

DIRECTRICES PARA EL USO DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM) EN LA IDENTIFICACIÓN, CONFIRMACIÓN Y DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE RESIDUOS

CAC/GL 56 - 2005

ENSAYOS DE CONFIRMACIÓN

Cuando se llevan a cabo análisis con fines de vigilancia o aplicación reglamentaria, es especialmente importante que se generen datos de confirmación antes de dar un informe sobre muestras que contienen residuos de plaguicidas normalmente no asociados con el producto, o cuando parece que se han superado los LMR. Las muestras pueden contener sustancias químicas que interfieren en el análisis, que se han identificado erróneamente como plaguicidas. En la cromatografía de gases son ejemplos de esto las respuestas de los detectores de captura de electrones a los ésteres de ftalato y las que se obtienen de los detectores selectivos de fósforo con compuestos que contienen azufre y nitrógeno.

El análisis de los residuos de plaguicidas con métodos para residuos múltiples consta generalmente de dos fases: cribado y confirmación. El proceso se describe esquemáticamente en la Fig. 2. La primera fase comprende el establecimiento de los residuos de plaguicidas que puede esperarse que se hallen presentes desde la interpretación de los datos sin elaborar, evitando en lo posible las falsas negativas. La segunda fase es la confirmación, que se concentra en los plaguicidas encontrados en la primera fase. El uso de los resultados a comunicar y la consiguiente decisión de gestión determina los esfuerzos realizados en el proceso de confirmación. La elección de la técnica utilizada para la confirmación depende de su disponibilidad, tiempo y costos, que están basados o bien en una mayor interpretación de los datos de espectrometrías de masas y cromatográficas, o en métodos alternativos utilizando propiedades fisicoquímicas diferentes del compuesto, o la combinación de varios métodos de separación y detección. En el Cuadro 6 se proporcionan algunos procedimientos alternativos de confirmación.

Siempre que se utilicen técnicas cromatográficas en el cribado o confirmación, es esencial determinar correctamente las ventanas del tiempo de retención. Hay que asegurarse de que el instrumento se regule correctamente antes de empezar el análisis, debiéndose realizar un ensayo de idoneidad antes de cada lote de análisis¹. La base de datos sobre tiempos de retención deberá ajustarse a las condiciones actuales². En la fase 1 pueden aplicarse intervalos de tolerancia de 1,5 al 3% del tiempo de retención absoluto a la GC capilar dependiendo de la forma de un pico. Para la confirmación del tiempo de retención los intervalos de tolerancia absoluta aumentarán a un tiempo de retención más elevado. El intervalo de tolerancia debe ser inferior a 1 seg para un RT de menos de 500 seg. Para tiempos de retención entre 500 y 5000 seg. se recomienda un intervalo de 0,2% del RRT. Para tiempos de retención más elevados es conveniente un intervalo de 6 seg.

Los ensayos de confirmación pueden ser cuantitativos y/o cualitativos, pero en la mayor parte de los casos se necesitarán ambos tipos de información. Se plantean problemas particulares cuando se deben confirmar los residuos en el límite de determinación o próximos al mismo, pero aunque en este nivel es difícil cuantificarlos, es imprescindible que se confirme adecuadamente su nivel de identidad.

La necesidad de ensayos de confirmación puede depender del tipo de muestra o de su historial conocido. En algunos cultivos o productos se encuentran con frecuencia determinados residuos. Tratándose de una serie de muestras de origen similar, que contenga residuos del mismo plaguicida, quizás baste con confirmar la identidad de los residuos en una pequeña parte de las muestras, tomada al azar. De igual forma, cuando se sabe que se ha aplicado un determinado plaguicida al material de la muestra, no hay mucha necesidad de confirmar la identidad, si bien deberán confirmarse algunos de los resultados seleccionados al azar. Cuando se disponga de muestras de control, deberían utilizarse para comprobar la presencia de posibles sustancias que interfieren en el análisis.

¹ Soboleva E. Ambrus A., Aplicación del ensayo de idoneidad del sistema para garantizar la calidad y optimizar el rendimiento de un sistema de cromatografía de gases para el análisis de residuos de plaguicidas, J. Chromatogr. A. 1027. 2004. 55-65.

² Lantos J., Kadenczki L., Zakar F., Ambrus A. Validación de bases de datos de cromatografía de gases para la identificación cualitativa de ingredientes activos de residuos de plaguicidas en Fajgelj A. Ambrus A. (eds)(eds) Principios de Validación del Método, Real Sociedad de Química, Cambridge, 2000, pp 128-137.

Las operaciones necesarias para una identificación positiva dependen del criterio del analista, debiendo prestarse atención particular a la elección de un método que reduzca al mínimo los efectos de compuestos que interfieren en el análisis. La(s) técnica(s) que se elija(n) dependerá(n) de la disponibilidad de instrumentos y conocimientos adecuados en el laboratorio de ensayo.

CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS)

Los datos sobre residuos obtenidos mediante espectrometría de masas suponen las pruebas más definitivas y, cuando se dispone del equipo necesario, constituyen la técnica de confirmación preferible. La técnica también se utiliza normalmente a efectos de selección de residuos (fase 1). Generalmente el análisis de residuos mediante espectrometría de masas se aplica conjuntamente con una técnica cromatográfica de separación, con el fin de obtener simultáneamente datos sobre el tiempo de retención, la relación masa/carga en los iones y la abundancia de los mismos. La transmisión cuantitativa de analitos lábiles a través del sistema cromatográfico plantea problemas semejantes a los experimentados con otros detectores. En lo que respecta a la cuantificación, los iones que se controlen deberán ser los más específicos del analito, los que sufran menos interferencias y aquellos en los cuales la relación señal/ruido sea buena.

Cuando se utiliza el monitoreo selectivo de iones (SIM), los intervalos de tolerancia de la relación de iones y los tiempos de retención basados en la inyección del plaguicida tipo en disolvente puro a la concentración cercana al nivel crítico deberían haberse establecido en este punto. Los intervalos de tolerancia para las relaciones iónicas deben estar dentro de los límites de $\pm 30\%$ de la relación iónica absoluta. Cuando 2 (ó 3) relaciones iónicas seleccionadas están dentro de los intervalos de tolerancia establecidos, se confirma³ el residuo. Para un pequeño número de plaguicidas la espectrometría de masas probablemente solo muestre un ión específico, en cuyo caso debe buscarse una confirmación alternativa.

Cuando los iones detectados indican todavía la posible presencia de un residuo, el resultado puede comunicarse como identificado provisionalmente. Sin embargo, cuando el resultado dé lugar a una medida reglamentaria o los resultados se utilicen con otra finalidad (p. ej.: evaluación de la ingestión dietética), se buscará mayor confirmación de la identidad del analito. Esto puede lograrse con el mismo instrumental de GC-MS, inyectando compuestos tipo ajustados a la matriz del analito sospechado, para compensar la influencia de la matriz sobre las relaciones iónicas. En este caso, deben realizarse inyecciones posteriores del compuesto tipo ajustado a la matriz y la muestra sospechosa. La desviación del RRT del analito en el compuesto tipo y el pico sospechado en la muestra debe ser normalmente inferior al 0,1%. Dos relaciones iónicas medidas en una muestra deben estar dentro del intervalo de tolerancia calculado en base a las relaciones iónicas en el compuesto tipo ajustado a la matriz. Se considerará que el residuo ha sido confirmado si cumple la norma general expuesta anteriormente. Si las relaciones iónicas no se encuentran dentro de los intervalos de tolerancia, puede obtenerse una confirmación adicional de la identidad utilizando otras técnicas analíticas, ejemplos de las cuales figuran en la Tabla 6.

Otra confirmación por espectrometría de masas puede realizarse mediante la formación de su espectro completo de masas mediante ionización por impacto electrónico (en la práctica, normalmente desde m/z 50 hasta más allá de la región de iones moleculares). La ausencia de iones que interfieren es una consideración importante en la confirmación de la identidad. Una confirmación complementaria de la identidad puede conseguirse: i) utilizando una columna cromatográfica alternativa; ii) otra técnica de ionización (por ejemplo ionización química); iii) controlando otros productos de reacción de determinados iones mediante espectrometría doble de masas (MS/MS o MS^n) o iv) controlando otros iones con una masa mayor de resolución.

Las determinaciones por espectrometría de masas deberán satisfacer unos controles de calidad analítica similares a los que se aplican a otros sistemas.

HPLC y HPLC-MS

La confirmación de los residuos detectados tras la separación por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) suele ser más problemática con respecto a la cromatografía de gases. Si la detección se efectúa por absorción de rayos UV, la producción de un espectro completo puede proporcionar una prueba adecuada de la identidad. Sin embargo, los espectros UV de algunos plaguicidas no son muy útiles para el diagnóstico por ser análogos a los producidos por muchos otros compuestos que poseen grupos funcionales o estructuras

³ Soboleva E. Ahad K. Ambrus A. Aplicabilidad de algunos criterios de MS para la confirmación de residuos de plaguicidas, *Analyst*, 129, 1123-1129, 2004.

similares, y la coelución simultánea de compuestos que provocan interferencia puede determinar otros problemas. Los datos sobre la absorción UV obtenidos con diversas longitudes de onda pueden apoyar o refutar la identificación, pero en general por sí solos no son suficientemente característicos. Se pueden emplear datos de fluorescencia para apoyar los obtenidos por absorción UV. El empleo de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM) puede proporcionar datos justificativos adecuados, pero considerando que habitualmente los espectros generados son muy simples y presentan una escasa fragmentación característica, es improbable que los resultados obtenidos mediante CL-EM sean definitivos. Una técnica más potente es la aplicación de CL-EM/EM, ya que combina selectividad y especificidad y a menudo ofrece pruebas adecuadas de la identidad del compuesto. Las técnicas de CL-EM tienden a estar sujetas a los efectos de las matrices, especialmente la supresión, y por consiguiente para confirmar la cantidad puede hacerse necesaria la adición de compuesto tipo o compuestos tipo marcados por isótopos. Asimismo se podrá recurrir a la derivación para confirmar los residuos detectados por HPLC (Tabla 6).

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

En algunos casos será muy conveniente confirmar mediante cromatografía en capa fina (CCF) los resultados de la cromatografía de gases. La identificación se basa en dos criterios: valor *f*R y reacción de visualización. Los métodos de detección basados en bioensayos (por ejemplo con enzimas, proliferación fúngica, inhibición del cloroplasto) resultan particularmente idóneos para la confirmación cualitativa puesto que son específicos de cierto tipo de compuestos, sensibles, y normalmente se ven muy poco afectados por los coextractos^{4,5}. La literatura científica contiene numerosas referencias a esta técnica⁶. Sin embargo, los aspectos cuantitativos de la cromatografía en capa fina son limitados. Una extensión ulterior de esta técnica implica la eliminación de la superficie de la placa correspondiente al *f*R del compuesto de interés, seguida de coelución del material de la capa y de un nuevo análisis químico o físico de confirmación. Habrá que poner siempre en la placa, junto al extracto de la muestra, gotas de una solución del plaguicida tipo para evitar problemas de no repetibilidad del *f*R. Echando sobre el extracto gotas del plaguicida tipo también se puede obtener información útil. Las ventajas de la cromatografía en capa fina son la rapidez, el bajo costo y la aplicabilidad a materiales sensibles al calor; las desventajas consisten en que normalmente es menos sensible que las técnicas instrumentales de detección cromatográfica y exige una purificación más eficiente cuando la detección se basa en las reacciones cromáticas de las sustancias químicas.

DERIVACIÓN

Al seleccionar iones para confirmación GC/MS basados en una derivación, los iones seleccionados tienen que ser estructuralmente pertinentes para el residuo y no representar fragmentos del agente de derivación. Aunque la derivación puede ser una forma valiosa de confirmar la identidad de un residuo, debe tenerse en cuenta que añade también un elemento extra a la incertidumbre de una confirmación cuantitativa.

Esta forma de confirmación puede considerarse bajo tres amplios epígrafes:

a) Reacciones químicas

Se han utilizado frecuentemente reacciones químicas en pequeña escala que originan productos de degradación, adición o condensación de plaguicidas, seguidas de un reexamen de los productos por técnicas cromatográficas. Las reacciones dan origen a productos que tienen tiempos de retención y/o respuesta al detector distintos de los del compuesto de origen. Hay que tratar una muestra de plaguicida tipo juntamente con el residuo sospechado a fin de poder comparar directamente los respectivos resultados. Deberá incluirse también un extracto enriquecido para probar que la reacción ha tenido lugar en presencia de material de la muestra. Cuando los derivados se detectan gracias a las propiedades del reactivo del que se derivan, pueden producirse interferencias. Cochrane, W.P., ha publicado una reseña de las reacciones químicas utilizadas para fines de confirmación (Chemical derivatisation in pesticide analysis, Plenum Press, NY (1981)). Las

⁴ Ambrus^{1*} Á., Füzesi² I.; Susán² M.; Dobi³ D., Lantos⁴ J., Zakar⁵ F., Korsós⁴ I., Oláh³ J., Beke³ B.B., y L. Katavics⁵ Métodos de cribado efectivos en cuanto a costos para análisis de residuos de plaguicidas en fruta, hortalizas y cereales en grano, J. Environ Sci. Health B40, 297-339, 2005. Health B39 **2004** *aceptado para publicación.*

⁵ Ambrus Á.; Füzesi I.; Lantos J.; Korsos I.; Hatfaludi T. Repetibilidad y Reproducibilidad de los valores *f*R y MDQ con distintos Sistemas de Elución y Detección TLC. J. Environ Sci. Health B39 **2004** *aceptado para publicación.*

⁶ Informe sobre Plaguicidas de IUPAC (13) (Bátora, V., Vitorovic, S.Y., Thier, H.-P. and Klisenko, M.A.; Pure & Appl. Chem., 53, 1981, 1039-1049.

reacciones químicas tienen la ventaja de ser rápidas y fáciles de realizar, pero es necesario comprar o purificar reactivos especializados.

b) Reacciones físicas

Una técnica útil es la alteración fotoquímica de un residuo de plaguicida para obtener uno o más productos de patrón cromatográfico reproducible. Hay que tratar siempre de igual manera una muestra del plaguicida tipo y del extracto enriquecido. Las muestras que contienen más de un residuo de plaguicida pueden plantear problemas en la interpretación de los resultados. En tales casos, puede efectuarse antes de la reacción una separación previa de residuos específicos mediante CCF, cromatografía de alto rendimiento o fraccionamiento en columna.

c) Otros métodos

Muchos plaguicidas pueden degradarse o transformarse por la acción de enzimas. En contraposición a las reacciones químicas normales, estos procesos son muy específicos y generalmente consisten en oxidación, hidrólisis o desalquilación. Los productos de la conversión poseen características cromatográficas distintas de las del plaguicida de origen, y pueden utilizarse a efectos de confirmación si se comparan con los productos de reacción utilizando plaguicidas tipo.

Tabla 6. Métodos de detección apropiados para el cribado (fase 1) y la confirmación (fase 2) de residuos.

| | | Fase 1 - Cribado | | | | | | | |
|-------------------------------|--|--|------------------|-------|-------------------------|-------------------------------------|------------------|---|---|
| | | GC con columna capilar – ECD, NPD, FPD, PFPD | GC-MS | LC-MS | LC-DAD o exploración UV | LC-UV/VIS (longitud de onda simple) | LC-fluorescencia | GC con columna envasada – ECD, NPD, FPD | TLC – enzimas, proliferación fungal, inhibición del cloroplasto |
| Fase 2, confirmación | GC – columna capilar – ECD, NPD, FPD, PFPD | x ¹ | x ¹ | x | x | x | x | x | x |
| | GC-MS | x | x ^{1,2} | x | x | x | x | x | x |
| | LC-MS | x | x | | x | x | x | x | x |
| | Técnicas de examen completas | x | x | x | x | x | x | x | x |
| | (MS) ⁿ , HRMS, otras técnicas de ionización | x | x | x | x | x | x | x | x |
| | LC-DAD o exploración UV | x | x | x | | x | x | x | x |
| | LC-UV/VIS (longitud de onda simple) | x | x | | | | x | x | x |
| | LC-fluorescencia | x | x | | x | x | | x | x |
| | TLC – enzimas, proliferación fungal o inhibición del cloroplasto | x | x | x | x | x | x | x | x ^{2,3} |
| | Derivación | x | x | x | x | x | x | x | x |
| Perfil específico de isómeros | x | x | x | x | x | x | x | | |

1- Se utilizará o bien la columna de polaridad diferente que da lugar a un orden de elución diferente o elución de residuos y contaminantes en las proximidades del pico de interés u otro detector específico.

2- Puede utilizarse la misma técnica GC-MS para la fase 2 (confirmación) si se seleccionan iones diferentes o se establecen intervalos de tolerancia basados en soluciones ajustadas a la matriz.

3 - Se utilizará la fase móvil o estacionaria de polaridad diferente.

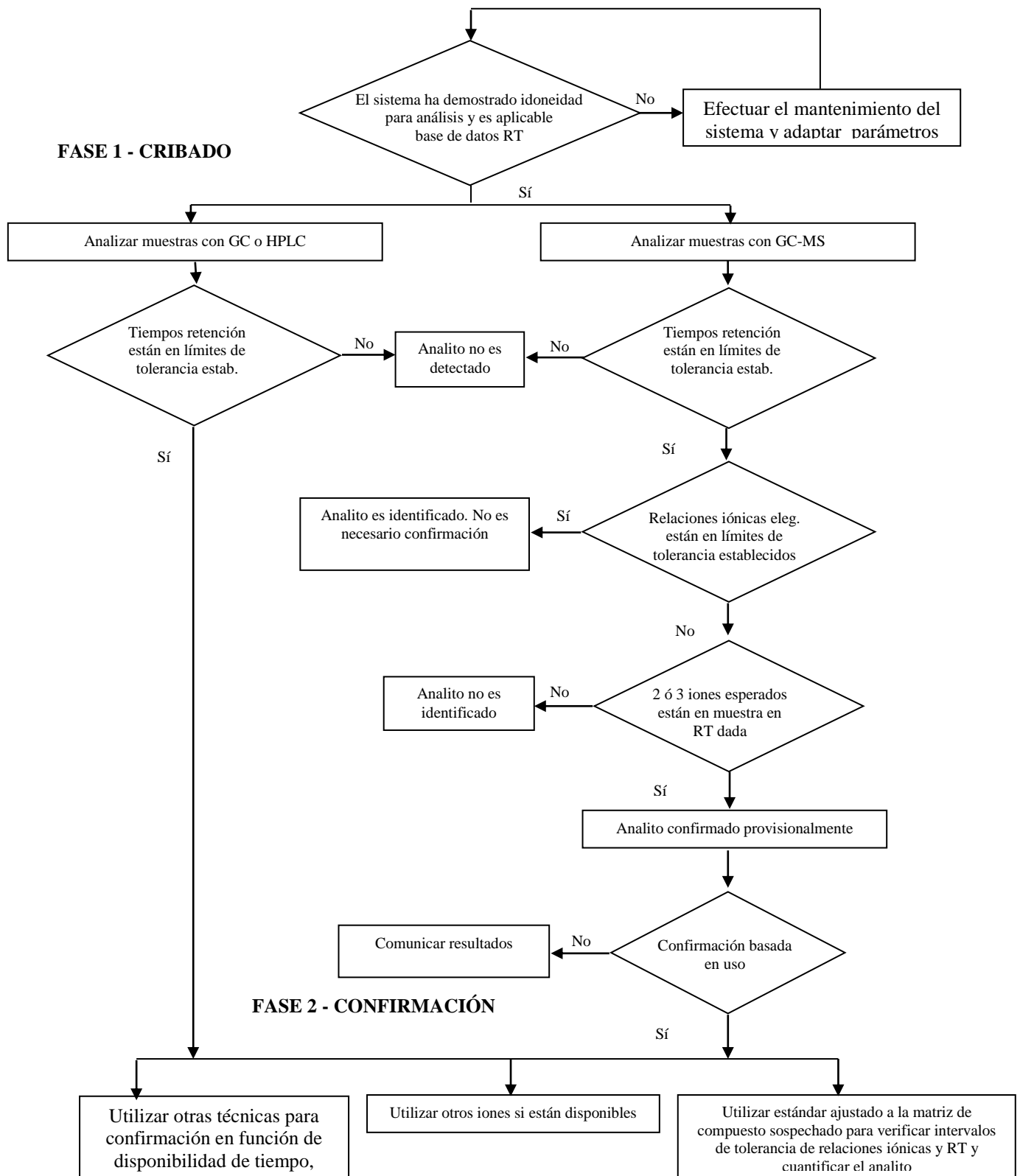


Figura 2. Representación esquemática del Cribado y Confirmación (Fase 1 y Fase 2) para residuos de plaguicidas

- 1 –Valores no habituales incluidas las sustancias prohibidas, violación de LMR o requisitos de estudio como, por ejemplo, en la evaluación de la exposición.
- 2 – Remitirse a la Tabla 6 para otros medios de confirmación.
- 3 – Para un pequeño número de plaguicidas la espectrometría de masas puede mostrar solamente un ión específico. En este caso debe buscarse una confirmación alternativa.