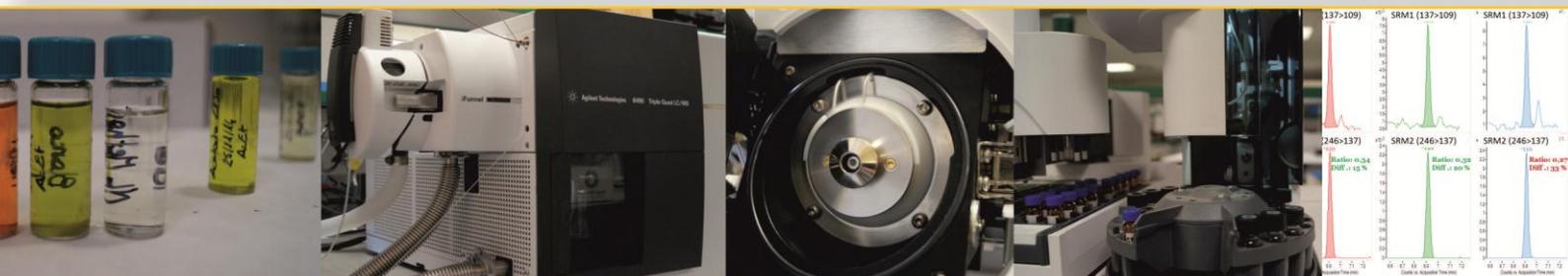




UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Master en Química.
Especialidad "Química Ambiental y de la Vida"

EFFECTO DE LA MATRIZ EN LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN FRUTAS Y HORTALIZAS MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA Y GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS TRIPLE CUADRUPOLO EN TÁNDEM



Autor: Sosa Alexis Lionel

Director: Fernández-Alba Amadeo R.

Codirector: Mezcua Peral Milagros

Almería, 27 de julio de 2015

AGRADECIMIENTO

Al catedrático Amadeo R. Fernández-Alba por su enseñanza y por ofrecerme la oportunidad de capacitación y entrenamiento en el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para Residuos de Pesticidas en Frutas y Vegetales.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por financiar el perfeccionamiento y en especial a Cecilia Kulczycki y Claudia González por sus gestiones para que esto fuera posible.

Al excelente grupo humano del laboratorio y muy especialmente a Ana Lozano y Samanta Uclés por su enorme contribución en el trabajo fin de máster.

A Mariana Jiménez Veuthey por acompañarme en este proyecto en Almería.

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. OBJETIVOS.....	4
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
3.2. OBJETIVO ESPECIFICO	4
4. MATERIALES Y MÉTODOS	5
4.1. CONSIDERACIONES GENERALES.....	5
4.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	5
4.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS MULTIRESIDUOS DE PESTICIDAS	6
4.3.1. Método QuEChERS Citrato	7
4.3.2. Método QuEChERS Citrato sin clean-up.....	8
4.3.3. Método Acetato de Etilo	9
4.3.4. Método Dutch mini-Luke (NL)	10
4.4. ANÁLISIS POR LC-QqQ-MS/MS Y GC-QqQ-MS/MS	12
4.4.1. GC-QqQ-MS/MS.	12
4.4.2. LC-QqQ-MS/MS.	19
4.5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	25
4.5.1. Estudio de interferencias.....	25
4.5.2. Estudio de linealidad, efecto matriz (EM) y potenciales falsos negativos	25
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1. GC-QqQ-MS/MS.....	27
5.1.1. Interferencias	27
5.1.2. Linealidad (R^2) y efecto matriz (EM).....	31
5.1.3. Potenciales falsos negativos	34
5.2. LC-QqQ-MS/MS.....	37
5.2.1. Interferencias	37
5.2.2. Linealidad y efecto matriz	40
Fig. 14. Efecto matriz por matriz. LC-QqQ-MS/MS.....	42
5.2.3. Potenciales falsos negativos	42
6. CONCLUSIONES	45
7. REFERENCIAS.....	46

1. RESUMEN

La cromatografía gaseosa (GC) y líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo en tándem (MS/MS) constituyen las principales herramientas en el análisis de residuos de pesticidas. Sin embargo el efecto matriz (EM) y los potenciales falsos negativos son graves problemas que se presentan con frecuencia. En los procesos de validación de metodologías de análisis multiresiduos se cuantifica el EM pero en pocos casos se estudia las interferencias presentes. Por tanto, el objetivo del trabajo fue determinar las interferencias, el EM, linealidad y los potenciales falsos negativos aplicando métodos de análisis multiresiduos de pesticidas (MRMs) mediante el empleo de LC-QqQ-MS/MS y GC-QqQ-MS/MS. Para ello se seleccionaron 25 blancos de frutas y hortalizas. Se aplicaron 4 MRMs (QuEChERS Citrato, QuEChERS Citrato sin clean-up, Acetato de Etilo y Dutch mini-Luke). Los extractos obtenidos se analizaron por LC-QqQ-MS/MS y GC-QqQ-MS/MS. El estudio de EM, linealidad y potenciales falsos negativos se realizó sobre 10 matrices problemáticas. Previo al análisis, los extractos de las matrices se enriquecieron con una mezcla de pesticidas (220 para GC y 160 para LC). Las interferencias estuvieron presentes en la mayoría de las matrices siendo más intensas en cromatografía de gases. Los MRMs presentaron un comportamiento similar con respecto a las interferencias. Excepto para el método NL que en algunos casos duplicó el porcentaje de interferencias. La linealidad medida a través del coeficiente de determinación fue en la mayoría de los casos superior a 0.99 %. Los resultados de EM en GC-QqQ-MS/MS fueron elevados con valores superiores al 50 %. Además, el 98 % de los compuestos presentó efecto de aumento. En LC-QqQ-MS/MS el 80 % de los casos no presentó EM o fue moderado. Además hubo un predominio del efecto de supresión en el 70 % de los compuestos. La presencia de potenciales falsos negativos en GC-QqQ-MS/MS estuvo en el rango de 0.9-9 % del total de compuestos. En LC-QqQ-MS/MS la incidencia fue más baja con valores comprendidos en el rango de 0-4.4 %. Por otro lado, no se pudo establecer una correlación entre los resultados de interferencias y potenciales falsos negativos. Los resultados de interferencias permitieron identificar las matrices más complejas. También se pudieron establecer los problemas de efecto matriz y la presencia de potenciales falsos negativos. Los resultados indican la necesidad de implementar estrategias que reduzcan los problemas de cuantificación e identificación.

2. INTRODUCCIÓN

En los modelos productivos de frutas y hortalizas se necesitan diversos pesticidas para la protección de los mismos frente al ataque por plagas. El mercado mundial de pesticidas tiene una amplia oferta que incluyen herbicidas, fungicidas, insecticidas y fitoreguladores entre otros. El uso de estos productos supone la presencia de residuos de pesticidas en las frutas y hortalizas. Coscolla (1). Por tanto es fundamental la regulación y control garantizando la inocuidad de los alimentos y protegiendo la salud de los consumidores.

Los países establecen reglamentaciones específicas para la producción, almacenamiento, transporte, fraccionamiento, comercialización y usos de pesticidas. Se definen los cultivos donde podrán ser aplicados, las plagas objetivos, períodos de carencia (tiempo desde la aplicación hasta la cosecha) y los Límites Máximos de Residuos (LMR). En Argentina tiene vigencia la resolución N° 934/2010 del SENASA (2), donde se encuentra un listado de los pesticidas (materia activa) autorizados por cultivo y sus correspondientes LMR's. Por su parte en la Unión Europea está vigente la Reglamentación (CE) 396/2005 (3). La aplicación de las Buenas Prácticas Agrícolas garantiza el cumplimiento de los LMR's, pero es necesario realizar controles. Por ello se establecen programas de vigilancia de residuos de pesticidas en frutas y hortalizas realizando análisis de los niveles presentes. La Unión Europea es referente a nivel mundial y el organismo responsable es la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). En el informe anual del 2013, EFSA (4) destacan que el 97.4 % de las muestras evaluadas no contenían residuos de pesticidas o los niveles eran inferiores al LMR. Sin embargo un 5.7 % de productos procedentes de terceros países tuvieron niveles de residuos de pesticidas por encima de los LMR's. Los resultados obtenidos indican la necesidad de implementar y fortalecer los programas de vigilancia de las frutas y hortalizas que consumimos.

Los laboratorios que tienen la responsabilidad de realizar los análisis cuentan con una diversidad de sistemas cromatográficos y métodos de análisis multiresiduos de pesticidas. En los programas de control europeos hay una tendencia hacia los métodos de análisis multiresiduos de pesticidas. Hanot et al. (5). Por otro lado la cromatografía gaseosa y líquida acoplada a espectrometría de masas triplecuadrupolo en tándem (GC-QqQ-MS/MS y LC-QqQ-MS/MS) constituyen las principales herramientas de análisis

en laboratorios de control a nivel mundial. Lehotay et al. (6). Mediante procesos sencillos y rápidos se pueden analizar más de 100 compuestos objetivos en un solo análisis. Además ofrecen gran especificidad, selectividad y rendimiento. Van Eeckhaut et al. (7).

No obstante, los elevados costos de compra de estos equipos y el mantenimiento constituyen una desventaja. También preocupa la susceptibilidad al efecto matriz (EM), el cual influye en la cuantificación cuando se analizan muestras complejas. Kwon et al. (8). El procedimiento SANCO/12571/2013 (9) define al EM como la influencia de 1 o más componentes no detectados de la muestra en la medida de la masa o concentración del analito. En sistemas GC-QqQ-MS/MS con impacto electrónico (EI) existe un predominio de efecto de aumento. Mientras que en LC-QqQ-MS/MS con ionización electrospray (ESI) predomina el efecto de supresión. La forma más aceptada para medir EM es por comparación de pendientes de compuestos en disolvente y en matriz. A mayor porcentaje de EM mayor diferencia en las pendientes. Otra forma usada es el método de infusión post-columna. Donde se infunde en forma constante una solución mezcla de compuestos en el ingreso a la fuente de ionización. Constituye una medida cualitativa de la región con mayor probabilidad de presentar EM. Las interferencias también pueden afectar los parámetros de identificación de compuestos dando falsos positivos o falsos negativos. El procedimiento SANCO/12571/2013 (9) define como una respuesta positiva o negativa producida por un compuestos(s) distinto del analito contribuyendo a la respuesta medida para el analito o haciendo una integración menos confiable o exacta.

Los procesos de validación y control de calidad establecen muchos parámetros que deben cumplirse. Por ejemplo, el EM debe encontrarse en el rango de valores $\pm 20\%$. Por otro lado, las interferencias no siempre influyen en la intensidad del EM pudiendo afectar solamente a la respuesta del analito, por tanto al proceso de cuantificación. Poca información existe sobre las interferencias que producen las matrices como frutas y hortalizas. Por tanto se plantea estudiar las interferencias en 25 matrices de frutas y hortalizas mediante la aplicación de MRMs y sistemas QqQ-MS/MS y LC-QqQ-MS/MS.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de la matriz en la identificación y cuantificación de residuos de pesticidas en frutas y hortalizas aplicando métodos de análisis multiresiduos de pesticidas mediante el empleo de LC-QqQ-MS/MS y GC-QqQ-MS/MS.

3.2. Objetivo específico

- ✓ Determinar la influencia de 4 métodos de análisis multiresiduos de pesticidas en la presencia de interferentes en frutas y hortalizas mediante LC-QqQ-MS/MS y GC-QqQ-MS/MS.
- ✓ Cuantificar el efecto matriz mediante comparación de pendientes y caracterizar la naturaleza del mismo (aumento o supresión).
- ✓ Establecer los coeficientes de determinación y los porcentajes de potenciales falsos negativos por matriz y método de análisis multiresiduos de pesticidas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Consideraciones generales

Interferencia: señal de un componente con una intensidad igual o superior al 50 % de la que presenta el analito a 10 µg/L, con una diferencia en el tiempo de retención respecto al del analito de ± 0.2 minutos.

Estándar interno de inyección: la adición se realizó después de la etapa de extracción con 2 µL de Dimethoato-d6 a 2.50 mg/L para los análisis por cromatografía líquida y 2 µL de Lindano-d6 para cromatografía gaseosa a 1.25 mg/L.

Estándar de pesticidas: los estándares de alta pureza fueron obtenidos de Ehrenstorfer (Ausburg, Alemania), Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y Riedel-de Haen (Selze, Alemania). La solución stock de cada plaguicida se preparó a 1000-2000 mg/L y se almacenó en vial color ámbar con tapa a rosca a -20 °C. A partir de la misma se prepararon soluciones de trabajo a 1 mg/L que fueron utilizadas para la optimización de los parámetros de adquisición del espectrómetro de masas. Para los estudios de interferencias, linealidad y efecto matriz, se prepararon soluciones mezclas a 10 mg/L y después diluciones para la recta de calibrado en un rango de 0.01-0.2 mg/L.

Efecto matriz: se considera la definición establecida en el procedimiento SANCO/12571/2013 (9). Constituye una influencia de 1 o más componentes no detectados de la muestra en la medida de la masa o concentración del analito. La respuesta en algunos sistemas de análisis puede verse afectada por la presencia de componentes coextraídos de la matriz. Se puede observar un aumento o disminución (supresión) de la señal del detector.

Términos en inglés: en el trabajo se utilizan algunos términos en el idioma inglés a modo de Galicismo. Por ejemplo: backflush, Solvent delay, Single Reaction Monitoring, buffer, etc.

4.2. Procesamiento de muestras

En la figura 1 se presenta el listado de muestras seleccionadas para el estudio. Las mismas se compraron en el mercado local de Almería, España. La trituración y homogeneización se realizó mediante molinillo Thermomix Vorwerk. El tamaño final de partículas fue adecuado para evitar las variaciones entre sub-muestras y facilitar la posterior extracción con disolventes. El control de la temperatura es un factor clave

porque influye en la calidad del triturado y en la estabilidad de compuestos termosensibles.



Fig. 1. Muestras seleccionadas para el estudio

4.3. Métodos de análisis multiresiduos de pesticidas

Los métodos de análisis multiresiduos (MRMs) son ampliamente utilizados a nivel mundial. Lozano et al. (10) señalaron 3 métodos MRMs como principales (QuEChERS, Acetato de Etilo y mini-Luke). En el último Workshop Latinoamericano de Residuos de Pesticidas “LAPRW 2015” se reflejó la importancia de estos métodos. El 66 % de los trabajos publicados en el área “*desarrollo y aplicación de metodologías analíticas*” correspondían a los 3 MRMs principales. Además el 77 % pertenecía al método QuEChERS y sus distintas versiones. Ferrer et al. (11) indicaron en los resultados del “*European Union proficiency test in fruit and vegetables*” un incremento exponencial de los métodos basados en el uso de acetonitrilo. Por tanto, el estudio de interferencias se realizó mediante MRM QuEChERS citrato, QuEChERS citrato sin clean-up, Acetato de etilo y Dutch mini-Luke (NL). El procedimiento detallado de cada método así como los conceptos teóricos se detalla a continuación.

4.3.1. Método QuEChERS Citrato

4.3.1.1. Fundamentos y procedimiento

QuEChERS Citrato es un método de análisis multiresiduos de pesticidas basado en la versión original de Anastassiades et al. (12). La palabra es un acrónimo en inglés que significa Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe. Es la principal herramienta analítica utilizada por los laboratorios. Desde el desarrollo del método fueron surgiendo distintas versiones. En el año 2010 se registraron 10 empresas que producen y comercializan este producto. El acetonitrilo, produce la extracción/partición de los residuos de pesticidas. El $MgSO_4$ elimina el agua del acetonitrilo. Asimismo participa en la etapa de clean-up con el mismo fin. El NaCl mejora la polaridad de la fase orgánica permitiendo recuperaciones mayores de compuestos polares. Los compuestos de citrato se utilizan como un buffer débil y se adicionan para regular el pH en torno a 5. La amina primaria-secundaria (PSA) participa en la etapa de limpieza o clean-up y es responsable de limpiar el extracto de compuestos interferentes tales como azúcares, ácidos grasos y pigmentos.

En un tubo de centrífuga de polipropileno (PP) de 50 mL se adicionaron $10 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ de muestra previamente homogeneizada y 10 mL de acetonitrilo. La mezcla se agitó mediante agitador axial por 4 min. A continuación se adicionaron 4 g de $MgSO_4$, 1 g de NaCl, 1 g de citrato trisódico dihidrato ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) y 0,5 g de citrato disódico sesquihidrato ($C_6H_5Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$). La mezcla se agitó nuevamente con agitador axial por 5 min y después se centrifugó a 3700 rpm durante 4 min. Una alícuota de 5 mL de sobrenadante se transfirió a un tubo de centrifuga de PP de 15 mL con 750 mg de $MgSO_4$ y 125 mg de PSA. La mezcla se agitó en vortex por 30 s y se centrifugó a 3700 rpm por 5 min. El sobrenadante se traspasó a un vial de 4 mL con tapa a rosca mediante pipeta Pasteur. El pH se corrigió adicionando 40 μL de ácido fórmico al 5 % (v/v) en acetonitrilo. Para los análisis por cromatografía se realizaron cambios en los disolventes. En cromatografía de gases 50 μL del extracto se evaporó hasta sequedad mediante corriente suave de N_2 y después se reconstituyó con 50 μL de acetato de etilo. Después se adicionó 2 μL del estándar interno de inyección (Lindano-d6 1.25 mg/L). En cromatografía líquida 50 μL del extracto se diluyó 5 veces con agua ultrapura tipo 1 obteniendo un extracto final de acetonitrilo: agua 20:80, v/v y se adicionó 2 μL del estándar interno de inyección (Dimethoato-d6 2.50 mg/L).

4.3.1.2. Aparatos y reactivos

- ✓ Centrífuga con cabezal para tubos PP de 50 y 15 mL, marca Mixtasel
- ✓ Agitador axial Agitax SR1CP57
- ✓ Balanza Mettler Toledo, AB204-5. Rango 10 mg-220 g
- ✓ Balanza Mettler Toledo, Pb1501. Rango 5-1510 g
- ✓ Vortex yellow-line TTS-2
- ✓ Pipetas automáticas Gilson, Pipetman. Volumen regulable de 1000-5000 μL , 20-100 μL , 2-20 μL , 50-200 μL y 200-1000 μL .
- ✓ Pipeta de vidrio de 10 mL
- ✓ Viales de inyección con tapa a rosca de 2 mL color ambar y viales con tapa a rosca de 4 mL transparentes
- ✓ Tubos de centrifuga PP de 50 y 15 mL
- ✓ Disolventes: Acetonitrilo Sigma-Aldrich para HPLC, pureza $\geq 99.9\%$. Agua ultra pura tipo 1, acetato de etilo Fluka, pureza $> 99.8\%$ y ácido fórmico Sigma-Aldrich, pureza $\geq 96\%$
- ✓ Sales: MgSO_4 anhidro Sigma-Aldrich, pureza $\geq 98\%$, NaCl Sigma-Aldrich, pureza $\geq 99.8\%$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ EMD Millipore Corporation, pureza 99% , $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ Sigama-Aldrich, pureza 99% y PSA Supelco.

4.3.2. Método QuEChERS Citrato sin clean-up

4.3.2.1. Fundamentos y procedimiento

QuEChERS Citrato sin clean-up es similar al método QuEChERS Citrato. Solo difiere en que no se realiza la etapa de limpieza (uso de MgSO_4 y PSA). Por otro lado al no usar PSA no se adiciona ácido fórmico en el extracto. Es de esperar que el extracto obtenido presente mayor cantidad de azúcares y compuestos lipofílicos tales como ceras y pigmentos.

4.3.2.2. Aparatos y reactivos

- ✓ Centrífuga con cabezal para tubos PP de 50 mL, marca Mixtasel
- ✓ Agitador axial Agitax SR1CP57
- ✓ Balanza Mettler Toledo, AB204-5. Rango 10mg-220 g
- ✓ Balanza Mettler Toledo, Pb1501. Rango 5-1510 g

- ✓ Vortex yellow-line TTS-2
- ✓ Pipetas automáticas Gilson, Pipetman. Volumen regulable de 1000-5000 μL , 2-20 μL , 50-200 μL y 200-1000 μL .
- ✓ Pipeta de vidrio de 10 mL
- ✓ Viales de inyección con tapa a rosca de 2 mL color ámbar y viales con tapa a rosca de 4 mL transparente
- ✓ Tubos de centrifuga PP de 50 mL
- ✓ Disolventes: Acetonitrilo Sigma-Aldrich para HPLC, pureza ≥ 99.9 %. Agua ultra pura tipo 1 y acetato de etilo Fluka, pureza > 99.8 %
- ✓ Sales: MgSO_4 anhidro Sigma-Aldrich, pureza ≥ 98 %, NaCl Sigma-Aldrich, pureza ≥ 99.8 %, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ EMD Millipore Corporation, pureza 99 % y $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ Sigama-Aldrich, pureza 99 %.

4.3.3. Método Acetato de Etilo

4.3.3.1. Fundamentos y procedimiento

Acetato de Etilo es un método de análisis multiresiduos de pesticidas adecuados para compuestos de polaridad media y para compuestos no polares en una amplia gama de matrices. El método fue desarrollado por Uclés et al. (13) en base a la versión original Sueca “SweEt method”. El acetato de etilo produce la extracción/partición de los residuos de pesticidas. El MgSO_4 elimina agua del acetato de etilo. El NaCl mejora la polaridad de la fase orgánica permitiendo recuperaciones mayores de compuestos polares.

En un tubo de centrifuga de PP de 50 ml se adicionaron $10 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ de muestra previamente homogeneizada y 10 mL de acetato de etilo. La mezcla se agitó manualmente por 3 s. A continuación se adicionaron 8 g de MgSO_4 y 1,5 g NaCl . La mezcla se agitó mediante agitador axial por 15 min y después se centrifugó a 3700 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un vial de 4 mL con tapa a rosca y se almacenó en congelador. Para los análisis por cromatografía de gases se tomaron 50 μL de extracto y se adicionó 2 μL del estándar interno de inyección (Lindano- d_6 1.25 mg/L). Para cromatografía líquida 50 μL del extracto se evaporó hasta sequedad mediante corriente suave de N_2 . Después se reconstituyó con 50 μL de acetonitrilo y 200 μL de agua ultrapura tipo 1 obteniendo un extracto final de acetonitrilo: agua 20:80, v/v.

Por último se adicionó 2 μL del estándar interno de inyección (Dimethoato- d_6 2.50 mg/L).

4.3.3.2. Aparatos y reactivos

- ✓ Centrífuga con cabezal para tubos PP de 50 mL, marca Mixtasel
- ✓ Agitador axial Agitax SR1CP57
- ✓ Balanza Mettler Toledo, Pb1501. Rango 5-1510 g
- ✓ Pipetas automáticas Gilson, Pipetman. Volumen regulable de 1000-5000 μL , 2-20 μL , 50-200 μL y 200-1000 μL
- ✓ Pipeta de vidrio de 10 mL
- ✓ Viales de inyección con tapa a rosca de 2 mL color ámbar y viales con tapa a rosca de 4 mL transparentes
- ✓ Tubos de centrifuga PP de 50 mL
- ✓ Disolventes: acetato de etilo Fluka, pureza > 99.8 %, acetonitrilo Sigma-Aldrich para HPLC, pureza \geq 99.9 % y agua ultra pura tipo 1
- ✓ Sales: MgSO_4 anhidro Sigma-Aldrich, pureza \geq 98 % y NaCl Sigma-Aldrich, pureza \geq 99.8 %

4.3.4. Método Dutch mini-Luke (NL)

4.3.4.1. Fundamentos y procedimiento

Dutch mini-Luke es un método de análisis multiresiduos adecuado para pesticidas no iónicos, polares y no polares presentes en una amplia gama de matrices no grasas. El método fue desarrollado por Lozano et al. (10) basado en la versión original "Luke". La adición de acetona produce la extracción de los residuos de pesticidas. El Na_2SO_4 es responsable del salting-out favoreciendo el proceso de extracción de compuestos más polares por expulsión del agua contenida en la acetona. La mezcla éter de petróleo-diclorometano (CH_2Cl_2) de carácter más apolar, produce el proceso de partición, donde los residuos de pesticidas se transfieren desde la acetona. Después el extracto se evapora y por último se recupera con disolvente adecuado para su análisis.

En un tubo de centrifuga politetrafluoroetileno (PTFE) de 250 mL se adicionaron 15 g \pm 0,1 g de muestra previamente homogeneizada, 15 g de Na_2SO_4 y 20 mL de acetona. La mezcla se agitó mediante homogeneizador turrax a 1500 rpm por 30 s. A continuación

se adicionaron 10 ml de diclorometano y 20 mL de éter de petróleo. La mezcla se agitó nuevamente a 1500 rpm por 30 s y se centrifugó a 3300 rpm durante 3 min. El sobrenadante se transfirió a un vial de 15 ml topacio con cierre a rosca. Para los análisis por cromatografía de gases, una alícuota de 300 μL se evaporó hasta sequedad mediante corriente suave de N_2 . Después se adicionó 90 μL de acetato de etilo alcanzando una concentración final de 1 g de muestra por cada mL de extracto. Por último se adicionó 2 μL del estándar interno de inyección (Lindano-d6 1.25 mg/L). Para los análisis por cromatografía líquida una alícuota de 200 μL se evaporó hasta sequedad mediante corriente suave de N_2 . La reconstitución se realizó adicionando 300 μL de acetonitrilo: agua (10:90, v/v) y se adicionó 2 μL del estándar interno de inyección (Dimethoato-d6 2.50 mg/L).

4.3.4.2. Aparatos y reactivos

- ✓ Centrifuga con cabezal para tubos PTFE de 250 mL, Heraeus Labofuge GL
- ✓ Ultra-turax Ika T-25
- ✓ Balanza Mettler Toledo, Pb1501. Rango 5-1510 g
- ✓ Pipetas automáticas Gilson, Pipetman. Volumen regulable de 1000-5000 μL , 2-20 μL , 50-200 μL y 200-1000 μL
- ✓ Pipeta de vidrio de 10 mL.
- ✓ Viales de inyección con tapa a rosca de 2 mL color ambar y viales con tapa a rosca de 15 mL transparente
- ✓ Disolventes: acetona J. T. Baker, pureza 99.4 %, éter de petróleo, CH_2Cl_2 Fluka, acetonitrilo Sigma-Aldrich para HPLC, pureza ≥ 99.9 %. Agua ultra pura tipo 1, acetato de etilo Fluka, pureza > 99.8 %
- ✓ Sales: Na_2SO_4 anhidro J. T. Baker, pureza ≥ 99 %
- ✓ Tubos de centrifuga PTFE de 250 ml

4.4. Análisis por LC-QqQ-MS/MS y GC-QqQ-MS/MS

4.4.1. GC-QqQ-MS/MS.

4.4.1.1. Condiciones del análisis cromatográfico

Los análisis de residuos de pesticidas se realizaron para 220 compuestos a través del cromatógrafo gaseoso Agilent 7890 A con automuestreador Agilent 7693 B y espectrómetro de masas triple cuadrupolo, Agilent serie 7000 que trabaja en impacto electrónico (EI). La adquisición y procesamiento de datos se realizó con el software “massHunter QQQ Quantitative analysis B.04.00”. Los parámetros de funcionamiento se detallan en la figura 2.



Parámetro	Valor
Volumen de muestra	2µL
Modo de inyección	Splitless
Columna	HP-5MSUI (15 m x 250 µm x 0.25 µm)
Gas	He (99.999 %) y Quenching. N ₂ (99.999 %) gas de colisión
Presión	14.1 psi, constante
Tiempo análisis	20 + 3 min (post-run)
Liner	Ultrainerte con lana de vidrio
Tº puerto inyección	80 °C (0.1 min), 300 °C (20 min)
Solvent delay	2 min

Fig. 2. Parámetros optimizados del sistema cromatográfico GC-QqQ-MS/MS

La temperatura del horno se configuró de la siguiente manera: 70 °C (1 min), 50 °C/min hasta 150 °C, 6 °C/min hasta 200 °C y finalmente 16 °C/min hasta 280 °C (4.07 min). Después del programa de temperatura que fue de 20 min, se aplicó backflush por 3 min. El objetivo del backflush es invertir el flujo de la columna mediante un cambio de presión. De esta forma, los analitos que aún no han eluido se eliminan de la columna sin pasar por el espectrómetro de masas. Los tiempos se pueden acortar ya que no es necesario mantener una temperatura alta al final del análisis como es habitual en cromatografía de gases para eliminar los componentes menos volátiles de la matriz.

Además evita el ingreso de material residual en el espectrómetro de masas reduciendo la frecuencia de mantenimiento del sistema y aumentando el tiempo de vida útil del detector.

También se implementó el método “Retention Time Locked” para eliminar la necesidad de ajuste del segmento de ventana del tiempo de retención para la adquisición en MRM (Monitoreo de Reacciones Múltiples). Para ello se utilizó trifluralina como compuesto de referencia a un tiempo de retención de 5.82 min. La conexión entre la columna y el detector se realiza a través de un restrictor.

La temperatura en la fuente de iones y en la línea de transferencia fue de 280 °C y en el analizador de 150 °C.

4.4.1.2. Optimización de los parámetros del espectrómetro de masas

El proceso de optimización de los parámetros se realizó a través del monitoreo de todos los compuestos en el modo full scan y con un rango de masas entre 50-550 m/z. En primer lugar se prepararon e inyectaron disoluciones de cada compuesto a una concentración de 1 mg/L. Después se analizaron los espectros de masas y se seleccionaron los iones precursores más convenientes, (el fragmento más intenso y con la relación m/z más alta). La fragmentación en la celda de colisión, para obtener iones producto, tuvo lugar mediante “collision-induced dissociation” (CID). Una vez seleccionados los iones precursores se ensayaron diferentes energías de colisión en un rango de 3-40 eV y se eligieron las transiciones con más intensidad. Como transición de cuantificación se eligió la de mayor intensidad y como transición de confirmación fue la segunda más intensa. Para la identificación de los analitos se siguieron los criterios establecidos en el procedimiento SANCO/12571/2013 (9). Este procedimiento establece que se requieren identificar 2 transiciones “Single Reaction Monitoring” (SRM), tiempo de retención y el “ratio” de las SRM. En la tabla 1 se presenta el listado de compuestos objetivo, las transiciones seleccionadas y la energía de colisión. El flujo del gas de colisión fue de 1.5 mL/min y la del gas “quenching” 2.25 mL/min. La energía de colisión estuvo en el rango de 3-40 eV.

Tabla 1. Parámetros optimizados de transiciones por compuestos y tiempo de retención

Compuesto	T _R (min.)	SRM1	CV1 (V)	SRM2	CV2(V)
2,4-DDT	12,21	235>165	20	235>199	15
2,4 DDE	11,25	246>176	30	246>211	20
3-5 Dichloroaniline	4,11	161>99	25	161>90	20
3-Chloroaniline	2,89	127>92	15	127>100	10
4,4-DDD	12,91	235>165	20	235>199	15
4,4-DDE	12,07	246>176	30	246>211	20
4,4 DDT	12,9	235>165	20	235>199	20
Acefato	4,2	136>42	6	136>94	12
Acrinathrin	15,4	208>181	5	209>141	20
Alachlor	8,55	188>160	10	188>130	40
Aldrin	9,28	293>186	40	293>257	8
Ametryn	8,7	227>185	5	227>212	8
Anthraquinone	9,409	208>180	10	208>152	20
Atrazine	6,61	215>58	10	215>173	5
Azoxytrobin	18,47	344>329	10	344>156	40
Benalaxyl	13,47	148>105	20	204>176	2
Bifenox	14,67	311>279	14	311>216	25
Bifenthrin	14,42	181>166	10	181>115	50
Biphenyl	3,56	154>102	40	154>126	40
Bixafen	16,89	159>139	15	413>159	12
Boscalid	16,51	140>112	10	140>76	25
Bromopropylate	14,39	341>185	20	341>155	20
Bupirimate	12,56	273>193	5	273>108	15
Buprofezin	12,33	305>172	5	305>140	10
Butralin	10,19	266>174	20	266>190	12
Butylate	3,79	156>57	5	174>146	3
Cadusafos	5,9	159>97	10	213>73	10
Captan	10,81	149>79	15	149>105	5
Carbofenotion	13,39	199>143	10	342>157	10
Carbofuran	6,74	164>149	12	164>122	12
Carbosulfan	3,17	164>149	12	164>122	12
Chinomethionate	11,19	234>206	10	206>148	15
Chlorbromuron	3,7	233>124	25	233>205	12
Chlordane	11,14	373>266	20	373>301	10
Chlorfenapyr	12,68	247>227	15	247>200	25
Chlorobenzilate	12,78	139>111	15	139>75	30
Chlorothalonil	8,41	266>231	20	266>133	40
Chlorpropham	5,58	213>171	5	213>127	5
Chlorpyrifos	9,6	313>258	15	313>286	5
Chlorpyrifos Methyl	8,33	288>93	26	286>271	16
Chlozolinate	10,73	259>188	10	331>216	5

Ciflutrin	16,29	163>127	5	226>206	10
Chlorfenvinphos	10,89	267>159	20	267>81	40
Cypermethrin	16,45	163>127	5	209>141	20
Ciproconazol	12,55	139>111	14	222>125	18
Coumaphos	15,86	210>182	10	362>109	15
Clorthal-dimethyl	9,72	330>299	12	330>221	35
Cyprodinil	10,38	224>208	20	224>197	21
Deltamethrin	18,09	253>93	20	253>172	5
Desmethyl-pirimicarb	8,12	152>96	12	224>152	8
Diazinon	7,22	304>179	15	304>137	30
Dichlorvos	2,95	185>93	15	185>109	15
Diclobutrazole	12,33	270>159	15	270>201	8
Diclofluanid	9,21	224>123	8	167>124	5
Dicloran	6,49	206>176	5	206>148	20
Dicofol	10,16	139>111	10	250>139	8
Dieldrin	11,99	279>243	8	345>263	8
Diethofencarb	9,71	207>179	5	207>151	10
Dimethenamid	8,01	230>154	10	154>111	10
Dimetipin	6,84	118>58	10	118>70	5
Diphenylamine	5,34	169>77	35	168>140	40
Disulfoton	7,25	142>109	5	142>81	12
Disulfoton sulfoxide	3,28	125>97	3	212>153	15
DMST	7,13	106>79	8	214>106	15
Dodemorph	9,9	154>82	20	154>97	10
Endosulphan I	11,31	239>204	15	241>206	25
Endosulphan II	12,67	241>206	14	239>204	15
Endosulphan sulphate	13,43	387>289	5	387>206	40
Endrin	12,39	263>193	35	263>228	25
EPN	14,39	157>77	25	157>110	15
Epoconazole	13,4	192>138	10	192>111	35
Ethion	13,06	231>1129	25	231>175	5
Ethofumesate	9,17	207>161	5	207>137	10
Etofenprox	16,63	163>107	15	163>135	5
Ethoprophos	5,37	158>97	15	158>114	5
Etoxiquina	6,42	202>174,3	15	202>158,9	30
Etrimfos	7,55	292>181	5	292>153	20
Fenamidone	14,61	268>180	20	238>103	20
Fenarimol	15,3	139>111	15	219>107	10
Fenazaquin	14,59	160>145	5	160>117	20
Fenbuconazole	16,23	198>129	5	129>102	15
Fenclorphos	8,65	285>270	18	285>240	30
Fenhexamid	13,56	177>78	20	177>113	10
Fenitrotrion	9,07	277>260	5	277>109	20
Fenpropathrin	14,52	181>152	26	265>210	10

Fenpropidin	8,85	98>55	12	273>98	3
Fenpropimorph	9,56	128>70	12	128>110	10
Fenthion	9,58	278>109	20	278>169	20
Fen/Esfen (both)	17,5	167>125	12	125>89	22
Fen/Esfen RS/SR	17,29	167>125	12	125>89	22
Fipronil	11,13	213>178	10	213>143	20
Fipronil-Disulfinil	9,1	388>333	20	333>281	15
Fipronil sulfone	12,77	383>255	20	383>213	25
Flamprop-isopropyl	12,91	276>105	5	304>105	12
Flamprop-methyl	12,39	276>105	8	230>170	15
Flonicamid	5,52	174>146	15	174>126	25
Fluacrypyrim	13,36	145>102	30	145>115	15
Fluazifop-p-butyl	12,66	282>91	15	282>238	20
Flucytrinate	16,6	199>157	5	157>107	15
Fludioxonil	12,39	248>127	30	248>154	25
Fluopicolide	13,72	209>182	20	173>109	25
Fluopyram	11,08	173>145	15	223>196	15
Fluquinconazole	15,91	340>298	20	340>286	30
Flusilazole	12,47	233>165	20	233>152	20
Flutolanil	12,07	323>173	13	323>281	4
Flutriafol	11,86	219>123	12	219>95	20
Fluvalinate tau	17,5	250>55	18	250>200	22
Folpet	11,03	147>103	5	147>76	25
Fonofos	6,94	137>109	5	246>137	5
Formothion	7,88	170>93	5	224>125	20
Fostiazate	10,21	195>103	5	195>139	5
HCB	6,19	284>249	25	284>214	40
HCH-alpha	6,08	219>183	5	219>145	25
HCH-beta	6,85	219>183	10	219>145	25
Heptachlor	8,38	272>237	10	272>143	40
Heptachloroepoxido-cis	10,42	217>182	22	183>119	25
Heptachloroepoxido-trans	10,57	183>155	15	183>119	30
Heptenofos	4,89	124>89	15	215>200	10
Hexaconazole	11,84	214>159	22	214>172	22
Indoxacarb	18,07	203>134	10	264>148	28
Iprodione	14,37	314>245	10	314>56	20
Iprovalicarb	12,41	158>116	5	158>98	10
Isazofos	7,5	161>119	5	257>162	5
Isocarbophos	9,87	136>108	14	230>212	8
Isophenphos-Methyl	10,4	199>121	10	199>167	10
Isophenphos-ethyl	10,93	213>121	15	213>185	3
Isoprothiolane	12,066	162>85	15	162>134	5
Isopyrazam	15,55	159>139	10	359>303	8
Kresoxim-methyl	12,46	206>116	5	206>131	10

λ-Cyhalothrin	15,22	197>141	10	197>161	5
Lindane	6,79	219>183	5	181>145	12
Malaoxon	8,46	127>99	5	195>125	16
Malathion	9,39	173>99	15	158>125	8
Mecarbam	10,87	159>131	5	329>160	3
Merphos	12,05	169>57	8	169>113	3
Mepanypirim	11,72	223>207	30	222>179	30
Metalaxyl	8,67	206>132	20	206>162	8
Metamidofos	3,05	141>95	6	141>79	18
Metazachlor	10,46	209>133	10	133>117	25
Metconazole	14,75	125>89	20	125>99	20
Methidation	11,31	145>85	5	145>58	15
Methiocarb	9,24	168>153	10	153>109	10
Methiocarb-sulfone	8,75	121>77	12	185>121	5
Metolachlor	9,45	238>162	8	162>133	12
Methoxychlor	13,85	227>169	25	227>115	40
Mevinphos	3,83	127>109	10	127>95	15
Miclobutanil	12,35	179>125	10	179>152	5
Molinate	4,59	126>55	12	126>83	3
Napropamide	11,78	128>72	3	271>128	3
Nuarimol	13,8	203>107	10	235>139	12
Ofurace	13,41	232>158	20	232>186	5
o-Phenylphenol	4,45	170>141	30	170>115	40
Oxadixyl	13,06	163>132	15	163>117	25
Paclobutrazole	11,44	236>125	10	236>167	20
Paraoxon-Methyl	7,27	109>79	5	230>106	20
Parathion-ethyl	9,67	291>109	10	291>81	10
Parathion-Methyl	8,35	263>109	10	233>124	10
Pebulate	3,97	128>57	5	161>128	3
Penconazole	10,6	248>157	25	148>192	15
Pendimetalin	10,5	252>162	10	252>191	10
Pentachloraniline	7,88	263>192	25	263>227	5
Permethrin	15,7	163>127	5	183>153	15
Phenothrin	14,7	123>81	8	183>153	15
Phenthoate	10,86	274>121	10	274>246	5
Phorate	5,98	231>129	20	231>175	20
Phorate sulfone	9,93	153>97	10	199>143	8
Phosmet	14,36	160>77	30	160>133	15
Phosmet-oxon	6,2	160>77	30	160>133	15
Phtalimide	4,14	147>103	5	147>76	30
Picolinafen	14,75	238>145	25	376>238	25
Picoxistrobin	11,9	335>173	10	303>157	15
Piridaben	15,82	147>117	20	147>132	10
Pirimetanil	7,13	198>118	25	198>156	25

Pirimicarb	7,84	238>166	10	166>96	20
Pirimiphos-Me	9,11	290>151	15	305>180	5
Piriproxifen	14,97	136>78	18	136>96	8
Procimidone	11,04	283>96	8	283>255	8
Profenfos	11,99	337>267	16	337>309	6
Prometon	6,55	225>183	3	225>168	10
Prometryn	8,74	241>184	12	241>226	8
Propaphos	11,37	220>140	12	220>125	25
Propargite	13,87	135>107	15	135>77	25
Propazine	6,75	214>172	8	229>187	3
Propiconazole	13,5	259>173	10	259>191	8
Propizamide	7,02	173>145	16	173>109	32
Prosulfocarb	8,74	128>86	3	251>128	5
Protiofos	11,87	309>239	15	309>221	25
Pyraclostrobin	17,42	132>77	20	132>104	10
pyrazofos	15,38	221>193	10	221>149	15
Pyrifenox	11,49	262>227	10	262>200	20
Quinalphos	10,85	146>91	30	157>129	15
Quinoxifen	13,45	307>272	5	307>237	25
Quintozene	6,86	295>237	15	295>265	10
Secbumeton	7,77	225>169	5	225>196	5
Spiroclifofen	15,69	312>259	10	312>109	20
Spiromesifen	14,16	272>254	3	272>209	12
Spiroxamine I	8,23	100>58	10	100>72	10
Spiroxamine II	8,94	100>72	10	100>58	10
Sulfotep	5,905	202>146	10	238>146	10
Sulprofos	13,2	156>141	15	322>156	10
tebuconazole	13,83	250>125	20	250>153	12
Tebuconpyrad	14,56	333>171	20	333>276	5
Tecnazeno	5,16	215>179	12	203>143	20
Teflutrin	7,5	177>127	15	177>137	15
Terbufos	6,88	231>129	25	231>175	10
Terbumeton	6,77	169>154	5	225>169	3
terbutryn	9,06	241>185	3	241>170	10
tetraclorvinfos	11,53	329>109	25	329>79	35
Tetraconazole	10,12	336>204	30	336>218	30
Tetradifon	14,77	356>159	10	356>229	10
Tetrahydroptalimide	4,23	151>80	5	151>122	8
Tetramethrin	14,44	164>77	30	164>107	15
Thiobencarb	9,3	100>72	3	125>89	15
Tolclofos-Methyl	8,45	265>250	15	265>220	25
Tolyfluanide	10,68	137>91	20	238>137	10
triadimefon	9,74	208>181	5	208>127	15
Triazophos	13,31	161>134	5	161>106	10

Trifloxistrobin	13,66	222>190	3	222>130	15
trifluralin	5,79	306>264	10	264>160	15
Vinclozolin	8,33	212>172	15	212>109	40

4.4.2. LC-QqQ-MS/MS.

4.4.2.1. Condiciones del análisis cromatográfico

Los análisis se realizaron para 160 compuestos mediante cromatografía líquida utilizando un equipo Agilent UPLC 1290 y un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Agilent serie 6490 con fuente de ionización electrospray (ESI). La adquisición y procesamiento de datos se realizó con el software cuantitativo y cualitativo massHunter Data, v.B.05.

Los parámetros de funcionamiento se detallan en la figura 3.

		Parámetro	Valor
		Volumen de muestra	5 µL
		Columna	Zorbax Eclipse PlusC8 1.8 µm, 2.1x100 mm
		Fase móvil	H ₂ O con 0.1 % de CH ₃ COOH y acetonitrilo con 0.1 % de CH ₃ COOH y 5 % H ₂ O
		Flujo	300 µL/min
		Tiempo análisis	20 + 2.5 min (post-run)
			A: agua milliQ con 0,1 % CH ₃ COOH B: acetonitrilo con 0,1 % CH ₃ COOH Fuente: ESI (+) y ESI (-)

Fig. 3. Parámetros optimizados del sistema cromatográfico LC-QqQ-MS/MS

Se aplicó elución en gradiente tanto en modo positivo como negativo. El método de elución implicó un aumento gradual de la fracción B que comenzó con 20 % durante 2 min; después aumentó durante 13 min hasta 100 % de B, para finalizar las condiciones se mantuvieron constantes por 5 min. Además hay que adicionar 2.5 min para el

restablecimiento del equilibrio. La fuente ESI “jetstream” se configuró a una temperatura de 120 °C, flujo de gas de 13 L/min, presión 45 psi, temperatura de “sheath gas” de 375 °C, flujo del “sheath gas” 10 L/min, voltaje del fragmentador de 380 V y el voltaje del capilar de 3000 V en positivo y negativo. El N₂ fue utilizado como gas de colisión y nebulizador.

4.4.2.2. Optimización de los parámetros del espectrómetro de masas

El proceso de optimización de los parámetros se realizó de manera similar que en cromatografía de gases pero con infusión sin pasar por la columna. En primer lugar se prepararon e inyectaron soluciones de cada compuesto a 1 mg/L usando como disolvente una mezcla de agua: acetonitrilo en relación 1:1. Después se analizaron los espectros de masas y se seleccionaron los iones precursores más convenientes, (el fragmento más intenso y con la relación m/z más alta). Una vez seleccionados los iones precursores se ensayaron diferentes energías de colisión en un rango de 3-40 eV y se eligieron las transiciones más intensas. Como transición de cuantificación se eligió la de mayor intensidad y como transición de confirmación fue la segunda más intensa. La identificación de los analitos siguió los criterios establecidos en el procedimiento SANCO N° 12571/2013. Este procedimiento establece que se requieren identificar 2 transiciones SRM, tiempo de retención (con una ventana de error de ± 0.2 min) y el “ratio” de las SRM. En la tabla 2 se presenta el listado de compuestos objetivo, las transiciones seleccionadas y la energía de colisión.

Tabla 2. Parámetros optimizados de transiciones por compuestos y tiempo de retención

Compuesto	T _R (min.)	SRM1	CV1(V)	SRM2	CV2(V)	F (V)
2,4-D	7,88	219>161	15	221>163	15	380
3-Hydroxy Carbofuran	3,60	238>181	10	238>163	10	380
Acephate	1,15	184>143	5	184>125	15	380
Acetamiprid	4,43	223>126	20	223>56	15	380
Aldicarb	5,73	213>116	10	213>89	15	380
Aldicarb sulfone	1,78	223>148	5	223>86	10	380
Aldicarb sulfoxide	1,27	207>132	5	207>89	10	380
Amitraz	11,59	294>253	10	294>163	5	380
Azinphos-methyl	9,15	318>261	0	318>132	8	380
Azoxystrobin	9,63	404>372	10	404>344	20	380
Benfuracarb	12,69	411>252	10	411>195	20	380

Benomyl	9,97	291>192	10	291>160	20	380
Bifenazate	10,18	301>198	10	301>170	20	380
Bitertanol	10,24	338>269	5	338>99	10	380
Boscalid	9,72	343>307	16	343>272	32	380
Bromuconazole	9,50	378>159	20	378>70	20	380
Bupirimate	8,49	317>272	20	317>166	20	380
Buprofezin	10,27	306>201	10	306>116	15	380
Carbaryl	7,49	202>145	10	202>127	20	380
Carbendazim	1,26	192>160	15	192>132	20	380
Carbendazim d3	1,26	195>160	20	195>132	20	380
Carbofuran	7,16	222>165	10	222>123	20	380
Carbosulfan	15,12	381>160	10	381>118	20	380
Chlorantraniliprol	8,63	484>453	16	484>286	8	380
Chlorfenvinphos	10,90	359>155	8	359>99	28	380
Chlorpyrifos-methyl	11,79	322>290	14	322>125	16	380
Clofentezin	11,44	303>138	12	303>102	40	380
Clomazone	8,59	240>128	10	240>125	20	380
Clothianidin	3,39	250>169	8	250>132	8	380
Cyazofamid	11,05	325>261	10	325>108	15	380
Cymoxanil	5,08	199>128	4	199>111	12	380
Cyproconazole	9,15	292>125	32	292>70	16	380
Cyprodinil	7,90	226>93	40	226>77	40	380
Cyromazine	0,88	167>125	15	167>60	20	380
Demeton-S-methylsulfone	2,31	263>169	12	263>109	24	380
Demeton-S-methylsulfoxide	1,42	247>169	8	247>109	24	380
Diazinon	11,41	305>169	15	305>153	20	380
Diclorvos	6,53	221>109	15	221>79	30	380
Diclorvos d6	6,49	227>133	20	227>115	20	380
Dicrotophos	2,06	238>112	8	238>72	28	380
Diethofencarb	9,21	268>226	5	268>180	15	380
Difenoconazole	10,02	406>337	15	406>251	20	380
Diflubenzuron	10,08	311>158	8	311>141	32	380
Dimethoate	4,31	230>199	5	230>171	10	380
Dimethoate-d6	4,25	236>205	4	236>131	16	380
Dimethomorph	8,70	388>301	20	388>165	20	380
Diniconazole	10,53	326>159	28	326>70	28	380
Diphenylamine	10,40	170>93	32	170>65	36	380
Dithianon	13,88	296>264	32	296>164	41	380
DMA	1,49	122>107	15	122>79	20	380
DMPF	1,99	163>132	15	163>122	15	380
Dodine	8,85	228>60	20	228>57	20	380
Emamectin B1a	9,60	887>158	40	886>82	50	380
EPN	12,08	324>296	10	324>157	20	380

Epoxiconazole	9,63	330>121	16	330>101	52	380
Ethion	13,32	385>199	5	385>171	10	380
Ethirimol	2,53	210>140	20	210>43	52	380
Ethoprophos	9,84	243>131	15	243>97	30	380
Fenamidone	9,75	312>92	28	312>65	56	380
Fenamiphos	9,56	304>234	12	304>217	20	380
Fenamiphos - sulfone	6,95	336>266	16	336>188	24	380
Fenamiphos - sulfoxide	5,80	320>292	8	320>108	44	380
Fenarimol	9,30	331>268	20	331>259	20	380
Fenazaquin	12,54	307>161	15	307>147	15	380
Fenbuconazole	10,18	337>125	40	337>70	33	380
Fenhexamid	9,77	302>97	25	302>55	30	380
Fenoxycarb	10,38	302>116	5	302>88	20	380
Fenpropimorph	7,74	304>147	30	304>130	25	380
Fenpyrazamide	9,99	332>272	10	332>230	20	380
Fenpyroximate	13,13	422>366	12	422>107	64	380
Fenthion	11,25	279>247	8	279>169	12	380
Fenthion sulfone	14,70	310>125	15	310>109	15	380
Fenthion-oxon	8,19	263>231	8	263>91	40	380
Fenthion-oxon-sulfone	4,95	295>217	20	295>104	28	380
Fenthion-oxon-sulfoxide	3,22	279>264	12	279>104	28	380
Fenthion-sulfoxide	7,14	295>280	16	295>109	32	380
Fipronil	11,18	435>330	12	435>250	28	380
Fonicamid	4,31	230>199	4	230>125	16	380
Fluazifop	9,27	328>282	15	328>254	20	380
Flubendiamide	11,09	681>274	15	681>254	20	380
Fludioxonil	9,38	247>169	32	247>152	32	380
Flufenacet	10,60	364>194	15	364>152	15	380
Flufenoxuron	12,95	489>158	20	489>141	56	380
Fluopyram	10,18	397>208	20	397>173	20	380
Fluquinconazole	9,74	376>307	24	376>108	56	380
Flusilazol	10,08	316>247	12	316>165	24	380
Flutriafol	7,56	302>95	56	302>70	16	380
Formetanate	1,02	222>165	8	222>65	52	380
Fosthiazate	7,59	284>228	10	284>104	20	380
Haloxfop	10,32	362>316	12	362>288	24	380
Hexaconazole	10,21	314>159	30	314>70	20	380
Hexythiazox	13,11	353>228	10	353>168	15	380
Imazalil	6,56	297>255	15	297>159	45	380
Imidacloprid	3,86	256>209	15	256>195	15	380
Indoxacarb	12,19	528>218	20	528>203	45	380
Ixonil	8,41	370>215	30	370>127	30	380
Iprovalicarb	9,58	321>203	0	321>119	16	380
Isofenfos methyl	11,64	231>199	15	231>121	15	380

Isoprocarb	8,19	194>152	5	194>95	15	380
Isoxaflutole	9,73	360>251	15	360>220	50	380
Kresoxim methyl	11,06	314>267	0	314>222	10	380
Linuron	9,18	249>160	20	249>133	36	380
Lufenuron	12,62	509>339	10	509>326	10	380
Malaoxon	7,06	315>127	20	315>99	4	380
Malathion-d10	10,39	341>132	12	341>100	20	380
Mandipropamid	9,82	412>356	4	412>328	24	380
MCPA	7,92	199>155	5	199>141	8	380
Mepanypirim	9,69	224>207	10	224>191	10	380
Meptyldinocap	13,93	295>193	42	295>163	10	380
Metalaxyl	7,82	280>220	5	280>192	50	380
Metconazole	10,28	320>125	48	320>70	24	380
Methamidophos	1,12	142>125	10	142>94	10	380
Methidathion	9,14	303>145	0	303>85	15	380
Methiocarb	9,12	226>121	12	226>169	5	380
Methiocarb sulfoxide	2,80	242>185	10	242>170	20	380
Methomyl	2,09	163>106	4	163>8	0	380
Methoxyfenozide	10,21	369>149	15	369>133	20	380
Metobromuron	8,11	259>170	15	259>148	10	380
Monocrotophos	1,62	224>193	5	224>127	10	380
Myclobutanil	9,60	289>125	20	289>70	15	380
Nitempyram	1,67	271>225	10	271>99	10	380
Omethoate	1,21	214>183	5	214>125	20	380
Oxadixyl	6,10	279>219	5	279>132	32	380
Oxamyl	1,76	237>90	5	237>90	10	380
Oxyfluorfen	12,82	362>252	25	362>237	30	380
Paclobutrazol	8,90	294>125	36	294>70	16	380
Paraoxon methyl	6,25	248>202	15	248>109	30	380
Penconazole	10,20	284>159	20	284>70	15	380
Pencycuron	11,70	329>125	24	329>89	60	380
Pendimethalin	13,07	282>212	4	282>194	16	380
Phenthoate	11,48	321>247	4	321>79	44	380
Phosalone	11,87	368>182	8	368>111	44	380
Phosmet	9,44	318>160	8	318>133	36	380
Phosmet oxon	5,82	302>160	12	302>133	40	380
Phoxim	11,91	299>129	4	299>77	24	380
Pirimicarb	2,47	239>182	15	239>72	20	380
Pirimicarb, desmethyl-	1,48	225>168	8	225>72	20	380
Pirimiphos-methyl	11,14	306>164	20	306>108	20	380
Prochloraz	8,75	376>308	10	376>266	15	380
Profenofos	12,00	375>347	5	375>305	15	380
Propamocarb	1,14	189>144	10	189>102	15	380
Propaquizafop	12,17	444>371	15	444>100	20	380

Propargite	13,53	368>231	0	368>57	20	380
Propiconazole	10,52	342>159	32	342>69	16	380
Propoxur	7,02	210>168	5	210>111	10	380
Propyzamide	9,81	256>190	10	256>173	20	380
Proquinazid	13,18	373>331	20	373>289	20	380
Prothioconazole	10,35	342>306	15	342>100	20	380
Prothioconazole-Desthio	9,36	312>125	40	312>70	20	380
Prothiofos	14,20	345>241	20	345>161	40	380
Pymetrozine	0,89	218>105	20	218>51	60	380
Pyraclostrobin	11,41	388>194	8	388>163	20	380
Pyrethrin	13,71	329>161	5	329>143	20	380
Pyridaben	13,84	365>309	10	365>147	20	380
Pyridate	14,60	379>351	5	379>207	10	380
Pyrimethanil	6,22	200>183	20	200>107	20	380
Pyriproxyfen	12,63	322>185	20	322>96	10	380
Quinoclamine	6,13	208>105	25	208>77	40	380
Quinoxifen	11,64	308>272	25	308>197	35	380
Quizalofop-ethyl	12,05	373>271	24	373>255	36	380
Rotenone	10,35	395>213	20	395>192	20	380
Spinosyn A	8,80	733>142	20	733>98	20	380
Spinosyn D	9,21	747>142	20	747>98	20	380
Spirodiclofen	14,26	411>313	5	411>71	15	380
Spiromesifen	14,20	371>273	5	371>255	20	380
Spirotetramat	9,32	374>330	15	374>270	20	380
Spiroxamine	7,79	298>144	20	298>100	20	380
Tebuconazole	9,90	308>125	20	308>70	20	380
Tebufenozide	10,92	353>297	5	357>133	15	380
Tebufenpyrad	12,13	334>145	20	334>117	47	380
Teflubenzuron	11,74	379>359	0	379>339	4	380
Terbutylazine	9,05	230>174	15	230>146	20	380
Tetraconazole	9,99	372>159	36	372>70	20	380
Thiabendazol	1,29	202>175	30	202>131	40	380
Thiacloprid	5,27	253>186	10	253>126	20	380
Thiamethoxam	2,52	292>211	10	292>181	20	380
Thiodicarb	6,87	355>108	8	355>88	8	380
Thiophanate-methyl	6,73	343>151	20	343>93	56	380
Tolclofos-methyl	11,71	301>269	10	301>125	15	380
Triadimefon	9,81	294>225	10	294>197	10	380
Triadimenol	9,00	296>227	5	296>70	10	380
Triazophos	10,38	314>286	10	314>162	20	380
Trichlorfon	2,97	257>221	4	257>109	12	380
Trifloxystrobin	12,29	409>206	10	409>186	20	380
Triflumuron	11,12	359>156	8	359>139	32	380
Triticonazole	9,09	318>125	41	318>70	33	380
Zoxamide	11,37	336>187	16	336>159	44	380

4.5. Análisis de resultados

4.5.1. Estudio de interferencias

Como se definió en el punto 4.1, la interferencia es la señal de un componente distinto del analito con una intensidad igual o superior al 50 % de la que presenta el analito a 10 µg/L y con una diferencia en el tiempo de retención respecto al del analito de ± 0.2 minutos. Considerando 25 matrices, 4 métodos de extracción, 220 compuestos por GC-QqQ-MS/MS y 160 compuestos por LC-QqQ-MS/MS, se evaluaron 38000 posibles interferencias. En gráficos de barras (Fig. 4 y 11) se representaron los porcentajes de compuestos con interferencias en función de la matriz ensayada y método de análisis multiresiduos. Se consideraron por separado las interferencias en una de las transiciones y en las dos transiciones simultáneamente. Además se evaluó la distribución de las interferencias en el tiempo de retención (Fig. 7 y 13). Para ello se establecieron 3 categorías, la primera de 0-7 min, la segunda de 7-13 min y la tercera superior a 13 min.

4.5.2. Estudio de linealidad, efecto matriz (EM) y potenciales falsos negativos

Después de evaluar los perfiles de interferencias por matriz y método se estudió el efecto de las interferencias sobre el efecto matriz, rango lineal y presencia de potenciales falsos negativos. Para ello se seleccionaron 10 extractos problemáticos. Se fortificaron con mezcla de compuestos a 4 niveles de concentración: 10, 50, 100 y 200 µg/L.

El coeficiente de determinación (R^2) se calculó aplicando un modelo de regresión lineal. El efecto matriz se calculó teniendo en cuenta las pendientes del compuesto en disolvente y en el extracto. $EM = \left(\frac{P_m}{P_s} - 1 \right) * 100$. Donde P_m es la pendiente de la recta de calibrado en la matriz y P_s es la pendiente de la recta de calibrado en disolvente. Mediante un gráfico de barras se representó el porcentaje de compuestos con EM en función de la intensidad del EM. La intensidad se clasificó en 3 grupos, el primero de 0-20 % de EM donde se considera que no hay EM. El segundo de 20-50 % que se considera como EM moderado y el tercero > 50 % donde el EM se considera como elevado.

Los potenciales falsos negativos se calcularon siguiendo los criterios establecidos en el procedimiento SANCO/12571/2013 (9). La misma tiene lugar cuando las interferencias producen un cambio en el valor del “ratio” de transiciones siendo la diferencia en

porcentaje superior al 30 % de valor correcto. Mediante gráficos de barras se representaron el porcentaje de compuestos que dieron potenciales falsos negativos en función de la matriz y método de análisis multiresiduos. (Fig. 9 y 15).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. GC-QqQ-MS/MS

5.1.1. Interferencias

En la figura 4 se representan los resultados de interferencias por matriz y método de extracción. El color azul indica el porcentaje de interferencias en una de las transiciones. Mientras que el color celeste indica el porcentaje de interferencias en las dos transiciones simultáneamente. Los resultados obtenidos permitieron clasificar las matrices en dos grupos. Por un lado el grupo de matrices con baja incidencia de interferencias y por otro lado el grupo de matrices con alta incidencia de interferencias.

Grupo de matrices con baja incidencia de interferencias: los métodos QuEChERS Citrato, QuEChERS Citrato sin clean-up y Acetato de Etilo mostraron un comportamiento similar. Cerca del 60 % de las matrices tuvieron interferencias por debajo de 2,3 %. En otras palabras, de 220 compuestos solo 5 presentarían interferencias que podrían afectar la identificación o cuantificación. En cambio, en el método NL solo el 32 % de las matrices tuvieron valores de interferencias por debajo del 2,3 %.

Grupo de muestras con mayores interferencias: nuevamente los métodos QuEChERS Citrato, QuEChERS Citrato sin clean-up y Acetato de Etilo presentaron un comportamiento similar. Cerca del 20 % de las matrices tuvieron más del 5 % de interferencias. Mientras que en el método NL el valor asciende al 40 %.

Anastassiades et al. (12) ensayaron la selectividad del acetato de etilo, acetonitrilo y acetona para la extracción de pesticidas en frutas y vegetales. El parámetro evaluado fue la materia seca obtenida después de la extracción. Las conclusiones indicaron que el acetato de etilo fue el más selectivo, después el acetonitrilo y bastante menos selectivo la acetona. Sin embargo no se puede concluir que una mayor cantidad de componentes provenientes de la matriz supone una mayor cantidad de interferencias. Gómez et al. (14) demostraron en análisis por LC-TOF-MS que un extracto puede tener muchos componentes provenientes de la matriz pero con un tiempo de retención diferente al de los compuestos objetivos. Por tanto no constituyen una interferencia.

En la figura 5 se presentan los extractos obtenidos por los distintos MRMs. En apariencia visual puede suponerse que algunos extractos están más limpios que otros.

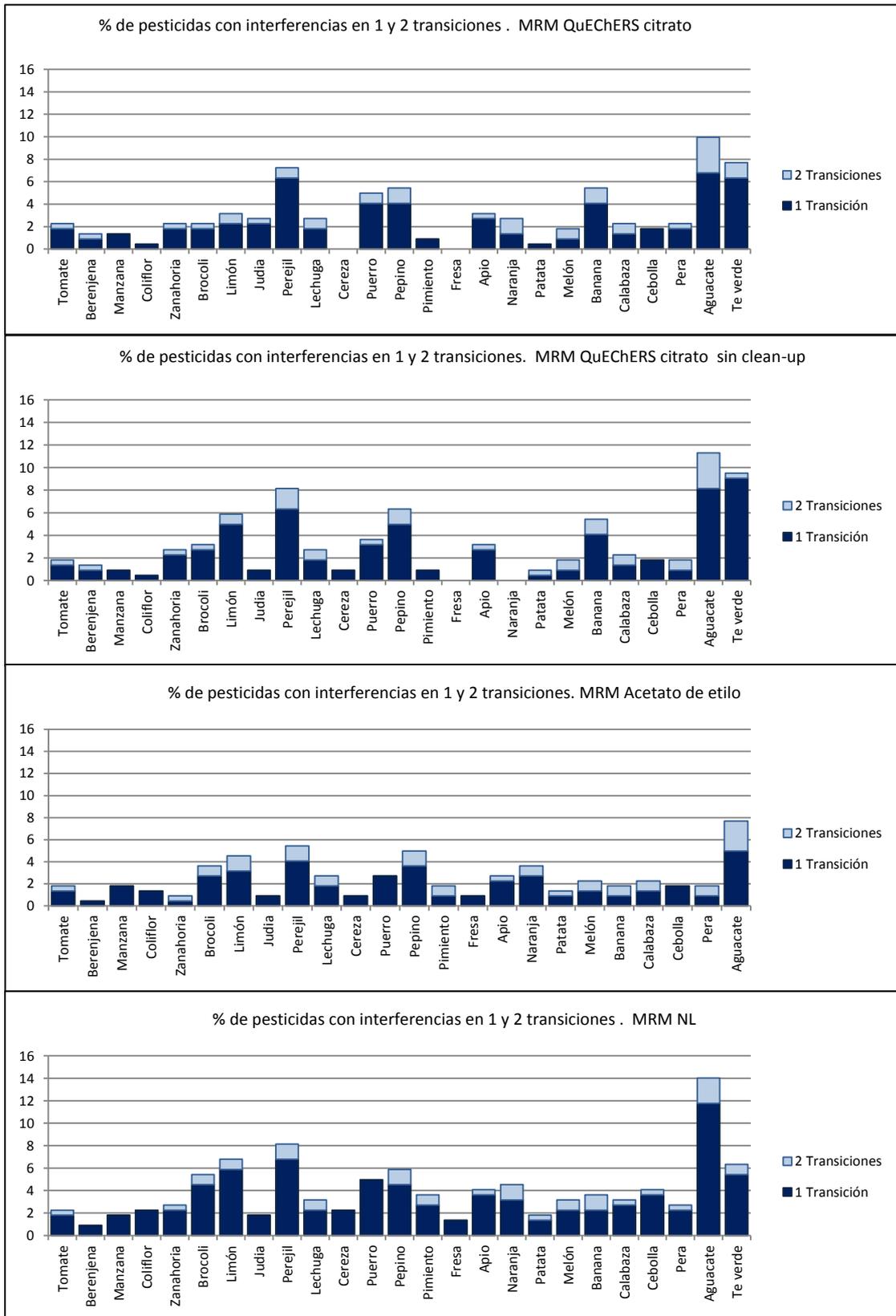


Fig. 4. Porcentaje de pesticidas con interferencias GC-QqQ-MS/MSS. A.- QuEChERS Citrato. B.- QuEChERS Citrato sin clean-up. C.- Acetato de Etilo. D.- NL

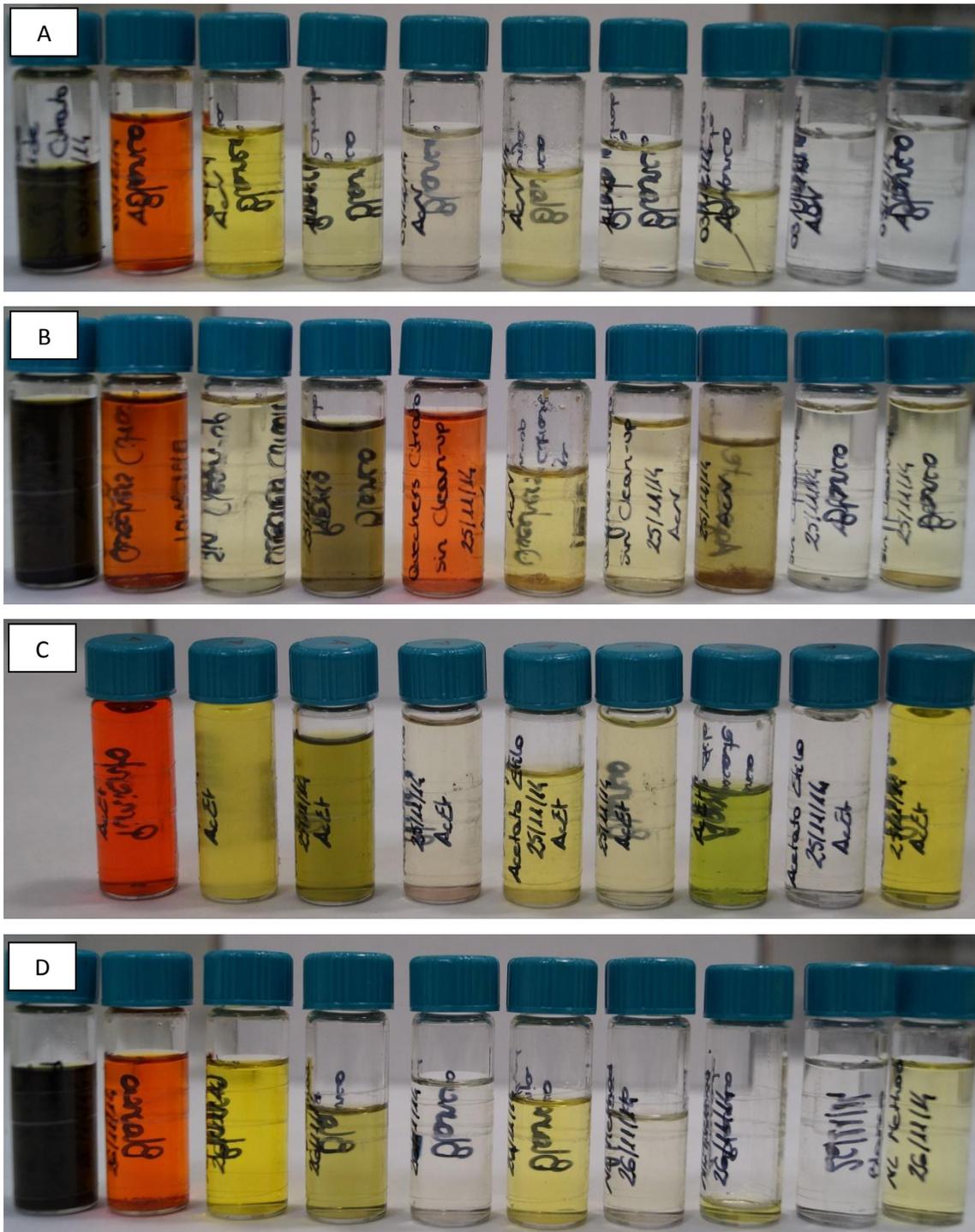


Fig. 5. Comparación de extractos obtenidos con los diferentes métodos multiresiduos. A- QuEChERS Citrato. B- QuEChERS Citrato sin clean-up. C- Acetato de Etilo. D- NL. De izquierda a derecha: té verde, pimienta, calabaza, puerro, fresa, naranja, plátano, aguacate, coliflor y manzana.

En todos los métodos de extracción y matrices predominan las interferencias en una transición. El aguacate fue la matriz que dio mayor porcentaje de interferencia tanto en una transición como en dos transiciones.

En la figura 6 se comparan los extractos de puerro y fresa obtenidos con los 4 MRMs. El método QuEChERS Citrato proporciona extractos más limpios que QuEChERS Citrato sin clean-up. Sin embargo esto no se vio reflejado en el total de interferencias tanto en análisis por GC-QqQ-MS/MS como por LC-QqQ-MS/MS donde fueron similares.

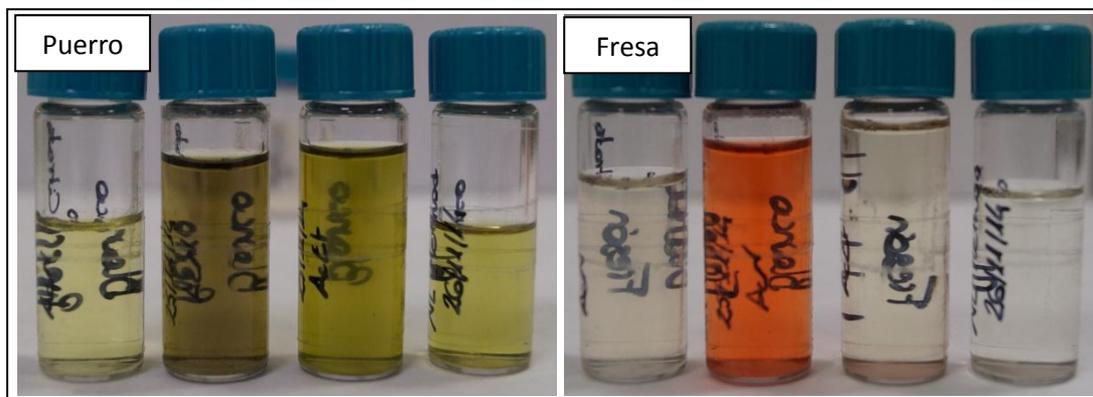


Fig. 6. Comparación de extractos de puerro y fresa extraídos con los 4 MRMs. De izquierda a derecha: QuEChERS Citrato, QuEChERS Citrato sin clean-up, Acetato de Etilo, NL.

Además se evaluó la distribución de las interferencias en el tiempo de análisis. Las mismas se ordenaron en 3 categorías de tiempo de retención: a) 0-7 minutos, b) 7-13 minutos y c) >13 minutos. En la figura 7 se representan los porcentajes de interferencias por categoría de tiempo, matriz y MRM.

Cerca del 60 % de las interferencias se localizan entre 7-13 minutos coincidiendo con el mayor porcentaje de compuestos que se ubican en esta categoría. También existe un 10 % de interferencias en la primera categoría, asociada a compuestos que eluyen más rápido.

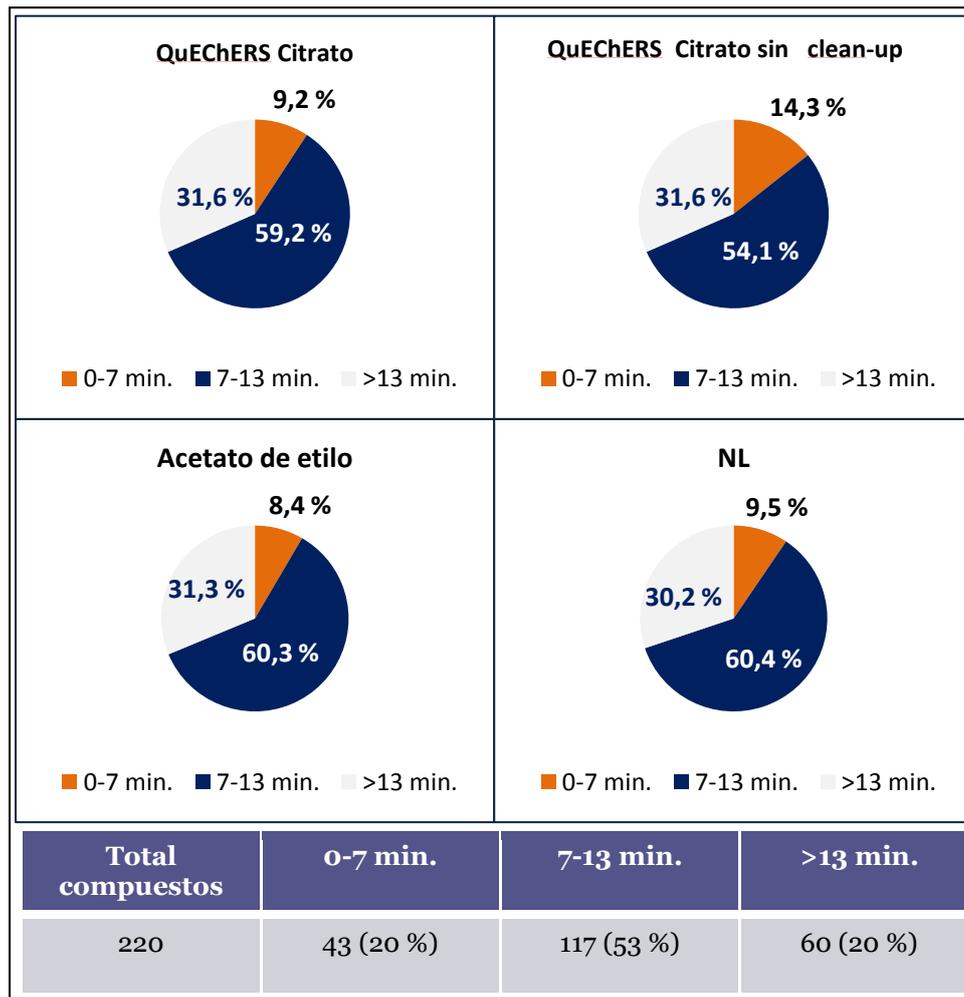


Fig. 7. Distribución de interferencias en el tiempo en análisis por GC-QqQ-MS/MS

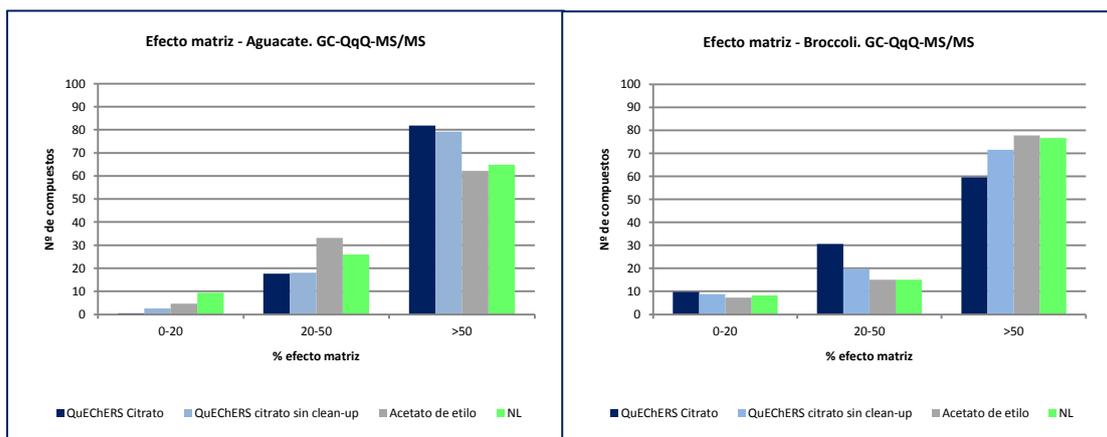
5.1.2. Linealidad (R^2) y efecto matriz (EM)

Después del estudio de interferencias se seleccionaron y analizaron 10 matrices de las 25 para evaluar la linealidad y el EM. Estas fueron: aguacate, brócoli, apio puerro, naranja, perejil, banana, pepino, limón y lechuga. Los extractos de cada matriz obtenidos con los diferentes MRMs fueron fortificados con una mezcla de 220 pesticidas a 4 niveles de concentración (10, 50, 100 Y 200 $\mu\text{g/L}$) antes de las inyecciones.

Los valores de R^2 promedio de todos los compuestos por matriz y método fueron superiores a 0.99, excepto para el aguacate con el método NL de 0.9887. Los casos más problemáticos para diferentes métodos fueron el chlorbromuron, chlorothalonil,

dietofencarb, ethoxyquin, heptachlor, methoxychlor, permethrin, phenothrin y tolyfluanide con valores inferiores a 0.98. Otras investigaciones con MRMs y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) indicaron problemas para obtener $R^2 > 0.99$. Koesukwiwat et al. (15) tuvieron problemas con el 10 % de 150 compuestos, en algunos casos con R^2 inferiores a 0.94.

Los resultados del EM se ordenaron en 3 categorías. La primera categoría de 0-20 % donde se considera que no hay EM, la segunda de 20-50 % donde EM es moderado, por último, la tercera mayor a 50 % donde EM es elevado. Los resultados en valor absoluto, se presentan en la figura 8. En todos los casos se observa un elevado EM. Cerca del 60 % de los compuestos se encuentran en la tercera categoría. Por otro lado existe un predominio del efecto de aumento. Considerando todos los casos de EM, el 98 % es por efecto de aumento y solo el 2 % es por efecto de supresión. Erney et al. (16) reportaron por primera vez el efecto de aumento en 1993. Propusieron que algunos componentes de la matriz protegen a los analitos de la adsorción y degradación en la zona del inyector. Mientras que los analitos en disolventes carecen de componentes protectores y sufren mayores pérdidas. El predominio del efecto aumento fue indicado por Payá et al. (17) en análisis por GC-MS/MS en limón, pepino, pasas y trigo y por Uclés et al. (13) en análisis por GC-MS/MS en patata, naranja, cebolleta y tomate. Con respecto al efecto de supresión Lehotay et al. (6) indicaron que ocurría cuando los compuestos de la matriz coeluyen con el analito objetivo.



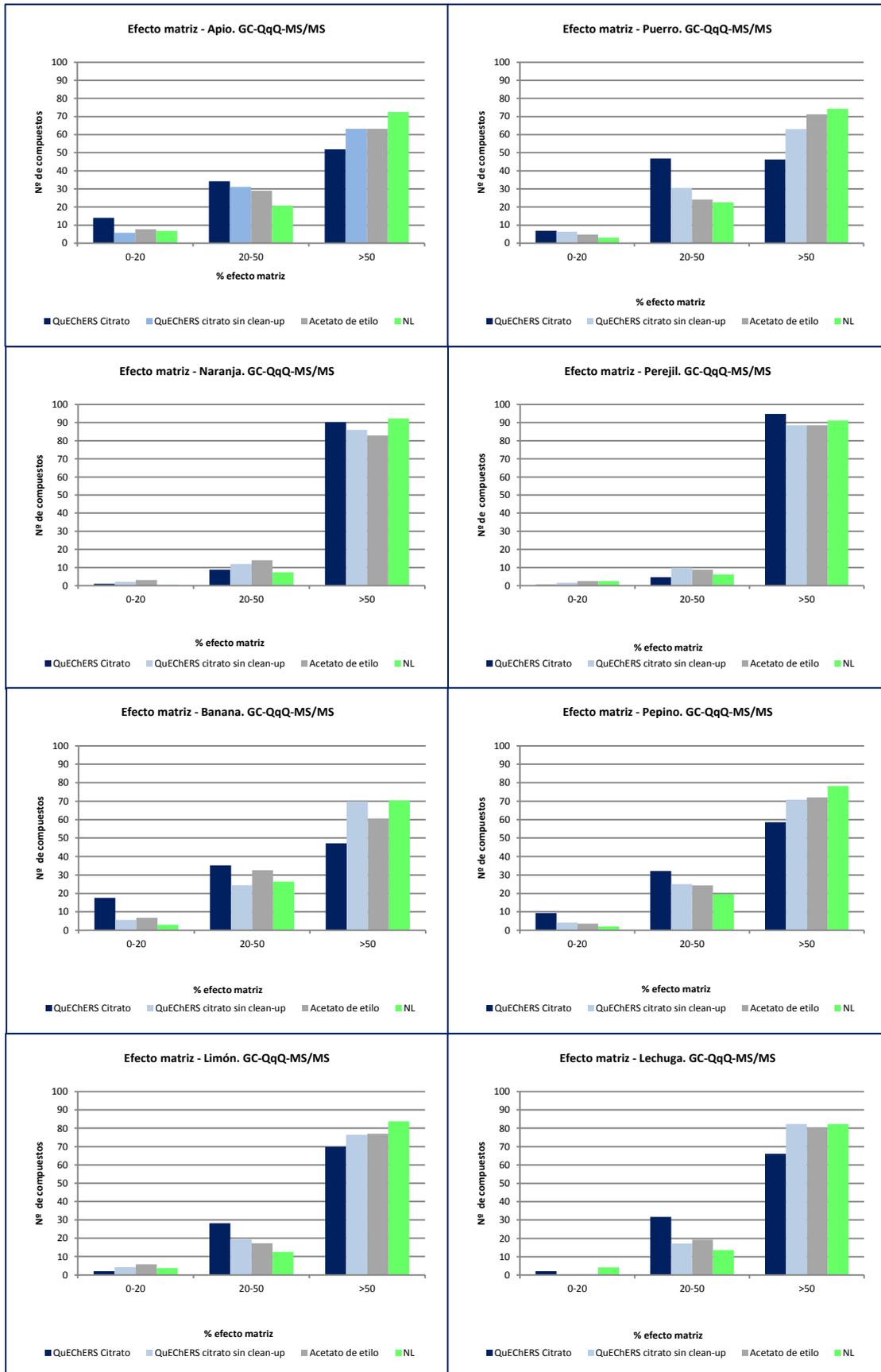


Fig. 8. Efecto matriz por matriz y método análisis multiresiduos. GC-QqQ-MS/MS

Los resultados presentados en la figura 8 indican la necesidad de reducir el efecto matriz mediante diferentes estrategias. Por ejemplo usando blancos fortificados, calibrado con adición de estándar o componentes protectores, Kwon et al. (8); Payá et al (17); Yudthavorasit et al. (18). Por otro lado se puede utilizar cartuchos de intercambio iónico con o sin Carbono Grafitado Negro (GCB) para lograr excelentes resultados. Schenk et al. (19).

5.1.3. Potenciales falsos negativos

Para estudiar el efecto de las interferencias en los parámetros de identificación de los compuestos se escogieron y analizaron las mismas 10 matrices enriquecidas con los 220 compuestos objetivos a 4 niveles de concentración. En la figura 9 se presentan los resultados de potenciales falsos negativos. Un falso negativo es un error que se produce cuando se dice que un compuesto determinado no está presente en la matriz, cuando en realidad si está presente. El criterio que se utiliza para decir si un compuesto está presente es el valor del “ratio” entre las transiciones. La expresión “potencial falso negativo” se refiere a que se puede sospechar del resultado obtenido y por tanto implementar estrategias que detecten el error antes de publicar el resultado. Sin embargo, si no se sospecha del resultado obtenido y no se implementan dichas estrategias se estará en presencia de un real falso negativo.

Independientemente del método de análisis multiresiduos de pesticidas, las matrices más complejas fueron el aguacate, puerro, perejil y limón. QuEChERS Citrato generó los porcentajes de potenciales falsos negativos más bajos con solo 3 matrices por encima de la línea de 3 %. Mientras que en QuEChERS Citrato sin clean-up, Acetato de Etilo y NL, el total de matrices por encima de la línea del 3 % de potenciales falsos negativos fueron 4, 5 y 6 respectivamente.

La presencia de potenciales falsos negativos estuvo en el rango de 0-9 % del total de compuestos. Los resultados son relativamente altos en especial para las matrices más complejas. Si comparamos los resultados de potenciales falsos negativos con los reales falsos negativos del informe EUPT-FV17, Ferrer et al. (11) indicaron falsos negativos en menos del 1 % de los casos. Barbandier et al. (20) plantearon la necesidad de realizar un segundo análisis con otro método, utilizar otra columna, etc. Los resultados

confirman la necesidad de establecer estrategias efectivas para el control de estos problemas de falsos negativos.

Por otro lado se observa que no se puede establecer una correlación entre potenciales falsos negativos e interferencias. Por tanto no podemos afirmar que a mayor cantidad de interferencias mayor cantidad de potenciales falsos negativos.

En la figura 10 se presentan 2 ejemplos de potenciales falsos negativos. En los ejemplos se comparan los valores de “ratio”, por un lado del compuesto en tomate, utilizado como referencia, extraído por el método QuEChERS Citrato y por otro lado el “ratio” del compuesto extraído con los distintos métodos presentados. El primer ejemplo corresponde al fonofos a 10 µg/Kg en aguacate para el método NL. El “ratio” en el aguacate fue de 0.97 y la diferencia superior al 30 % respecto del “ratio” para el fonofos a 10 µg/Kg en tomate. En el segundo ejemplo se observa en el método QuEChERS Citrato un falso negativo para el metazachlor en apio. El “ratio” fue de 1.31 y la diferencia de 51 % respecto del compuesto en tomate.

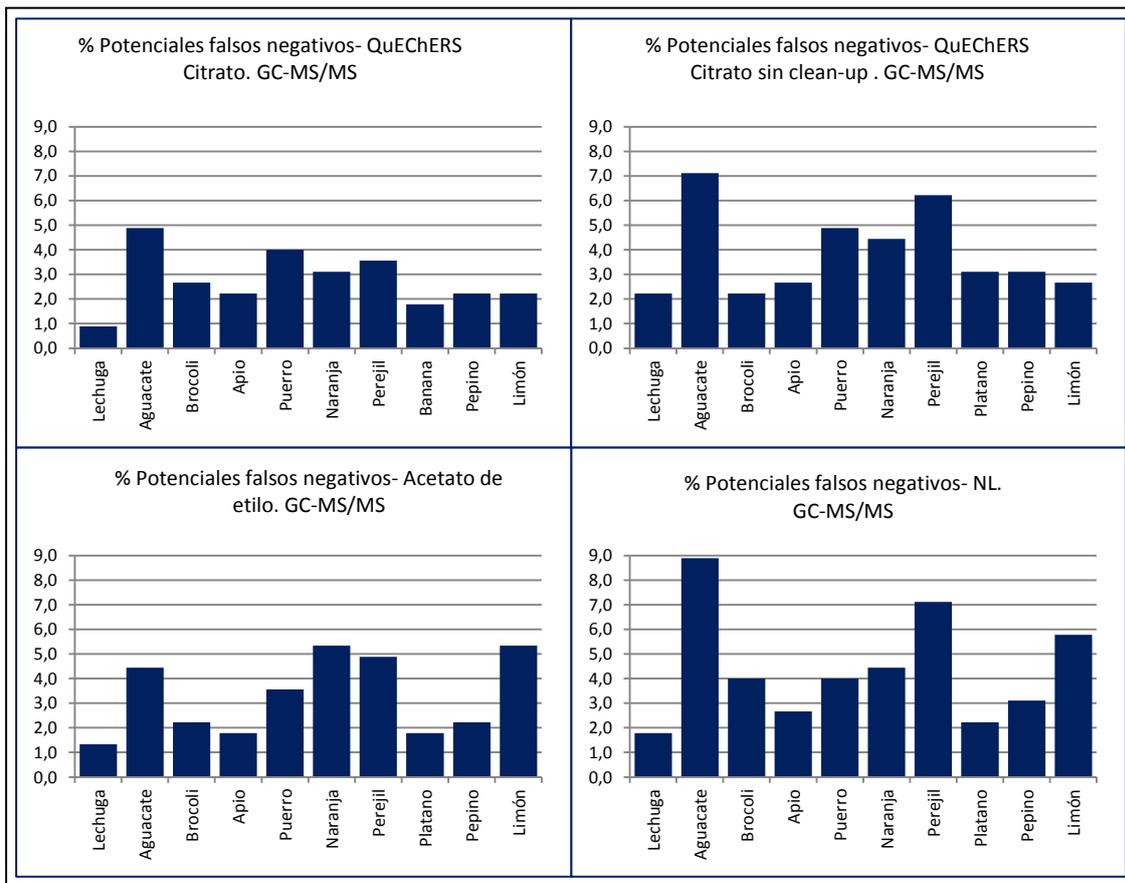


Fig. 9. Porcentaje de potenciales falsos negativos por método y matriz

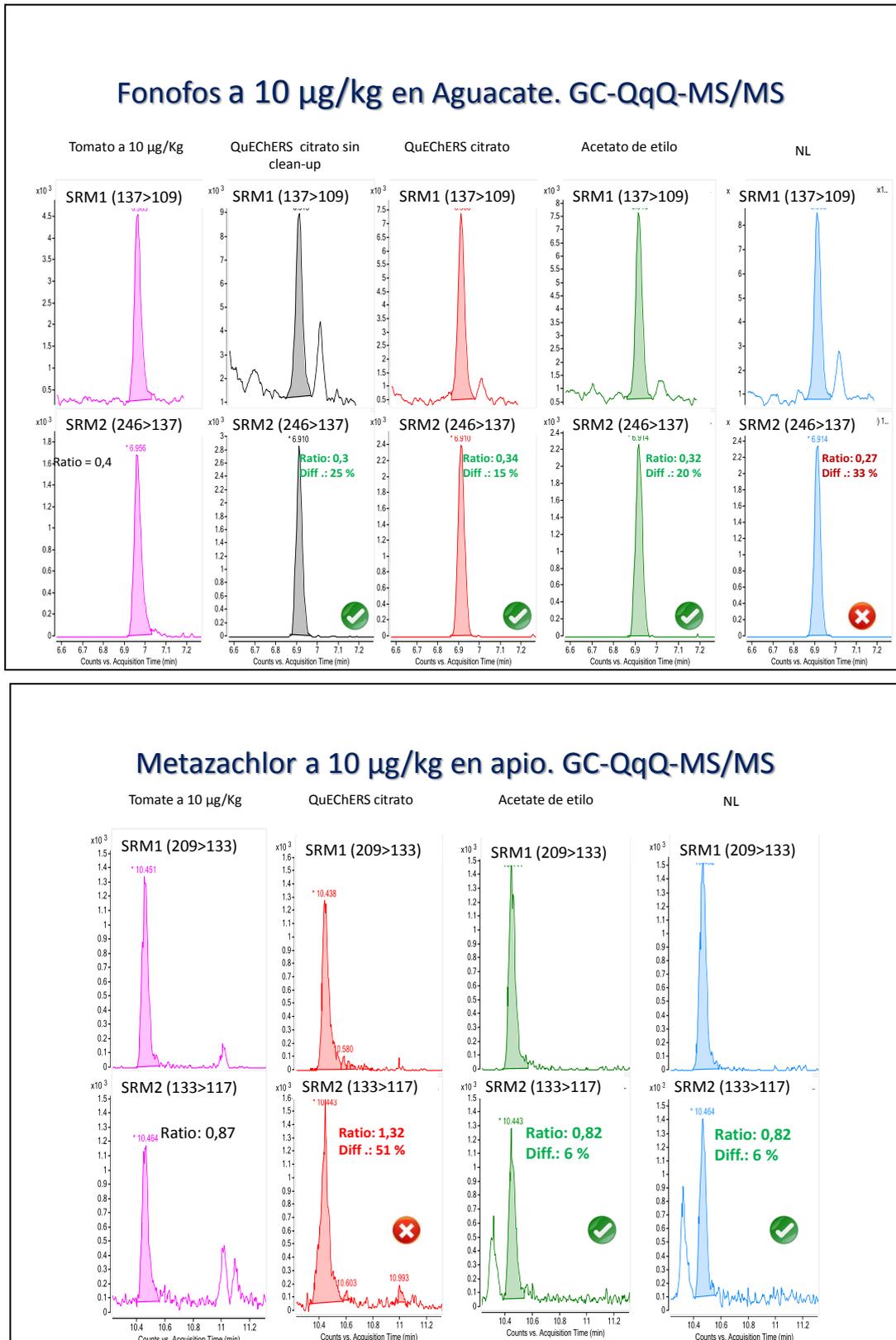
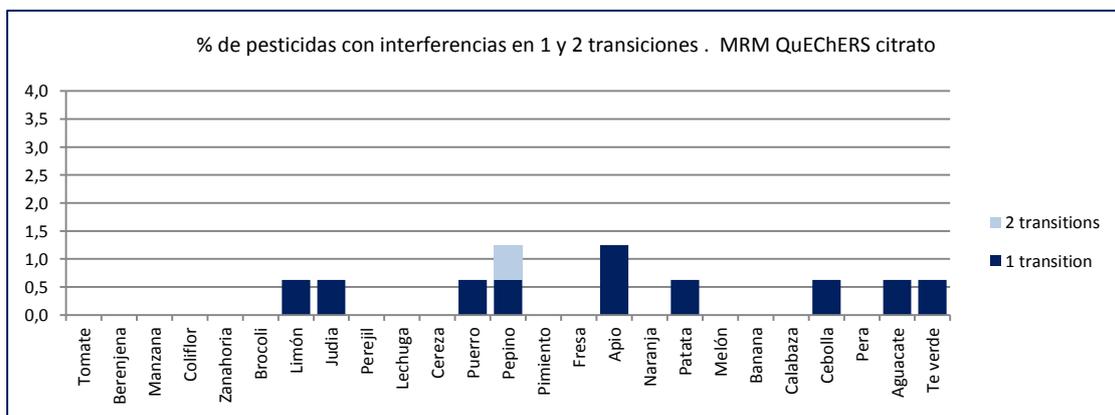


Fig. 10. Ejemplos de transiciones para el fonofos en aguacate y metazachlor en apio fortificados a 10 µg/Kg. La tilde en color verde indica que no constituye un potencial falso negativo y la cruz en rojo indica que hay un potencial falso negativo.

5.2. LC-QqQ-MS/MS

5.2.1. Interferencias

En la figura 11 se representan los resultados de interferencias por matriz y método. El color azul indica el porcentaje de interferencias en una de las transiciones. Mientras que el color celeste indica el porcentaje de interferencias en las dos transiciones simultáneamente. QuEChERS Citrato y QuEChERS Citrato sin clean-up ofrecen los mejores resultados con 16 y 13 matrices sin interferencias respectivamente. El resto de matrices no supera el 2 % de interferencias. El método Acetato de Etilo posee 6 matrices sin interferencias y el método NL solamente 2. En todos los casos, la incidencia de interferencias en 2 transiciones es baja. Por otro lado el total de interferencias es significativamente menor que en cromatografía de gases. Una de las razones fue por el efecto de dilución del extracto (5 veces). Existen numerosos trabajos que relacionan el factor de dilución del extracto con EM. Yang et al. (21); Ferrer et al. (22); Stahnke et al. (23); Krueve et al. (24). Otra razón está relacionada con la fuente de ionización. En LC-QqQ-MS/MS la fuente de ionización electrospray (ESI) produce una ionización blanda dando lugar a escasa fragmentación. Mientras que en GC-QqQ-MS/MS la fuente de ionización de impacto de electrones (EI) produce una ionización dura dando lugar a una mayor fragmentación y transiciones menos selectivas. La tecnología de ionización ESI “i funnel” también podría contribuir a la reducción comparada a un sistema ESI convencional. Ofrece mayor sensibilidad. I-funnel combina la tecnología “Jet Stream” que reduce la dispersión del spray, “hexabore sampling capillary” (figura 12) para realizar una mejor toma de muestra de iones reduciendo las pérdidas y “dual ion funnel” que purifica los iones de interés separando partículas neutras y gases. Page (25); Momoh (26); Stahnke y Alder (27).



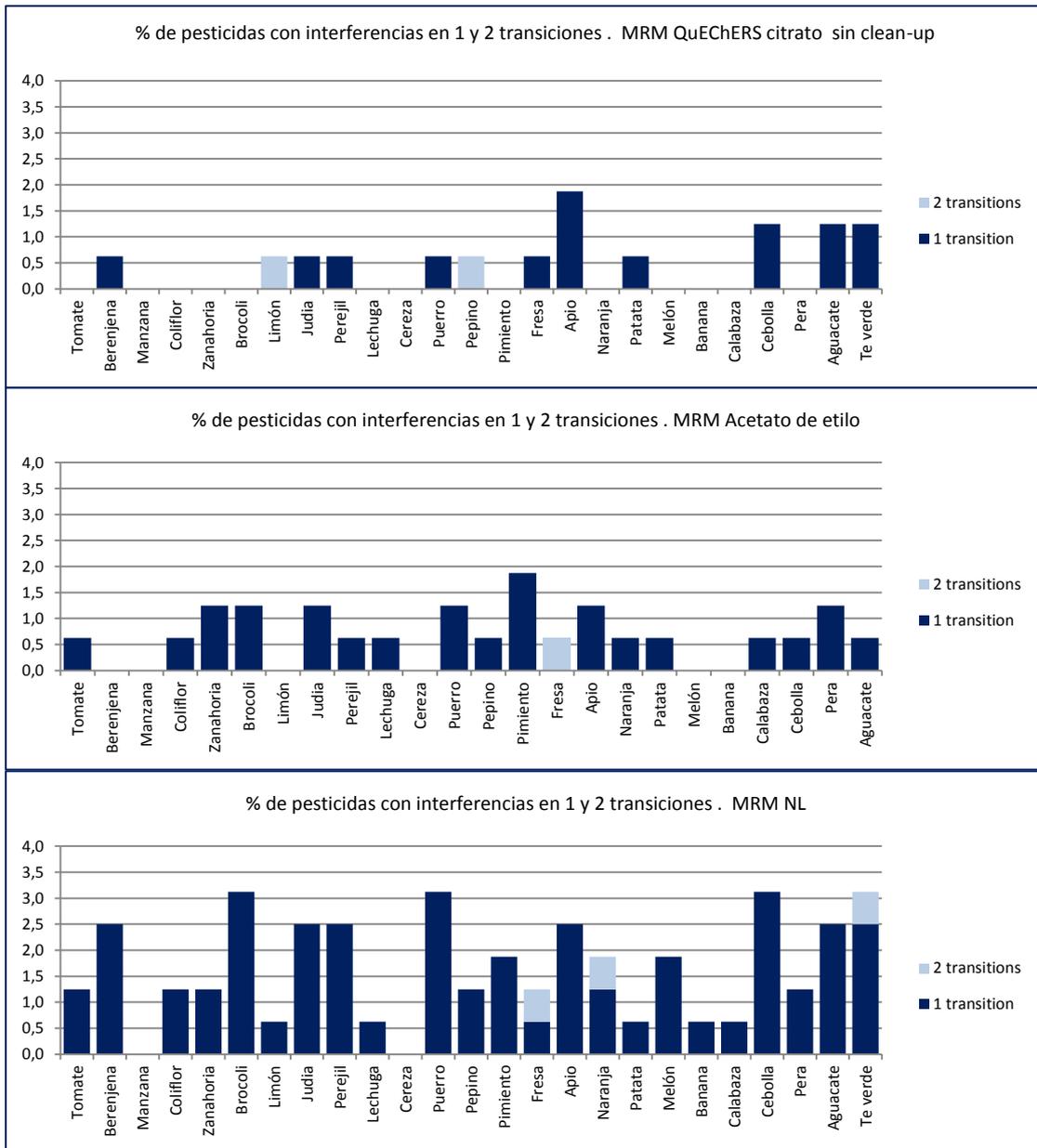


Fig. 11. Porcentaje de pesticidas con interferencias LC-QqQ-MS/MSS. A.- QuEChERS citrato. B.- QuEChERS citrato sin clean-up. C.- Acetato de Etilo. D.- NL

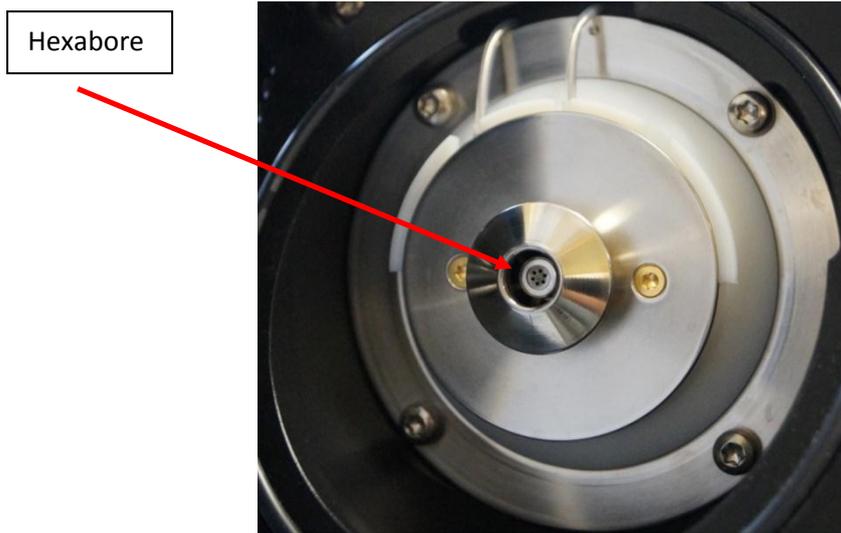


Fig. 12. Tecnología Hexabore sampling capillary del espectrómetro de masas

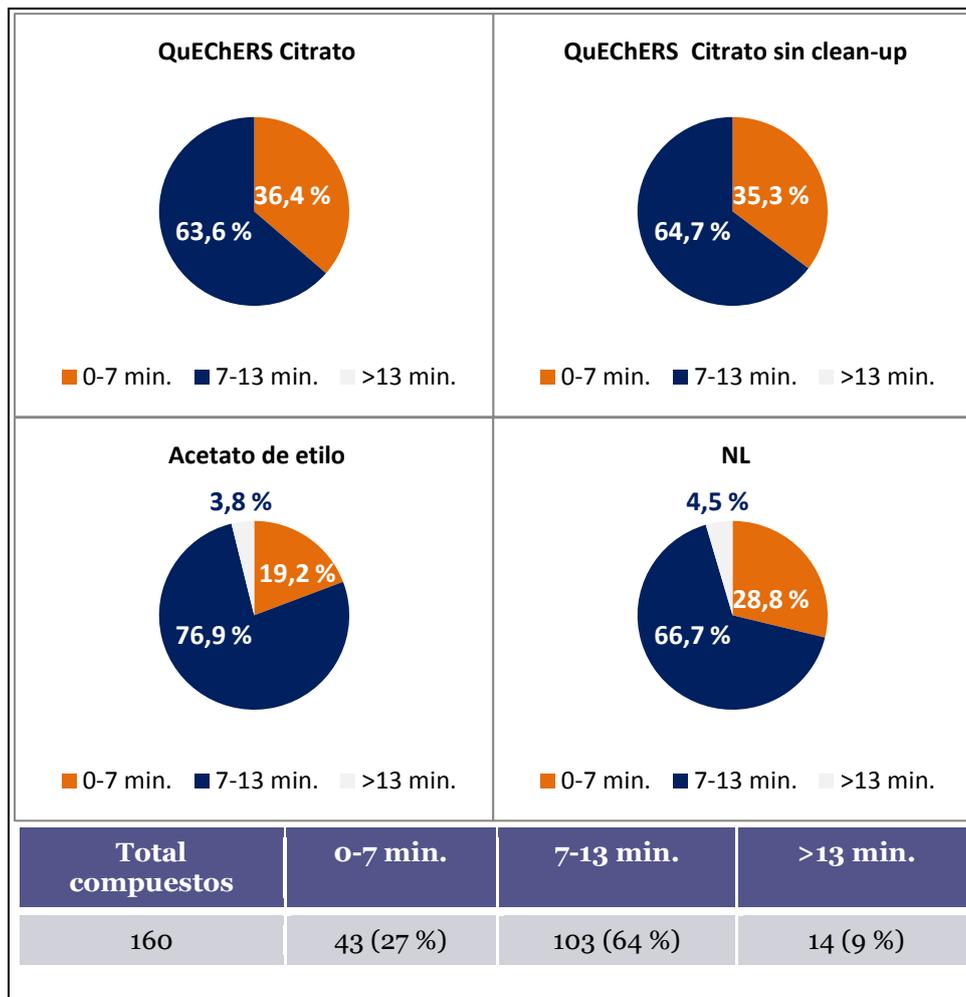


Fig. 13. Distribución de interferencias en el tiempo en análisis por LC-QqQ-MS/MS

También se evaluó la distribución de las interferencias en el tiempo de análisis. Las mismas se ordenaron en 3 categorías: a) 0-7 minutos, b) 7-13 minutos y c) >13 minutos. En la figura 13 se representan los porcentajes de interferencias por categoría de tiempo de retención y método de análisis multiresiduos. Cerca del 64 % de las interferencias se localizan entre 7-13 minutos para todos los métodos de análisis multiresiduos de pesticidas. La excepción fue para el método acetato de etilo que en esa categoría tuvo un 76.9 % de interferencias.

5.2.2. Linealidad y efecto matriz

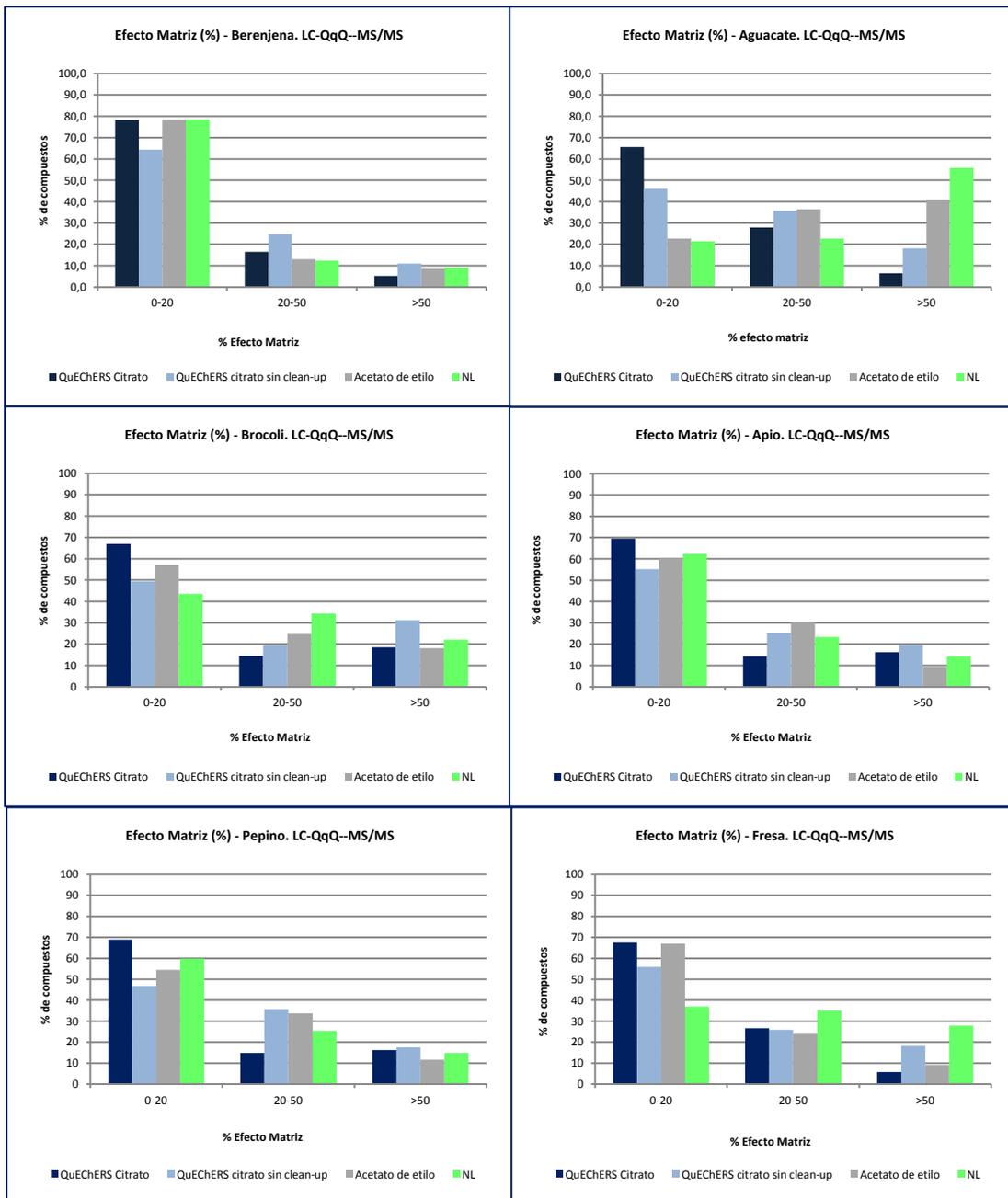
De manera similar a GC-QqQ-MS/MS y después del estudio de interferencias se seleccionaron y analizaron 10 matrices de las 25 para evaluar la linealidad y el EM. Estas fueron: berenjena, aguacate, brócoli, apio, pepino, fresa, judía, puerro, perejil y patata. Los extractos de cada matriz obtenidos con los diferentes MRMs fueron fortificados con una mezcla de 160 pesticidas a 4 niveles de concentración antes de las inyecciones.

Los valores de R^2 promedio de todos los compuestos por matriz y método fueron superiores a 0.99, excepto para la patata y fresa con el método NL que dieron en promedio 0.9859 y 0.9882 respectivamente. Los compuestos que presentaron bajos valores de R^2 en diferentes métodos fueron acephate, aldicarb sulfoxide, dithianon, EPN, meptildinocarp, methicarb sulfoxide, fenthion, phosmet, tolclofos methyl, trichlorfon y prothioconazole. Mastovska y Lehotay (28) indicaron que algunos compuestos tal como el acephate son inestables en el disolvente de extracción y sufren una rápida degradación.

En la figura 14 se representan los resultados del efecto matriz ordenados en 3 categorías. La primera categoría sin efecto matriz ($\leq 20\%$), la segunda con efecto matriz moderado (20-50 %) y la tercera con elevado efecto matriz ($>50\%$). Se observa un comportamiento similar entre los métodos QuEChERS Citrato, QuEChERS Citrato sin clean-up y Acetato de Etilo, donde la mayoría de los compuestos se encuentran en la primera categoría. Las excepciones tienen lugar en el puerro para todos los métodos de análisis multiresiduos, donde solo el 30 % de los compuestos no posee EM, en el aguacate para el método Acetato de Etilo con solo el 20 % y en el perejil para el método QuEChERS Citrato sin clean-up con menos del 40 %. El método NL presenta en

algunos casos un efecto matriz mayor que el resto de métodos como en el caso de la fresa, aguacate y patata.

Considerando todos los casos de EM, el 70 % es por efecto de supresión y el 30 % restante por efecto de aumento. El predominio del efecto de supresión fue indicado por varios autores. Yang et al. (21); Furey et al. (29); Annesley (30); Antignac et al. (31); King et al. (32); Aguera et al. (33). La coelución de compuestos distintos al analito impiden que el proceso de ionización transcurra normalmente.



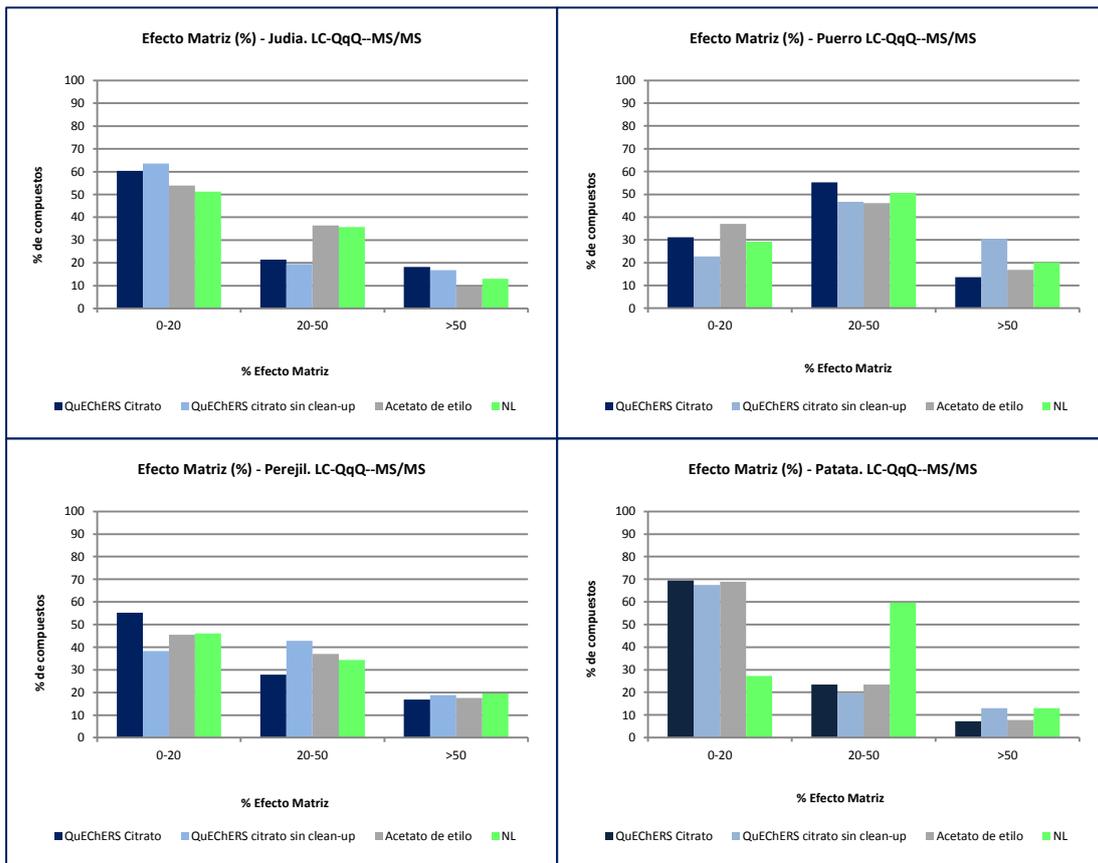


Fig. 14. Efecto matriz por matriz y método de análisis multiresiduos de pesticidas. LC-QqQ-MS/MS

5.2.3. Potenciales falsos negativos

En el punto 5.1.3 “potenciales falsos negativos”, se indica la diferencia entre real falso negativo y potencial falso negativo. En la figura 15 se presentan los porcentajes de potenciales falsos negativos para cada uno de los métodos de análisis multiresiduos de pesticidas.

El perejil no presentó potenciales falsos negativos para los métodos QuEChERS Citrato, Acetato de Etilo y NL. También la berenjena para el método QuEChERS Citrato. El rango de potenciales falsos negativos estuvo entre 0-4.4 %. Las matrices que presentaron los porcentajes más altos de potenciales falsos negativos fueron el puerro, judía, aguacate y pepino. Los resultados son más bajos que los obtenidos por GC-QqQ-MS/MS.

Por otro lado no se observa una correlación entre las interferencias y los potenciales falsos negativos. No se puede asegurar que a mayor cantidad de interferencias mayores serán los potenciales falsos negativos.

En la figura 16 se presentan 2 ejemplo de potenciales falsos negativos. En los ejemplos se comparan los valores de “ratio”, por un lado del compuesto en la matriz tomate, utilizado como referencia, extraído por el método QuEChERS Citrato y por otro lado el “ratio” del compuesto extraído con los distintos métodos de los ejemplos. En el primero se observa un potencial falso negativo para el azinphos methyl a 10 µg/Kg en cebolla en los métodos de análisis multiresiduos Acetato de Etilo, NL y QuEChERS Citrato sin clean-up. El “ratio” difiere más del 30 % con valores de 78, 76 y 84 % respectivamente. En el segundo ejemplo se observa un falso negativo para el haloxyfop en berenjena con el método QuEChERS Citrato sin clean-up. El “ratio” fue de 0.21 con una diferencia de 45 % respecto de la misma concentración en tomate.

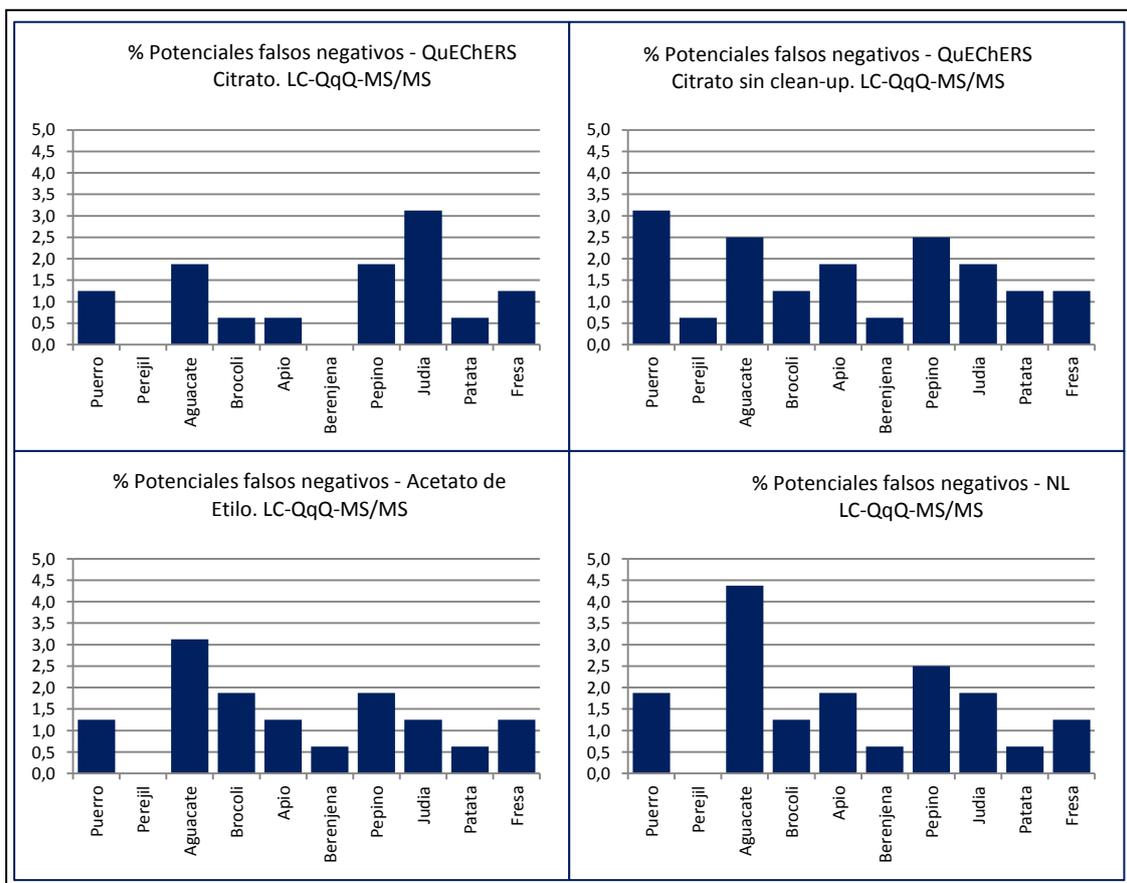


Fig. 15. Porcentaje de potenciales falsos negativos por método y matriz

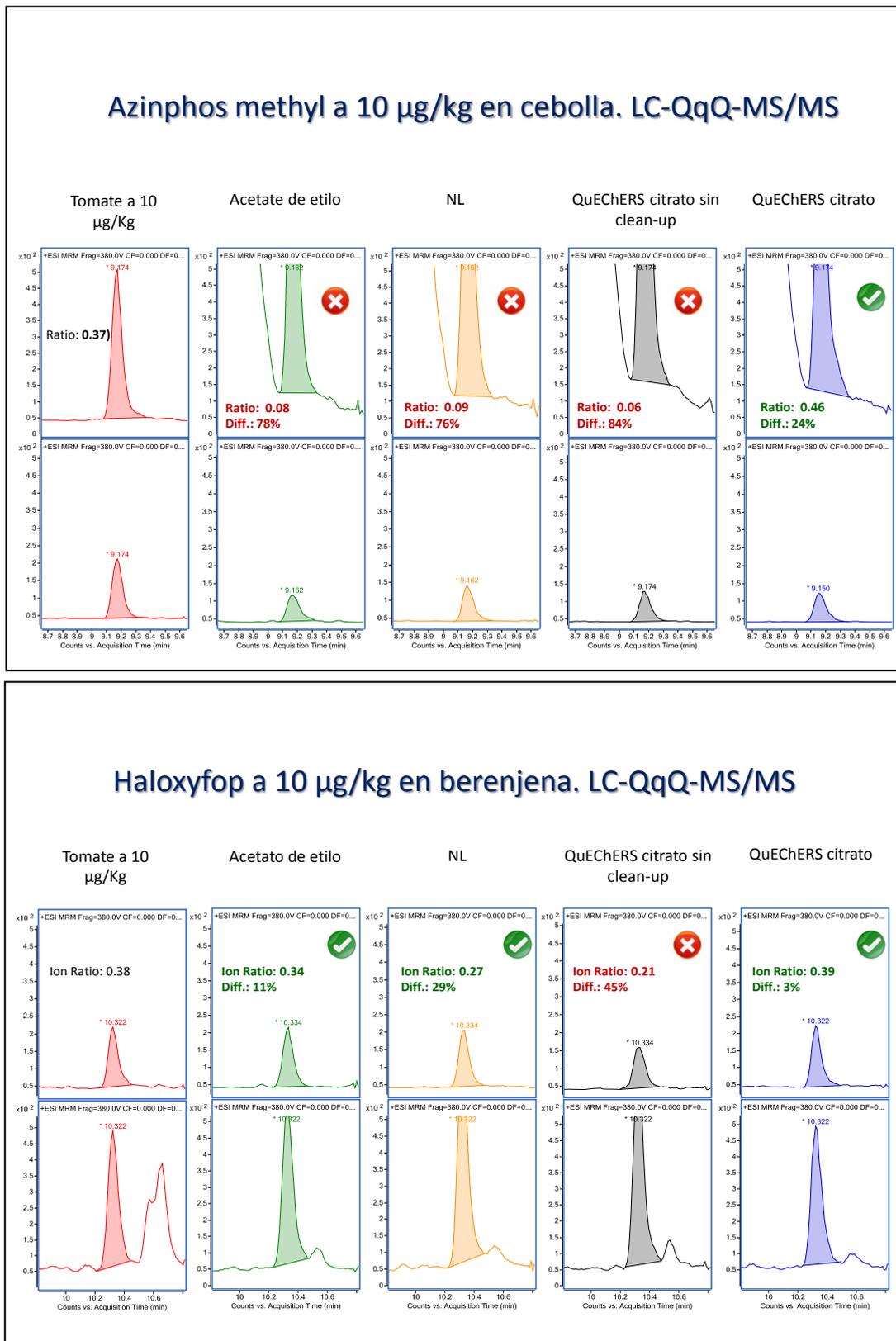


Fig. 16. Ejemplos de transiciones para el azinphos methyl en cebolla y haloxyfop en berenjena fortificados a 10 µg/Kg. La tilde en color verde indica que no constituye un potencial falso negativo y la cruz en rojo indica que hay un potencial falso negativo.

6. CONCLUSIONES

Las interferencias estuvieron presentes en la mayoría de las matrices en los análisis por GC-QqQ-MS/MS y LC-QqQ-MS/MS siendo más intensas en cromatografía de gases. La dilución del extracto previo al análisis por LC-QqQ-MS/MS y las diferencias en el modo de funcionamiento de la fuente de ionización explican, por lo menos en parte, estos resultados. Los métodos de análisis multiresiduos de pesticidas presentaron un comportamiento similar con respecto a las interferencias. Excepto para el método NL que en algunos casos se duplicó el porcentaje de interferencias que presentaron los otros métodos. Los resultados obtenidos demuestran la menor selectividad de los disolventes utilizados en el método NL.

La linealidad medida a través del coeficiente de determinación estuvo dentro de los parámetros de calidad aceptados siendo en la mayoría de los casos superior a 0.99 %.

El efecto matriz en GC-QqQ-MS/MS fue elevado con valores superiores al 50 %. Además, el 98 % de los compuestos presentó efecto de aumento. Por tanto es esencial la implementación de estrategias para reducir el efecto matriz. Por ejemplo mediante la implementación de calibrado con adición de estándar.

En LC-QqQ-MS/MS el 80 % de los casos no presentó EM o fue moderado. Del total de casos con EM existió un predominio del efecto de supresión en el 70 % de los compuestos. De manera similar a GC-QqQ-MS/MS es necesario implementar estrategias adecuadas para reducir el EM, por ejemplo mediante el calibrado con adición de estándar.

La presencia de potenciales falsos negativos en GC-QqQ-MS/MS estuvo en el rango de 0.9-9 % del total de compuestos. En LC-QqQ-MS/MS la incidencia fue más baja con valores comprendidos en el rango de 0-4.4 %. Por otro lado no se pudo establecer una correlación entre los resultados de interferencias y potenciales falsos negativos.

Los resultados de interferencias permitieron identificar las matrices más complejas. Además se pudieron establecer los problemas de efecto matriz y la presencia de potenciales falsos negativos. Los resultados indican la necesidad de implementar estrategias que reduzcan los problemas de cuantificación e identificación.

7. REFERENCIAS

- (1). Coscolla, R. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Ed. Mundiprensa, Madrid, **1993**, pp205.
- (2). SENASA. Requisitos que deben cumplir los productos y subproductos agropecuarios para consumo interno. Boletín Oficial de la República Argentina N° 32064. **2010**.
- (3). Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal.
- (4) European Food Safety Authority (EFSA). The 2013 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* **2015**; 13(3):4038, 168 p.
- (5) Hanot, V.; Goscinny, S.; Deridder, M. A Simple Multi-Residue Method for the Determination of Pesticides in Fruits and Vegetables Using a Methanolic Extraction and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Optimization and Extension of Scope. *J. Chromatogr. A* **2015**, 1384, 53–66.
- (6) Lehotay, S. J.; Son, K. A.; Kwon, H.; Koesukwiwat, U.; Fu, W.; Mastovska, K.; Hoh, E.; Leepipatpiboon, N. Comparison of QuEChERS Sample Preparation Methods for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217 (16), 2548–2560.
- (7) Van Eeckhaut, A.; Lanckmans, K.; Sarre, S.; Smolders, I.; Michotte, Y. Validation of Bioanalytical LC-MS/MS Assays: Evaluation of Matrix Effects. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, 877 (23), 2198–2207.
- (8) Kwon, H.; Lehotay, S. J.; Geis-Asteggiant, L. Variability of Matrix Effects in Liquid and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Pesticide Residues after QuEChERS Sample Preparation of Different Food Crops. *J. Chromatogr. A* **2012**, 1270, 235–245.
- (9) SANCO/12571/2013: Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed . Disponible online:

http://ec.europa.eu/food/plant/plant_protection_products/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf. Acceso 02 de julio de 2015.

- (10). Lozano, A.; de Kok, A.; Kiedrowska, B.; Scholten, J.; Fernandez-Alba, A. R. *Food Control* **2015**, accepted.
- (11) Ferrer, A.; Mezcua, M.; Lozano, A.; Malato, O.; R. Fernandez-Alba, A. European Union Proficiency Tests in Fruits and Vegetables. Main results obtained during the last 10 years. Presentado en el *5 Latin American Pesticide Residue Workshop food and Environment*. Santiago de Chile, Chile, 10-13 de mayo, 2015.
- (12) Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrilo extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. of AOAC Int.* **2003**, 86, (2), 412-431.
- (13) Uclés, S.; Belmonte, N.; Mezcua, M.; Martínez, A. B.; Martinez-Bueno, M. J.; Gamón, M.; Fernández-Alba, A. R. Validation of a Multiclass Multiresidue Method and Monitoring Results for 210 Pesticides in Fruits and Vegetables by Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* **2014**, 49 (8), 557–568.
- (14) Gómez-Ramos, M. M.; Ferrer, C.; Malato, O.; Agüera, a.; Fernández-Alba, a. R. Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry for Pesticide Residue Analysis in Fruit and Vegetables: Screening and Quantitative Studies. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1287, 24–37.
- (15) Koesukwiwat, U.; Lehotay, S. J.; Leepipatiboon, N. Fast, Low-Pressure Gas Chromatography Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry for Analysis of 150 Pesticide Residues in Fruits and Vegetables. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218 (39), 7039–7050.
- (16) Erney, D. R.; Gillespie, A. M.; Gilvydis, D. M.; Poole, C. F. Explanation of the Matrix-Induced Chromatographic Response Enhancement of Organophosphorus Pesticides During Open-Tubular Column Gas-Chromatography with Splitless Or Hot On-Column Injection and Flame Photometric Detection. *J. Chromatogr.* **1993**, 638 (1), 57–63.
- (17) Payá, P.; Anastassiades, M.; MacK, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A. Analysis of Pesticide Residues Using the Quick Easy Cheap Effective Rugged

- and Safe (QuEChERS) Pesticide Multiresidue Method in Combination with Gas and Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometric Detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 389 (6), 1697–1714.
- (19) Stahnke, H.; Reemtsma, T.; Alder, L. Compensation of Matrix Effects by Postcolumn Infusion of a Monitor Substance in Multiresidue Analysis with LC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2009**, 81 (6), 2185–2192.
- (20) Brabander, K.; De Wasch, S.; Impens, R.; Schilt, R.; Leloux M. S. Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Residue Analysis: Some Basic Concepts. Current Practice of Gas chromatography-Mass spectrometry, 1; Chromatography Science Series (86); Marcel Dekker, Inc., 2001; 86; 441-455.
- (21) Yang, P.; Chang, J. S.; Wong, J. W.; Zhang, K.; Krynitsky, A. J.; Bromirski, M.; Wang, J. Effect of Sample Dilution on Matrix Effects in Pesticide Analysis of Several Matrices by Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 150205153611009.
- (22) Ferrer, C.; Lozano, A.; Agüera, A.; Girón, a. J.; Fernández-Alba, a. R. Overcoming Matrix Effects Using the Dilution Approach in Multiresidue Methods for Fruits and Vegetables. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218 (42), 7634–7639.
- (23) Stahnke, H.; Kittlaus, S.; Kempe, G.; Alder, L. Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution Is Needed? *Anal. Chem.* **2012**, 84 (3), 1474–1482.
- (24) Krueve, A.; Leito, I.; Herodes, K. Combating Matrix Effects in LC/ESI/MS: The Extrapolative Dilution Approach. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 651 (1), 75–80.
- (25) Page, J. S.; Kelly, R. T.; Tang, K.; Smith, R. D. Ionization and Transmission Efficiency in an Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Interface. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, 18 (9), 1582–1590.
- (26) Momoh, P.; Fandino, A.; Aisawa, E.; Schlabach, T.; Miller, K.; Stafford, G. iFunnel Technology for Enhanced Sensitivity in Tandem LC / MS: Technical Overview. **2010**.
- (27) Stahnke H. y Alder L. Matrix Effects in Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. P 161-185.

- (28) Maštovská, K.; Lehotay, S. J. Evaluation of Common Organic Solvents for Gas Chromatographic Analysis and Stability of Multiclass Pesticide Residues. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1040* (2), 259–272.
- (29) Furey, A.; Moriarty, M.; Bane, V.; Kinsella, B.; Lehane, M. Ion Suppression; A Critical Review on Causes, Evaluation, Prevention and Applications. *Talanta* **2013**, *115*, 104–122.
- (30) Annesley, T. M. Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* **2003**, *49* (7), 1041–1044.
- (31) Antignac, J. P.; De Wasch, K.; Monteau, F.; De Brabander, H.; Andre, F.; Le Bizec, B. The Ion Suppression Phenomenon in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Consequences in the Field of Residue Analysis. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *529* (1-2 SPEC. ISS.), 129–136.
- (32) King, R.; Bonfiglio, R.; Fernandez-Metzler, C.; Miller-Stein, C.; Olah, T. Mechanistic Investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11* (11), 942–950.
- (33) Agüera, A.; López, S.; Fernández-Alba, A. R.; Contreras, M.; Crespo, J.; Piedra, L. One-Year Routine Application of a New Method Based on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to the Analysis of 16 Multiclass Pesticides in Vegetable Samples. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1045* (1-2), 125–135.