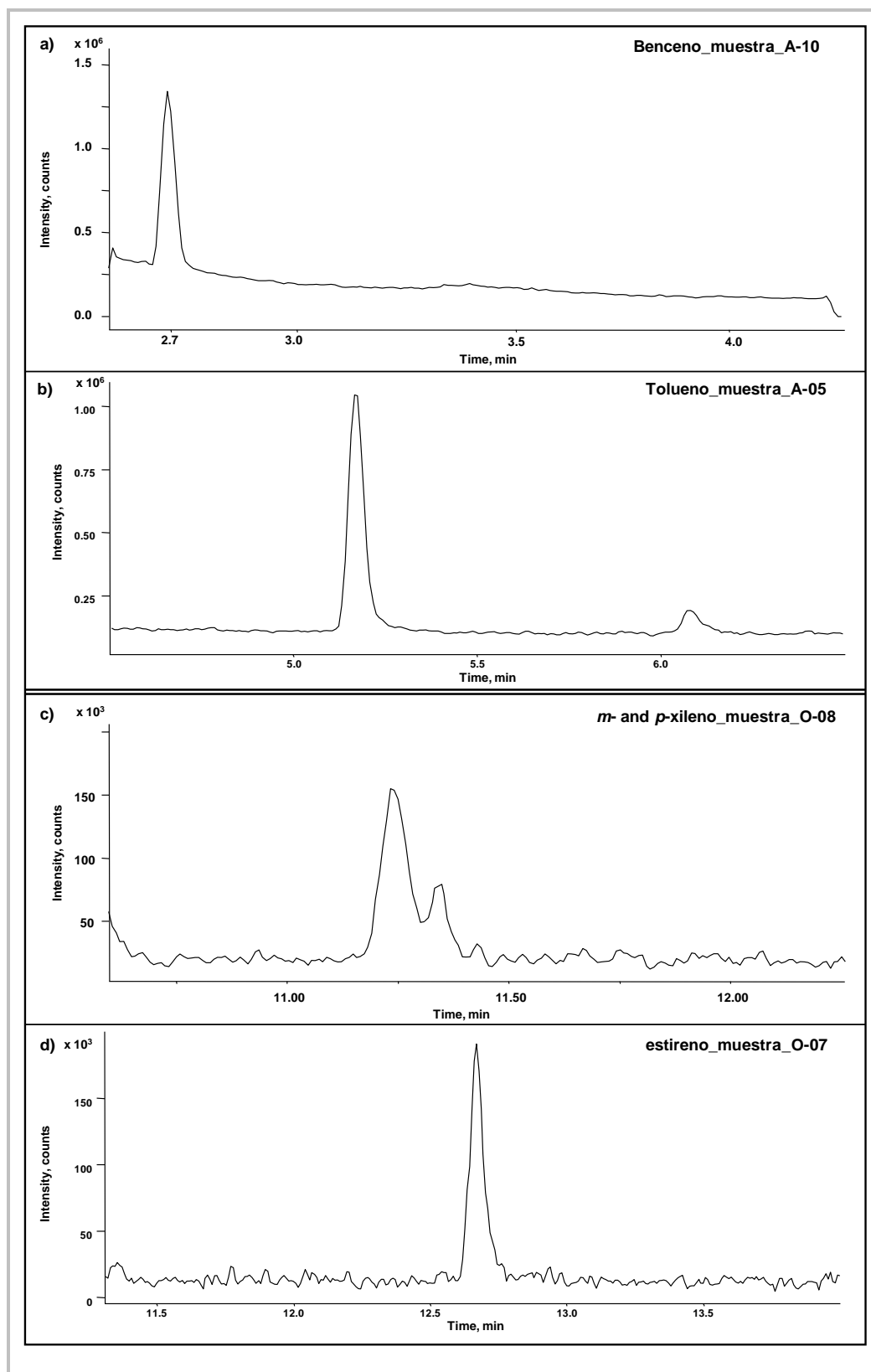


Figura IV.7.4. Ejemplos de positivos de BTEXS encontrados en muestras reales a bajos niveles de concentración ($< 15 \mu\text{g kg}^{-1}$): a) benceno en una muestra de aceite de oliva (A-10); b) tolueno en una muestra de aceite de oliva (A-05); c) m- y p-xileno en una muestra de pasta de aceituna (O-08); d) estireno en una muestra de pasta de aceituna (O-07).

IV.7.4. Conclusiones

En este trabajo se presenta la primera metodología analítica para el análisis directo de BTEXS en aceitunas. El método propuesto, basado en la técnica de espacio de cabeza (HS), está completamente automatizado, es rápido, directo y fiable. No fueron necesarias etapas de tratamiento de la muestra ni de limpieza o *clean-up*, sino que las muestras de aceite de oliva fueron directamente depositadas en el vial para su inyección automática mediante HS-GC-MS. En el caso de las muestras de aceitunas se requería una preparación de muestra mínima, consistente en la molienda de las aceitunas y la adición de agua y cloruro potásico a la pasta homogeneizada. La metodología propuesta fue aplicada al análisis de un total de 23 muestras de aceite de oliva (13) y aceituna (10). Este es el primer trabajo que presenta datos de concentración de BTEXS en aceitunas, observándose que la concentración total encontrada en muestras de aceitunas era inferior a la encontrada en muestras de aceite de oliva. La metodología propuesta puede ser usada como una herramienta efectiva para detectar lotes de aceitunas contaminadas a nivel de trazas, e incluso para elucidar el posible origen de la contaminación por BTEXS, como por ejemplo, debido a la proximidad al campo de cultivo o a la almazara de una carretera altamente transitada o de una gasolinera.

V. CONCLUSIONES



A partir de los resultados obtenidos, descritos en los capítulos anteriores, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- Se ha demostrado la potencialidad de la técnica LC-TOFMS para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos procesados elaborados a base de frutas y vegetales, como alimentos infantiles, zumos de frutas, refrescos y aceite de oliva. Se han desarrollado métodos sensibles, exactos y precisos que han sido aplicados satisfactoriamente al análisis de muestras reales. Todos ellos presentan una interesante característica inherente a la técnica de detección: la posibilidad de reexaminar los archivos de las muestras analizadas en busca de nuevos compuestos (susceptibles de ser detectados con el método propuesto) y para los que en principio no se había dirigido el análisis, lo que es posible debido al registro de espectros de masa exacta en modo *full scan*.

1.1.- Se ha desarrollado el primer método descrito para la determinación de residuos de fungicidas en alimentos infantiles mediante LC-TOFMS. La alta sensibilidad obtenida permite el análisis satisfactorio de muestras reales, de acuerdo con el exigente estándar europeo (0.01 mg kg^{-1}) establecido para este tipo de alimentos. Además, el método propuesto se puede aplicar independientemente del porcentaje de fruta que contengan las muestras, ya que este factor no afecta al efecto matriz. Por otro lado, el análisis de muestras reales sugiere la necesidad de establecer límites máximos para el contenido total de residuos de plaguicidas en este tipo de alimentos, dado que el 30% de las mismas mostraron resultados positivos para más de un fungicida.

1.2.- Se ha desarrollado el primer método descrito para la determinación de residuos de fungicidas en zumos mediante LC-TOFMS. La alta sensibilidad obtenida es comparable a la de los métodos LC-MS/MS descritos previamente para el mismo tipo de análisis. Es destacable la obtención de bajos límites de detección, sobre todo teniendo en cuenta que la complejidad de los extractos condiciona el factor de preconcentración que se puede utilizar (factores de preconcentración del orden de 20:1 o superiores originan un importante efecto matriz).

1.3.- Se ha realizado el primer estudio a nivel mundial sobre la presencia de residuos de plaguicidas en muestras de refrescos, en el que se analizaron más de 100 muestras de

bebidas. Los niveles de concentración de plaguicidas encontrados en las mismas están en el rango de decenas de microgramos por litro, siendo valores bajos si consideramos los límites establecidos en las normativas europeas (MRLs) para frutas, pero muy elevados si consideramos los MRLs establecidos en agua de consumo humano. Esto pone de manifiesto la necesidad de que se establezcan nuevos estándares de seguridad para regular de forma apropiada el mercado de este tipo de bebidas.

1.4.- Se ha demostrado que el empleo de columnas de tamaño de partícula reducido permite disminuir drásticamente el consumo de disolvente orgánico y acortar el tiempo de análisis incluso en más del 50%. Asimismo, la anchura de pico a la altura de la línea base también se ve reducida, lo que se traduce en una mejora de la relación señal-ruido y, por tanto, de los límites de detección. El nuevo método rápido fue validado para una treintena de plaguicidas y aplicado a muestras de bebidas.

2.- Se han evaluado dos procedimientos de extracción actuales para el análisis multi-residuo de plaguicidas en aceite de oliva y aceituna. Estos métodos, basados en el empleo de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), y extracción con acetonitrilo (QuEChERS) combinados con detección por LC-MS, fueron evaluados y validados por primera vez para el análisis de más de un centenar de plaguicidas en aceite de oliva y aceituna. Teniendo en cuenta que la mayoría de los plaguicidas estudiados pertenecen a familias de compuestos con propiedades fisicoquímicas similares entre ellos, los métodos propuestos podrían ser adecuados para el análisis de un gran número de compuestos (p.ej: 250-300) en estas matrices tan complejas.

2.1.- El método de análisis multi-residuo de plaguicidas en aceite de oliva se basó en el uso de la técnica LC-TOFMS con una columna de tamaño de partícula reducido. Los límites de detección obtenidos, independientemente de la metodología de preparación de la muestra, eran adecuados para el análisis de residuos de plaguicidas en aceite de oliva, tomando como referencia los MRLs establecidos por la Unión Europea para aceitunas destinadas a la producción de aceite de oliva y por el Codex Alimentarius para el aceite de oliva virgen. El estudio comparativo de los dos métodos de extracción indica que los resultados muestran un menor efecto matriz cuando se combina el método MSPD con LC-TOFMS, pero, en cambio se obtienen mejores recuperaciones cuando se usa el método

QuEChERS. Teniendo en cuenta, por una parte, que el uso de calibración por adición de patrón minimiza el problema del efecto matriz, y, por otra, que el método QuEChERS proporciona mayor rendimiento, se concluye que éste ofrece una ligera ventaja sobre el método MSPD.

2.2.- El método de análisis multi-residuo de plaguicidas en aceituna se basó en el uso de la técnica LC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo, y proporciona una sensibilidad adecuada para el análisis multi-residuo de plaguicidas en aceitunas, de forma que cumplen con los requerimientos de las normativas Europeas vigentes. A la vista de los resultados obtenidos en los estudios de recuperación y el efecto matriz, el método QuEChERS resulta más apropiado que el método MSPD para el análisis multi-residuo de plaguicidas de gran alcance en aceitunas. Además, se ha resaltado el uso de nuevas herramientas de software avanzado, que supone una gran mejora en el desarrollo de métodos MRM, facilitando el trabajo del analista y superando algunas limitaciones y desventajas asociadas a los métodos MS/MS convencionales.

3.- Se ha desarrollado, por primera vez, un método HS-GC-MS rápido, sencillo y totalmente automatizado para la determinación del grupo de contaminantes orgánicos volátiles llamados BTEXS (benceno, tolueno, etilbenceno, *o*-, *m*- y *p*-xilenos y estireno), en aceituna. La metodología propuesta también fue optimizada para la determinación de BTEXS en aceite de oliva virgen. El método desarrollado permitió la detección de estos contaminantes en diversas muestras de aceituna de distinta procedencia, y puede servir como herramienta para detectar el origen de la contaminación de partidas de aceituna con BTEXS y también para evaluar el comportamiento de estos compuestos durante el proceso de producción de aceite de oliva virgen en la almazara.

V. CONCLUSIONS



From the results obtained and described in the previous sections, the following conclusions can be drawn:

1.- The potential of LC-TOFMS for the analysis of pesticide residues in fruit and vegetable derivative foodstuffs (such as baby food, fruit juices -including those intended for infant consumption-, soft drinks and olive oil) has been demonstrated. Sensitive, accurate and rugged analytical methods have been developed and applied successfully to real samples.

1.1.- For the first time, a LC-TOFMS method has been developed for the analysis of fungicide residues in baby food. The developed LC-TOFMS method displayed high sensitivity and low limits of detection, being thus in compliance with the stringent EU standards established for this kind of commodities (0.01 mg kg^{-1}). Besides, it was found that the fruit percentage of the matrix did not exert a significant role in analyte ionization, as matrix effects were not affected significantly by this factor. Taking into account that about 30% of the analyzed samples contained more than one pesticide, this study suggests the establishment of a limit for the total sum of pesticides detected in baby food, likewise EU regulations on pesticide content in water intended for human consumption.

1.2.- For the first time, a LC-TOFMS method has been developed for the analysis of fungicide residues in fruit juices. The high sensitivity obtained compares well against the previously reported LC-MS/MS methods described for pesticide testing in fruit juices. The low LODs obtained are remarkable, taking into account that the concentration factor is conditioned by the complexity of the extracts (concentration factors of 20:1 or higher led to significant matrix effects).

1.3.- In this PhD Thesis, the first worldwide reconnaissance study of the presence and occurrence of pesticide residues in fruit-based soft drinks was reported, covering over a hundred of samples from 15 countries. The concentration levels found in the tested samples were in the microgram per liter range. These levels are low if we consider the MRLs established for fruits, but too high, considering the MRLs established in drinking water. This study suggests the establishment of regulations in order to regulate the presence of pesticide residues in these products.

1.4.- For these developed LC-TOFMS methods, the use of small particle size LC-columns diminishes drastically the organic solvent consumption and shorten the run time even more than one half. The peak width at the baseline is also reduced, resulting in increased signal-to-noise ratios and thus, better limits of detection. The new fast method was validated for more than thirty pesticides and was applied to soft drinks samples.

2.- Two current extraction procedures for the multi-residue analysis of pesticides in olive oil and olives have been evaluated. These methods, based on matrix solid-phase dispersion (MSPD) and extraction with acetonitrile (QuEChERS) were evaluated and validated, for the first time, for the multi-residue analysis by LC-MS of more than a hundred of pesticides in olive oil and olives. Given that most of the studied pesticides belong to different families of compounds, the proposed methods could be suitable for the analysis of a large number of compounds (e.g.: 250-300) in these complex matrices.

2.1.- The developed multi-residue method for the analysis of pesticides in olive oil is based on the use of the LC-TOFMS technique and a LC-column of small particle size. The limits of detection achieved (with both sample treatment approaches) were found suitable for multiclass pesticide testing in olive oil, considering the MRLs established by European Union for olives destined for olive oil production and those set by the Codex Alimentarius for virgin olive oil. With respect to the sample treatment comparison, results showed minor matrix effects for MSPD methodology combined with LC-TOFMS, while higher throughput and better recovery rates were obtained with QuEChERS procedure. Considering that matrix effects can be overcome by using matrix-matched standards, QuEChERS method was found to offer slightly better overall analytical performance.

2.2.- The developed multi-residue method for the analysis of pesticides in olives is based on the use of the LC-MS/MS technique with triple quadrupole analyzer and provides appropriate sensitivity for multi-residue analysis of pesticides in olives, meeting the requirements of European regulations in this field. The results obtained from the recovery studies and matrix effects showed that QuEChERS methodology is more appropriate than MSPD for large-scale multi-residue analysis of pesticides in olives. In addition, it was pointed out that the use of advanced software features associated to MRM method performance involves a remarkable improvement in the development of multi-residue

methods, facilitating the work of the analyst and overcoming several limitations and drawbacks associated to conventional MS/MS MRM methods.

3.- For the first time, a rapid, simple and fully automated HS-GC-MS method was developed for the determination of a group of volatile organic compounds, the so called BTEXS, in olives. The proposed methodology allowed the detection of these contaminants in various samples of olives of different origin and was also optimized for the determination of BTEXS in virgin olive oil. The developed method can be used as a tool to detect batches of olives contaminated with BTEXS (and thus to find out the source of contamination) and to study the behavior of these compounds during the production stage of virgin olive oil.

VI. BIOBLIGRAFÍA



- [1] Libro blanco sobre seguridad alimentaria. COM (1999) 719 final. Bruselas, 12-01-2000.
- [2] Reglamento 178/2002/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.
- [3] M. Stiborova, V. Martinek, H. Rydlova, P. Hodek, E. Frei. Sudan I is a potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. *Cancer Res.* 62 (2002) 5678-5684.
- [4] Decisión de la Comisión 2008/798/CE por la que se establecen las condiciones particulares de importación de productos que contienen leche o productos lácteos originarios o procedentes de China, y se deroga la decisión 2008/757/CE de la Comisión.
- [5] http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/notas_prensa/pimientos_frescos.shtml
- [6] J.L. Valverde Villareal, J.J. J. Pérez De-Gregorio, J. Pérez De-Gregorio Capella. *Manual de Toxicología Medioambiental Forense*. Editorial Ramón Areces, 2001. ISBN 84-8004-501-9.
- [7] Real Decreto 162/91, 8/2/91. (BOE 15/2/91) por el que se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas, aprobada por RD 3349/1983 de 30 nov.
- [8] IFA-FAO Agriculture Conference. "Global Food security and the role of sustainable fertilization". Marzo 2003, Roma, Italia.
- [9] J.H. Kolaczinski, C.F. Curtis, Chronic illness as a result of lowlevel exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate. *Food Chem. Toxicol.* 42 (2004) 697-706.
- [10] J.A. Ortega García, J. Ferrís i Tortajada, A. Ortí Martín, J.A. López Andreu, A. Cánovas Conesa, J. García i Castell, J. Aliaga Vera, J.J. Alcón Saez, B. Beseler Soto, E. Andreu Alapont, N. Molini Menchón, I. Navarro Vázquez. Contaminantes medio-ambientales en la alimentación. *Pediatría Integral* 5 (2002) 69-76.
- [11] www.aepla.es
- [12] Perfil Ambiental de España. Sección 2.6. Agricultura. Última edición: 2008. Publicado por el Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. (www.marm.es)

- [13] Reglamento CE 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.
- [14] C. Creaser, R. Purchase. *Food Contaminants: sources and surveillance*. Royal Society of Chemistry. Cambridge, 1991. ISBN-13: 978-1-85573-784-6.
- [15] www.fao.org
- [16] Z. Wang, K. Li, M. Fingas, L. Sigouin, L. Ménard. Characterization and source identification of hydrocarbons in water samples using multiple analytical techniques. *J. Chromatogr. A* 971 (2002) 173-184.
- [17] T.J. Lopes, D.A. Bender. Nonpoint sources of volatile organic compounds in urban areas—relative importance of land surfaces and air. *Environ. Pollut.* 101 (1998) 221-230.
- [18] G. Morchio, J.C. Spadone, U. Bracco. Volatile aromatic hydrocarbons (VAHs) in edible vegetable oils with particular reference to virgin olive oil. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 71 (1994) 491-501.
- [19] M. Biedermann, K. Grob, G. Morchio. On the origin of benzene, toluene, ethylbenzene, and the xylenes in virgin olive oil—further results. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 203 (1996) 224-229.
- [20] F. Peña, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel. Combining headspace gas chromatography with mass spectrometry detection for confirmation of hydrocarbon residues in virgin olive oil following automatic screening. *J. Chromatogr. A* 1052 (2004) 137-143.
- [21] SCF, CS/CNTM/OLIVE /2 Rev. 1, Data presented at the workshop of 15 of May 1996 on the presence of aromatic hydrocarbons on foodstuffs and particularly in olive oils in the European Union, 11 November 1996.
- [22] SCF, CS/CNTM/OLIVE/7, Results of the determination of aromatic hydrocarbons in Greek virgin olive oils, 7 October 1998.
- [23] SCF Opinion on certain aromatic hydrocarbons present in food, 20 January 1999.
- [24] Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.

- [25] Decisión 2002/657/CE de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.
- [26] Directiva 2003/13/CE de la Comisión, de 10 de febrero de 2003, por la que se modifica la Directiva 96/5/CE relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y los alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.
- [27] Directiva 2003/14/CE de la Comisión, de 10 de febrero de 2003, por la que se modifica la Directiva 91/321/CEE relativa a los preparados para lactantes y los preparados de continuación.
- [28] Reglamento CE 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.
- [29] Reglamento (CE) 178/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, que establece el anexo I del Reglamento (CE) 396/2005, que incluye la lista de alimentos y piensos a los que se aplican los contenidos máximos de residuos de plaguicidas.
- [30] Reglamento (CE) 149/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, que establece los anexos II, III y IV del Reglamento (CE) 396/2005, que estipulan los límites máximos de residuos para los productos que figuran en el anexo I de dicho Reglamento.
- [31] Reglamento 260/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, estableciendo el anexo VII con la lista de combinaciones de sustancia activa y producto a las que se aplica la excepción respecto al tratamiento por fumigación posterior a la cosecha.
- [32] Guidance EU Document nº SANCO 2009/10684. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed.
- [33] Orden pre/3301/2006, de 27 de octubre, por la que se modifican los anexos II de los Reales Decretos 569/1990, de 27 de abril, y 280/1994, de 18 de febrero, por los que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen animal y vegetal, respectivamente.
- [34] Orden pre/508/2008, de 26 de febrero, por la que se modifican los anexos II de los Reales Decretos 569/1990, de 27 de abril y 280/1994, de 18 de febrero, por los que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen animal y vegetal, respectivamente.

- [35] Orden pre/695/2008, de 7 de marzo, por la que se modifica el anexo II del Real Decreto 569/1990, de 27 de abril y los anexos I y II del Real Decreto 280/1994, de 18 de febrero, por los que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen animal y vegetal, respectivamente.
- [36] C. Cámara (Ed.). Toma y tratamiento de muestras. Editorial Síntesis, 2002. ISBN: 8477389624.
- [37] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1663-1683.
- [38] K. Ridgway, S.P.D. Lalljie, R.M. Smith. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 36-53.
- [39] P.L. Buldini, L. Ricci, J.L. Sharma. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 47-70.
- [40] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412-431.
- [41] F.J. Schenk, A.N. Brown, L.V. Podhorniak, A. Parker, M. Reliford, J.W. Wong. A rapid multiresidue method for determination of pesticides in fruits and vegetables by using acetonitrile extraction/partitioning and solid-phase extraction column cleanup. *J. AOAC Int.* 91 (2008) 422-438.
- [42] S.J. Lehotay, A. De Kok, M. Hiemstra, P. van Bodegraven. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.* 88 (2005) 595-614.
- [43] S.J. Lehotay. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J. AOAC Int.* 90 (2007) 485-520.

- [44] S.J. Lehotay, K. Matštovská, A.L. Lightfield. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J. AOAC Int.* 88 (2005) 615-629.
- [45] S.J. Lehotay, K. Maštovská, S.J. Yun. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *J. AOAC Int.* 88 (2005) 630-638.
- [46] S.C. Cunha, S.J. Lehotay, K. Maštovská, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 620-632.
- [47] S.A. Barker. Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 115-127.
- [48] C. Ferrer, M.J. Gómez, J.F. García-Reyes, I. Ferrer, E.M. Thurman, A.R. Fernández-Alba. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1069 (2005) 183-194.
- [49] S.C. Cunha, J.O. Fernandes, M. Beatriz, P.P. Oliveira. Determination of phosmet and its metabolites in olives by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 73 (2007) 514-522.
- [50] M. Navarro, Y. Picó, R. Marín, J. Mañes. Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 201-209.
- [51] S. Wang, Y. Xu, C. Pan, S. Jiang, F. Liu. Application of matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass spectrometry to fungicide residue analysis in fruits and vegetables. *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 673-685.
- [52] D. Perret, A. Gentili, S. Marchese, M. Sergi, G. D'Ascenzo G. Validation of a method for the determination of multiclass pesticide residues in fruit juices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after extraction by matrix solid-phase dispersion. *J. AOAC Int.* 85 (2002) 724–730.
- [53] A. Hercegová, M. Dömötöröová, E. Matisová, M. Kirchner, R. Otrekal, V. Štefuca. Fast gas chromatography with solid phase extraction clean-up for ultratrace analysis of pesticide residues in baby food. *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 46-53.
- [54] H.H. Liu, P.K. Dasgupta. Analytical Chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop. *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817-1821.

- [55] M. Ma, F.F. Cantwell. Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: quantitative extraction. *Anal. Chem.* 70 (1998) 3912-3919.
- [56] M. Ma, F.F. Cantwell. Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: preconcentration into a single microdrop. *Anal. Chem.* 71 (1999) 388-393.
- [57] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 195–228.
- [58] E. Zhao, L. Han, S.Jiang, Q. Wang, Z. Zhou. Application of a single-drop microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in juice. *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 269-273.
- [59] R. Romero-González, E. Pastor-Montoro, J.L. Martínez-Vidal, A. Garrido-Frenich. Application of hollow fiber supported liquid membrane extraction to the simultaneous determination of pesticide residues in vegetables by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 2701–2708.
- [60] L.M.L. Nollet. *Handbook of Food Analysis. Volumen 2.* CRC Press, 2004. ISBN-13: 9780824750374.
- [61] www.waters.com
- [62] Y. Picó, M. Fernández, M.J. Ruiz, G. Font. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 117–131.
- [63] C. Baggiani, L. Anfossi, C. Giovannoli. Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers. *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 29–39.
- [64] J.J. Jiménez, J.L. Bernal, M^a. J. del Nozal, L. Toribio and E. Arias. Analysis of pesticide residues in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen–phosphorus detection. *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 147-156.
- [65] D. Stajnbaher, L. Zupancic-Kralj. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 185–98.

- [66] Obana H, Okihashi M, Akutsu K, Kitagawa Y, Hori S. Determination of neonicotinoid pesticide residues in vegetables and fruits with solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2501–2505.
- [67] J.J. Jimenez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M. Novo, M. Higes, J. Llorente. Determination of rotenone residues in raw honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 67–73.
- [68] O. Shimelis, Y. Yang, K. Stenerson, T. Kaneko, M. Ye. Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 18–25.
- [69] F.J. Schenck, S.J. Lehotay, V. Vega. Comparison of solid-phase extraction sorbents for cleanup in pesticide residue analysis of fresh fruits and vegetables. *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 883–890.
- [70] H. Guan, W.E. Brewer, S.L. Morgan. New approach to multiresidue pesticide determination in foods with high fat content using disposable pipette extraction (DPX) and gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS). *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 10531-10538.
- [71] H. Guan, W.E. Brewer, S.T. Garris, S.L. Morgan. Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1867-1874.
- [72] C.L. Arthur, J. Pawliszyn. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145-2148.
- [73] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction Theory and Practice*, John Wiley & Sons, New York, 1997. ISBN: 978-0-471-19034-9.
- [74] J.H. Borges, M.A. Rodríguez Delgado, F.J. García Montelongo. Microextracción en fase sólida: Aplicación al análisis de pesticidas. *Cromatografía y Técnicas Afines* 26 (2005) 12-26.
- [75] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 35-62.

- [76] W. Wardencki, M. Michulec, J. Curylo. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *Int. J. Food Sci. Technol.* 39 (2004) 703-717.
- [77] D.A. Lambropoulou, I.K. Konstantinou, T.A. Albanis. Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices. *J. Chromatogr. A*, 1152 (2007) 70-96.
- [78] F. Bianchi, M. Careri, A. Mangia, M. Musci. Development and validation of a solid phase micro-extraction–gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of furan in baby-food. *J. Chromatogr. A* 1102 (2006) 268-272.
- [79] R. Rial Otero, C. Yagüe Ruiz, B. Cancho Grande, J. Simal Gándara. Solid-phase microextraction–gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of the fungicides cyprodinil and fludioxonil in white wines. *J. Chromatogr. A* 942 (2001) 41-52.
- [80] D. A. Lambropoulou, T. A. Albanis. Headspace Solid Phase Microextraction Applied to the analysis of organophosphorus insecticides in strawberry and cherry juices. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3359-3365.
- [81] J.S. Aulakh, A.K. Malik, V. Kaur, P. Schmitt-Koplin. A review on solid phase micro extraction-high performance liquid chromatography (SPME-HPLC) analysis of pesticides. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 35 (2005) 71-85.
- [82] B.E. Ritcher, B.A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter, N. Avdalovic, C.Pohl. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Anal. Chem.* 68 (1996) 1033-1039.
- [83] M. Fernández-Alvarez, M. Llompart, J.P. Lamas, M.Lores, C. García-Jares, M. García-Chao, T. Dagnac. Simultaneous extraction and cleanup method based on pressurized solvent extraction for multiresidue analysis of pesticides in complex feed samples. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 3963-3973.
- [84] J.C. Chuang, K. Hart, J.S. Chang, L.E. Boman, J.M. Van Emon, A.W. Reed. Evaluation of analytical methods for determining pesticides in baby foods and adult duplicate-diet samples. *Anal. Chim. Acta* 444 (2001) 87-95.
- [85] M.C. Herrera, R.C. Prados-Rosales, J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro. Static–dynamic pressurized hot water extraction coupled to on-line filtration–solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–post-column derivatization–

- fluorescence detection for the analysis of N-methylcarbamates in foods. *Anal. Chim. Acta* 463 (2002) 189–197.
- [86] M. Barriada-Pereira, M.J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Bahía, D. Prada-Rodríguez, E. Fernández-Fernández. Comparison of pressurized liquid extraction and microwave assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in vegetables. *Talanta* 71 (2007) 1345-1351.
- [87] B.W. Renoe. Microwave assisted extraction. *Am. Lab.* 26 (1994) 34-40.
- [88] K. Ganzler, A. Salgo, K. Valko. Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *J. Chromatogr.* 371 (1986) 299-306.
- [89] V. Camel. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends Anal. Chem. (TrAC)* 19 (2000) 229-248.
- [90] A. Bouaid, A. Martín-Esteban, P. Fernández, C. Cámara. Microwave-assisted extraction method for the determination of atrazine and four organophosphorous pesticides in oranges by gas chromatography (GC). *Fresenius J. Anal. Chem.* 367 (2000) 291-294.
- [91] M. Barriada-Pereira, M.J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Bahía, D. Prada-Rodríguez, E. Fernández-Fernández. Comparison of pressurized liquid extraction and microwave assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in vegetables. *Talanta* 71 (2007) 1345-1351.
- [92] E. Fuentes, M.E. Báez, J. Díaz. Microwave-assisted extraction at atmospheric pressure coupled to different clean-up methods for the determination of organophosphorous pesticides in olive and avocado oil. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8859-8866.
- [93] F. Rouessac, A. Rouessac. *Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas.* McGraw Hill. 2003. ISBN: 84-481-3785-X.
- [94] M. Guardia-Rubio, M.L. Fernández-de-Córdova, M.J. Ayora-Cañada, A. Ruiz-Medina. Simplified pesticide multiresidue analysis in virgin olive oil by gas chromatography with thermoionic specific, electron-capture and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1108 (2006) 231-239.
- [95] E. Ballesteros, A. García Sánchez, N. Ramos Martos. Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 89-96.

- [96] M.L. Hopper. Automated one-step supercritical fluid extraction and clean-up system for the analysis of pesticide residues in fatty matrices. *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 93-105.
- [97] E. Anklam, H. Berg, L. Mathiasson, M. Sharman, F. Ulberth. Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: A review. *Food Addit. Contam.* 15 (1998) 729-750.
- [98] M. Zougagh, M. Valcárcel, A. Ríos. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *Trends Anal. Chem. (TrAC)* 23 (2004) 399-405.
- [99] M.A. Lage Yusty, J.L. Cortizo Davina. Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil. *Food Control* 16 (2005) 59-64.
- [100] Y. Ono, T. Yamagami, T. Nishina, T. Tobino. Pesticide Multiresidue Analysis of 303 compounds using supercritical fluid extraction. *Anal. Sci.* 22 (2006) 1473-1476.
- [101] J.W. Pensabene, W. Fiddler, D.J. Donoghue. Supercritical fluid extraction of atrazine and other triazine herbicides from fortified and incurred eggs. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1668-1672.
- [102] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, B. Albero, L. González. Analysis of pesticide residues in juice and beverages. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 34 (2004) 165–175.
- [103] E. Orejuela, M. Silva. Monitoring some phenoxy-type N-methylcarbamate pesticide residues in fruit juices using high-performance liquid chromatography with peroxyoxalate-chemiluminescence detection. *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 197-201.
- [104] H. Obana, K. Kikuchi, M. Okihashi, S. Hori. Determination of organophosphorus pesticides in foods using an accelerated solvent extraction system. *Analyst* 122 (1997) 217-220.
- [105] M.S. Young, D.J. Phillips, P.C. Iraneta, J. Krol. Mixed-mode solid-phase extraction and cleanup procedures for the liquid chromatographic determination of thiabendazole and carbendazim in fruit juices. *J. AOAC Int.* 84 (2001) 556–561.
- [106] S. Topuz, G. Özhan, B. Alpertunga. Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD. *Food Control* 16 (2005) 87–92.
- [107] F. Will, E. Kruger. Fungicide residues in strawberry processing. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 858–861.

- [108] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete. Analysis of pesticide residues in fruit juices by matrix-solid phase dispersion and gas chromatographic determination. *Chromatographia* 57 (2003) 793–798.
- [109] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo. Determination of endosulfan isomers and endosulfan sulfate in tomato juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 137–143.
- [110] D. Perret, A. Gentili, S. Marchese, M. Sergi, G. D’Ascenso. Validation of a method for the determination of multiclass pesticide residues in fruit juices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after extraction by matrix solid phase dispersion. *J. AOAC Int.* 85 (2002) 724–731.
- [111] G. Sagratini, J. Mañes, D. Giardina, P. Damiani, Y. Picó. Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1147 (2007) 135–143.
- [112] C.G. Zambonin, M. Quinto, N. De Vietro, F. Palmisano. Solid-phase microextraction–gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. *Food Chem.* 86 (2004) 269–274.
- [113] T.D. Nguyen, M.Y. Yun, G.-H. Lee. A multiresidue method for the determination of 118 pesticides in vegetable juice by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 10095–10101.
- [114] N. Paske, B. Berry, J. Schmitz, D. Sullivan. Determination of low-level agricultural residues in soft drinks and sports drinks by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: single-laboratory validation. *J. AOAC Int.* 90 (2007) 521-533.
- [115] C. CSE Report: Analysis of Pesticide Residues in Soft Drinks. India, agosto de 2006. (disponible en www.cseindia.org).
- [116] N. Paske, B. Berry, J. Schmitz, D. Sullivan. Determination of low-level agricultural residues in soft drinks and sports drinks by gas chromatography with mass-selective detection: single-laboratory validation. *J. AOAC Int.* 90 (2007) 534-543.
- [117] X.Q. Li, F. Zhang, Y. Y. Sun, W. Yong, X G. Chu, Y.Y. Fang, J. Zweigenbaum. Accurate screening for synthetic preservatives in beverage using high performance liquid

- chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 608 (2008) 165–177.
- [118] C. Van Pouke, C.'L Detavernier, J.F. Van Bocxlaer, R. Vermeulen, C. Van Peteghem. Monitoring the benzene contents in soft drinks using Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry: A survey of the situation on the Belgian market. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 4504-4510.
- [119] F. Fabietti, M. Delise, A. Piccioli Bocca. Investigation into the benzene and toluene content of soft drinks. *Food Control* 12 (2001) 505-509.
- [120] K. Ridgway, S.P.D. Lalljie, R.M. Smith. Use of in-tube sorptive extraction techniques for determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soft drinks. *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 20-26.
- [121] G. Ouyang, W. Zhao, J. Pawliszyn. Kinetic calibration for automated headspace liquid-phase microextraction. *Anal. Chem.* 77 (2005) 8122-8128.
- [122] K. Patel, R.J. Fussell, D.M. Goodall, B.J. Keely. Evaluation of large volume-difficult matrix introduction-gas chromatography-time of flight-mass spectrometry (LV-DMI-GC-TOF-MS) for the determination of pesticides in fruit-based baby foods. *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 658-669.
- [123] P. Georgakopoulos, A. Mylona, P. Athanasopoulos, E.H. Drosinos, P.N. Skandamis. Evaluation of cost-effective methods in the pesticide residue analysis of non-fatty baby foods. *Food Chem.* 115 (2009) 1164-1169.
- [124] F. Hernández, O.J. Pozo, J.V. Sancho, L. Bijlsma, M. Barreda, E. Pitarch. Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 242-252.
- [125] A. Hercegovà, M. Dömötörövä, E. Matisová, M. Kirchner, R. Otrekal, V. Stefuca. Fast gas chromatography with solid phase extraction clean-up for ultratrace analysis of pesticide residues in baby food. *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 46-53.
- [126] P. Sandra, B. Tienpont, F. David. Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 299-309.

- [127] A. Hercegová, M. Dömötörövä, D. Kruzlicova, E. Matisová. Comparison of simple preparation methods combined with fast gas chromatography-mass spectrometry for ultratrace analysis of pesticide residues in baby food. *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1102-1109.
- [128] T. Čajka, K. Maštovská, S.J. Lehotay, J. Hajšlová. Use of automated direct sample introduction with analyte protectants in the GC-MS analysis of pesticide residues. *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1048-1060.
- [129] C.C. Leandro, P. Hancock, R.J. Fusell, B.J. Keely. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 94-101.
- [130] T. Čajka, J. Hajšlová, O. Lacina, K. Maštovská, S.J. Lehotay. Rapid analysis of multiple pesticide residues in fruit-based baby food using programmed temperature vaporizer injection-low-pressure gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 281-294.
- [131] J. Wang, D. Leung. Determination of 142 pesticides in fruit- and vegetable-based infant foods by liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry and estimation of measurement uncertainty. *J. AOAC Int.* 92 (2009) 279-301.
- [132] D.W. Lachenmeier, H. Reusch, C. Sproll, K. Schoeberl, T. Kuballa. Occurrence of benzene as a heat-induced contaminant of carrot juice for babies in a general survey of beverages. *Food Addit. Contam.* 25 (2008) 1216-1224.
- [133] A. Garrido-Frenich, J.L. Fernández-Moreno, J.L. Martínez-Vidal, F.J. Arrebola-Liébanas. Application of gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry for the multiresidue analysis of pesticides in olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 8346-8352.
- [134] A. García-Sánchez, N. Ramos-Martos, E. Ballesteros. Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography-tandem mass-spectrometric determination. *Anal. Chim. Acta* 558 (2006) 53-61.
- [135] E.G. Amvrazi, T.A. Albanis. Multiresidue method for determination of 35 pesticides in virgin olive oil by using liquid-liquid extraction techniques coupled with solid-phase extraction clean up and gas chromatography with nitrogen phosphorus detection and electron capture detection. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9642-9651.

- [136] F.A. Esteve-Turrillas, A. Pastor, M. de la Guardia. Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phase extraction and tandem mass spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta* 553 (2005) 50-57.
- [137] M. Guardia-Rubio, A. Ruiz-Medina, A. Molina-Díaz, M.J. Ayora-Cañada. Influence of harvesting method and washing on the presence of pesticide residues in olives and olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8538-8544.
- [138] A. Di Muccio, T. Generali, D.A. Barbini, P. Pelosi, A. Ausili, F. Vergori, S. Girolometti. Single-step separation of organochlorine pesticide residues from fatty materials by combined use of solid-matrix partition and C₁₈ cartridges. *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 61-68.
- [139] A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, E. Pastor-Montoro, R. Romero-González. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 947–959.
- [140] S. López-Feria, S. Cárdenas, M. Valcárcel. One step nanotubes-based solid-phase extraction for the gas chromatographic-mass spectrometric multiclass pesticide control in virgin olive oils. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7346-7350.
- [141] E. Fuentes, M.E. Báez, A. Quiñones. Suitability of microwave-assisted extraction coupled with solid-phase extraction for organophosphorus pesticide determination in olive oil. *J. Chromatogr. A* 1207 (2008) 38-45.
- [142] E. Fuentes, M.E. Báez, J. Díaz. Microwave-assisted extraction at atmospheric pressure coupled to different clean-up methods for determining organophosphorus pesticides in olive and avocado oil. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8859-8866.
- [143] Tsoutsis, K.I.D. Hela, T.A. Albanis. Screening method for organophosphorus insecticides and their metabolites in olive oil samples based on headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography. *Anal. Chim. Acta* 573-574 (2006) 216-222.
- [144] M.D. Hernando, C. Ferrer, M. Ulaszewska, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba. Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a quadrupole/linear ion trap instrument for the analysis of pesticide residues in olive oil. *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1815-1831.

- [145] D. Ollivier, M. Guerere. Development of a benzene hydrocarbon measurement method for virgin olive oils. *Am. Lab.* 33 (2001) 18-20.
- [146] F. Peña, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel. Direct screening of olive oil samples for residual benzene hydrocarbon compounds by headspace-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 526 (2004) 77-82.
- [147] B.D. Page, G. Lacroix. Analysis of volatile contaminants in vegetable oils by headspace solid-phase microextraction with Carboxen-based fibres. *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 79-94.
- [148] C. Carrillo-Carrión, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel. Liquid-liquid extraction/headspace/gas chromatographic/mass spectrometric determination of benzene, toluene, ethylbenzene, (o-, m- and p-)xylene and styrene in olive oil using surfactant-coated carbon nanotubes as extractant. *J. Chromatogr. A* 1171 (2007) 1-7.
- [149] A.R. Fernández-Alba (Ed.). *Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues*, Comprehensive Analytical Chemistry, Volume XLIII, Elsevier, The Netherlands, 2005. ISBN: 978-0-444-50943-7.
- [150] L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, V. Bärbel. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 838-865.
- [151] B.M. Ham. *Even electron mass spectrometry with biomolecule applications*. Wiley. New Jersey and Canada, 2008. ISBN: 978-0-470-11802-3.
- [152] D.J. Weston. Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. *Analyst* 135 (2010) 661-668.
- [153] R.B. Cody, J.A. Laramée, H. Dupont Durst. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal. Chem.* 77 (2005) 2297-2302.
- [154] N. Na, M. Zhao, S. Zhang, C. Yang, X. Zhang. Development of a dielectric barrier discharge ion source for ambient mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 18 (2007) 1859-1862.
- [155] J.D. Harper, N.A. Charipar, C.C. Mulligan, X. Zhang, R.G. Cooks, Z. Ouyang. Low-temperature plasma probe for ambient desorption ionization. *Anal. Chem.* 80 (2008) 9097-9104.

- [156] H. Hayen, A. Michels, J. Franzke. Dielectric barrier discharge ionization for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 81 (2009) 10239-10245.
- [157] L. Vaclavik, T. Čajka, V. Hrbek, J. Hajšlova. Ambient mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source for olive oil quality and authenticity assessment. *Anal. Chim. Acta* 645 (2009) 56–63.
- [158] J.F. García-Reyes, F. Mazzoti, J.D. Harper, N.A. Charipar, S. Oradu, Z. Ouyang, G. Sindona, R.G. Cooks. Direct olive oil analysis by low-temperature plasma (LTP) ambient ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 3057–3062.
- [159] Z. Takats, J.M. Wiseman, B. Gologan, R.G. Cooks. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with electrospray ionization. *Science* 306 (2004) 471–473.
- [160] J.F. García-Reyes, A.U. Jackson, A. Molina-Díaz, R.G. Cooks. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for trace analysis of agrochemicals in food. *Anal. Chem.* 81 (2009) 820-829.
- [161] J.H. Gross. "Mass Spectrometry. A Textbook". Springer, Berlin · Heidelberg, 2004. ISBN: 3-540-40739-1.
- [162] R.P.W. Scott C.G. Scott, M. Munroe, J. Hess Jr. Interface for on-line liquid chromatography—mass spectroscopy analysis. *J. Chromatogr.* 99 (1974) 395-405.
- [163] R.B. Cole, ed. *Electrospray ionization mass spectrometry. Fundamentals, instrumentation and applications.* Wiley Interscience. 1997. ISBN: 0-471-14564-5.
- [164] B.A. Thomsom, J.V. Iribarne. Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J. Chem. Phys.* 71 (1979) 4451-4463.
- [165] J.V. Iribarne, P.J. Dziedzic, B.A. Thomsom. Atmospheric pressure ion evaporation-mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 50 (1983) 331-347.
- [166] A.P. Bruins, T.R. Covey, I.D. Henion. Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 59 (1987) 2642-2646.
- [167] J. Zrostlíková, J. Hajšlova, T. Kovalczuk, R. Štípan, J. Poustka. Determination of seventeen polar/thermolabile pesticides in apples and apricots by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 86 (2003) 612-622.

- [168] K.F. Medzihradsky, M.J. Besman, A.L. Burlingame. Structural characterization of site-specific N-glycosylation of recombinant human factor VIII by reversed-phase high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 69 (1997) 3986-3994.
- [169] M.J. Martínez-Bueno, A. Agüera, M.J. Gómez, M.D. Hernando, J.F. García-Reyes, A.R. Fernández-Alba. Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Anal. Chem.* 79 (2007) 9372-9384.
- [170] J. Klein, L. Alder. Applicability of Gradient Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry to the Simultaneous Screening for About 100 Pesticides in Crops. *J. AOAC Int.* 86 (2003) 1015-1037.
- [171] B. Kmellár, P. Fodor, L. Pareja, C. Ferrer, M.A. Martínez-Uroz, A. Valverde, A.R. Fernández-Alba. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1215 (2008) 37-50.
- [172] W.M.A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spec. Rev.* 25 (2006) 881-899.
- [173] A. Krueve, A. Künnapas, K. Herodes, I. Leito. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 58-66.
- [174] L. Howells, M.J. Sauer. Multi-residue analysis of avermectins and moxidectin by ion-trap LC-MSⁿ. *Analyst* 126 (2001) 155-160.
- [175] D. Baglio, D. Kotzias, B.R. Larsen. Atmospheric pressure ionisation multiple mass spectrometric analysis of pesticides. *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 207-220.
- [176] E. Barceló-Barrachina, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran. Evaluation of different liquid chromatography–electrospray mass spectrometry systems for the analysis of heterocyclic amines. *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 67-78.
- [177] A. Carrasco-Pancorbo, E. Nevedomskaya, T. Arthen-Engeland, T. Zey, G. Zurek, C. Baessmann, A.M. Deelder, O.A. Mayboroda. Gas chromatography/atmospheric

- pressure chemical ionization-time of flight mass spectrometry: analytical validation and applicability to metabolic profiling. *Anal. Chem.* 81 (2009) 10071-10079.
- [178] C. Cavaliere, P. Foglia, E. Pastorini, R. Samperi, A. Lagana. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk: Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. *J. Chromatogr. A* 1101 (2006) 69-78.
- [179] T. Portolés, J.V. Sancho, F. Hernández, A. Newton, P. Hancock. Potential of atmospheric pressure chemical ionization source in GC-QTOF MS for pesticide residue analysis. *J. Mass Spectrom.* 45 (2010) 926-936.
- [180] J.L. Gómez-Ariza, A. Arias Borrego, T. García-Barrera, R. Beltrán. Comparative study of electrospray and photospray ionization sources coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for olive oil authentication. *Talanta* 70 (2006) 859-869.
- [181] N. Yoshioka, Y. Akiyama, K. Teranishi. Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 145-159.
- [182] E. de Hoffmann, V. Stroobant. *Mass Spectrometry Principles and Applications* (3rd Edition). Wiley. 2007. ISBN: 978-0-470-03310-4.
- [183] R. Huskova, E. Matisová, S. Hrouzkova, L. Svorc. Analysis of pesticide residues by fast gas chromatography in combination with negative chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6326-6334.
- [184] P. Stefanelli, A. Santilio, L. Cataldi, R. Dommarco. Multiresidue analysis of organochlorine and pyrethroid pesticides in ground beef meat by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Health, B* 44 (2009) 350-356.
- [185] R. Huskova, E. Matisová, M. Kirchner. Fast GC-MS pesticide multiresidue analysis of apples. *Chromatographia* 68 (suppl) (2008) S49-S55.
- [186] T. Čajka, K. Maštovská, S.J. Lehotay, J. Hajšlová. Use of automated direct sample introduction with analyte protectants in the GC-MS analysis of pesticide residues. *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1048-1060.

- [187] K. Maštovská, S.J. Lehotay, J. Hajšlová. Optimization and evaluation of low-pressure gas chromatography-mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in a food commodity. *J. Chromatogr. A* 926 (2001) 291-308.
- [188] S.J. Lehotay, R.A. Gates. Blind analysis of fortified pesticide residues in carrot extracts using GC-MS to evaluate qualitative and quantitative performance. *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3706-3719.
- [189] R.H. Savant, K. Banerjee, S.C. Utture, S.H. Patil, S. Dasgupta, M.S. Ghaste, P.G. Adsule. Multiresidue Analysis of 50 pesticides in grape, pomegranate, and mango by gas chromatography-Ion trap mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* 58 (2010) 1447-1454.
- [190] R.M. González-Rodríguez, R. Rial-Otero, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gandara. Determination of 23 pesticide residues in leafy vegetables using gas chromatography-ion trap mass spectrometry and analyte protectants. *J. Chromatogr. A* 1196-1197 (2008) 100-109.
- [191] M. Mezcuca, C. Ferrer, J.F. García-Reyes, M.J. Martínez-Bueno, M. Sigrist, A.R. Fernández-Alba. Analyses of selected non-authorized insecticides in peppers by gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 112 (2008) 221-225.
- [192] T. Chen, G. Chen. Identification and quantitation of pyrethroid pesticide residues in vegetables by solid-phase extraction and liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spec.* 21 (2007) 1848-1854.
- [193] C. Blasco, G. Font, Y. Picó. Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-ion trap-triple stage mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 37-43.
- [194] E.M. Thurman, I. Ferrer, J.A. Zweigenbaum, J.F. García-Reyes, M. Woodman, A.R. Fernández-Alba. Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1082 (2005) 71-80.
- [195] J. Caixach, C. Planas, E. Abad, M. Om, M. Calvo, A. Ginebreda, J. Rivera. Assessment of persistent organic pollutants in river sediments from Catalonia (Spain). Analysis by HRGC/LRMS and HRGC/HRMS. *Organohalogen Compd.* 51 (2001) 191-194.

- [196] J. Hagberg. Analysis of brominated dioxins and furans by high resolution gas chromatography /high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 376-384.
- [197] I. Ericson Jogsten, J. Hagberg, G. Lindstroem, B. van Bavel. Analysis of POPs in human samples reveal a contribution of brominated dioxin of up to 15% of the total dioxin TEQ. *Chemosphere* 78 (2010), 113-120.
- [198] J. Seo, Y-S. Chang, J-H. Shin, J-W. Choi. Determination of persistent organochlorine pesticides in human breast milk by solid phase extraction and GC/HRMS. *Organohalogen Compd.* 69 (2007) 310/1-310/4.
- [199] M. Woudneh, D.R. Oros. Pyrethroids, pyrethrins, and piperonyl butoxide in sediments by high-resolution gas chromatography /high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1135 (2006) 71-77.
- [200] M.B. Woudneh, M. Sekela, T. Tuominen, M. Gledhill. Acidic herbicides in surface waters of Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 121-129.
- [201] S. Lacorte, A.R. Fernández-Alba. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spec. Rev.* 25 (2006) 866-880.
- [202] E.M. Thurman, I. Ferrer, J.A. Zweigenbaum, J.F. García-Reyes, M. Woodman, A.R. Fernández-Alba. Discovering metabolites of post harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1082 (2005) 71–80.
- [203] I. Ferrer, J.F. García-Reyes, M. Mezcuca, E.M. Thurman, A.R. Fernández-Alba. Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1082 (2005) 81–90.
- [204] J.F. García-Reyes, I. Ferrer, E.M. Thurman, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba. Searching for non-target chlorinated pesticides in food by liquid chromatography/time of flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 2780–2788.
- [205] C. Soler, B. Hamilton, A. Furey, K.J. James, J. Mañes, Y. Picó. Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry analysis of carbosulfan, carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, and other metabolites in food. *Anal. Chem.* 79 (2007) 1492-1501.

- [206] M. Mezcuca, O. Malato, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba. Accurate-mass databases for comprehensive screening of pesticide residues in food by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 81 (2009) 913-929.
- [207] T. Portolés, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández. Combined Use of GC-TOFMS and UHPLC-(Q)TOFMS to Investigate the Presence of Nontarget Pollutants and Their Metabolites in a Case of Honeybee Poisoning. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4079-4090.
- [208] S.H. Patil, K. Banerjee, S. Dasgupta, D. Oulkar, P. Dasharath, S.B. Patil, M.R. Jadhav, R.H. Savant, P.G. Adsule, M.B. Deshmukh. Multiresidue analysis of 83 pesticides and 12 dioxin-like polychlorinated biphenyls in wine by gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2307-2319.
- [209] C. Leandro, P. Hancock, R.J. Fussell, B.J. Keely. Quantification and screening of pesticide residues in food by gas chromatography -exact mass time-of-flight mass spectrometry. *J.Chromatogr. A* 1166 (2007) 152-162.
- [210] T. Čajka, J. Hajšlová. Gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis: advantages and limitations. *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 251-261.
- [211] J. Schurek, T. Portolés, J. Hajslova, K. Riddelova, F. Hernández. Application of HS-SPME coupled to two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple residues of pesticides in tea samples. *Anal. Chim. Acta* 611 (2008) 163-172.
- [212] J. Zrostlíková, J. Hajšlová, T. Čajka. Evaluation of two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticide residues in fruit. *J. Chromatogr. A* 1019 (2003) 173-186.
- [213] K. Patel, R.J. Fussell, D.M. Goodall, B.J. Keely. Analysis of pesticide residues in lettuce by large volume-difficult matrix introduction-gas chromatography-time of flight-mass spectrometry (LV-DMI-GC-TOF-MS). *Analyst* 128 (2003) 1228-1231.
- [214] D.J. Douglas, A.J. Frank, D. Mao. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 24 (2005) 1–29.

- [215] A.G. Marshall, C.L. Hendrickson, G.S. Jackson. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spec. Rev.* 17 (1998) 1-35.
- [216] R. Perry, R.G. Cooks, R.J. Noll. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrom. Rev.* 27 (2008) 661-699.
- [217] A. Makarov. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* 72 (2000) 1156–1162.
- [218] Q. Hu, R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R.G. Cooks. The orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 430–443.
- [219] C. Dass. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Wiley-Interscience, 2007. ISBN-13: 978-0-471-68229-5.
- [220] Agilent Technologies technical note nº 5990-3595EN, 2009.
- [221] C. Hunter, B. Simons, Applied Biosystems Sciex Technical Note 114TN 52-02, 2008.
- [222] P.D. Rainville, J. Mather, R.S. Plumb, Waters Application Note 720002569EN, 2008.
- [223] M. Petrovic, D. Barceló. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants. *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 422-424.
- [224] O.J. Pozo, J.V. Sancho, M. Ibáñez, F. Hernández, W.M.A. Niessen. Confirmation of organic micropollutants detected in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Achievements and pitfalls. *Trends Anal. Chem. (TrAC)* 25 (2006) 1030-1042.
- [225] Y. Picó, C. Blasco, G. Font. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. *Mass Spec. Rev.* 23 (2003) 45-85.
- [226] S. Bogialli, A. Di Corcia. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 947-966.
- [227] A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, E. Pastor-Montoro, R. Romero-González. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 947-959.

- [228] Y. Picó, M. Farré, C. Soler, D. Barceló. Identification of unknown pesticides in fruits using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1176 (2007), 123-134.
- [229] S. Grimalt, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F. Hernández. Use of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry to investigate pesticide residues in fruits. *Anal. Chem.* 79 (2007) 2833-2843.
- [230] Y. Picó, M. Farré, N. Tokman, D. Barceló. Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography- quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the quantification of amitraz and identification of its degradation products in fruits. *J. Chromatogr. A* 1203 (2008) 36-46.
- [231] E. Barceló-Barrachina, E. Moyano, M.T. Galcerán. Determination of heterocyclic amines by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 409-418.
- [232] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo. Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 66 (2005) 917–924.
- [233] M. Natangelo, S. Tavazzi, E. Benfenati. Evaluation of solid phase microextraction–gas chromatography in the analysis of some pesticides with different mass spectrometric techniques: application to environmental waters and food samples. *Anal. Lett.* 35 (2002) 327- 338.
- [234] T. Goto, Y. Ito, I. Saito, H. Matsumoto, H. Sugiyama, C. Ohkubo, H. Nakazawa, H. Nagase. The high throughput analysis of N-methyl carbamate pesticides in wine and juice by electrospray ionization liquid chromatography tandem mass spectrometry with direct sample injection into a short column. *Anal. Chim. Acta* 531 (2005) 79–86.
- [235] A. Sannino, L. Bolzoni, M. Bandini. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* 1036 (2004) 161–169.
- [236] J. Wang, W. Cheung, D. Grant. Determination of pesticides in apple-based infant foods using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 528-537.

- [237] J.F. García-Reyes, C. Ferrer, M.J. Gómez-Ramos, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 239-251.
- [238] E. Martínez S. Lacorte, I. Llobet, P. Viana, D. Barceló. Multicomponent analysis of volatile organic compounds in water by automated purge and trap coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 181-190.
- [239] I. Ferrer, J.F. García-Reyes, A.R. Fernández-Alba. Identification and quantitation of pesticides in vegetables by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 671–682.
- [240] M.J. Gómez, O. Malato, I. Ferrer, A. Agüera, A.R. Fernández-Alba. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry to evaluate pharmaceuticals in effluents. A pilot monitoring study. *J. Environ. Monit.* 9 (2007) 718–729.
- [241] J.F. García-Reyes, M.D. Hernando, C. Ferrer, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba. Large scale pesticide multiresidue methods in food by combining liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 79 (2007) 7308–7323.
- [242] J.F. García-Reyes, M.D. Hernando, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba. Comprehensive screening of target, nontarget and unknown pesticides in food by LC-TOFMS. *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 828–841.
- [243] A. Economou, H. Botitsi, S. Antoniou, D. Tsipi, Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5856-5867.
- [244] M. Hiemstra, A. De Kok. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 3-25.
- [245] E.R. Trösken, K. Scholz, R.W. Lutz, W. Völkel, J.A. Zarn, W.K. Lutz. Comparative assessment of the inhibition of recombinant human CYP19 (aromatase) by azoles used in agriculture and as drugs for humans. *Endocr. Res.* 30 (2004) 387-394.
- [246] A.M. Vinggaard, C. Hnida, V. Breinholt, J.C. Larsen. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity *in vitro*. *Toxicol. in Vitro* 14 (2000) 227-234.

- [247] J.A. Zarn, B.J. Brüsweiler, J.R. Schlatter. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 111 (2003) 255-261.
- [248] F.A. Esteve-Turrillas, S. Armenta, S. Garrigues, A. Pastor, M. De la Guardia. Headspace–mass spectrometry determination of benzene, toluene and the mixture of ethylbenzene and xylene isomers in soil samples using chemometrics. *Anal. Chim. Acta* 587 (2007) 89-96.
- [249] C. Aeppli, M. Berg, T.B. Hofstetter, R. Kipfer, R.P. Schwarzenbach. Simultaneous quantification of polar and non-polar volatile organic compounds in water samples by direct aqueous injection-gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1181 (2008) 116-124.
- [250] A. Campos-Candel, M. Llobat-Estellés, A. Mauri-Aucejo. Comparative evaluation of liquid chromatography versus gas chromatography using a β -cyclodextrin stationary phase for the determination of BTEX in occupational environments. *Talanta* 78 (2009) 1286-1292.

VII. CONTRIBUCIONES



Los resultados que se incluyen en esta tesis doctoral han sido presentados a congresos de distinto ámbito, tanto en forma de comunicación oral como en comunicaciones de tipo póster. Así mismo, se han redactado varios artículos científicos que han sido publicados en revistas de ámbito internacional:

VII.1. COMUNICACIONES A CONGRESOS (6)

VIII.1.1. Comunicaciones a congresos de ámbito internacional (1).

1. Título: ***Metodologías de tratamiento de muestra para el análisis multi-residuo de pesticidas en aceite de oliva mediante LC/MS.***

Autores: Bienvenida Gilbert López, Juan Francisco García Reyes, Amadeo R. Fernández-Alba, Antonio Molina Díaz.

Tipo de participación: Comunicación oral y póster.

Congreso: XIV Simposium Científico Técnico EXPOLIVA (Feria Internacional del Aceite de Oliva e Industrias Afines).

Lugar y fecha: Jaén, 2008.

Se corresponde con el *capítulo IV.5.* de esta Tesis.

VII.1.2. Comunicaciones a congresos de ámbito nacional (3).

2. Título: ***Analyses of pesticide residues in fruit based baby food by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (LC/TOF MS).***

Autores: Bienvenida Gilbert López, Juan Francisco García Reyes, Pilar Ortega Barrales, Antonio Molina Díaz, Amadeo R. Fernández-Alba.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XIV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Química Analítica (XIV SEQA).

Lugar y fecha: Pollensa, Mallorca, 2007.

Se corresponde con el *capítulo IV.1.* de esta Tesis.

3. Título: *Determination of postharvest fungicides in fruit juices by solid-phase extraction followed by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry (LC/TOF MS).*

Autores: Bienvenida Gilbert López, Juan Francisco García Reyes, Amadeo R. Fernández-Alba, Antonio Molina Díaz.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XIV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Química Analítica (XIV SEQA).

Lugar y fecha: Pollensa, Mallorca, 2007.

Se corresponde con el *capítulo IV.2.* de esta Tesis.

4. Título: *Rapid resolution liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry for the multi-residue analysis of pesticides in fruit-based soft drinks.*

Autores: Bienvenida Gilbert López, Juan Francisco García Reyes, Milagros Mezcua, Amadeo R. Fernández-Alba, Antonio Molina Díaz.

Tipo de participación: Póster

Congreso: 12ª Jornadas de Análisis Instrumental (JAI).

Lugar y fecha: Barcelona, 2008.

Se corresponde con el *capítulo IV.3.* de esta Tesis.

VII.1.3. Comunicaciones a congresos de ámbito regional (2).

5. Título: *Uso de segmentos dinámicos de tiempo para la simplificación de los métodos multi-residuo basados en cromatografía de líquidos/espectrometría de masas en tándem en modo MRM: ejemplo de método MRM para control de residuos de plaguicidas en aceitunas.*

Autores: Bienvenida Gilbert López, Juan Francisco García Reyes, Ana Lozano, Amadeo R. Fernández-Alba, Antonio Molina Díaz.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XII Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA 2010).

Lugar y fecha: Córdoba, 2010.

Se corresponde con el *capítulo IV.6.* de esta Tesis.

6. Título: *Desarrollo de un método para la determinación de BTEXS en aceitunas mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas con espacio de cabeza.*

Autores: José Robles-Molina, Bienvenida Gilbert-López, Juan Francisco García-Reyes, Antonio Molina-Díaz.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XII Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA 2010).

Lugar y fecha: Córdoba, 2010.

Se corresponde con el *capítulo IV.7.* de esta Tesis.

VII.2. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS (8)

1. Título: *Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: a review.* (review por invitación)

Autores: Bienvenida Gilbert-López, Juan Francisco García-Reyes, Antonio Molina-Díaz.

Referencia: Talanta 79 (2009) 109-128.

Se corresponde con el *capítulo II* de esta Tesis.

Reconocido como artículo destacado por la editorial Elsevier entre abril y junio de 2009 (posición 9 dentro de los 25 más destacados). Un año más tarde (periodo comprendido entre abril y junio de 2010), seguía siendo reconocido como un artículo destacado de la revista Talanta (posición 13 dentro de los 25 más destacados).

2. Título: *Analyses of pesticide residues in fruit-based baby food by liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry.*

Autores: Bienvenida Gilbert López, Juan Francisco García Reyes, Pilar Ortega Barrales, Antonio Molina Díaz, Amadeo R. Fernández-Alba.

Referencia: Rapid Communications in Mass Spectrometry 21 (2007) 2059-2071.

Se corresponde con el *capítulo IV.1.* de esta Tesis.

3. Título: *Determination of postharvest fungicides in fruit juices by solid-phase extraction followed by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry.*

Autores: Bienvenida Gilbert-López, Juan Francisco García-Reyes, Milagros Mezcua, Antonio Molina-Díaz, Amadeo R. Fernández-Alba.

Referencia: Journal of Agricultural and Food Chemistry 55 (2007) 10548-10556.

Se corresponde con el *capítulo IV.2.* de esta Tesis.

4. Título: *Determination of pesticide residues in fruit-based soft drinks.*

Autores: Juan Francisco García-Reyes, Bienvenida Gilbert-López, Antonio Molina-Díaz, Amadeo R. Fernández-Alba.

Referencia: Analytical Chemistry 80 (2008) 8966- 8974.

Se corresponde con el *capítulo IV.3.* de esta Tesis.

Reconocido como artículo altamente descargado (“top downloaded article”). Fue el artículo más descargado de la revista Analytical Chemistry durante el mes de Enero de 2009 y de los 12 meses anteriores a Febrero de 2009. Artículo destacado con reseña en la revista *Chemistry and Engineering News* (ACS) (8 Diciembre 2008) y en la sección “in the news” del volumen de Enero 2009 de la revista TrAC.

5. Título: *Multi-residue determination of pesticides in fruit-based soft drinks by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry.*

Autores: Bienvenida Gilbert-López, Juan Francisco García-Reyes, Milagros Mezcua, Natividad Ramos-Martos, Amadeo R. Fernández-Alba, Antonio Molina-Díaz.

Referencia: Talanta 81 (2010) 1310-1321.

Se corresponde con el *capítulo IV.4.* de esta Tesis.

6. Título: *Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue analysis in olive oil by fast liquid chromatography–electrospray mass spectrometry.*

Autores: Bienvenida Gilbert-López, Juan Francisco García-Reyes, Amadeo R. Fernández-Alba, Antonio Molina-Díaz.

Referencia: Journal of Chromatography A 1217 (2010) 3736-3747.

Se corresponde con el *capítulo IV.5.* de esta Tesis.

7. Título: *Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS.*

Autores: Bienvenida Gilbert-López, Juan Francisco García-Reyes, Ana Lozano, Amadeo R. Fernández-Alba, Antonio Molina-Díaz.

Referencia: Journal of Chromatography A 1217 (2010) 6022-6035.

Se corresponde con el *capítulo IV.6.* de esta Tesis.

8. Título: *Rapid determination of BTEXS in olives and olive oil by headspace-gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC-MS).*

Autores: Bienvenida Gilbert-López, José Robles Molina, Juan Francisco García-Reyes, Antonio Molina-Díaz.

Referencia: Talanta 83 (2010) 391-399.

Se corresponde con el *capítulo IV.7.* de esta Tesis.

ÍNDICE DE TABLAS



ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo II

| Tabla | pág |
|--|-----|
| Tabla II.1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad aguda. | 21 |
| Tabla II.2. Tipos de fibras disponibles comercialmente para SPME. | 38 |
| Tabla II.3. Principales tipos de fuentes de iones usadas en espectrometría de masas molecular | 54 |
| Tabla II.4. Tipos de analizadores de masas | 62 |
| Tabla II.5. Modos de trabajo MS/MS disponibles en un instrumento de triple cuadrupolo. | 77 |

Capítulo IV.1.

| Tabla | pág |
|---|-----|
| Tabla IV.1.1. Estudio de fragmentación en la fuente de los pesticidas estudiados. | 100 |
| Tabla IV.1.2. Resultados de las medidas de masa exacta mediante LC-TOFMS de las moléculas protonadas y los principales fragmentos de los fungicidas estudiados en un extracto de potito fortificado a un nivel de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. | 101 |
| Tabla IV.1.3. Parámetros analíticos obtenidos para el análisis de fungicidas en potitos de frutas mediante LC-TOFMS. | 107 |
| Tabla IV.1.4. Evaluación del efecto matriz: comparación de las pendientes de las curvas de calibración. | 108 |
| Tabla IV.1.5. Estudios de recuperación ($n=6$) en un extracto de potito de frutas fortificado con la mezcla de fungicidas a un nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. | 109 |
| Tabla IV.1.6. Residuos de fungicidas encontrados en las muestras de alimentos infantiles analizadas. | 110 |

Capítulo IV.2.

| Tabla | pág |
|---|-----|
| Tabla IV.2.1. Identificación de los pesticidas estudiados en extractos de zumo fortificados usando la medida de masa exacta de la molécula protonada y los fragmentos característicos mediante LC-TOFMS. Nivel de fortificación: $10 \mu\text{g L}^{-1}$. | 122 |
| Tabla IV.2.2. Estudios de recuperación en extractos de zumo fortificados con la mezcla de pesticidas a dos niveles de concentración: 10 y $20 \mu\text{g L}^{-1}$. | 124 |
| Tabla IV.2.3. Parámetros analíticos para la determinación de residuos de pesticidas en muestras de zumos mediante LC-TOFMS. | 125 |
| Tabla IV.2.4. Evaluación de los efectos matriz: comparación de las pendientes de las curvas de calibrado. | 126 |
| Tabla IV.2.5. Residuos de pesticidas encontrados en las muestras de zumo analizadas. Sólo se incluyen los datos de concentración de las muestras que dieron resultados positivos. | 127 |

Capítulo IV.3.

| Tabla | pág |
|--|------------|
| Tabla IV.3.1. Medidas de masa exacta de los iones de interés y los tiempos de retención (t_R) de los compuestos incluidos en el método para el monitoreo de pesticidas en refrescos. | 135 |
| Tabla IV.3.2. Identificación y confirmación de residuos de pesticidas en refrescos mediante LC-TOFMS. Medida de masa exacta de un extracto de refresco fortificado a un nivel de concentración de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ con una muestra de los pesticidas encontrados a lo largo de todo el estudio. | 138 |
| Tabla IV.3.3. Estudios de recuperación en refrescos fortificados con los pesticidas seleccionados a tres niveles de concentración: 5, 10 and $20 \mu\text{g L}^{-1}$. | 140 |
| Tabla IV.3.4. Parámetros analíticos para el análisis de los pesticidas seleccionados en refrescos mediante LC-TOFMS. | 142 |
| Tabla IV.3.5. Niveles de concentración de los pesticidas detectados en las muestras de refrescos analizadas. | 144 |
| Tabla S1. Detalle de las muestras de refrescos analizadas. | 150 |
| Tabla S2. Lista de compañías distribuidoras de las muestras analizadas en este estudio. | 153 |
| Tabla S3. Concentración de los residuos de pesticidas detectados en las muestras de refrescos analizadas: carbendazim (CBZ), thiabendazole (TBZ), imazalil (IMZ), imazalil metabolite (IMZ-Met), Prochloraz (PRC), Prochloraz metabolite (PRC-Met), Malathion (MLT) and Iprodione (IPR). | 153 |

Capítulo IV.4.

| Tabla | pág |
|---|------------|
| Tabla IV.4.1. Estudio de fragmentación de los 33 pesticidas seleccionados: efecto del voltaje de fragmentación en la fuente (fragmentación inducida por colisión – CID). | 162 |
| Tabla IV.4.2. Medidas de masa exacta mediante LC-TOFMS de las moléculas protonadas y los principales fragmentos (voltaje de fragmentación en la fuente: 190 V) de los pesticidas estudiados en un patrón en matriz fortificado a un nivel de concentración de $2 \mu\text{g L}^{-1}$. | 167 |
| Tabla IV.4.3. Recuperaciones obtenidas en extractos de refrescos fortificados con la mezcla de 33 pesticidas a dos niveles de concentración: 10 and $50 \mu\text{g L}^{-1}$. | 173 |
| Tabla IV.4.4. Parámetros analíticos obtenidos para el análisis de pesticidas en refrescos mediante el método LC-TOFMS desarrollado. | 176 |
| Tabla IV.4.5. Aplicación del método LC-TOFMS propuesto al análisis de muestras de refrescos de cítricos adquiridas en Europa durante el año 2009. Las concentraciones halladas de los compuestos estudiados están expresadas en $\mu\text{g L}^{-1}$. | 177 |

Capítulo IV.5.

| Tabla | pág |
|---|------------|
| Tabla IV.5.1. Parámetros identificativos de las especies de interés y MRLs europeos establecidos en aceite de oliva y aceituna. También se incluyen los estudios de recuperación y el efecto matriz obtenido con las dos metodologías de tratamiento de muestra propuestas. La primera línea en el estudio de recuperación corresponde a un nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ y la segunda línea corresponde a un nivel de concentración de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. | 196 |
| Tabla IV.5.2. Rango dinámico lineal (LDR), límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) de los pesticidas estudiados en aceite de oliva en las condiciones seleccionadas. | 200 |

Capítulo IV.6.

| Tabla | pág |
|---|------------|
| Tabla IV.6.1. Parámetros MRM para el método LC-MS/MS desarrollado para 104 pesticidas, incluyendo las transiciones cuantificadora (Q) (en negrita) y cualificadora (q) junto con los valores optimizados para el voltaje de fragmentación (fragmentor) y la energía de colisión (CE). | 215 |
| Tabla IV.6.2. Evaluación del rendimiento de los tratamientos de muestra ensayados: estudios de recuperación y efecto matriz. La primera línea en el estudio de recuperación corresponde a un nivel de concentración de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, y la segunda a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. | 222 |
| Tabla IV.6.3. Parámetros analíticos de los métodos LC-MS/MS propuestos: rango lineal (LDR), límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) expresados en $\mu\text{g kg}^{-1}$. | 227 |

Capítulo IV.7.

| Tabla | pág |
|---|------------|
| Tabla IV.7.1. Parámetros cromatográficos estudiados para la optimización de la separación de BTEXS. Las condiciones FS-3 fueron las seleccionadas para el procedimiento final, correspondiendo el parámetro "delay" al tiempo que el detector permanece apagado al comienzo del análisis para evitar que se dañe con la llegada del frente del disolvente. | 238 |
| Tabla IV.7.2. Tiempos de retención, iones SIM seleccionados para BTEXS y abundancia relativa. | 241 |
| Tabla IV.7.3. Linealidad, límites de detección y cuantificación obtenidos en aceite de oliva y aceituna mediante el método propuesto. | 245 |
| Tabla IV.7.4. Estudios de reproducibilidad en aceite de oliva y aceituna. | 245 |
| Tabla IV.7.5. Resultados de las muestras de aceite de oliva y aceituna analizadas ($\mu\text{g kg}^{-1}$). | 246 |

ÍNDICE DE FIGURAS



ÍNDICE DE FIGURAS**Capítulo II.**

| Figura | pág |
|--|------------|
| Figura II.1. Diagrama de flujo de los pasos seguidos para el establecimiento de los MRLs de pesticidas en alimentos. | 24 |
| Figura II.2. Esquema de un espectrómetro de masas. | 52 |
| Figura II.3. Esquema de una fuente ESI. 1: entrada del líquido (efluente HPLC); 2: entrada del gas de nebulización; 3: aguja de nebulización; 4: calentador del gas de secado; 5: capilar de vidrio a través del cual pasan los iones hacia el analizador. | 59 |
| Figura II.4. Esquema de un analizador de masas cuadrupolar. | 64 |
| Figura II.5. Esquema 3D (sección) de una trampa de iones cuadrupolar. Los iones son expulsados selectivamente hacia el detector. | 65 |
| Figura II.6. Esquema de un analizador de tiempo de vuelo operando en modo "V". | 69 |
| Figura II.7. Esquema de una trampa de iones lineal. | 70 |
| Figura II.8. Esquema del funcionamiento de un analizador de triple cuadrupolo. Q1: filtro de masas trabajando con una masa objetivo (color verde). Q2: el segundo cuadrupolo está envuelto por una atmósfera de gas reactivo, utilizado para la fragmentación. Q3: filtro de masas trabajando en full scan. | 75 |

Capítulo III.

| Figura | pág |
|---|------------|
| Figura III.1. Dispositivo de vacío utilizado para la extracción en fase sólida. | 86 |
| Figura III.2. Evaporador-concentrador Turbovap LV, utilizado para la evaporación de los extractos. | 87 |
| Figura III.3. Molino triturador de aceituna (modelo M-R, Talleres Lopera). | 88 |
| Figura III.4. Equipo de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS Agilent MSD TOF) utilizado en los experimentos. Grupo de investigación de análisis de pesticidas. Universidad de Almería. | 89 |
| Figura III.5. Equipo de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo (LC-QQQMS Agilent 6410 Triple Quad) utilizado en los experimentos. Grupo de investigación de análisis de pesticidas. Universidad de Almería. | 90 |
| Figura III.6. Equipo de cromatografía de gases/espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo (GC-QQQMS Varian 300-MS) utilizado en los experimentos. | 92 |

Capítulo IV.1.

| Figura | pág |
|--|------------|
| Figura IV.1.1. Esquema de la obtención del extracto de potitos de frutas mediante el método QuEChERS. | 97 |
| Figura IV.1.2. Esquema de la obtención del extracto de zumos infantiles mediante SPE. | 98 |

| | |
|--|-----|
| Figura IV.1.3. Cromatograma de iones totales (TIC) correspondiente al análisis de una muestra de potito fortificada con la mezcla de fungicidas ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) mediante LC/ESI-TOF MS. También se muestran los cromatogramas extraídos (EICs) correspondientes a la molécula protonada de algunos de los pesticidas estudiados (ventana de masa: 40 mDa). | 104 |
| Figura IV.1.4. Comparación de las pendientes de las curvas de calibración obtenidas para bitertanol, carbendazim, prochloraz y thiabendazole, usando estándares preparados por adición de patrón sobre diferentes extractos de potitos de frutas (matriz A: 55% fruta, matriz B: 100% fruta, matriz C: 85% fruta) y patrones preparados en disolvente. | 106 |
| Figura IV.1.5. (a) Cromatograma de iones totales (TIC) correspondiente al análisis mediante LC-TOFMS de un potito multifrutas (muestra nº 32), en la que fueron detectados thiabendazole ($1.1 \mu\text{g kg}^{-1}$) e imazalil ($2.2 \mu\text{g kg}^{-1}$). (b) Cromatograma extraído de imazalil (recuadro: espectro de masa exacta). (c) Cromatograma extraído de thiabendazole (recuadro: espectro de masa exacta). | 111 |
| Figura IV.1.6. (a) Cromatograma de iones totales (TIC) correspondiente al análisis mediante LC-TOFMS de un zumo multifrutas (muestra nº 17), en la que fueron detectados carbendazim ($2.9 \mu\text{g L}^{-1}$) e imazalil ($0.14 \mu\text{g L}^{-1}$). (b) Cromatograma extraído de carbendazim (recuadro: espectro de masa exacta). (c) Cromatograma extraído de imazalil (recuadro: espectro de masa exacta). | 112 |

Capítulo IV.2.

| Figura | pág |
|---|-----|
| Figura IV.2.1. Esquema de la obtención del extracto de zumos mediante SPE. | 116 |
| Figura IV.2.2. Espectro de masa exacta para la confirmación de prochloraz en un extracto de zumo fortificado a un nivel de concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. | 119 |
| Figura IV.2.3. (a) TIC correspondiente al análisis mediante LC-TOFMS de una muestra de zumo fortificada con los pesticidas estudiados (nivel de fortificación: $10 \mu\text{g L}^{-1}$). (b) EIC correspondiente a la molécula protonada de los pesticidas estudiados (ventana de masa: 20 mDa). | 120 |
| Figura IV.2.4. (a) TIC correspondiente al análisis mediante LC-TOFMS de una muestra de zumo multivitamina de 12 frutas en la que se encontraron residuos de carbendazim ($3.9 \mu\text{g L}^{-1}$), prochloraz metabolite ($1.7 \mu\text{g L}^{-1}$) e imazalil ($2.1 \mu\text{g L}^{-1}$). (b) EIC correspondiente a carbendazim (b.1), prochloraz metabolite (b.2) e imazalil (b.3). | 128 |

Capítulo IV.3.

| Figura | pág |
|---|-----|
| Figura IV.3.1. Esquema de la obtención del extracto de refrescos mediante SPE. | 133 |
| Figura IV.3.3. Concentraciones medias totales (expresadas en $\mu\text{g L}^{-1}$) de los pesticidas encontrados en las muestras de refrescos, ordenadas por países (en azul) y límite máximo de residuos (MRL) tolerado para la suma de pesticidas ($0.5 \mu\text{g L}^{-1}$) según el estándar europeo. El número de muestras aparece entre paréntesis al lado de cada país. Los valores de concentración media total de cada país excedían el MRL establecido para agua de consumo humano en la mayoría de los casos, especialmente en España y el Reino Unido, donde las concentraciones encontradas eran 25 y 35 veces el estándar europeo, respectivamente. | 145 |
| Figura IV.3.2. Concentraciones encontradas de imazalil y thiabendazole (en $\mu\text{g L}^{-1}$) en algunas muestras seleccionadas de distintos países europeos, donde (O) = sabor a naranja; (L) = sabor a limón. El límite máximo de residuos (MRL) tolerado en agua de consumo por la normativa europea para un pesticida individual es $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$. Las concentraciones de imazalil y thiabendazole detectadas eran más de 320 veces superiores al MRL europeo. | 146 |

| | |
|--|-----|
| Figura IV.3.4. Análisis mediante LC-TOFMS de los residuos de pesticidas presentes en una muestra de refresco adquirida en el aeropuerto de Gatwick, en Londres. (a) Cromatograma de iones totales. (b) EICs de los compuestos seleccionados: (b.1) thiabendazole ($9.44 \mu\text{g L}^{-1}$), (b.2) imazalil metabolito ($0.689 \mu\text{g L}^{-1}$) e (b.3) imazalil ($30.8 \mu\text{g L}^{-1}$). La concentración total de pesticidas detectados fue de $41.5 \mu\text{g L}^{-1}$, 83 veces el límite permitido. Las estructuras y las masas exactas de los pesticidas están también incluidas en la figura. | 147 |
|--|-----|

Capítulo IV.4.

| Figura | pág |
|--|-----|
| Figura IV.4.1. Esquema de la obtención del extracto de refrescos mediante SPE. | 160 |
| Figura IV.4.2. (a) Cromatograma de iones totales (TIC) de un extracto de refresco fortificado con la mezcla de pesticidas a analizar. (b) Cromatogramas extraídos de algunos compuestos: (b.1.) imazalil, $2 \mu\text{g L}^{-1}$, (b.2.) malathion, $2 \mu\text{g L}^{-1}$, (b.3.) imidacloprid, $10 \mu\text{g L}^{-1}$, (b.1.) thiabendazole, $10 \mu\text{g L}^{-1}$. | 171 |
| Fig. IV.4.3. Ejemplo de una muestra de refresco de naranja que contenía imazalil ($3.2 \mu\text{g L}^{-1}$) y thiabendazole ($0.6 \mu\text{g L}^{-1}$). a) Cromatograma de iones totales de la muestra; b.1.) Cromatograma extraído de thiabendazole; b.2.) Identificación de thiabendazole en la muestra a un tiempo de retención de 4.35 min debido al espectro de masa exacta obtenido en dicho punto del EIC (masa teórica: 202.0433; masa experimental: 202.0432); c.1.) Cromatograma extraído de imazalil; c.2.) Identificación de imazalil en la muestra a un tiempo de retención de 4.35 min debido al espectro de masa exacta obtenido en dicho punto del EIC (masa teórica: 297.0555; masa experimental: 297.0563). | 178 |

Capítulo IV.5.

| Figura | pág |
|--|-----|
| Figura IV.5.1. Esquema del protocolo QuEChERS utilizado para obtener los extractos de aceite. | 184 |
| Figura IV.5.2. Esquema del protocolo MSPD utilizado para obtener los extractos de aceite. | 185 |
| Figura IV.5.3. a) Cromatograma de ión extraído (ventana de masa: 10 mDa) para las moléculas protonadas de pirimicarb (5.81 min), diuron (9.06 min), terbuthylazine (10.00 min) y diazinon (11.87 min), obtenidos a partir de una muestra de aceite de olive fortificada con los pesticidas estudiados ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$, QuEChERS). b) Cromatograma de ión extraído (ventana de masa: 10 mDa) para las moléculas protonadas de pirimicarb (5.81 min), diuron (9.06 min), terbuthylazine (10.00 min) y diazinon (11.87 min), obtenidos a partir de una muestra de aceite de olive fortificada con los pesticidas estudiados ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$, MSPD). | 190 |
| Figura IV.5.4. Comparación de la limpieza de los extractos usando los cromatogramas iónicos totales (TICs) obtenidos mediante análisis por LC-ESI-MS en modo "full scan" (en polaridad positiva y negativa) y mediante análisis por GC-MS (Full scan, ionización por impacto electrónico (EI)). La señal correspondiente al extracto obtenido mediante el procedimiento QuEChERS aparece representada por una línea sólida, mientras que la línea punteada corresponde al extracto obtenido mediante el procedimiento MSPD. a) TICs de los extractos de aceite de oliva analizados mediante LC-ESI(+) TOF MS. b) TICs de los extractos de aceite de oliva analizados mediante LC-ESI(-) TOF MS. c) TICs de los extractos de aceite de oliva analizados mediante GC-EI-MS. | 192 |
| Figura IV.5.5. Distribución de los porcentajes de recuperación medios de los pesticidas estudiados en muestras de aceite de oliva fortificadas, utilizando los dos métodos de tratamiento de muestra ensayados a dos niveles de concentración (10 y $100 \mu\text{g kg}^{-1}$). | 195 |

| | |
|---|-----|
| Figura IV.5.6. Estudio de precisión. Distribución de los valores medios de la desviación estándar relativa (RSD%) para los 104 pesticidas estudiados en muestras de aceite de oliva fortificadas, utilizando los dos métodos de tratamiento de muestra ensayados a dos niveles de concentración (10 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). | 196 |
| Figura IV.5.7. Distribución del efecto matriz (expresado en términos de porcentaje de incremento o disminución de la señal) obtenido para los 105 pesticidas analizados en aceite de oliva, utilizando los dos métodos ensayados. | 204 |

Capítulo IV.6.

| Figura | pág |
|--|-----|
| Figura IV.6.1. Esquema del protocolo QuEChERS utilizado para obtener los extractos de aceituna. | 209 |
| Figura IV.6.2. Esquema del protocolo MSPD utilizado para obtener los extractos de aceituna. | 210 |
| Figura IV.6.3. Cromatograma MRM correspondiente a la transición cuantificadora elegida (en modo DMRM) para: (1) dimethoate, (2) simazine, (3) terbuthylazine y (4) tebuconazole, en (a) un extracto QuEChERS fortificado a un nivel de concentración de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, y (b) un extracto MSPD fortificado a un nivel de concentración de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. | 214 |
| Figura IV.6.4. Distribución de los porcentajes de recuperación medios de los pesticidas estudiados en aceitunas fortificadas, utilizando los dos métodos de tratamiento de muestra ensayados a dos niveles de concentración (10 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). | 220 |
| Figura IV.6.5. Estudio de precisión. Distribución de los valores medios de la desviación estándar relativa (RSD %) para los 104 pesticidas estudiados en aceitunas fortificadas, utilizando los dos métodos de tratamiento de muestra ensayados a dos niveles de concentración (10 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). | 221 |
| Figura IV.6.6. Distribución del efecto matriz (expresado en términos de porcentaje de incremento o disminución de la señal) obtenido para los 104 pesticidas seleccionados, utilizando los dos métodos ensayados. | 231 |

Capítulo IV.7.

| Figura | pág |
|--|-----|
| Figura IV.7.1. Cromatograma de iones totales (TIC) y cromatogramas SIM de (a) un aceite de oliva fortificado con 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de la mezcla de BTEXS y (b) una muestra de pasta de aceituna fortificada con la mezcla de BTEXS al mismo nivel de concentración (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$). | 239 |
| Figura IV.7.2. Optimización del tiempo de equilibrado utilizando un aceite de olive fortificado con 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de la mezcla de BTEXS. | 242 |
| Figura IV.7.3. Optimización de la adición de sal a una muestra homogeneizada de pasta de aceituna fortificada a un nivel de concentración de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. | 244 |
| Figura IV.7.4. Ejemplos de positivos de BTEXS encontrados en muestras reales a bajos niveles de concentración (< 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$): a) benceno en una muestra de aceite de oliva (A-10); b) tolueno en una muestra de aceite de oliva (A-05); c) m- y p-xileno en una muestra de pasta de aceituna (O-08); d) estireno en una muestra de pasta de aceituna (O-07). | 248 |

ACRÓNIMOS



ACRÓNIMOS

| Acrónimo | Definición |
|----------|---|
| A | |
| Ac | <i>Acetate</i> . Acetato |
| APCI | <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> . Ionización química a presión atmosférica |
| API | <i>Atmospheric pressure ionization</i> . Ionización a presión atmosférica |
| APPI | <i>Atmospheric pressure photoionization</i> . Fotoionización a presión atmosférica |
| ASE | <i>Accelerated solvent extraction</i> . Extracción acelerada con disolventes También denominada <i>PLE (pressurized liquid extraction)</i> ó <i>PSE (pressurized solvent extraction)</i> |
| B | |
| BTEXS | Benceno, tolueno, etil-benceno, (o-,m-,p-)xilenos, estireno |
| C | |
| CI | <i>Chemical ionization</i> . Ionización química |
| CID | <i>Collision-induced dissociation</i> . Disociación inducida por colisiones |
| D | |
| DART | <i>Direct analysis in real time</i> . Análisis directo en tiempo real |
| DBDI | <i>Dielectric barrier discharge ionization</i> . Descarga en una barrera dieléctrica |
| DESI | <i>Desorption electrospray ionization</i> . Desorción por electrospray |
| E | |
| ECD | <i>Electron capture detector</i> . Detector de captura electrónica |
| EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> . Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria |
| EI | <i>Electron impact</i> . Impacto electrónico |
| EIC | <i>Extracted ion chromatogram</i> . Cromatograma extraído |
| ELSD | <i>Evaporative light scattering detector</i> . Detector de luz dispersada tras evaporación |
| ESA | <i>Electrostatic energy analyzer</i> . Analizador electrostático |
| ESI | <i>Electrospray ionization</i> . Electrospray También conocido como <i>ionspray</i> |
| F | |
| FID | <i>Flame ionization detector</i> . Detector de ionización de llama |
| FT | <i>Fourier transform</i> . Transformada de Fourier |
| G | |
| GC | <i>Gas chromatography</i> . Cromatografía de gases |
| GCB | <i>Graphitized carbon black</i> . Carbón grafitizado |
| GC-MS | <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> . Cromatografía de gases-espectrometría de masas |
| GPC | <i>Gel permeation chromatography</i> . Cromatografía de permeación en gel |
| H | |
| HAc | <i>Acetic acid</i> . Ácido acético |
| HLB | <i>Hydrophilic lipophilic balanced copolymer</i> . Copolímero de balance hidrofílico-lipofílico. |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> . Cromatografía de líquidos de alta eficacia |

| Acrónimo | Definición |
|-----------------|---|
| HS | <i>Headspace</i> . Espacio de cabeza |
| I | |
| ICP | <i>Inductively coupled plasma</i> . Plasma acoplado generado por inducción |
| ICR | <i>Ion cyclotron resonance</i> . Resonancia ciclotrónica de iones |
| IDA | Ingesta Diaria Admisible (<i>ADI – Acceptable daily intake</i>) |
| (Q)IT | <i>(Quadrupole) Ion trap</i> . Trampa de iones cuadrupolar o tridimensional |
| L | |
| LC | <i>Liquid chromatography</i> . Cromatografía líquida |
| LC-MS/MS | <i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> . Cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem |
| LC-TOFMS | <i>Liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry</i> . Cromatografía líquida-espectrometría de masas con tiempo de vuelo |
| LDR | <i>Linear dynamic range</i> . Rango dinámico lineal (intervalo lineal) |
| LIT (LTQ) | <i>Linear ion trap</i> . Trampa de iones lineal |
| LLE | <i>Liquid-liquid extraction</i> . Extracción líquido-líquido |
| LOD | <i>Limit of detection</i> . Límite de detección |
| LOQ | <i>Limit of quantitation</i> . Límite de cuantificación |
| LPME | <i>Liquid phase microextraction</i> . Microextracción en fase líquida |
| LTP | <i>Low temperature plasma</i> . Plasma de baja temperatura |
| M | |
| MAE | <i>Microwave assisted extraction</i> . Extracción asistida por microondas |
| MAHs | <i>Mono-ring aromatic hydrocarbons</i> . Hidrocarburos aromáticos policíclicos |
| MALDI | <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> . Desorción/ionización por laser asistida por una matriz |
| MeCN | <i>Acetonitrile</i> . Acetonitrilo |
| MeOH | <i>Methanol</i> . Metanol |
| MIP | <i>Molecularly imprinted polymer</i> . Polímero de impresión molecular |
| MRL | <i>Maximum residue level</i> . Límite máximo de residuos permitido |
| MRM | <i>Multiple reaction monitoring</i> |
| MS | <i>Mass spectrometry</i> . Espectrometría de masas |
| MS/MS | <i>Tandem mass spectrometry</i> . Espectrometría de masas en tándem |
| MSPD | <i>Matrix solid phase dispersion</i> . Dispersión de la muestra en fase sólida |
| m/z | <i>Mass-to-charge ratio</i> . Relación masa-carga |
| N | |
| ND | <i>Non-detected</i> . No detectado |
| NOEL | <i>No observed effective level</i> . Nivel de dosis sin efecto |
| NPD ó TID | <i>Thermionic Ionization detector</i> . Detector termoiónico |
| O | |
| OT | Orbitrap |
| P | |
| PAC | Política Agraria Común |
| PIS | <i>Product ion scan</i> |

| Acrónimo | Definición |
|-----------------|--|
| POPs | <i>Persistent organic pollutants</i> . Compuestos orgánicos persistentes |
| PSA | Amina primaria-secundaria |
| Q | |
| Q | <i>Quadrupole</i> . Cuadrupolo (analizador de masas) |
| QQQ | <i>Triple quadrupole</i> . Triple cuadrupolo |
| Q-TRAP | Instrumento similar a un triple cuadrupolo en el que el tercer cuadrupolo se ha sustituido por una trampa lineal |
| QuEChERS | <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> |
| R | |
| r | <i>Correlation coefficient</i> . Coeficiente de correlación. |
| RSD | <i>Relative standard deviation</i> . Desviación estándar relativa (coeficiente de variación) |
| S | |
| SDME | <i>Single-drop microextraction</i> . Microextracción sobre una sola gota |
| SFE | <i>Supercritical fluid extraction</i> . Extracción con fluidos supercríticos |
| SIM | <i>Selected ion monitoring</i> |
| SLE | <i>Solid-liquid extraction</i> . Extracción sólido-líquido |
| S/N | <i>Signal-to-noise ratio</i> . Relación señal-ruido |
| SPE | <i>Solid-phase extraction</i> . Extracción en fase sólida |
| SPME | <i>Solid-phase microextraction</i> . Microextracción en fase sólida |
| T | |
| TIC | <i>Total ion chromatogram</i> . Cromatograma iónico total |
| TOF | <i>Time of flight</i> . Tiempo de vuelo (analizador de masas) |
| TQ | <i>Triple quadrupole</i> . Triple cuadrupolo |
| t _R | <i>Retention time</i> . Tiempo de retención |
| U | |
| UE | <i>European Union (EU)</i> . Unión Europea |
| UV | <i>Ultraviolet</i> . Ultravioleta |