



PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS

COMITÉ DEL CODEX SOBRE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

51.ª reunión

Región Administrativa Especial de Macao (República Popular China), 8-13 de abril de 2019

DOCUMENTO DE DEBATE

SOBRE LA OPORTUNIDAD DE REVISAR LAS

DIRECTRICES PARA EL USO DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN LA IDENTIFICACIÓN, CONFIRMACIÓN Y DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE RESIDUOS (CXG 56-2005)

(Preparado por el Grupo de trabajo por medios electrónicos
presidido por la República Islámica de Irán y Costa Rica)

INFORMACIÓN GENERAL

1. El Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas (CCPR50, 2018) examinó, en su 50.ª reunión, una propuesta de nuevo trabajo de Irán sobre la revisión de las *Directrices sobre el uso de la espectrometría de masas en la identificación, confirmación y determinación cuantitativa de residuos* (CXG 56-2005) y puso de relieve las lagunas en las Directrices que era necesario abordar, por ejemplo, el título de las Directrices no coincide con el contenido del documento que se centra solo en el ensayo de confirmación; claros errores de redacción en el texto; las Directrices contemplan la espectrometría de masas en general que requiere una mayor orientación detallada, etc.
2. La CCPR50 reconoció la importancia del problema y recalcó la necesidad de que las Directrices estuvieran armonizadas con las *Directrices sobre criterios de rendimiento para métodos de análisis para la determinación de residuos de plaguicidas en los alimentos y los piensos* (CXG 90-2017).
3. La CCPR50 acordó establecer un Grupo de trabajo por medios electrónicos (GTE), bajo la presidencia de Irán y la copresidencia de Costa Rica, que trabajaría en inglés, con los siguientes términos de referencia (REP50/PR, párrs. 164-166):
 - (i) Preparar un documento de debate sobre la información general, los problemas y soluciones posibles a las lagunas identificadas en las directrices, incluido un documento de proyecto y una exposición de la revisión propuesta de CXG 56 para su examen en la CCPR51.
 - (ii) Armonizar CXG 56 con CXG 90 y otros documentos pertinentes del Codex.
4. La invitación para unirse al GTE fue distribuida a mediados de julio de 2018 con la fecha límite para el registro a finales de julio de 2018. La lista de participantes se encuentra en el Apéndice II.

DOCUMENTO DE DEBATE

5. 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.
6. Se puede argumentar que la cuantificación del analito no tiene sentido sin la confirmación de su identidad, mientras que, en algunos casos, como en el de los compuestos prohibidos o el análisis cualitativo, solo se necesita la confirmación o es más importante que la cuantificación.
7. Convencionalmente, para la confirmación de los resultados positivos para los residuos de plaguicidas en los alimentos o cualquier compartimiento del medio ambiente, se han adoptado enfoques diferentes, como cromatografía de gases con dos detectores diferentes o dos columnas de diferentes polaridades, combinación de dos técnicas cromatográficas o reacción química seguido del análisis del derivado. Otros medios de confirmación, como el patrón cromatográfico característico, podrían aplicarse alternativamente.
8. Sin embargo, estos enfoques de confirmación clásicos no proporcionan suficiente información estructural sobre el analito. Los métodos de confirmación deben proporcionar toda la información estructural sobre el analito que sea posible, lo cual solo es posible mediante la aplicación de técnicas de espectrometría (por

ejemplo EM, IR).

9. Dada la importancia de la confirmación de los resultados positivos de residuos de plaguicidas en los alimentos, la Comisión del Codex Alimentarius (CAC) aprobó en 2005 unas *Directrices para el uso de la espectrometría de masas (EM) en la identificación, confirmación y determinación cuantitativa de residuos* (CXG 56-2005).

10. Las lagunas en las directrices que era necesario abordar, por ejemplo, el título de las directrices no coincide con el contenido del documento; CXG56 se centra solo en el ensayo de confirmación; claros errores de redacción en el texto; CXG56 contempla la espectrometría de masas en general que requiere una mayor orientación detallada, etc.

11. En cada sección siguiente se revisan las materias contenidas en CXG 56-2005 y se proporcionan recomendaciones de revisión. Los apéndices I y II del presente documento contienen un documento de proyecto y un esbozo de las directrices revisadas para la propuesta de nuevo trabajo para su consideración por el CCPR. El apéndice III contiene una lista de los participantes de este GTE.

ENSAYO DE CONFIRMACIÓN

13. El párrafo 1 pone de relieve la importancia de la generación de datos de confirmación de los resultados, antes de presentar un informe del análisis. El párrafo se cierra con un ejemplo de las técnicas y confirma que no se corresponde con el uso de espectrometría de masas.

14. Los párrafos 2, 3 y 6 describen las técnicas de confirmación no relacionados con las técnicas de espectrometría de masas actuales; no son compatibles con el título de las directrices y su ámbito de aplicación; se recomienda eliminar ambos párrafos.

CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG/EM)

15. De los párrafos 7 a 17 se propone eliminar las secciones actuales, ya que no solo se refieren a los métodos de espectroscopia, sino también a las técnicas fuera del alcance del documento. Hay una mezcla de criterios de aceptación de otras técnicas con las técnicas de la espectrometría de masas.

16. Se propone eliminar las secciones de cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM), HPLC y HPLC-EM, cromatografía en capa fina (TLC) y derivación, y en su lugar incluir las secciones: Ámbito de aplicación, Principios generales, Selección de iones de reconocimiento para la identificación, confirmación, detección cuantitativa y un glosario de términos.

RECOMENDACIONES

17. El GTE formula las recomendaciones siguientes para el CCPR:

- Recomendar la aprobación del nuevo trabajo por la Comisión del Codex Alimentarius (CAC42) basado en el documento del proyecto presentado en el apéndice I.
- Establecer un GTE para llevar a cabo la revisión de las directrices de acuerdo con los puntos planteados en el documento del proyecto.
- Proporcionar observaciones generales sobre las directrices revisadas propuestas expuestas en el apéndice II para ayudar al GTE en la revisión ulterior de las directrices.

DOCUMENTO DE PROYECTO**PROPUESTA DE NUEVO TRABAJO SOBRE LA REVISIÓN DE LAS DIRECTRICES PARA EL USO DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN LA IDENTIFICACIÓN, CONFIRMACIÓN Y DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE RESIDUOS (CXG 56-2005)****(Para examen)****Objetivo y ámbito de aplicación**

El objetivo del nuevo trabajo propuesto es revisar las Directrices sobre *el uso de la espectrometría de masas (EM) para la identificación, confirmación y determinación cuantitativa de residuos* (CXG 56-2005) con el fin de mejorar y aclarar el contenido. Las directrices CXG 56-2005 revisadas contemplan aspectos generales sobre el análisis de residuos de plaguicidas por EM, con recomendaciones sobre la identificación, confirmación y determinación cuantitativa. La revisión tiene como fin:

- Dar a las directrices un formato conforme a la estructura de las normas del Codex.
- Centrándose más en hechos sobre la EM, como una poderosa técnica de confirmación y cuantitativa para la determinación de residuos de plaguicidas, especialmente en los métodos para residuos múltiples.

Pertinencia y oportunidad

Los plaguicidas comprenden un gran número de sustancias que pertenecen a muchos grupos químicos diferentes. La característica común es que son eficaces contra las plagas. Los plaguicidas comprenden una gran variedad de sustancias químicas con diferentes estructuras. Hay diferencias entre sus modos de acción, absorción, biotransformación y eliminación. Se necesitan metodologías analíticas que sean capaces de medir los residuos a niveles muy bajos y proporcionen evidencia inequívoca de la identidad y la magnitud de cualquier residuo detectado. La EM es una tecnología precisa y altamente flexible que se ha utilizado durante muchos años en la identificación y cuantificación de residuos de plaguicidas.

Desde que el CAC38 adoptó las CXG 56 en 2005, se han realizado muchas mejoras en la EM y las técnicas de separación de cromatografía líquida (CL) y cromatografía de gases (CG) que se emplean a menudo con la EM. En consecuencia, las CXG 56 deben revisarse para incluir los avances tecnológicos y las actualizaciones en la EM para la determinación de residuos de plaguicidas.

La revisión de las directrices tiene su origen en las solicitudes de explicaciones más detalladas sobre el uso de la EM como el método más potente de confirmación y cuantitativo para la determinación de residuos de plaguicidas, en especial en los métodos para residuos múltiples.

Principales aspectos que deben tratarse

El nuevo trabajo propuesto por el CCPR debe contemplar los siguientes aspectos:

1. Principios generales de los ensayos de confirmación en la determinación de residuos de plaguicidas, en especial en los métodos para residuos múltiples y que demuestran los avances de la técnica de EM para CG y HPLC aplicables a los plaguicidas.
2. Criterios para la selección de iones precursores y del producto para la identificación, confirmación y detección cuantitativa.
3. Criterios para la confirmación de las identidades de los residuos.
4. Criterios del control de calidad de la cuantificación de los residuos identificados.

Evaluación con respecto a los criterios para el establecimiento de las prioridades de trabajo

El principal trabajo propuesto sobre la revisión de CXG 56-2005 es describir los avances recientes en espectrometría de masas, incluyendo separaciones cromatográficas, diferentes analizadores de masas con guiones para CG/CL, efectos de la matriz en el análisis de EM, y diversas aplicaciones de la EM en el análisis de residuos de plaguicidas. Los métodos de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL-ES) siguen desempeñando un papel crucial en el campo del análisis de residuos de plaguicidas (ARP). Pese al predominio de los métodos de CL-EM, la CG-EM sigue siendo una herramienta útil para el análisis de plaguicidas que no son aptos para ionización a presión atmosférica (IPA) (como los compuestos organoclorados y piretroides) o en ciertas matrices de alimentos, como los productos con alto contenido de grasa.

Los principales objetivos de la revisión son:

- Cuantificar los compuestos de interés con gran precisión y exactitud en los niveles impuestos o por

debajo de ellos por la legislación actual o más bajos

- Posibilitar el análisis de residuos múltiples de compuestos con diferentes propiedades fisicoquímicas
- Ser suficientemente sólida como para permitir un análisis de alto rendimiento

Las directrices deben incluir tolerancias permitidas de intensidades iónicas relativas ya que pueden variar según la técnica utilizada para el análisis. En el caso de la EMCL-EM, la mejorada. La selectividad ofrecida por el uso de EM/EM es crucial en el caso de la coelución de compuestos en los que puede lograrse la identificación inequívoca y la confirmación de los picos coeluyentes a través de transiciones de MRM únicas.

En esta revisión pretendemos aclarar estos aspectos.

Pertinencia para los objetivos estratégicos del Codex

Objetivo estratégico 1: establecer normas alimentarias internacionales que aborden problemas alimentarios actuales y que se planteen

Debido al desarrollo de métodos de análisis de residuos de plaguicidas, la revisión de estas directrices garantiza resultados uniformes de análisis de diferentes laboratorios.

Objetivo estratégico 2: garantizar la aplicación de los principios de análisis de riesgos en la elaboración de normas del Codex

El documento de directrices no abordará residuos de un plaguicida o productos alimenticios específicos. En otras palabras, se pretende que sea pertinente para todos los riesgos de residuos de plaguicidas en todo tipo de alimentos que causen un riesgo.

Objetivo estratégico 3: facilitar la participación efectiva de todos los miembros del Codex

El alcance de las directrices es aplicable para cualquier laboratorio de residuos de plaguicidas en cualquier país miembro del Codex.

Objetivo estratégico 4: poner en práctica sistemas y prácticas efectivos y eficaces de gestión del trabajo

Durante el desarrollo de las directrices, todos los documentos de trabajo y debates electrónicos serán distribuidos de manera oportuna y transparente a través del foro electrónico en <http://forum.codexalimentarius.net/>. A medida que avance la revisión, las últimas versiones de los textos serán traducidas a los idiomas oficiales de la Comisión antes de las reuniones anuales del Comité.

Información sobre la relación entre la propuesta y otros documentos existentes del Codex

Las directrices complementarán las normas existentes del Codex que se centran en los residuos de plaguicidas. El documento de directrices del CCPR contempla los métodos analíticos cuantitativos y cualitativos (de detección, identificación, confirmación) que son coherentes con los criterios establecidos en CXG 90-2017 y siguen de cerca las recomendaciones del documento SANTE 11813 2017.

Determinación de necesidades de aportaciones técnicas a la norma procedentes de órganos externos, a fin de que se puedan programar

En este estadio no se ha identificado ninguna necesidad adicional.

Espacio de tiempo propuesto para la finalización del trabajo

A reserva de la aprobación por la CAC en 2019, un primer borrador de las directrices revisadas se presentará a la CCPR52 (2020) para su consideración. La aprobación final por la CAC está prevista en el año 2022.

APÉNDICE II**DIRECTRICES PARA EL USO DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM) EN LA IDENTIFICACIÓN, CONFIRMACIÓN Y DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE RESIDUOS****CAC/GL 56-2019-
Proyecto de revisión preliminar
Para recabar observaciones generales del CCPR****Introducción**

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.

Se puede argumentar que la cuantificación del analito no tiene sentido sin la confirmación de su identidad, mientras que, en algunos casos, como en el de los compuestos prohibidos o el análisis cualitativo, solo se necesita la confirmación o es más importante que la cuantificación.

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, deben utilizarse para comprobar la presencia de posibles sustancias que interfieren en el análisis.

Clásicamente, para la confirmación de los resultados positivos para los residuos de plaguicidas en los alimentos o cualquier compartimiento del medio ambiente, se han adoptado enfoques diferentes, como cromatografía de gases con dos detectores diferentes o dos columnas de diferentes polaridades, combinación de dos técnicas cromatográficas o reacción química seguido del análisis del derivado. Otros medios de confirmación, como el patrón cromatográfico característico, podrían aplicarse alternativamente. Por ejemplo, cuatro isómeros de cipermetrin forman un patrón específico, que, combinado con los tiempos de retención, puede servir como evidencia adicional de la identidad de cipermetrin. Sin embargo, en casos similares se debe tener cuidado cuando es posible la reísoimerización¹.

Sin embargo, estos enfoques de confirmación clásicos no proporcionan suficiente información estructural sobre el analito.

Los métodos de confirmación deben proporcionar toda la información estructural sobre el analito que sea posible, lo cual solo es posible mediante la aplicación de técnicas de espectrometría (por ejemplo EM, IR). Por consiguiente, la mayoría de los documentos que establecen los criterios de confirmación para residuos y contaminantes describen la combinación de una técnica cromatográfica con espectrometría de masas como el principal instrumento de confirmación.

Ámbito de aplicación

Estas directrices abordan el principio general de aplicación del espectrómetro de masas (EM) en la identificación, confirmación y determinación cuantitativa de residuos de plaguicidas, y deben leerse junto con todos los métodos de análisis pertinentes de residuos de plaguicidas.

Principios generales

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. 1. 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

¹ EN12393-3-2013: Alimentos de origen vegetal – métodos para residuos múltiples para la determinación de residuos de plaguicidas por CG o CL/EM. Parte 3: Determinación y ensayos de confirmación

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 cromatográficos, o en métodos alternativos utilizando propiedades fisicoquímicas diferentes del compuesto, o la combinación de varios métodos de separación y detección. En el Cuadro 1 se proporcionan algunos procedimientos alternativos de confirmación.

Selección de iones de reconocimiento para la identificación, confirmación y detección cuantitativa

La detección por espectrometría de masas se llevará a cabo mediante técnicas de EM, utilizando espectros de masa completos (barridos completos) o el control de iones específicos (SIM), o el control de la reacción seleccionada (SRM), u otras técnicas apropiadas de EM o EM-EMⁿ, combinadas con los modos de ionización adecuados. En el caso de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), la resolución será generalmente superior a 10 000 para todo el intervalo de masas, con una definición del valle del 10 %.

Los espectros de referencia para el analito deben generarse utilizando los mismos instrumentos y técnicas empleados para el análisis de las muestras. Si son evidentes grandes diferencias entre un espectro publicado y el generado en el laboratorio, debe demostrarse que el último es válido.

Si se registran espectros de barrido completo en una única espectrometría de masas, debe haber un mínimo de cuatro iones con una intensidad relativa ≥ 10 % del pico de base. Se incluirá el ion molecular si se encuentra en el espectro de referencia con una intensidad relativa ≥ 10 %. Puede recurrirse a la búsqueda bibliográfica asistida por ordenador². En este caso, la comparación de los datos del espectro de masas en las muestras de ensayo con la solución de calibración superará un factor crítico de correspondencia. Este factor se determinará para cada analito durante el proceso de validación, sobre la base de espectros para los que se cumplen los criterios que describiremos a continuación. Se controlará la variabilidad en los espectros debida a la matriz de la muestra y el funcionamiento del detector.

En caso de medición del barrido completo, puede ser necesaria la sustracción meticulosa de espectros del fondo por deconvolución u otros algoritmos, para asegurar que el espectro resultante del pico cromatográfico es representativo. Cuando se utiliza la corrección del fondo, debe de aplicarse de manera uniforme en todo el lote y debe indicarse claramente.

Si se realiza la determinación de espectrometría de masas por SIM, el ion molecular debe ser preferentemente uno de los iones de diagnóstico seleccionados. Los iones de diagnóstico seleccionados no deben proceder exclusivamente de la misma parte de la molécula. La relación señal-ruido de cada ion de diagnóstico debe ser $> 3:1$.

Al seleccionar los iones característicos para el desarrollo del método SIM deben considerarse muchos datos. Interferencias notorias, como iones que se sabe que son abundantes en el medio ambiente, como ftalatos (m/z 149), los artefactos de columna (m/z 73, 207, 221, 281, 327), la matriz, el fondo, la pérdida de fracción específica (m/z 18) etc. no deben incluirse cuando se desarrolla un método para SIM. Identificación y confirmación de los resultados.

Los cromatogramas de iones extraídos de los extractos de muestra deben tener picos de tiempo de retención, forma del pico y relación de respuesta similares a los obtenidos a partir de estándares de calibración analizados en concentraciones comparables en el mismo lote. Los picos cromatográficos de iones selectivos diferentes para el analito deben coincidir completamente. Cuando un cromatograma de iones muestra evidencia de interferencia cromatográfica significativa, la identificación no debe basarse en él.

Uno de los problemas en el análisis de residuos de plaguicidas es la falta de un número suficiente de iones con los volúmenes requeridos en los espectros de masas de algunos plaguicidas. Por ejemplo, la ionización por impacto electrónico en los espectros de masas de bitertanol, metoxicloro, fosmet produce iones de cuantificación solo con volúmenes superiores o inferiores al 10% del pico de base, que no pueden utilizarse para fines de cuantificación debido a la alta incertidumbre de la medición. Además, aumentarán significativamente el LOQ como se expondrá a continuación. En otros casos, como dimetoato, mevinfos y fentión, los iones de diagnóstico no son específicos y trazas de iones de las masas de identificación suelen coincidir con componentes de la matriz. Por ejemplo, pueden seleccionarse tres iones con m/z 109, 127, 192 para la identificación de mevinfos en el modo SIM, pero dos de ellos (109 y 127) aparecen a menudo en la superposición de coextractos³.

Distintos tipos y modos de detectores de espectrometría de masas proporcionan grados diferentes de selectividad y especificidad, lo cual guarda relación con la confianza en la identificación. Los requisitos para

² La deconvolución automatizada de espectros de masas y sistema de identificación (AMDIS) es un programa de ordenador que extrae los espectros de los componentes individuales en un archivo de datos de CG/EM e identifica los compuestos de interés, cotejando estos espectros en una biblioteca de referencia.

³ Soboleva E. Ahad K. Ambrus A. Applicability of some MS criteria for the confirmation of pesticide residues, Analyst, 129, 1123-1129, 2004.

la identificación se presentan en el Cuadro 2. Deben considerarse como criterios de referencia para identificación, no como criterios absolutos para demostrar la presencia o ausencia de un analito.

Cuantificación

Cuando se utiliza el control 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. Las intensidades relativas de los iones detectados, expresadas como un porcentaje de la intensidad del ion más intenso o la transición, deben corresponder a las del analito patrón, de patrones de calibración o de muestras adicionadas, en concentraciones comparables y medidas en las mismas condiciones, con las tolerancias de $\pm 30\%$. Cuando dos (o tres) razones iónicas seleccionados están dentro de los intervalos de tolerancia establecidos se confirma el residuo. Para un pequeño número de plaguicidas la espectrometría de masas probablemente solo muestre un ion 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 (por ejemplo, evaluación de la ingestión dietética), se buscará mayor confirmación de la identidad del analito. Esto puede lograrse con el mismo instrumental de CG-EM, inyectando compuestos tipo ajustados a la matriz del analito sospechado, para compensar la influencia de la matriz sobre las razones 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 razones iónicas medidas en una muestra deben estar dentro del intervalo de tolerancia calculado en base a las razones 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 razones 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 el Cuadro 1.

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. 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 1).

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 $m/z50$ 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 (EM/EM o EM^n) o iv) controlando otros iones con una masa mayor de resolución.

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 análisis⁴. La base de datos sobre tiempos de retención deberá ajustarse a las condiciones actuales⁵. En la fase 1 pueden aplicarse intervalos de tolerancia de 1,5 al 3% del tiempo de retención absoluto a la CG 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 TR 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.

⁴ Soboleva E. Ambrus A., Application of system suitability test for quality assurance and performance optimization of a gas chromatographic system for pesticide residue analysis, J. Chromatogr. A. 1027. 2004. 55-65.

⁵ Lantos J., Kadenczki L., Zakar F., Ambrus A. validation of gas chromatographic Databases for qualitative identification of active ingredients of pesticide residues in Fajgelj A. Ambrus A. (eds) Principles of Method Validation, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000, pp 128-137.

Cuadro 1. Métodos de detección apropiados para el cribado y la confirmación de residuos.

		Fase 1-Cribado							
		CG con columna capilar – ECD, NPD, FPD, PFPD	CG-EM	CL-EM	CL-DAD o exploración UV	CL-UV/VIS (longitud de onda simple)	CL-fluorescencia	CG con columna envasada – ECD_NPD	TLC – enzimas, proliferación fungal, inhibición del cloroplasto
Fase2- Confirmación	CG – columna capilar – ECD, NPD, FPD, PFPD	x ¹	x ¹	x	x	x	x	x	X
	CG-EM	x	x ^{1, 2}	x	x	x	x	x	X
	CL-EM	x	x		x	x	x	x	x
	Técnicas de barrido completo	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 CG-EM 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.

Cuadro 2. Requisitos de identificación para diferentes técnicas de EM

Detector / características de EM	Sistemas típicos (ejemplos)	Adquisición	Requisitos de identificación	
			número mínimo de iones	Otros
(resolución de la unidad de masa)	cuadrupolar trampa iónica, tiempo de vuelo (TOF)	barrido completo, intervalo m/z limitado, seguimiento de iones seleccionados (SIM)	3 iones	S/N $\geq 3^e)$ Los picos de analitos en los cromatogramas de iones extraídos deben coincidir plenamente. Razón iónica dentro del $\pm 30\%$ (relativo) del promedio de los patrones de calibración de la misma secuencia
EM/EM	triple cuadrupolar trampa iónica, trampa cuadrupolar Q-TOF, Q-Orbitrap	Control de la reacción seleccionada o múltiple (SRM, MRM), resolución de masa para el aislamiento del ion precursor igual o mejor que resolución de la unidad de masa	2 producciones	
Medición exacta de masa	EM de alta resolución: (Q-)TOF (Q-)Orbitrap FT-ICR-MS EM sector	barrido completo, intervalo m/z limitado, SIM, fragmentación con o sin selección del ion precursor, o combinación de ello	2 iones con exactitud de masa ≤ 5 ppm ^{a,b,c}	
		EM de fase individual combinada y EM/EM con resolución de masa para el aislamiento del ion precursor igual o mejor que la resolución de la unidad de masa	2 iones: 1 ion molecular, molécula (des)protonada o ion aducto con exact. de masa ≤ 5 ppm ^{a,c} <u>más</u> Producción ^{d1} EM/EM	

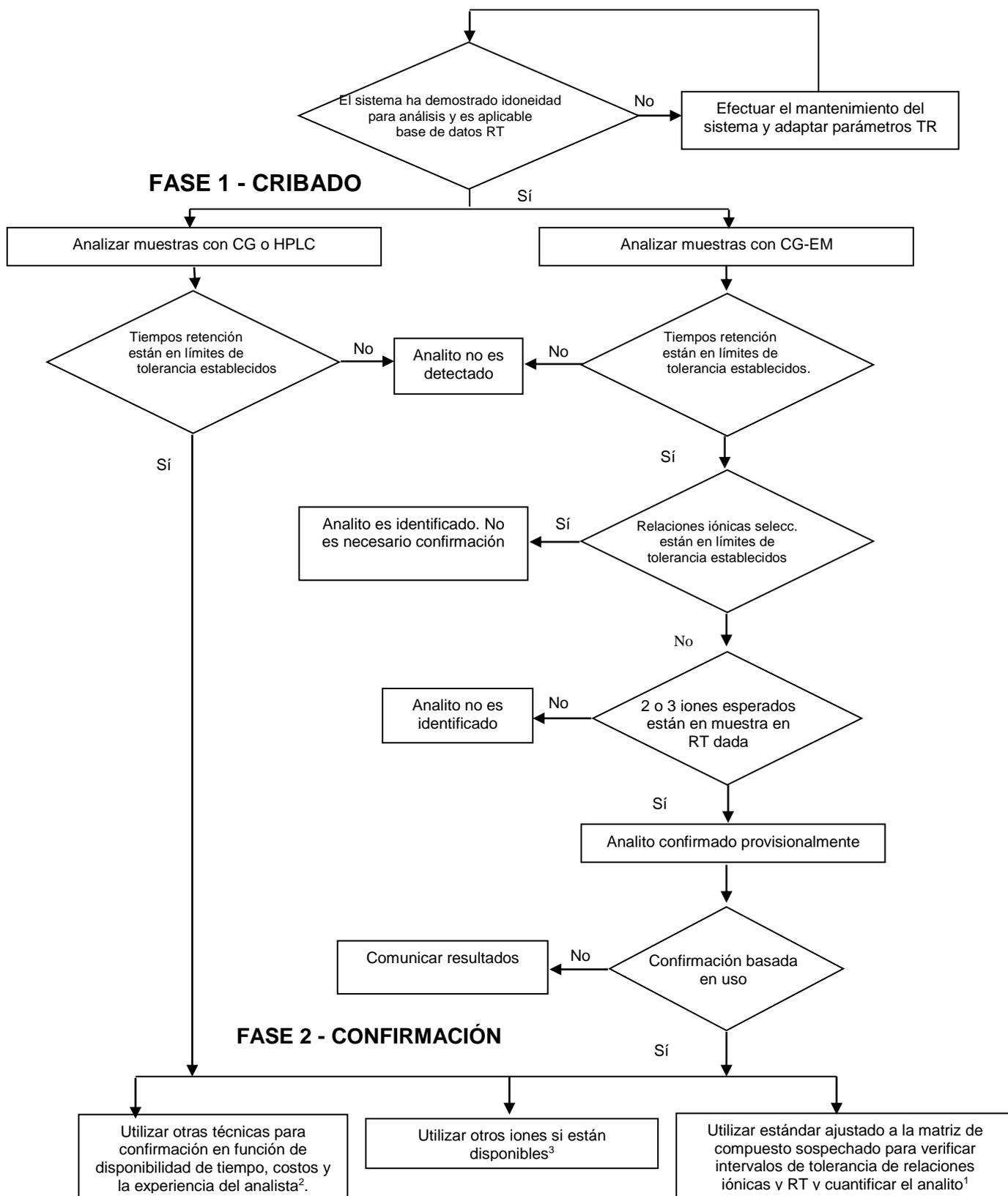
a) Preferiblemente incluyendo el ion molecular, molécula (des)protonada o ion aducto

b) incluyendo al menos un fragmento de ion

c) < 1 mDa para m/z < 200

d) ningún requisito específico para la exactitud de masa

e) en ausencia de ruido, debe haber una señal en al menos 5 barridos seguidos



1 –Valores no habituales incluidas las sustancias prohibidas, vulneración de LMR o requisitos de estudio como, por ejemplo, evaluación de la exposición.

2 – Remitirse al Cuadro 6 para otros medios de confirmación.

3 – Para un pequeño número de plaguicidas la espectrometría de masas puede mostrar solamente un ion específico. En este caso debe buscarse una confirmación alternativa.

Figura 1. Representación esquemática del cribado y confirmación (fase 1 y fase 2) para residuos de plaguicidas

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Confirmación	El proceso de generación de suficiente evidencia para garantizar que un resultado para una muestra específica es válido. Los analitos deben estar identificados correctamente para cuantificarlos. La identidad y la cantidad de residuos deben confirmarse. Es imposible confirmar la ausencia total de residuos. La adopción de un "límite de presentación de informes" en el LCL evita el alto costo injustificado de confirmar la presencia, o ausencia, de residuos en niveles innecesariamente bajos.
EM/EM	Espectrometría de masas en tándem, que aquí incluye EM ⁿ . Un procedimiento de EM en el que los iones de una masa seleccionada con la razón de carga (m/z) del proceso de ionización primario son aislados, fragmentados en general por colisión, y los iones del producto separados (EM/EM o EM ²). En los espectrómetros de masas de trampa de iones, el procedimiento puede llevarse a cabo de forma repetitiva en una secuencia de iones del producto (EM ⁿ), aunque esto no suele ser práctico con bajos niveles de residuos.
Validación	La confirmación mediante examen y puesta a disposición de pruebas efectivas de que se cumplen los requisitos particulares de un uso específico previsto.
Determinación	Un resultado cuantitativo de un método que cumple con los criterios de rendimiento aceptables para el propósito cuantitativo del análisis (por ejemplo, cromatografía con un detector selectivo de elementos)
Identificación	Un resultado cualitativo de un método capaz de proporcionar información estructural (por ejemplo, utilizando la detección por espectrometría de masas (EM)) que cumple con criterios aceptables para el propósito del análisis.
Barrido completo	Cuando la determinación con espectrometría de masas se lleva a cabo registrando espectros de barrido completos, es obligatoria la presencia de todos los iones de diagnóstico medidos (el ion molecular, los aductos característicos del ion molecular, los iones fragmentados característicos y los iones isotópicos) con una intensidad relativa superior al 10 % en el espectro de referencia del patrón de calibración.
Seguimiento de iones seleccionados (SIM)	Cuando la determinación con espectrometría de masas se lleva a cabo por fragmentografía, el ion molecular será preferiblemente uno de los iones de diagnóstico seleccionados (el ion molecular, los aductos característicos del ion molecular, los iones fragmentados característicos y todos sus iones isotópicos). Los iones de diagnóstico seleccionados no deberán proceder exclusivamente de la misma parte de la molécula. La relación señal-ruido para cada ion de diagnóstico será $\geq 3:1$
Control de la reacción seleccionada (SRM)	Los datos adquiridos a partir de uno o más iones de productos específicos correspondientes a iones precursores seleccionados registrados a través de dos o más etapas de espectrometría de masas. Nota 1: el control de la reacción seleccionada en la espectrometría de masas de múltiples etapas se conoce como control de reacciones consecutivas. Nota 2: el control de la reacción seleccionada aplicado a múltiples iones de productos de uno o más iones precursores se conoce

	como control de la reacción múltiple.
Control de la reacción múltiple (MRM)	<p>La aplicación del control de la reacción seleccionada a múltiples iones de productos de uno o más iones precursores.</p> <p>Nota: este término no debe confundirse con el control de la reacción consecutiva, que implica la aplicación en serie de tres o más etapas del control de la reacción seleccionada.</p>

APÉNDICE II
LISTA DE PARTICIPANTES

PRESIDENCIA: Roya Noorbakhsh / Head of biology reference lab , ISIRI / roybakhsh@yahoo.com

COPRESIDENCIA: Verónica Picado Pomar / Chemist, Servicio Fitosanitario del Estado / vpicado@sfe.go.cr

Nombre	Organización	País
Amanda Lasso Cruz	Ministerio de Economía Industria y Comercio	Costa Rica
Humberto Reyes Cervantes	SENASA	Perú/Lima
Yolandina Lambur	SENASA	Honduras
Florence Gerault	Ministry of agriculture	Francia
Tania Daniela Fosado Soriano	Secretaría de Economía	México
Jakeline Arias Méndez	Coordinadora del Subcomité del Codex	Ecuador
Roxana Inés Vera Muñoz	Servicio Agrícola y Ganadero	Chile
Volker Wachtler	Unión Europea	Unión Europea
Aaron Niman	U.S. Environmental Protection Agency	EE.UU.
Rita Kishore	USDA	EE.UU.
Joseph T Gesell	CortevaAgriscience / Crop Life International	EE.UU.
Aluwani Alice Madzivhandila	Department of Health	Sudáfrica
Krishna Kumar Sharma	Indian Agricultural Research Institute	India
Vidya M	Spices Board	India
Lucy Namu	Kenya Plant Health Inspectorate Service	Kenya
Kyunghee Jung	Ministry of Food and Drug Safety	República de Corea
HyoYoung Kim	Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs	República de Corea
Kim Hana	MAFRA	República de Corea
Park Yu-min	Ministry of Food and Drug Safety	República de Corea
Henk van der Schee	NVWA	Países Bajos
Hidetaka Kobayashi	Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries	Japón
Karina Budd	Department of Agriculture and Water Resources	Australia
Xiongwu QIAO	Shanxi Academy of Agricultural Sciences	China
Luo Yuanyuan	ICAMA, China	China
Yong Gong	ICAMA, China	China
Canping Pan	China agaric university	China
Ercheng Zhao	Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science	China
Elsa Maritza Acosta Piantini	Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social	República Dominicana
Finbarr O'Regan	Department of Agriculture, Food and the Marine	Irlanda
Jian Wang	Canadian Food Inspection Agency	Canadá
Stephanos Kirkagaslis	European Commission	Bélgica
Razzaryonov Alexandr	Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan	Kazajstán