

UNIVERSITAT  
JAUME I

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Universitat  
de Girona

2018

# MEMORIA DE PRÁCTICAS



**Raúl Oriol Sánchez**

**Iproma**

**28-6-2018**

## ÍNDICE

1. Introducción .....	4
1.1 Objetivo .....	4
2. Empresa.....	5
2.1 Organigrama de la empresa .....	6
2.2 Proceso de petición de servicio.....	7
2.3 Control de calidad. ....	8
2.4 Homologaciones y Títulos .....	8
3. Métodos de análisis desarrollados.....	9
3.1 Determinación de Glifosato y AMPA en agua, mediante HPLC-MS/MS con extracción SPE “on-line” .....	9
3.1.1 Introducción .....	9
3.1.2 Analitos a determinar.....	10
3.1.3 Técnicas utilizadas para el análisis .....	11
3.1.4 Reactivos, material y equipos .....	13
3.1.5 Calibración y ajustes previos. ....	18
3.1.6 Preparación de la muestra. ....	19
3.1.7 Control interno.....	20
3.1.8 Proceso analítico. ....	20
3.1.9 Posibles interferencias .....	22
3.1.10 Criterios para aceptación y rechazo .....	23
3.1.11 Cálculos y expresión de resultados .....	25
3.1.13. Valores habituales y límites legales .....	26
3.1.14 Informe final.....	26

3.2 Análisis multiresiduo en aguas mediante HPLC-MS/MS con extracción SPE “on-line” ....	27
3.2.1. Analitos a determinar.....	27
3.2.2. Técnica utilizada para el análisis. ....	28
3.2.3 Reactivos, material y equipos .....	29
3.2.4. Calibración.....	32
3.2.5. Preparación de la muestra .....	33
3.2.6. Control interno.....	34
3.2.7. Proceso analítico. ....	34
3.2.8. Posibles interferencias. ....	38
3.2.9. Criterios de aceptación y rechazo. ....	38
3.2.10. Cálculos y expresión de los resultados.....	40
3.2.11. Informe final.....	40
3.2.12. Valores habituales y límites legales .....	40
4. Conclusiones sobre las prácticas.....	42
5. Valoración personal .....	42
6. Agradecimientos .....	42
7. Bibliografía .....	43

# 1. Introducción

Esta memoria es el resultado de las prácticas en empresa del Máster en Técnicas Cromatográficas Aplicadas impartido en las universidades Rovira y Virgili, Universitat de Girona y Universitat Jaume I, llevadas a término por **Raúl Oriol Sánchez** en la empresa **Iproma**.

Durante mi estancia en prácticas he trabajado y realizado tareas de apoyo en la sección de cromatografía, pudiendo participar en la rutina diaria de algunos métodos acreditados que se encuentran en la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 trabajando en el ámbito de calidad. Ya que se encuentran implantados Sistemas de Calidad y de Gestión del medio Ambiente

Tal y como se indica a continuación, se describen algunos detalles de la empresa y los métodos que se han llevado a cabo para determinar algunos compuestos de interés. También expondré mis conclusiones sobre la estancia en prácticas en la empresa, valoración personal del máster y agradecimientos a aquellas personas que han contribuido a ello.

## 1.1 Objetivo

El objeto de este trabajo trata la determinación de dos herbicidas **Glifosato** [N-fosfometil)-glicina] y su metabolito de degradación AMPA (**ácido aminometilfosfónico**) mediante un método de rutina. Utilizando HPLC-MS/MS mediante extracción "SPE On-line". Como también el uso de un método multiresidual para la determinación de 48 plaguicidas, utilizando HPLC-MS/MS mediante extracción SPE "On-Line".

## 2. Empresa

**Iproma S.L** (Investigación y proyectos Medio Ambiente) es una empresa especializada en asesoría y control de contaminación medioambiental, agroalimentaria e higiénico sanitaria.

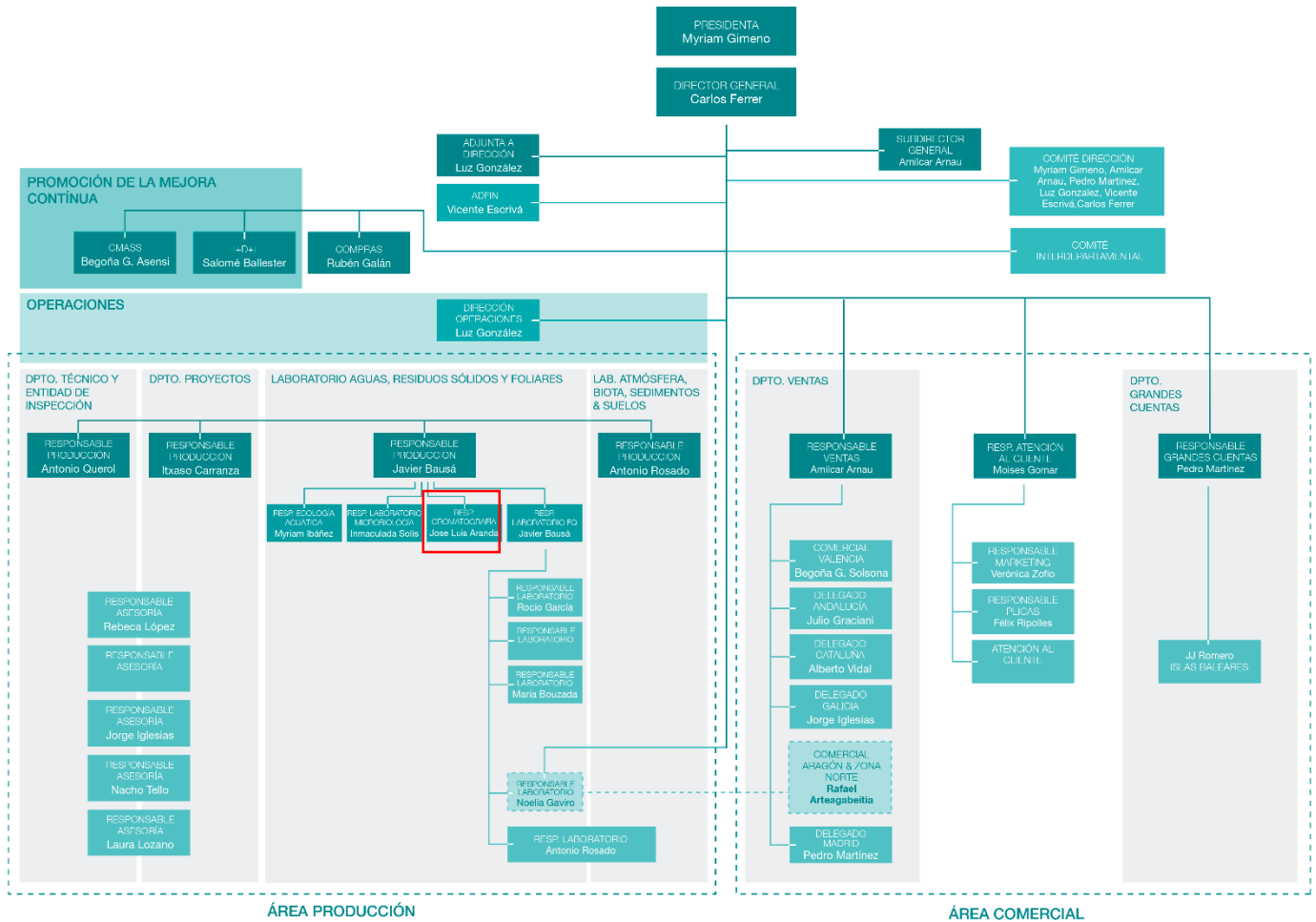
Desde sus inicios en 1990 ha estado trabajando en diferentes proyectos y estudios aportando soluciones a las diferentes cuestiones, que afectan al medio ambiente, a la salud y a la higiene industrial unido al cumplimiento de los requisitos legales y reglamentarios que afectan a cada empresa y organismo público como privado.

Actualmente Iproma cuenta con con 6 laboratorios ubicados en diferentes partes de España como pueden ser: Castellón (central), Madrid, Barcelona, Sevilla, Pontevedra y Zaragoza, además de una oficina técnica de Valencia.

La empresa trabaja con imparcialidad, independencia e integridad ofreciendo a sus clientes:

- **Confianza:** La empresa debe su existencia a sus clientes. Por este motivo procura ofrecer la mayor satisfacción en los servicios prestados, realizando análisis e informes de manera confidencial e imparcial
- **Calidad:** Consiguiendo la mejor incertidumbre en la medida y los mejores límites de cuantificación para el cumplimiento de los requisitos legales y reglamentarios que afectan a las muestras y ensayos. Así lo avalan las acreditaciones y certificaciones correspondientes.
- **Profesionalidad:** Componiendo su plantilla de más de 250 empleados de los cuales el 65% son titulados superiores en diversas ramas científicas.
- **Rapidez :** Ofreciendo la consulta de resultados On-line y la emisión de informes de ensayos a través de la página web
- **Confidencialidad:** El compromiso de los empleados y el establecimiento de medidas para la protección de datos
- **Eficacia:** Ofreciendo soluciones a los problemas medioambientales, agroalimentarios e higiene industrial que plantean los clientes con la mayor brevedad posible y con las mayores garantías de seguridad.
- **Respeto al medio ambiente:** Las actividades de Iproma se realizan con el máximo respeto al medio ambiente tal y como lo demuestra la obtención del certificado: ISO/14001:2015
- **Eficiencia tecnológica:** Se apuesta en la inversión de nuevas tecnologías y en el desarrollo de proyectos I+D+I de nuevos contaminantes.

## 2.1 Organigrama de la empresa



El laboratorio consta de 4 secciones:

1. **Registro:** Es el punto de entrada de las muestras a la empresa. Cuando las muestras llegan se etiquetan con un código (numérico), para que de esta forma el nombre del cliente, ni la procedencia de la muestra no sean reconocibles, garantizando así la confidencialidad de los datos.
2. **Cromatografía:** Es la sección en donde se aplican las técnicas de separación cromatográficas para analizar las muestras. Análisis de micro contaminantes orgánicos, incluyendo sustancias prioritarias y otras sustancias emergentes, por diversas técnicas cromatográficas ( gases, gases-masas, liquido, liquido-masas, triple cuadrupolo etc
3. **Microbiología:** Análisis de microorganismos mediante examen microscópico, técnicas moleculares (PCR), técnicas inmuno-magnéticas.
4. **Físico-químico:** Está sección está a la vez subdividida en diferentes áreas, dependiendo de la naturaleza de la matriz: residual, potable, agrícola. También se encuentran absorción atómica e ICP. Análisis de diferentes sustancias y compuestos físico-químicos mediante técnicas espectrofotométricas, electrometría, cromatografía iónica y metodología específica

## 2.2 Proceso de petición de servicio.



1. Cliente: es quien solicita el análisis de las muestras. El análisis se llevará a cabo según las especificaciones del cliente: análisis de un determinado analito, comprobación del cumplimiento de la legislación según el tipo de muestra, etc.
2. Solicitud de presupuesto: el cliente solicita el presupuesto al departamento comercial.
3. Solicitud del servicio: cuando el cliente está conforme con el presupuesto, solicita el servicio a la empresa.
4. Toma de envío o muestras: se hace de dos formas:
  1. El cliente lleva la muestra a la empresa asesorado por el departamento comercial, el cual le indica la forma de llevar a cabo la toma de muestra.
  2. El operario de la empresa es quien realiza el muestreo.
5. Registro: La muestra cuando llega a la empresa debe de ir acompañada de un formulario de petición de análisis. El personal de registro le asigna un código (numérico) para mantener la confidencialidad del cliente y marcar los parámetros a analizar. Posteriormente es almacenada correctamente para su análisis.
6. Análítica: Se saca la muestra de su lugar de almacenamiento y se prepara para analizar.
7. Validación: hay dos etapas básicas para validar un resultado.
  1. Revisión de los resultados por el jefe de laboratorio utilizando un criterio químico
  2. El departamento de calidad se encarga de analizar que los compuestos analizados son los solicitados por el cliente y que el método por el cual han sido analizados es el correcto.
8. Informe del ensayo: Se envían los resultados al cliente con las observaciones correspondientes cuando sea necesario.

### 2.3 Control de calidad.

Los sistemas de calidad han de ser sometidos periódicamente a una evaluación para garantizar que siguen siendo válidos. Esta actividad se denomina auditoría y en función del tipo de personal que la realiza y el objetivo que se persigue, se denomina auditoría interna o externa:

1. Auditoría interna. La lleva a cabo el propio personal de la empresa.

Existen diferentes formas de ponerla en práctica.

- a. Gráficos de control
- b. Muestras ciegas
- c. Materiales de referencia certificados matriciales
- d. Correlación de resultados.
- e. Repetición de medidas

2. Auditoría externa. Supone la evaluación de la calidad de los resultados del laboratorio por el personal ajeno a este. Algunos métodos para llevarla a cabo son:

- a. Ejercicios de ínter comparación
- b. Acreditación de laboratorios.
- c. Materiales de referencia certificados

La acreditación: Es el reconocimiento formal i/o escrito de que un laboratorio analítico es competente para llevar a cabo análisis específicos o tipos específicos de análisis. Esta actividad es concedida por la ENAC (Entidad nacional de acreditación) y se considera un elemento esencial para el buen funcionamiento de la empresa desde el punto de vista de calidad. No es global, de forma que solo se pueden acreditar algunos aspectos del trabajo de laboratorio. Y tampoco es indefinida, hace falta renovarse de forma periódica. Dos características de la acreditación, su carácter parcial y transitorio.

### 2.4 Homologaciones y Títulos

Según ENAC, **Iproma** está acreditado como laboratorio de ensayo de acuerdo con la norma **UNE-EN ISO/IEC 17025/2005** para la realización de los siguientes ensayos.

- Análisis físico-químico de aguas y lixiviados, residuos sólidos, suelos, sedimentos y biota.
- Análisis microbiológico de aguas y lixiviados. Toma de muestra y análisis "in-situ" de aguas y lixiviados.
- Análisis físico-químico de productos alimentarios, superficies y utensilios. Toma de muestra de superficie, utensilios e hisops (planta olorosa).
- Análisis físico-químico en soportes de muestreo por emisiones atmosféricas. Toma de muestra y análisis microbiológico del aire.

La norma **UNE-EN ISO 17025:2005** para las actividades de inspección en el área medioambiental en los ámbitos de aguas continentales superficiales y subterráneas, aguas, aguas de mar, residuales y de consumo.

Según la SGS, los sistemas de Calidad y Gestión Medio Ambiental de **Iproma** cumplen los requisitos exigidos en las normas:

- UNE-EN ISO 9001:2015**
- UNE-EN ISO 14001:2015**



### 3. Métodos de análisis desarrollados

#### 3.1 Determinación de Glifosato y AMPA en agua, mediante HPLC-MS/MS con extracción SPE “on-line”.

##### 3.1.1 Introducción

En la actualidad la agricultura hace uso en gran medida de la utilización de **plaguicidas**, para tener un control sobre las plagas, las malas hierbas y enfermedades, provocando una disminución de la calidad de las cosechas así como de su producción.

Los plaguicidas pueden ser clasificados de diferentes formas, según sea la función que desempeñen o como están estructurados químicamente.

En cuanto a la función que desarrollan, además de insecticidas, otros grupos de compuestos como herbicidas, fungicidas, acaricidas, desinfectantes del suelo o reguladores del crecimiento como es el caso del (**Glifosato/AMPA**)

El uso intensivo que se hace de este tipo de herbicidas, sin pensar en las consecuencias a medio y largo plazo que podría tener sobre el ser humano, el medio ambiente o sobre la efectividad del producto. Sumado a dosis inadecuadas y haciendo uso, de formas de aplicación de los productos que pueden poner en peligro aun mayor a quien los aplica.

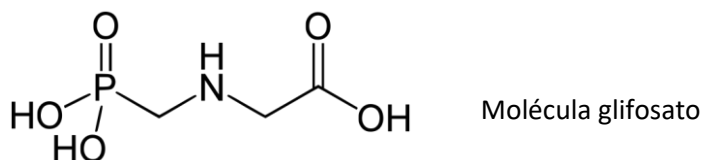
Unido a su persistencia y distribución medioambiental, origina la contaminación aguas superficiales, subterráneas, suelo y alimentos. Además, por su carácter lipofílico de muchos de estos pueden provocar su acumulación en los seres vivos al consumir los alimentos contaminados. Por todo esto, en estos últimos años la contaminación de alimentos y del medio ambiente por plaguicidas se ha convertido en objeto de gran interés y preocupación social debido a posibles efectos adversos de una exposición prolongada.

Por lo que la presencia de residuos de estas sustancias es una cuestión que no solo afecta a la salud pública, por sus repercusiones de orden toxicológico, sino que también tiene consecuencias económicas y comerciales, por su incidencia en el comercio de alimentos vegetales y su influencia en las estrategias de lucha contra plagas. También puede tener consecuencias sociales por la especial sensibilidad de la opinión pública a todas las cuestiones referentes a la seguridad alimentaria.

*El objetivo, consta del aprendizaje y aplicación de un método de rutina para la determinación de Glifosato en aguas.*

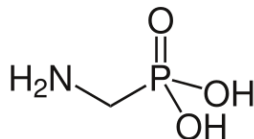
### 3.1.2 Analitos a determinar

El **glifosato** [N-(fosfometil) glicina] (GLY) es un herbicida no selectivo, de post-emergencia, de amplio espectro, ampliamente utilizado para el control de las malas hierbas.



El Glifosato fue introducido por Monsanto en la década de los 70 como principio activo del formulado **Round Up**, es posiblemente el herbicida más utilizado en la actualidad en todo el planeta. Diversos estudios han demostrado que una vez aplicado el Glifosato, éste es fuertemente adsorbido por los componentes del suelo, tales como arcillas, óxidos de hierro y ácidos húmicos.

Además, sufre una importante degradación, principalmente de tipo biológico, siendo su metabolito mayoritario el **ácido aminometilfosfónico (AMPA)**. De acuerdo con estos datos, no sería previsible su presencia en altas concentraciones en las aguas subterráneas y/o superficiales. Sin embargo, diversos autores han obtenido niveles de GLY y AMPA del orden de ppb en aguas, especialmente en las superficiales.



AMPA

El carácter anfótero y la elevada polaridad confieren al Glifosato unas características diferentes a la mayoría de los plaguicidas. Sus propiedades anfóteras se deben a la **presencia de grupos ácidos y básicos en su molécula**. Con cuatro pK característicos (pK<sub>1</sub>=0.8, pK<sub>2</sub>=2.2, pK<sub>3</sub>=5.5, pK<sub>4</sub>=10.1)

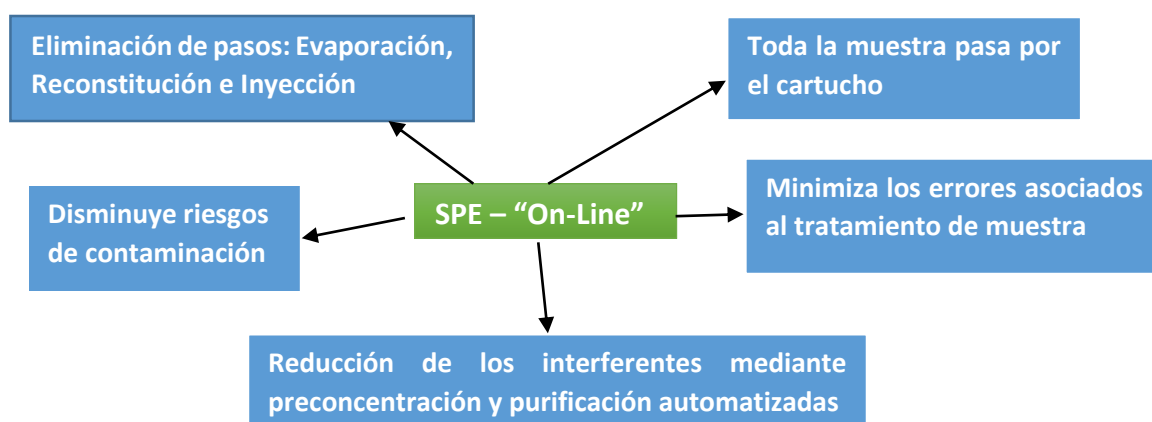
Se encuentra normalmente en forma iónica (generalmente con carga neta negativa en casi toda la escala de pH, aunque puede presentar carga positiva a pH<1), a excepción de un margen estrecho de pH, en medio ácido, en el que se encuentra **con carga neta neutra**, aunque presentado cargas parciales negativas (pérdida del protón más ácido del grupo fosfónico) y positivas (protonación del grupo amino).

Estas particulares características afectan de modo importante a su comportamiento en el medio ambiente suelo-agua, así como a su determinación analítica, la cual resulta muy compleja.

### 3.1.3 Técnicas utilizadas para el análisis

El glifosato al encontrarse en aguas superficiales, es necesario la utilización de técnicas con mucha sensibilidad y límites de detección muy bajos. Además de alta selectividad para evitar las interferencias de los constituyentes de la matriz. Actualmente LC-MS/MS se ha convertido en la mejor opción. Sin embargo las muestras acuosas siempre requieren una preconcentración y una purificación antes del análisis, lo cual es un paso que consume mucho tiempo en especial con la extracción off-line SPE.

Por lo que la extracción **SPE-“On-line”** se convierte junto al HPLC-MS/MS al método idóneo para analizar este tipo de muestras, presentado las siguientes ventajas:



Hacen la que sea la técnica ideal para la determinación de contaminantes orgánicos muy polares a nivel de trazas en agua.

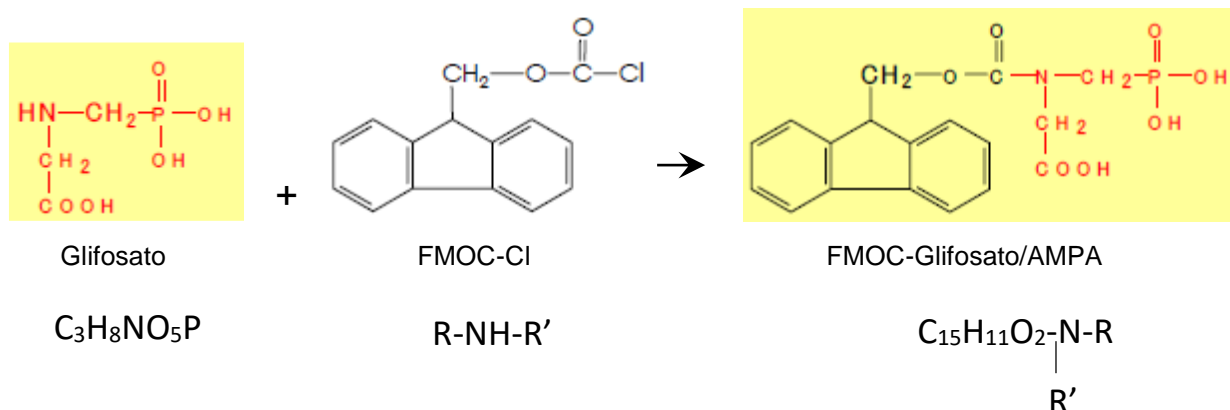
Por tanto, es de vital importancia la utilización de técnicas para la identificación, confirmación y posterior cuantificación de los plaguicidas y productos de transformación en muestras ambientales, como es la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS)

Para la determinación del Glifosato y AMPA además es necesario una derivatización previa con FMOC-Cl

El **FMOC-Cl** (apolar) con mayor peso molecular, presenta una baja solubilidad en el medio acuoso y estabilidad en agua, se utiliza para reducir el carácter polar del Glifosato y AMPA, además de darle un mayor peso molecular a la molécula FMOC-glifosato, FMOC-AMPA.

Facilitando así su retención cromatográfica, siendo necesario la derivatización durante al menos 21 horas a temperatura ambiente para la obtención de buenas recuperaciones. La concentración de FMOC-Cl es muy elevada 12000 ppm ya que se ha comprobado que si se adiciona demasiado volumen de FMOC se pierde sensibilidad, por lo que es más conveniente aumentar la concentración del agente derivatizante y disminuyendo así el volumen que se tiene que adicionar.

La reacción de derivatización es la siguiente:



Además del agente derivatizante será necesario acidificar a **pH=1,5** con HCOOH (Ácido fórmico) ya que por las características físico químicas del **Glifosato** y **AMPA** solo en un intervalo de pH muy ácido la molécula que después de ser derivatizada se encuentra desprotonada, con la adición del Ácido fórmico se protona y pasa a su forma neutra, favoreciendo la retención.

Acidificando puede romper las posibles uniones entre el glifosato y algún componente orgánico de la matriz. Aunque en principio el patrón interno debería corregir este efecto, en caso de formarse un compuesto con una cinética lenta, al (P.I) no le daría tiempo de formar dicho compuesto obteniéndose por tanto bajas recuperaciones por lo que la corrección del **patrón interno** no sería del todo efectiva.

También se acidifica la fase móvil acuosa preparativa para acondicionar el cartucho SPE al pH adecuado.

#### Patrón interno.

Además del hace uso de glifosato marcado isotópicamente (**Glifosato 1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub><sup>15</sup>N**) como patrón interno para minimizar las variaciones de derivatización y los efectos matriz. Se obtienen así unos buenos límites de cuantificación a niveles de ppt (ng/l).



**Blanco.** Se utiliza agua mineral (Font Vella), que es de una mineralización intermedia, siendo la más adecuada para utilizarse de blanco en este tipo de muestras, la cual se le trata como una muestra más sufriendo todo el proceso, de igual forma se le adiciona también el patrón interno (molécula de glifosato marcada isotópicamente) para poder cuantificar y controlar todo el proceso.

La detección se realiza por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con las transiciones específicas de cada materia activa. Se aísla el ion precursor (Q1) que puede ser alguna de las formas moleculares cargadas  $(M+H)^+$ ,  $(M+NH_4)^+$   $(M-H)^-$  o un fragmento del plaguicida. Sobre este ion precursor se practica en el Q2 (celda de colisión) una segunda ruptura en unas condiciones previamente optimizadas obteniendo un fragmento de menor m/z (ion producto). En donde son seleccionados en el Q3 obteniéndose así, pares (ion-precursor- ion hijo) denominadas transiciones. En este caso concreto se trabaja en (ESI) proporciona una buena intensidad de señal.

Las sustancias a las que se aplica, son todo tipo de aguas, excepto aguas marinas

### 3.1.4 Reactivos, material y equipos

#### 3.1.4.1 Reactivos

- ❖ **Acetonitrilo.** Calidad para análisis LC-MS.
- ❖ **Ácido acético.** Calidad reactivo para análisis.
- ❖ **Acido fórmico.** Calidad para análisis LC-MS.
- ❖ **Acetato amónico.** Calidad purísimo para análisis.
- ❖ **2-Propanol.** Calidad reactivo para análisis.
- ❖ **Agua Milli-Q.** Conductividades próximas a 18 mΩ y pasada por filtro de 0.22 μm.
- ❖ **Agua Mineral comercial de mineralización débil.**
- ❖ **Fase Móvil acuosa (preparativa):** Agua Milli-Q a pH=2.5.
- ❖ **Fase Móvil acuosa (analítica):** 5mM Acetato amónico/Ácido acético (2.5mM + 2.5mM) (pH = 4.8).
- ❖ **Cloruro de FMOC (9-Fluorenilmetil cloroformiate) ≥ 99.0 %.** Calidad para análisis y grado de derivatización de HPLC.
- ❖ **Disolución de FMOC de 12000 mg/l** en Acetonitrilo.
- ❖ **Ácido clorhídrico 37%.** Para análisis.
- ❖ **Disolución de clorhídrico 6M.**
- ❖ **Hidróxido potásico 85% (KOH).** Calidad para análisis.
- ❖ **Disolución de hidróxido potásico 6 M.**
- ❖ **Tetraborato disódico anhidro (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>).** Calidad para análisis.
- ❖ **Tiras indicadoras de pH de rango 0-14.**
- ❖ **Tiosulfato sódico pentahidratado (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O).**
- ❖ **Disolución tampón tetraborato 5% pH = 9.0.**
- ❖ **Nitrógeno.** Calidad para equipos LC-MS suministrado por un equipo generador de Nitrógeno.
- ❖ **Aire comprimido seco.** Suministrado por un compresor.

#### 3.1.4.2 Material

- ❖ Material volumétrico clase A.  
Viales de 10ml con tapa de PTFE.  
Filtros de 0,22micras de polipropileno
- ❖ Pipeta y micro jeringa verificadas.

#### 3.1.4.3 Equipos

- ❖ Balanza analítica de resolución 0.0001 g

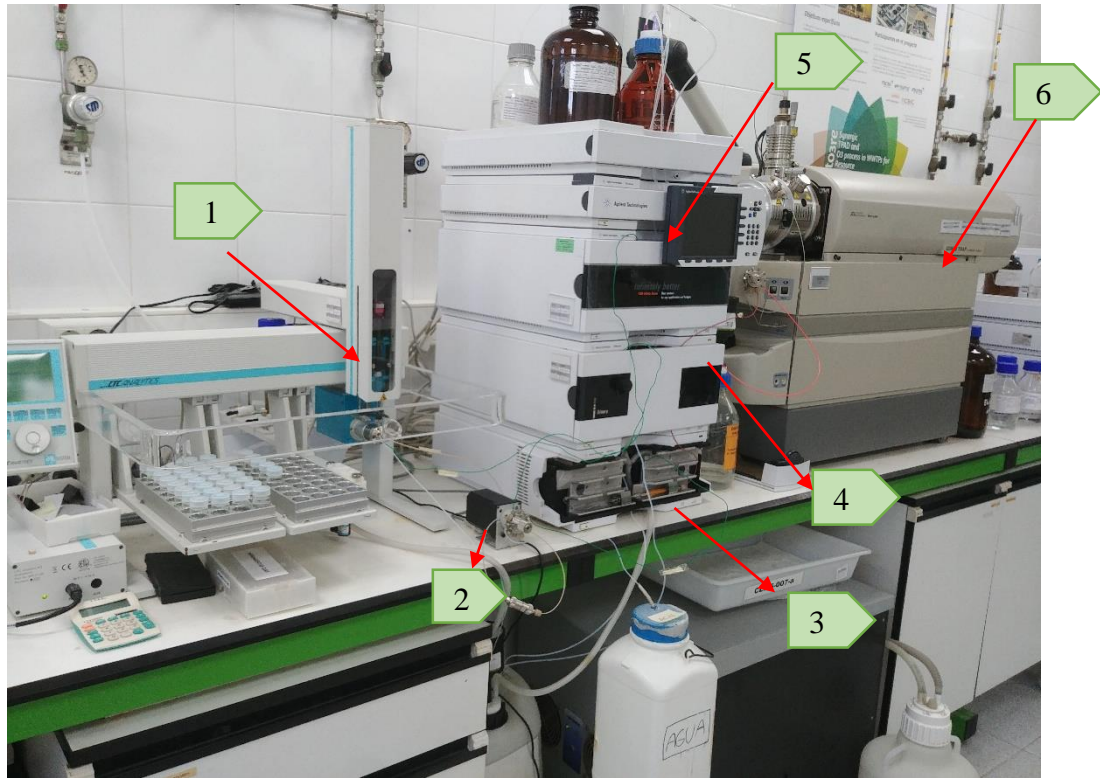
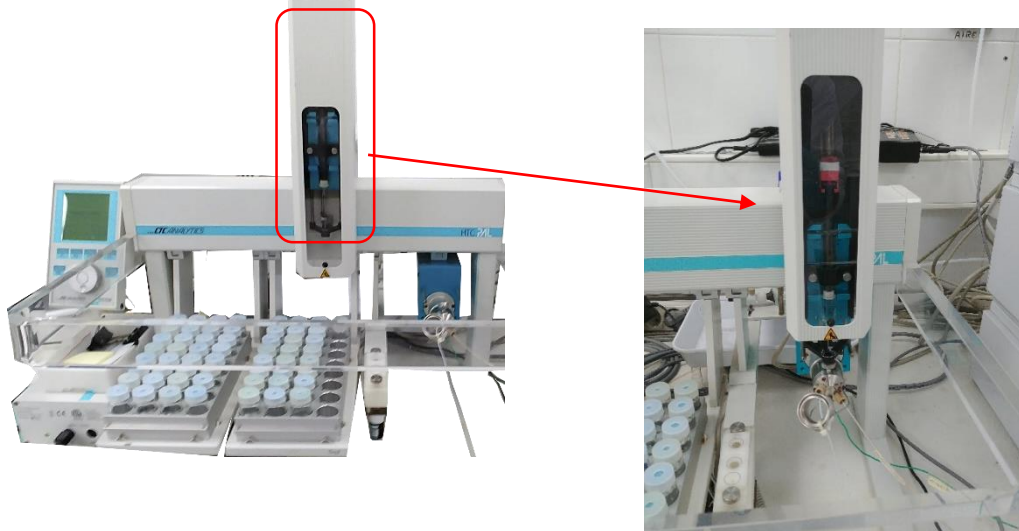


Foto general del equipo HPLC MS/MS Iproma

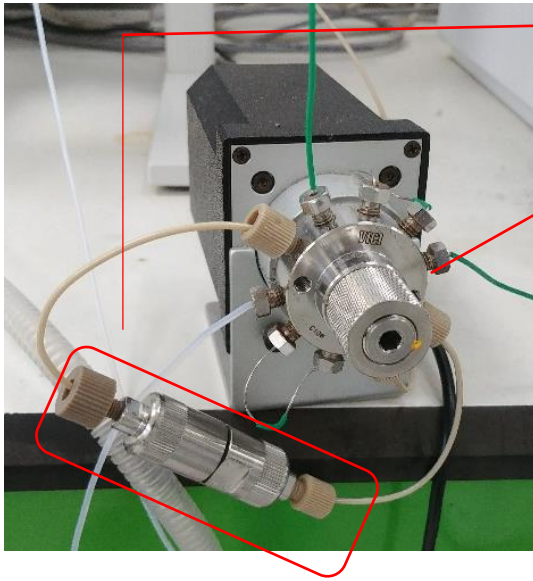
1

❖ **Autosampler PAL System** de CTC Analytics. Volúmenes de inyección de 10 a 5000 microlitros según jeringa instalada.



2

❖ **SPE“ On-Line” :**



❖ Columna de extracción en fase sólida **Phenomenex**, fase Oasis HLB de tamaño de partícula de 30 µm y de medidas 2.0 x20mm.

❖ Válvula de 10 vías “Valco”

6

❖ **Espectrómetro de masas** de Applied Biosystems API3200QTRAP.





5

❖ **Bomba analítica.** Cromatógrafo líquido 1200 SL Series de Agilent con desgasificador Agilent 1200 Series

4

❖ **Bomba preparativa:** Cromatógrafo líquido 1200 Series Agilent.

❖ **Columna analítica** Xterra MS C18 de medidas 2.1 x 100mm y un tamaño de partícula de 3,5 micras (Waters) y una

3



❖ **Precolumna** Gemini C18 de medidas 4 x 2.0mm (Phenomenex)



### 3.1.4.4 Patrones y material de referencia.

La preparación de todos los patrones se efectúa en atmósfera lo más libre posible en vapores orgánicos y con guantes, por tratarse de compuestos tóxicos.

- ❖ Materiales de referencia, MR: Producto puro y certificado de Glifosato
- ❖ Materiales de referencia marcado isotópicamente, MR: Disolución certificada de Glifosato 1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub><sup>15</sup>N de 100 mg/l en agua.
- ❖ Disoluciones de calibración de 10 mg/l de glifosato.
- ❖ Disoluciones de QC de 10 mg/l de glifosato.
- ❖ Disolución de calibración de 100 µg/l de glifosato (100 µg/l).
- ❖ Disolución QC de 100 µg/l de glifosato (100 µg/l).
- ❖ CAL (calibrado) de 1 µg/l de glifosato (1 µg/l).
- ❖ QC (quality control) de 1 µg/l de glifosato (1 µg/l). Mezclas de calibración.
  - QC ( Muestra inyectada al final de la tanda con una concentración que corresponde a el punto más bajo de la recta de calibrado)

**Tabla 1 .Plaguicidas en la mezcla de calibración y QC (µg/l)**

	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6
Glifosato	0	1.0	0.50	0.25	0.10	0.05	0.025
AMPA	0	1.0	0.50	0.25	0.10	0.05	0.025

- ❖ Patrones QC (control calidad), Estos patrones se prepararan también diariamente al igual que el calibrado.

**NIVEL QC-Alto:** Patrón de 0,75 µg/l.

**NIVEL QC-LC** (Limite cuantificación del calibrado): Patrón de 0,03 µg/l.



- ❖ Más la adición a los niveles de calibración y QC el patrón marcado isotópicamente de 100 µg/l (Glifosato 1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub><sup>15</sup>N).

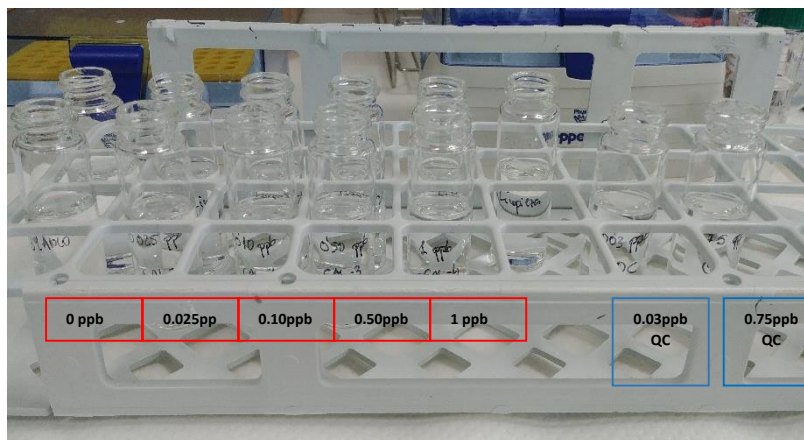
### 3.1.5 Calibración y ajustes previos.

#### Calibración con patrón interno

Se realizara la calibración empleando el compuesto marcado isotópicamente (Glifosato 1,2-  $^{13}\text{C}_2$   $^{15}\text{N}$ ). Como patrón interno

Los valores de área que se emplearán para el calibrado estarán corregidos por el área de la transición Q del patrón interno (Apatrón/Apatrón interno). Se utiliza un ajuste lineal empleando mínimos cuadrados.

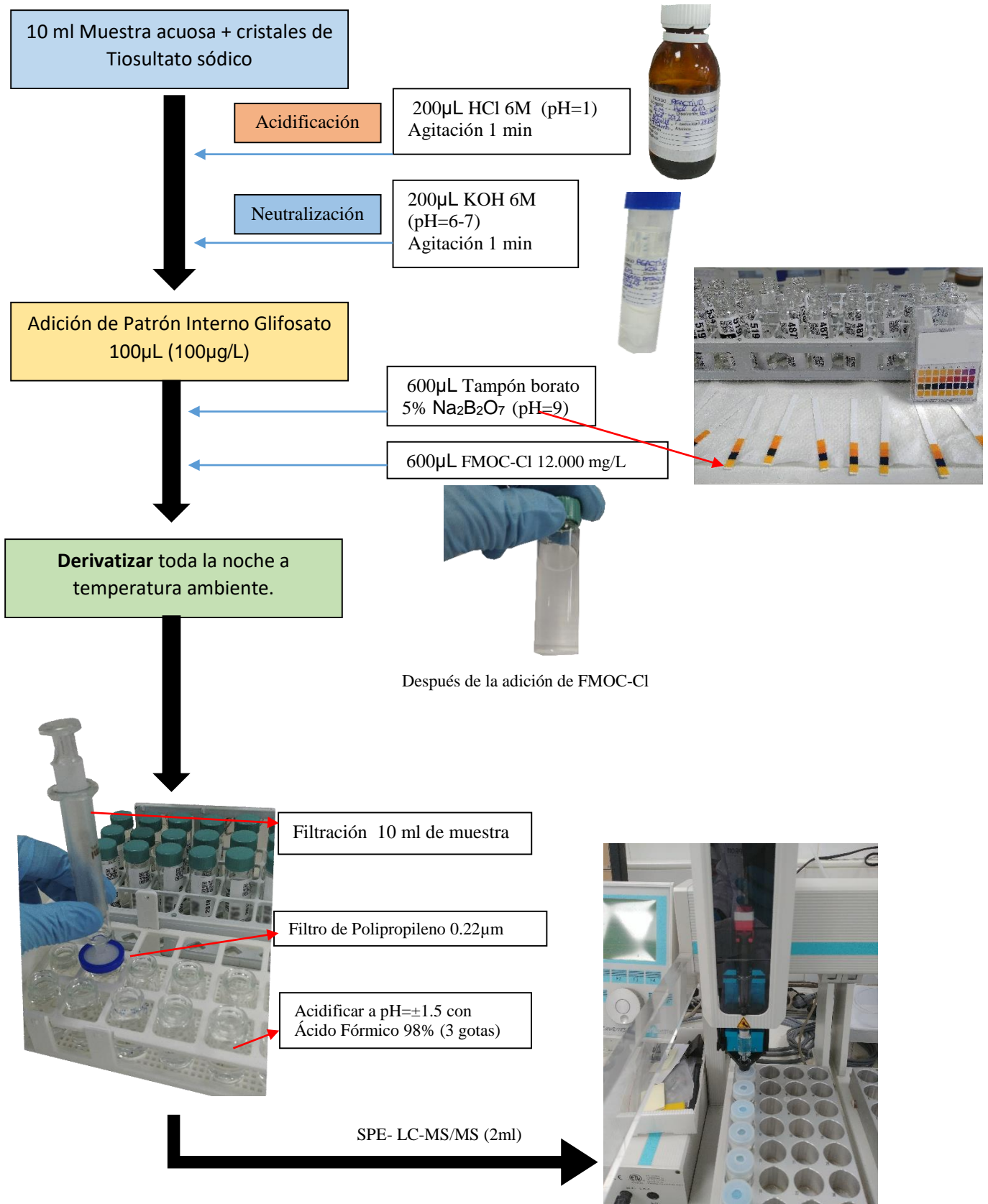
Se calibra siempre que se emplee el método. Realizar la calibración con los cinco puntos siguientes: (0 ppb, 0,025ppb, 0,10ppb 0,50 ppb, 1ppb).



Al preparar los patrones de calibración, se les adicionará una pequeña cantidad de **tiosulfato sódico** ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Para que así tengan el mismo tratamiento que las muestras, de esta forma se elimina el cloro residual.



### 3.1.6 Preparación de la muestra.



### 3.1.7 Control interno.

- ❖ Cuando se analizan muestras, al final de la tanda de muestras que se hayan realizado en ese día, se inyectará el patrón QC-LC (quality control, punto más bajo del calibrado). Se comprobará que el resultado obtenido se encuentra dentro de los límites establecidos por la incertidumbre del método.
- ❖ Si en la tanda hay más de 20 muestras, se inyectará el patrón QC-Alto a las 20 muestras y al final de la tanda el QC-LC. En el caso de que se tengan más de 40 muestras, en la tanda se irán alternando los QC.
- ❖ El proceso de derivatización se controla mediante la adición del **patrón interno marcado isotópicamente**. Así mismo, el proceso de inyección y extracción en fase sólida (SPE) viene corregidos por esos mismos patrones.
- ❖ En el lote de muestras, también se hará pasar un **blanco** del proceso, dependiendo del caso será agua continental o agua de consumo (mineral Font Vella) y se tratará como si fuera una muestra más. A este **blanco** también se le adicionará patrón interno, para cuantificar y controlar todo el proceso y posibles contaminaciones de los reactivos y se aplicarán los criterios de aceptación establecidos.
- ❖ Con una periodicidad mensual. Se controlará la precisión y la exactitud del método, realizando un blanco matriz por cada una de las familias de ensayo, plasmando los resultados en los gráficos de control internos correspondientes.

### 3.1.8 Proceso analítico.

- ❖ Una vez se ha derivatizado la muestra.
- ❖ Se concentra la muestra empleando un sistema de extracción en fase sólida en línea “SPE-on-line” explicando anteriormente.
- ❖ La muestra se inyecta en el sistema cromatográfico y es concentrada en una columna que retiene el compuesto de interés (Etapa de carga).
- ❖ Cuando toda la muestra ya ha pasado por esa columna, se cambia la dirección de los flujos y se eluye el compuesto retenido (FMOC-glifosato/AMPA) con la fase móvil que lo arrastra a la columna analítica (Etapa elución) donde se producirá la separación cromatográfica.
- ❖ Por ello, el sistema consta de dos bombas que realizan la concentración y análisis y una válvula de 10 vías que se conmuta para cambiar las fases móviles que circulan por el sistema.

Condiciones de trabajo de los cromatógrafo líquido:

**BOMBA PREPARATIVA**
**Tabla2:** Parámetros más significativos de la bomba preparativa

<b>Autosampler</b>	<b>Jeringa:</b> 5000 ml. <b>Volumen aspirado:</b> 4000 µl <b>Volumen de inyección (loop):</b> 2000 µl. <b>Draw Speed:</b> 200 µl/min <b>Eject Speed:</b> 200 µl/min <b>Solvente limpieza 1:</b> Isopropanol <b>Solvente limpieza 2:</b> Agua Milli-Q.																																			
<b>Columna de extracción en fase sólida (SPE-On-line)</b>	Strata-X 2.0x 20 mm un tamaño de partícula 25 µm																																			
<b>Composición de la fase móvil.</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Step</th> <th>R.Time(min)</th> <th>Flow (µl/min)</th> <th>A(%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0.00</td> <td>1000</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>7.00</td> <td>1000</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>7.10</td> <td>1000</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>14.00</td> <td>1000</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>14.10</td> <td>1000</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>14.50</td> <td>1000</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Step	R.Time(min)	Flow (µl/min)	A(%)	B (%)	0	0.00	1000	100	0	1	7.00	1000	100	0	2	7.10	1000	0	100	3	14.00	1000	0	100	4	14.10	1000	100	0	5	14.50	1000	100	0
Step	R.Time(min)	Flow (µl/min)	A(%)	B (%)																																
0	0.00	1000	100	0																																
1	7.00	1000	100	0																																
2	7.10	1000	0	100																																
3	14.00	1000	0	100																																
4	14.10	1000	100	0																																
5	14.50	1000	100	0																																
<b>Fases Móviles</b>	<b>A:</b> Agua Milli-Q pH 2.5 <b>B:</b> Acetonitrilo																																			
<b>Caudal</b>	1000 µl/min																																			

**BOMBA ANALITICA**
**Tabla3.** Parámetros más significativos de la bomba analítica

<b>Pre-columna</b>	Gemini C <sub>18</sub> de medidas 4 x 2.0 mm (Phenomenex).																														
<b>Columna</b>	Xterra MS C <sub>18</sub> de medidas 2.1 x 100 mm y un tamaño de partícula de 3.5µm.																														
<b>Composición de la fase móvil.</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Step</th> <th>R.Time (min)</th> <th>Flow (µl/min)</th> <th>A(%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0.00</td> <td>500</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>0.10</td> <td>500</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>5.00</td> <td>500</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>11.00</td> <td>500</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>14.50</td> <td>500</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table>	Step	R.Time (min)	Flow (µl/min)	A(%)	B (%)	0	0.00	500	10	90	1	0.10	500	90	10	2	5.00	500	90	10	3	11.00	500	10	90	4	14.50	500	10	90
Step	R.Time (min)	Flow (µl/min)	A(%)	B (%)																											
0	0.00	500	10	90																											
1	0.10	500	90	10																											
2	5.00	500	90	10																											
3	11.00	500	10	90																											
4	14.50	500	10	90																											
<b>Fases Móviles</b>	<b>A:</b> 5mM Acetato amónico/Ácido acético (pH=4.8) <b>B:</b> Acetonitrilo																														
<b>Caudal</b>	Constante de 500 µl/min																														

## CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS.

Tabla4. Parámetros fuente ionización

<b>Fuente ionización</b>	ESI
<b>Modo ionización</b>	Negativo (-)
<b>CUR (Curtain Gas)</b>	20.00 psi
<b>IS (Ion Spray Voltage) ESI (-)</b>	-2000
<b>TEM (Temperature)</b>	400°C
<b>GS1 (Gas 1)</b>	30.00 psi
<b>GS2 (Gas 2)</b>	50.00 psi



## CONDICIONES ESPECÍFICAS PARA CADA ANALITO

Tabla5. Parámetros de cada analito

ESI	Plaguicida	T. reten (min.)	Precursor Q1 mass (m/z)	Producto Q3 mass (m/z)
-	Glyfosato-FMOC	8.4	390.1 390.1	Q 167.9 q, 149.9
-	1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>15</sup> N Glyfosato-FMOC	8.4	393.1 393.1	Q 170.9 q, 152.9
-	AMPA-FMOC	9.0	332.0 332.0	Q 110.0 q, 135.9

El "Dwell Time" es de 30 ms para cada transición.

## 3.1.9 Posibles interferencias

Las muestras tienen que tratarse con mucho cuidado para evitar las posibles contaminaciones. Si después de la inyección de una muestra con un alto contenido en Glifosato, es posible que la muestra siguiente presenta trazas próximas al límite de cuantificación de este mismo plaguicida se estudiará si es una contaminación y se volverá a inyectar la muestra después de realizar una inyección para limpiar el sistema y comprobar si efectivamente se trata de una contaminación previa.

### 3.1.10 Criterios para aceptación y rechazo

- ❖ Para poder asegurar la identificación de un compuesto se aplicarán los siguientes criterios:
  - Previamente al estudio de muestra, verificar que el proceso de derivatización, concentración y elución de la muestra se ha realizado de forma correcta, para ello se analizará el área de los patrones internos marcados isotópicamente. Al valor del patrón interno en los **QC intermedio o finales (Glifosato 1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub><sup>15</sup>N)** se le aplicará una tolerancia del 25 % y se comprobará que las muestras se encuentran dentro de esta tolerancia.
  - Se admitirá una desviación respecto del (**Rt**) tiempo de retención esperado de ( $\pm 0.2$  min.)
  - Se confirmara la presencia de un analito comparando las relaciones de abundancia de iones con las que presentan los patrones en ese día.

Las tolerancias relativas (en tanto por cien) de las desviaciones que se admitirán para considerar que un pico ha sido confirmado según la guía SANCO/12571/2013

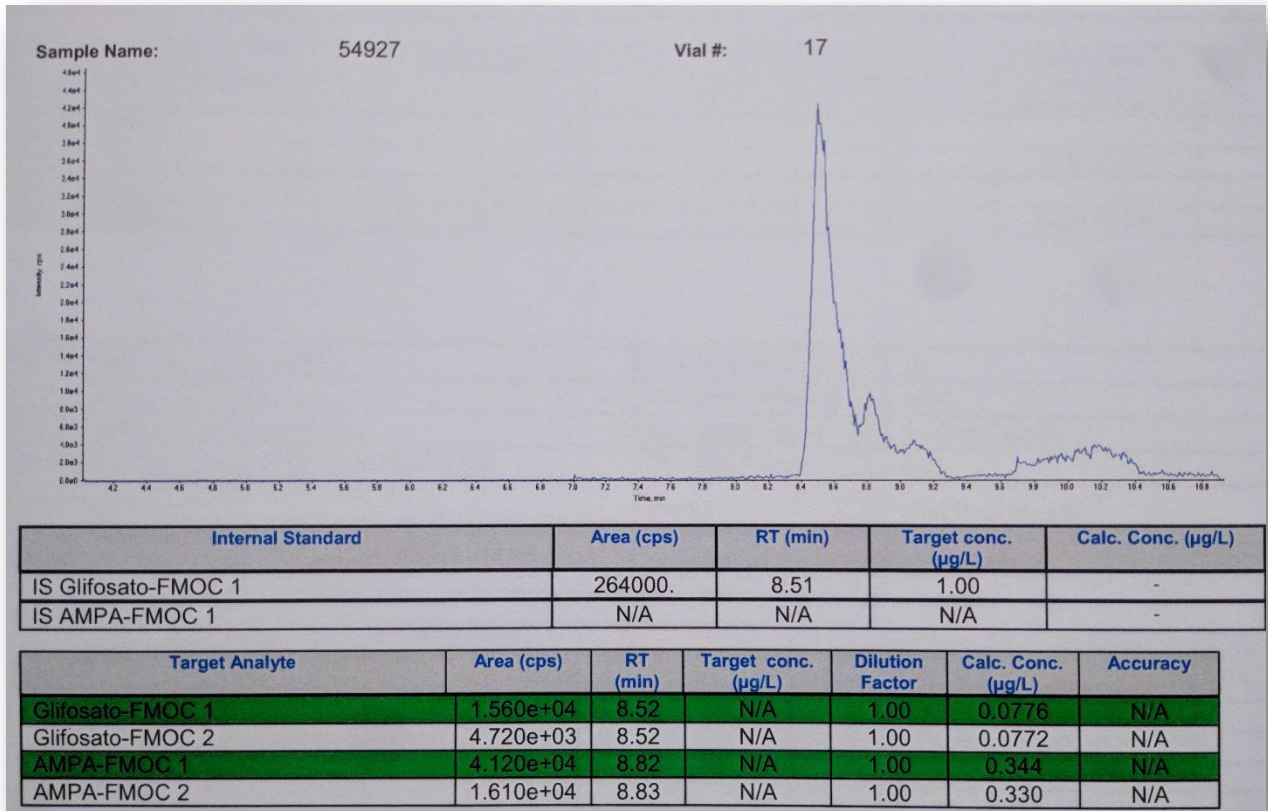
$$(Q/q)_{\text{patrón}} = (Q/q)_{\text{muestra}} (\pm 30\%)$$

- ❖ De forma diaria se estudiará el **blanco control** y se comprobará que para los analitos que son objeto del análisis, la concentración obtenida no excede del valor máximo descrito en el anexo correspondiente los criterios de aceptación del blanco.

Como **ejemplo**, de lo anteriormente dicho, a continuación se expone el cromatograma de una muestra positiva para **Glifosato** y **AMPA** en donde se aprecia que cumple los criterios mencionados anteriormente, tiempo de retención y concentración se encuentra dentro del calibrado.

Cumpléndose también los q/Q ratios por lo que efectivamente la muestra sería positiva.

Cromatograma de una muestra de glifosato positivo



Sample Name	54927	Injection Vial	17
Sample ID		Injection Volume	4000
Sample Type	Unknown	Algorithm Used	Analyst Classic
Acquisition Date	5/22/2018 3:16:24 PM	Dilution Factor	1.00
Acquisition Method	CLMS 007-a (2 polaridades)_OVEN_TrCorto.dam	Data File	HLB31-0796.wiff
Project	2018\CLMS_008-a_(Enero - Junio)	Instrument Name	3200 Q TRAP

Analyte Peak Name	Area (cps)	Analyte RT	Calculated Ion Ratio (Expected Value)	Ratio OK
Glifosato-FMOC 1	15600	8.5		
Glifosato-FMOC 2	4720	8.5	0.30 (0.30)	✓
AMPA-FMOC 1	41200	8.8		
AMPA-FMOC 2	16100	8.8	0.39 (0.43)	✓

Relaciones q/Q ratio



### 3.1.11 Cálculos y expresión de resultados

Una vez identificado un compuesto, se realiza la cuantificación en base a la abundancia del ion o iones característicos (Q).

- ❖ Concentración de compuestos en muestras con inyección directa:

$$(\mu\text{g/L}) = C_0$$

- ❖ Concentración de compuestos en muestras residuales.

$$\text{Concentración de compuestos en la muestra (dilución)} (\mu\text{g/L}) = C_0/\text{Dil}$$

Siendo:

$C_0$  = Concentración del compuesto volátil en el report ( $\mu\text{g/L}$ )

Dil = Dilución realizada (por ejemplo, si se ha hecho una dilución  $1/2$ , deberá dividirse por  $1/2$ ).

#### Hoja de toma de datos primarios

IPROMA

ANÁLISIS SPE EN LÍNEA DE PLAGUICIDAS

MÉTODO: Fecha: REVISIÓN: EQUIPOS:

Número registro	Fecha	Número de muestra en 10 ml	Preparación: Análisis	Observaciones

### 3.1.13. Valores habituales y límites legales

Tanto como para aguas potables, RD 140/2003 (RD 58/2006 en la Comunidad Valenciana) como para aguas envasadas, RD 1074/2002 y su posterior modificación RD 1744/2003, se limitan los pesticidas totales de una muestra a **0,5 ppb** y los pesticidas individuales a **0,10 ppb**.

El Decreto 70/2009, de 31 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento de Vigilancia Sanitaria y Calidad del Agua de consumo Humano de Andalucía mantiene los valores establecidos en el (RD 140/03).

### 3.1.14 Informe final

Finalmente se obtienen los informes (cuantificación/cualificación y confirmación) después de todo el proceso y donde se muestran los resultados obtenidos.

Informe de cuantificación/cualificación: Dicho informe obtenido por el software de tratamiento de datos, contiene toda la información necesaria según se describe en el Procedimiento General para la generación de datos primarios.

Informe de confirmación: Dicho informe obtenido por el software, en el que se recoge la comparación de las relaciones de abundancia de iones de la muestra con las que presentan los patrones de ese día.

## 3.2 Análisis multiresiduo en aguas mediante HPLC-MS/MS con extracción SPE “on-line”

### 3.2.1. Analitos a determinar.

Hoy en día el amplio uso de plaguicidas, provoca que se estos se encuentren en muestras medioambientales o en aguas superficiales y subterráneas. Una de las familias de plaguicidas más problemáticas son los **herbicidas** ya que estos son aplicados directamente al suelo. Su elevada polaridad junto con su elevada movilidad en suelos los hace susceptibles de contaminar las aguas subterráneas.

Unido a la amplia variedad de materias activas empleadas en el control de estas plagas hace necesario el uso de un tipo de técnicas cromatográficas, además las materias activas van renovándose, siendo necesario una técnica analítica que sea capaz de incorporar nuevas materias activas. Además este tipo de sustancias en la legislación precisan unos límites de cuantificación muy bajos.

Por tanto, se requiere utilizar técnicas que sean capaces de determinar un gran número considerable de compuestos, siendo las **técnicas multiresiduo** las más idóneas, estas presentan límites de cuantificación muy bajos, siendo capaces de determinar y cuantificar compuestos a nivel de trazas.

Sin embargo los métodos multiresiduo pueden presentar ciertos inconvenientes.

- La gran diversidad de propiedades físico-químicas dificulta la optimización de las condiciones experimentales para la **determinación simultánea de todos los analitos**. Así, es difícil encontrar un tratamiento de muestra que pueda purificar y preconcentrar a todos los analitos sin que varios de ellos se vean afectados.
- De la misma manera, las condiciones cromatográficas óptimas para un compuesto pueden no ser adecuadas para otro en cuanto a retención o forma de pico. Esto hace necesario que los métodos multiresiduo se desarrollen para compuestos de una misma familia química.
- La imposibilidad de corregir la cuantificación mediante un patrón interno adecuado. El **efecto matriz** depende en gran parte de la naturaleza del compuesto investigado; por tanto, si se incluye un número elevado de compuestos con propiedades distintas, se necesitan numerosos patrones internos con el fin de corregir todas las posibles desviaciones

Al tratarse de aguas superficiales y subterráneas será necesario una etapa previa de preconcentración y purificación antes del análisis, lo cual es un paso que consume mucho tiempo en especial con la extracción off-line SPE.

Por lo que la extracción **SPE-On-line** se convierte junto al HPLC-MS/MS al método idóneo para analizar este tipo de muestras, siendo un método más rápido con la eliminación de los pasos como evaporación, reconstitución, e inyección, disminuir errores de procedimiento, toda la muestra se pasa por el cartucho (grandes volúmenes de inyección), disminuyen a su vez los riesgos de contaminación, posibilidad de análisis de muestra con analitos muy polares, y no es necesario supervisión.

Para confirmar inequívocamente estas materias activas, se emplea la técnica de cromatografía líquida de alta resolución HPLC-MS/MS.

Con este método se determinan las siguientes materias activas: Metomilo, Oxamilo, Diurón, Linurón, Isoproturón, Metribucina, Metamitrón, Aldicarb, Bromacilo, Carbaril, Carbofuran, Diflubenzurón, Propizamida, Flufenoxurón, Lufenurón, Pirimicarb, Propazina, Desisopropil-atracina, Desetil-atracina, Imazalil, Tiabendazol, 3,4-Dicloroanilina, 4-Isopropil-anilina, Carbendazima, Clortoluron, Ometoato, Dimetoato, Simetrina, Cianazina, Ametrina, Atracina, Diazinon, Malation, Metil-Pirimifos, Molinato, Prometrina, Quinoxifeno, Simacina, Terbutilacina, Terbutrina, Trietazina, Metalaxil, Desetil-Terbutilazina, Miclobutanil, Desetil-Terbumeton, Diclrvos, Ciburina, Imidaclorprid, Ciprodinil, Triadimenol, Metiocarb, Oxadiazon, Triallat, Tiametoxam, Clotianidin y Acetamiprid.

*El objetivo, consta del aprendizaje y aplicación de un método multiresidual de rutina para la determinación de herbicidas en aguas.*

### 3.2.2. Técnica utilizada para el análisis.

Para la determinación de estos compuestos se realiza una preconcentración en línea (SPE on-line), seguida de la elución y separación mediante cromatografía de los analitos y posterior detección mediante espectrometría de masas/masas

La muestra que se inyecta inicialmente es concentrada en una columna que retiene el compuesto de interés. Cuando toda la muestra ha pasado por esta columna, se cambia la dirección de los flujos y se eluye el compuesto retenido con la fase móvil que lo arrastra a la columna analítica, en donde se produce la separación cromatografía.

La detección se realiza por espectrometría en tándem masas/masas con las transiciones específicas de cada materia activa. Se aísla el ion precursor en Q1 que puede ser alguna de las formas moleculares cargadas  $(M+H)^+$   $(M+NH_4)^+$   $(M-H)^-$  o un fragmento del plaguicida. Sobre ion precursor se practica en el Q2 (celda de colisión) su ruptura en unas condiciones previamente optimizadas obteniendo un fragmento de menor masas carga (ion-producto) Q3. Estos pares (Ion-precursor-ion hijo) se denominan transiciones.

Se pueden trabajar en dos modos ESI+ o ESI- en nuestro caso la forma de trabajo será en ESI positivo ya que nuestros compuestos nos dan buena intensidad en este modo de ionización.

Esta técnica nos permite eliminar interferencias de la matriz y confirmar con total seguridad que se trata de la materia activa.

Las sustancias a las que se aplica, son todo tipo de aguas, excepto aguas marinas.

### 3.2.3 Reactivos, material y equipos

#### 3.2.3.1. Reactivos

- ❖ **Metanol.** Calidad de análisis LC-MS
- ❖ **Acetona.** Calidad para análisis.
- ❖ **Ácido Fórmico (98%).** Calidad análisis LC-MS
- ❖ **Agua Milli-Q.** Conductividad próxima. A 18mOhms y pasada por un filtro de 0,22 micras.
- ❖ **Agua comercial de mineralización débil** (Agua FONT VELLA)
- ❖ Fase móvil acuosa (**analítica**): Agua Milli Q + 0,1% Ácido fórmico
- ❖ Fase móvil orgánica (**analítica**): Metanol + 0,1% de Acido fórmico
- ❖ Fase móvil acuosa (**Preparativa**). Agua Milli-Q.
- ❖ **Nitrógeno.** Calidad para equipos LC-MS
- ❖ **Tiosulfato sódico pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).** Calidad purísimo para análisis.-
- ❖ **Sulfito sódico anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ).** Calidad para análisis.

#### 3.2.3.2. Material

Volumétrico de clase A verificado.

- ❖ Viales de 10ml con tapa PTFE.
- ❖ Tubos para centrifuga de 15 ml
- ❖ Pipetas automáticas y micro jeringas.

#### 3.2.3.3. Equipos

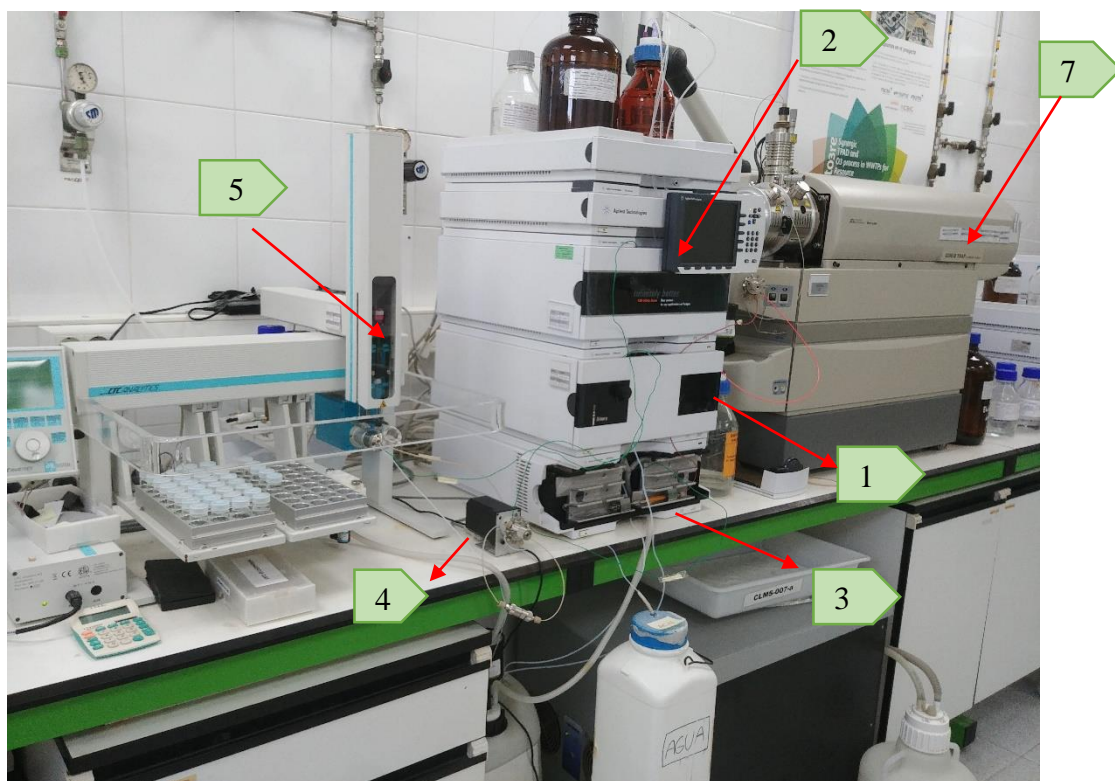


Foto general del equipo HPLC MS/MS Iproma

- ❖ Balanza analítica de resolución 0.0001g.
  - ❖ Centrifuga.
1. **Bomba preparativa:** Cromatógrafo líquido 1200 Series de Agilent.
  2. **Bomba analítica:** Cromatógrafo líquido 1200SL Series de Agilent con degasificador Agilent 1200 Series.
  3. **Instalada una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18** de medidas 4.6 x 50 mm y un tamaño de partícula de 1.8µm (Agilent).
  4. **SPE-“On line”:** Columna de extracción en fase sólida Strata-X de tamaño de partícula 25 µm y de medidas 2.0x20mm.
  5. **Autosampler PAL System de CTC Analytics.**
  6. Válvula de 10 vías “Valco” para instalar sistema SPE-“on-line”.
  7. **Espectrómetro de masas API3200QTRAP** de Applied Biosystems.

#### 3.2.3.4. Patrones y materiales de referencia

La preparación de todos los patrones se efectúa en atmósfera lo más libre posible en vapores orgánicos y con guantes, por tratarse de compuestos tóxicos.

Producto puro y certificado de Isoproturon-D6. Aproximadamente 1 ml de 100 mg/l en acetona.

Disolución de patrón interno de Isoproturon-D6 de 1 mg/L.

Disoluciones individuales de las materias activas de 1000mg/l.

Disoluciones mix de 10 mg/l de las materias activas.

Tabla 6. Disolución MIX de 10mg/L

MRI-474 (10mg/L)		MRI-649(10mg/L)	MRI-621(10mg/L)
Aldicarb	Propacina	Triclorfon	Tiaclorprid
Bromacilo	Desetil-atracina	Benfuracarb	Spinosad
Carbaril	Carbendazima	Fosmet	
Carbofuran	Pirimicarb	Imidaclorprid	
Difubenzuron	Imazalil	Cirpodinil	
Diuron	Tiabendazol	Triadimenol	
Flufenoxuron	3,4-Dicloroanilina	Metiocarb	
Isoproturon	Disisopropil-antracita	Oxadiazinon	
Linuron	4-Isopropilanilina	Triallat	
Lufenuron	Simetrina	Tiametoxam	
Metamitron	Cianazina	Clotanidin	
Metomilo	Ametrina	Acetamiprid	
Metribuzina	Metil-Pirimifos		
Oxamilo	Molinato		
Propizamida	Prometrina		
Clortoluron	Quinoxifeno		
Ometoato	SImacina		

Disoluciones mix de 1 mg/l de las materias activas

Disolución mix de 10 µg/l de las materias activas

Disolución mix de 1 µg/l de las materias activas

Disolución de patrón interno de **Isoproturon-D6 de 5 µg/l**

Mezclas de calibración. A partir de la mezcla de 1 µg/l de las materias activas cada vez que se vaya a calibrar se pueden preparar diferentes niveles de calibración

### 3.2.3.5. Patrones de calibración ajustes previos

Tabla7. Niveles de calibración y QC.

Nivel calibración	Concentración
Nivel QC	( $\mu\text{g/l}$ )
<b>Cal 0</b>	0
<b>Cal 1</b>	0.010
<b>Cal 2</b>	0.025
<b>Cal 3</b>	0.050
<b>Cal 4</b>	0.075
<b>QC-LC</b>	0.010
<b>QC-Alto</b>	0.060

### 3.2.4. Calibración

Se utiliza calibración con patrón interno para todas las materias activas excepto para el Oxamilo, Pirimicarb, Tiabendazol, 3,4-Dicloroanilina, 4-Isopropilanilina y Carbendazima que se empleará calibración externa.

Los valores de área que se emplean en la calibración con patrón interno están corregidos por el área de la transición Q del patrón interno ( $A_{\text{patrón}}/A_{\text{patrón interno}}$ ). Se utiliza un ajuste lineal con mínimos cuadrados para cada plaguicida.



### 3.2.5. Preparación de la muestra



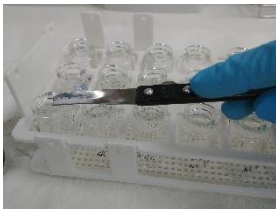
Muestra en botella vidrio topacio

Rellenar tubo de ensayo y centrifugar 5 min a 3900rpm

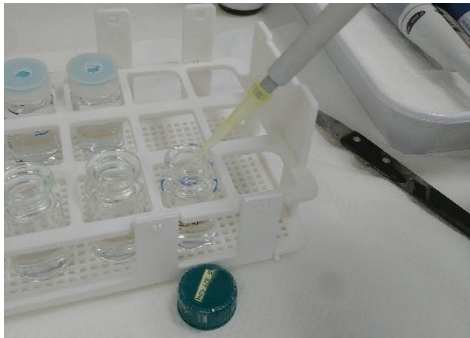


Tomar 10 ml de muestra\*

Añadir cristales de Tiosulfato sódico



Añadir 100µl del P.I.  
(Isoproturón-D6 de 5µg/l)



Injectar 2ml en el SPE- HPLC-MS/MS

**\*En caso de aguas residuales.**

Tomar 0.1 ml de muestra y llevarlo a un volumen final de 10 ml empleando agua mineral.



### 3.2.6. Control interno.

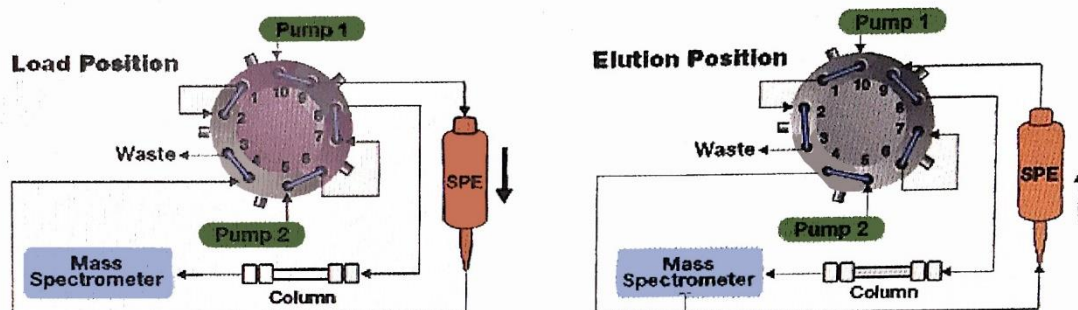
- ❖ Se siguen los mismos criterios que en el apartado 3.1.7 (pág. 20)
- ❖ El proceso de inyección y extracción en fase sólida (SPE-“On-line”) vienen controlados por el patrón interno marcado isotópicamente (**Isoproturón-D6**).

### 3.2.7. Proceso analítico.

Una vez preparados los patrones y las muestras, se procede a concentrar la muestra empleando un sistema de extracción en fase sólida en línea (SPE-“on-line”). La muestra se inyecta en un “loop” de 2 ml (se aspiran 4 ml) en el sistema cromatográfico y es concentrada en una columna que retiene al compuesto de interés (**Etapas de Carga**).

Cuando toda la muestra ya ha pasado por esta columna, se cambia la dirección de los flujos y se eluye el compuesto retenido (la materias activas del mix) con la fase móvil que lo arrastrara a la columna analítica (**Etapas de Elución**), donde se producirá la separación cromatográfica.

Por ello el sistema consta de dos bombas que realizarán la concentración y análisis y una válvula de 10 vías que se conmutara para cambiar las fases móviles que circularan por el sistema.



Esquema del sistema de extracción en fase solida SPE “On-Line”

Condiciones de trabajo del cromatógrafo:

## Bomba preparativa

Tabla 8: Parámetros más significativos de la bomba preparativa

<b>Autosampler</b>	<b>Jeringa: 5000 ml.</b> <b>Volumen aspirado: 4000 µl</b> <b>Volumen de inyección (loop): 2000 µl.</b> <b>Solvente limpieza 1: Metanol</b> <b>Solvente limpieza 2: Agua Milli-Q.</b>																																			
<b>Columna de extracción en fase sólida (SPE-On-line)</b>	Strata-X 2.0x 20 mm un tamaño de partícula 25 µm																																			
<b>Composición de la fase móvil.</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Step</th> <th>R.Time (min)</th> <th>Flow (µl/min)</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0.00</td> <td>2000</td> <td>100.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>3.40</td> <td>2000</td> <td>100.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3.50</td> <td>500</td> <td>100.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>9.70</td> <td>500</td> <td>100.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>10.00</td> <td>2000</td> <td>100.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>10.05</td> <td>2000</td> <td>100.0</td> <td>0.0</td> </tr> </tbody> </table>	Step	R.Time (min)	Flow (µl/min)	A(%)	B(%)	0	0.00	2000	100.0	0.0	1	3.40	2000	100.0	0.0	2	3.50	500	100.0	0.0	3	9.70	500	100.0	0.0	4	10.00	2000	100.0	0.0	5	10.05	2000	100.0	0.0
Step	R.Time (min)	Flow (µl/min)	A(%)	B(%)																																
0	0.00	2000	100.0	0.0																																
1	3.40	2000	100.0	0.0																																
2	3.50	500	100.0	0.0																																
3	9.70	500	100.0	0.0																																
4	10.00	2000	100.0	0.0																																
5	10.05	2000	100.0	0.0																																
<b>Fases Móviles</b>	<b>A: Agua MilliQ</b>																																			
<b>Caudal</b>	2000 y 500 µl/min																																			

## Bomba analítica

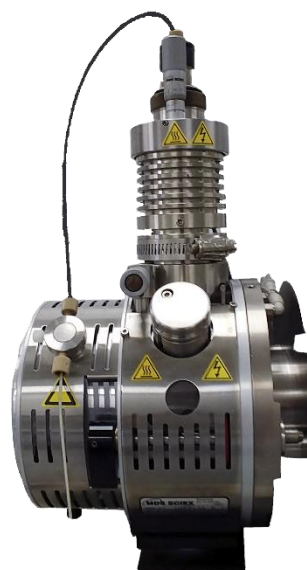
Tabla 9. Parámetros más significativos de la bomba analítica

<b>Pre-columna</b>	Gemini C <sub>18</sub> de medidas 4 x 2.0 mm (Phenomenex).																																													
<b>Columna</b>	ZORBAX Eclipse XDB-C18 de medidas 4.6 x 50 mm y un tamaño de partícula de 1.8µm.																																													
<b>Composición de la fase móvil.</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Step</th> <th>R.Time(min)</th> <th>Flow (µl/min)</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0.00</td> <td>600</td> <td>95.0</td> <td>5.0</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>0.10</td> <td>600</td> <td>95.0</td> <td>5.0</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>4.50</td> <td>600</td> <td>95.0</td> <td>5.0</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>4.60</td> <td>600</td> <td>70.0</td> <td>30.0</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>6.50</td> <td>600</td> <td>0.0</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>10.00</td> <td>600</td> <td>0.0</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>10.01</td> <td>600</td> <td>95.0</td> <td>5.0</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>10.05</td> <td>600</td> <td>95.0</td> <td>5.0</td> </tr> </tbody> </table>	Step	R.Time(min)	Flow (µl/min)	A(%)	B(%)	0	0.00	600	95.0	5.0	1	0.10	600	95.0	5.0	2	4.50	600	95.0	5.0	3	4.60	600	70.0	30.0	4	6.50	600	0.0	100.0	5	10.00	600	0.0	100.0	6	10.01	600	95.0	5.0	7	10.05	600	95.0	5.0
Step	R.Time(min)	Flow (µl/min)	A(%)	B(%)																																										
0	0.00	600	95.0	5.0																																										
1	0.10	600	95.0	5.0																																										
2	4.50	600	95.0	5.0																																										
3	4.60	600	70.0	30.0																																										
4	6.50	600	0.0	100.0																																										
5	10.00	600	0.0	100.0																																										
6	10.01	600	95.0	5.0																																										
7	10.05	600	95.0	5.0																																										
<b>Fases Móviles</b>	<b>A: Agua Milli-Q + 0.1% Acido fórmico</b> <b>B: Metanol + 0.1% Acido fórmico.</b>																																													
<b>Caudal</b>	600 µl/min																																													

## CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS.

Tabla 10. Parámetros fuente ionización

<b>Fuente ionización</b>	ESI
<b>Modo ionización</b>	Positivo (+)
<b>CUR (Curtain Gas)</b>	25.00 psi
<b>IS (Ion Spray Voltage) ESI (-)</b>	500v
<b>TEM (Temperature)</b>	400°C
<b>GS1 (Gas 1)</b>	70.00 psi
<b>GS2 (Gas 2)</b>	30.00 psi



## CONDICIONES ESPECÍFICAS PARA CADA ANALITO

Una de las transiciones se empleará para cuantificar la cantidad de analito (Q) y la otra transición se empleará para identificar inequívocamente al analito (q1).

Tabla 11. Ejemplo de las condiciones del sistema de detección de masas para los analitos más analizados.

ESI	Plaguicida	T. ret. (min.)	Precursor Q1 mass (m/z)	Producto Q3 mass (m/z)
+	Diurón	8.42	233.0	Q 72.0 q1 46.0
+	Linurón	8.54	249.0	Q 160.0 q1 182.0
+	Isoproturón	8.39	207.0	Q 72.0 q1 46.1
+	Metribucina	8.26	215.0	Q 187.0 q1 49.0
+	Metamitrón	7.92	202.9	Q 175.1 q1 104.2
+	Bromacilo	8.23	260.9 263.0	Q 205.0 q1 207.0

+	Propizamida	8.61	256.0	Q 173.0 q1 190.0
+	Propazina	8.52	230.2	Q 146.2 q1 188.1
+	Imazalil	8.09	297.1 299.1	Q 159.0 q1 161.1
+	Tiabendazol	7.65	202.1	Q 175.1 q1 131.2
+	Clortoluron	8.28	213.1	Q 72.0 q1 46.0
+	Cianazina	8.11	241.1	Q 214.1 q1 104.0
+	Simacina	8.20	202.1	Q 132.2 q1 124.1
+	Terbutilazina	8.55	230.1	Q 174.1 q1 176.2
+	Terbutrina	8.46	242.1	Q 186.2 q1 68.1
+	Isoproturón D6	8.39	213.1	Q 78.1 q1 52.1

Tabla 12. Condiciones generales del SMRM:

<b>MRM detection window (seg)</b>	60
<b>Target scan time (seg)</b>	0.75

En este caso el software del equipo nos permite trabajar en modo Shedule MRM (SMRM) de forma que el **Dwell time** se autoajusta para obtener el máximo número de puntos a lo largo del pico cromatográfico en función de los compuestos que tenga que detectar en un determinado tiempo de retención.

### 3.2.8. Posibles interferencias.

Las muestras deben tratarse con mucho cuidado para evitar contaminaciones. Si después de una muestra con un alto contenido de un plaguicida la muestra siguiente presenta trazas próximas al límite de cuantificación de este mismo plaguicida, se estudiará si es un efecto memoria y se volverá a inyectar la muestra después de realizar una inyección para limpiar el sistema.

Como precaución cada 5 muestras se inyecta una limpieza (agua Font Vella) para intentar en el caso de producirse contaminación que solo sean a 5 muestras máximo.

### 3.2.9. Criterios de aceptación y rechazo.

Para aceptar los resultados del método se estudian los siguientes criterios de aceptación y rechazo:

- ❖ Previamente al estudio de las muestras, verificar que el proceso de derivatización, concentración y elución se ha realizado de forma correcta, para ello se analizará el área del patrón interno marcados isotópicamente (**Isoproturón-D6**).
- ❖ Al valor del patrón interno en los **QC intermedio o finales (Isoproturón-D6)** se le aplicará una tolerancia del 25 % y se comprobará que las muestras se encuentran dentro de esta tolerancia.
- ❖ Se admitirá una desviación respecto del (**Rt**) tiempo de retención esperado de ( $\pm 0.2$  min).
- ❖ Se confirmara la presencia de un analito comparando las relaciones de abundancia de iones con las que presentan los patrones en ese día.

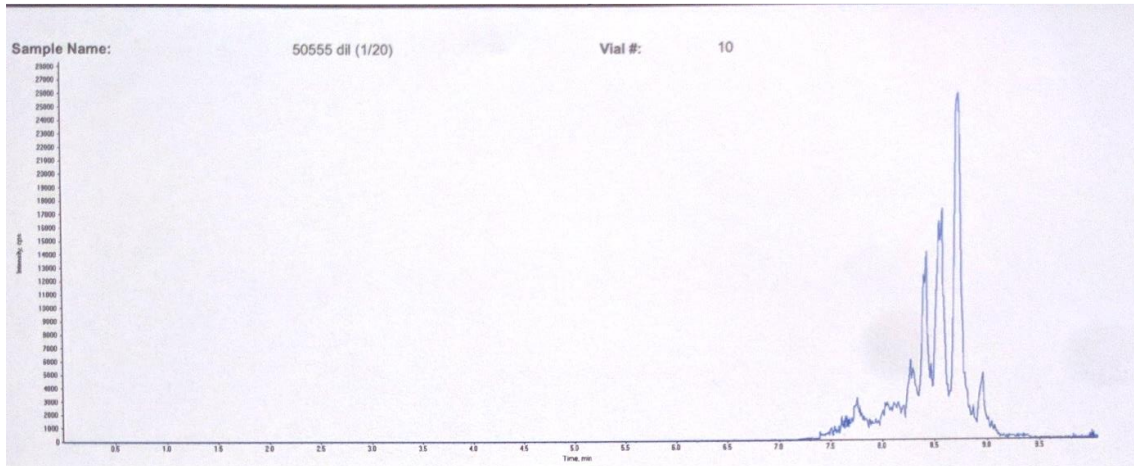
Las tolerancias relativas (en tanto por cien) de las desviaciones que se admitirán para considerar que un pico ha sido confirmado según la guía SANCO/12571/2013

$$(Q/q)_{\text{patrón}} = (Q/q)_{\text{muestra}} (\pm 30\%)$$

- ❖ De forma diaria se estudiará el **blanco control** y se comprobará que para los analitos que son objeto del análisis, la concentración obtenida no excede del valor máximo descrito en el anexo correspondiente los criterios de aceptación del blanco.

Como **ejemplo**, de lo anteriormente dicho, a continuación se exponen el cromatograma de una muestra positiva en **Diuron, Isoproturon, Simazina Terbutilazina** en donde vemos que se cumplen los criterios mencionados anteriormente, en cuanto a tiempo de retención y concentraciones que se encuentra dentro del calibrado.

Cumpléndose también los q/Q ratios por lo que efectivamente la muestra sería positiva en estos 4 compuestos.



Internal Standard	Area (cps)	RT (min)	Target conc. (µg/L)	Calc. Conc. (µg/L)
Isoproturon D6	43200.	8.53	0.0500	-
N/A	N/A	N/A	N/A	-
N/A	N/A	N/A	N/A	-

Target Analyte	Area (cps)	RT (min)	Target conc. (µg/L)	Dilution Factor	Calc. Conc. (µg/L)	Accuracy
Diuron 1	5.320e+03	8.57	N/A	20.0	0.620	N/A
Diuron 2	1.360e+03	8.58	N/A	20.0	0.590	N/A
Linuron 1	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Linuron 2	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Isoproturon 1	1.410e+04	8.55	N/A	20.0	0.439	N/A
Isoproturon 2	4.850e+03	8.54	N/A	20.0	0.421	N/A
Propazina 1	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Propazina 2	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Metamitron 1	2.720e+03	8.10	N/A	20.0	0.211	N/A
Metamitron 2	1.460e+03	8.09	N/A	20.0	0.212	N/A
Bromacilo 1	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Bromacilo 2	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Desisopropil atrazina 1	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Desisopropil atrazina 2	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Desetil atrazina 1	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Desetil atrazina 2	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Imazalil 1	9.270e+03	8.28	N/A	20.0	0.258	N/A
Imazalil 2	7.100e+03	8.28	N/A	20.0	0.227	N/A
Tiabendazol 1	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Tiabendazol 2	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Clortoluron 1	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Clortoluron 2	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Metalaxil 1	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Metalaxil 2	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Simazina 1	2.100e+04	8.40	N/A	20.0	0.310	N/A
Simazina 2	1.750e+04	8.40	N/A	20.0	0.320	N/A
Atrazina 1	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Atrazina 2	0.000e+00	0.00	N/A	20.0	N/A	N/A
Terbutilazina 1	8.140e+04	8.71	N/A	20.0	0.250	N/A
Terbutilazina 2	2.360e+04	8.70	N/A	20.0	0.240	N/A

Analyte Peak Name	Area (Cps)	Analyte RT	Calculated Ion Ratio (Expected Value)	Ratio OK
Diuron 1	5320	8.6		
Diuron 2	1360	8.6	0.26 (0.25)	✓
Isoproturon 1	14100	8.6		
Isoproturon 2	4850	8.5	0.34 (0.34)	✓
Metamitron 1	0	0		
Metamitron 2	0	0	0.00 (0.60)	
Bromazilo 1	0	0		
Bromazilo 2	0	0	0.00 (1.24)	
Imazalil 1	0	0		
Imazalil 2	0	0	0.00 ( 0.84)	
Clortoluron 1	0	0		
Clortoluron 2	0	0	0.00 (0.09)	
Simazina 1	21000	8.4		
Simazina 2	17500	8.4	0.83 (0.85)	✓
Terbutilazina 1	81400	8.7		
Terbutilazina 2	23600	8.7	0.29 (0.28)	✓

### 3.2.10. Cálculos y expresión de los resultados.

- ❖ Se siguen los mismos criterios que en el apartado 3.1.11 de la pág.25

### 3.2.11. Informe final.

- ❖ Se siguen los mismos criterios que en el apartado 3.1.14 de la pág.26

### 3.2.12. Valores habituales y límites legales

RD 140/2003 para aguas potables (RD 58/2006) en la Comunidad Valenciana) RD 1074/2002 para aguas envasadas y su posterior modificación (RD 17447/2003), limitan los pesticidas totales de una muestra a **0,50 ppb** y los pesticidas individuales a **0,10 ppb**.

Decreto 70/2009 de 31 de marzo, por lo que se aprueba el Reglamento de Vigilancia Sanitaria y Calidad del agua de consumo Humano de Andalucía mantiene los valores establecidos en el RD 140/03.

REAL DECRETO 1798/2010, de 30 de diciembre, regula la explotación y comercialización de aguas minerales y aguas de manatíes envasadas para consumo humano donde se limitan los plaguicidas totales de la muestra a 0.50 ppb y los plaguicidas individuales a 0,10 ppb.

REAL DECRETO 817/2015 de 11 de septiembre, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de políticas de aguas.

Este real decreto tiene como objetivo establecer unas normas de calidad ambiental (NCA) para sustancias prioritarias y otros contaminantes recogidas en las siguientes tablas con objeto de conseguir un buen estado de las aguas superficiales.

Tabla 13. Normas de calidad ambiental para sustancia prioritarias y otros contaminantes

Nombre de Sustancia	Media anual en aguas superficiales continentales (ppb)	Media anual en otras aguas superficiales (ppb)	Concentración máxima admisible en aguas superficiales continentales (ppb)	Concentración máxima admisible en otras aguas superficiales. (Ppb)
Diuron	0,2	0,2	1,8	1,8
Isoproturon	0,3	0,3	1,0	1,0
Atrazina	0,6	0,6	2,0	2,0
Simazina	1	1	4	4
Terbutilacina	30	30	-	-



Cubutrina*	0,0025	0,025	0,016	0,016
Diclovoros*	$6 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-5}$	$7 \times 10^{-4}$	$7 \times 10^{-5}$
Terbutrina*	0,065	0,0065	0,34	0,034

Las NCA entre corchetes tendrán efecto a partir del 22 de diciembre de 2018.

DECISIÓN DE EJECUCIÓN (UE) 2015/495 DE LA COMISIÓN de 20 marzo de 2015 por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/CE del Parlamento Europeo y del Consejo.

Tabla 14. Límites de detección (ppt)

Nombre de la sustancia	Límite máximo aceptable de detección del método (ppt) (ng/L)
Metocarb	10
Imidacloprid	9
Tiacloprid	9
Tiametoxam	9
Clotianidina	9
Acetamiprid	9
Oxadiazon	88
Triatato	670

## 4. Conclusiones sobre las prácticas

Durante el periodo de las prácticas he tenido la ocasión de conocer de cerca el trabajo que se realiza en un laboratorio de análisis, y del cual he formado parte durante 3 meses.

Los primeros días, fue imprescindible leer diferentes manuales tanto a los Procedimientos de Calidad y Generales ya que la empresa se rige bajo un sistema de calidad, como a procedimientos de técnicas cromatográficas en los cuales iba a formarme. Una vez empecé a trabajar en el laboratorio y junto con la ayuda de mis compañeros ya afiancé mejor los conceptos que había leído previamente en los manuales. Una vez pasado esa primera fase inicial, cada día vas aprendiendo cosas nuevas que se complementaban con lo que había dado de forma teórica en el Master que junto a las innumerables preguntas que me surgían y que siempre han estado muy atentos y amables en responderme he podido aprender mucho por lo que les estoy sumamente agradecido

## 5. Valoración personal

Decidí realizar el Master porque siempre me había llamado la atención y sentido cierto interés en mejorar mis conocimientos en la parte Analítica, también que profesionalmente quería cambiar y hacer algo diferente y con mayores opciones profesionales. Además de poder especializarme y no quedarme con una visión general de la química.

El tratarse de un master interuniversitario da la oportunidad de asistir a clase a diferentes universidades y con diversos profesores, la verdad que es muy enriquecedor. A parte con los compañeros he tenido la suerte de hacer grandes amigos y de convivir con ellos y conocer un poquito de aquí y de allá sin duda una maravillosa experiencia

## 6. Agradecimientos

Agradecer la ayuda y la colaboración de todos los profesores y mis compañeros del Master.

A mi familia y amigos por el apoyo prestado durante todo el curso.

Y finalmente, agradecer a todos los compañeros de Iproma, que me han hecho sentir como uno más, en donde me han dado la oportunidad de aprender cómo funciona un laboratorio y agradecer la infinita paciencia y por resolverme siempre mis preguntas.

## 7. Bibliografía

- M. Ibáñez, Oscar J. Pozo, Juan V. Sancho, Francisco J. López, F. Hernández. “Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry” Mayo 2005.
- M. Ibáñez, Oscar J. Pozo, Juan V. Sancho, Francisco J. López, F. Hernández “Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry” Julio 2006.
- Krispin Stoob, Heinz P. Singer \*, Christian W. Goetz, Matthias Ruff , Stephan R. Mueller “Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography–tandem mass spectrometry Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters”. Septiembre 2005
- [www.glyphosate.eu](http://www.glyphosate.eu)
- Krispin Stonehenge et al: “Fully automated online phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tándem mass spectrometry. Quantification on sulfonamide at low concentration in surface waters”. (2005).
- Ana Agüera et al.: “One Year routine application of a new method based on liquid chromatography- tándem mass spectrometry to the analysis of 16 múlticlass pesticides in vegetables samples” Journal of Chromatography A,1045 (2004) 125-135
- [www.Iproma.es](http://www.Iproma.es)
- Métodos y procedimientos generales de Iproma.