



VALIDACIÓ D'UN MÈTODE ANALÍTIC PER LA DETERMINACIÓ DE PLAGUICIDES EN AIGUA DE CONSUM



Autor: Xavier Bates Torres

Assignatura: Treball de Fi de Grau

Empresa: Empresa Municipal Mixta d'Aigües de Tarragona S.A. (EMATSA)

Tutora: Anna Clotet Romeu

Data: 15 de juny de 2022

Resum	1
1. Objectiu	1
2. Introducció, antecedents i fonaments	2
2.1. Activitat de l'empresa	2
2.2. Importància del mètode analític	2
2.3. Plaguicides.....	3
2.3.1. Herbicides.....	3
2.3.2. Fungicides.....	5
2.3.3. Insecticides	5
2.4. Fonament de la tècnica.....	5
2.4.1. Detector d'espectrometria de masses	6
2.4.2. <i>Multiple Reaction Monitoring (MRM)</i>	6
2.4.3. Interfases.....	7
2.5. Legislació.....	7
3. Part experimental.....	8
3.1. Components i optimització de les condicions de l'equip.....	8
3.1.1. Cromatografia líquida	8
3.1.2. Detector d'espectròmetre de masses	9
3.2. Programari utilitzat.....	11
3.2.1. <i>Analyst software</i>	11
3.2.2. SCIEX OS	12
3.3. Anàlisis	14
3.3.1. Reactius utilitzats.....	14
3.3.2. Preparació de les fases mòbils.....	15
3.3.3. Preparació dels patrons	15
3.3.4. Pretractament de les mostres	17
3.3.5. Gestió de residus	18
4. Resultats, càlculs i discussió	18
4.1. Identificació dels anàlits.....	18
4.2. Càlcul del límit de detecció i del límit de quantificació	19
4.3. Determinació de l'interval de linealitat	23
4.4. Veracitat i precisió	25
4.4.1. Càlcul de la precisió.....	26
4.4.2. Càlcul de la veracitat.....	32
4.5. Càlcul de la incertesa	34
4.6. Anàlisi de mostres reals	39
5. Conclusions.....	44
6. Bibliografia	46
7. Annexos.....	48

Resum

En aquest treball de final de grau s'investiga la validació d'un mètode analític per determinar la presència de plaguicides en mostres d'aigua de consum. Per estudiar tot el procés de validació s'aplica la cromatografia líquida acoblada a un detector d'espectròmetre de masses amb un analitzador de triple quadrupol (LC-MS/MS) per poder determinar una sèrie de contaminants orgànics en aquestes mostres. Per això s'han seleccionat uns compostos que a la natura es troben com a plaguicides en que la seva presència i quantificació és important per saber si aquelles mostres són aptes per al consum. Tota la metodologia analítica utilitzada per poder validar el mètode s'ha dut a terme tenint en compte la legislació europea vigent. S'han tingut en compte els nivells màxims permesos de cadascun dels residus i els paràmetres de qualitat relacionats amb la instrumentació analítica disponible. Els resultats han estat satisfactoris des d'un punt de vista quantitatiu i qualitatiu.

Abstract

In this final degree project, a validation of an analytical method to determine the presence of pesticides in consumption water samples is investigated. To study the entire validation process, liquid chromatography coupled to a mass spectrometer detector is applied with triple quadrupole analyser (LC-MS/MS) to determine a series of organic pollutants in these samples. For this reason, pesticide compounds have been selected in which their presence and quantification is important to know if those samples are suitable for consumption. All the analytical methodology used to validate the method has been carried out taking into account the current European legislation according to the maximum permitted levels of each of the waste and the quality parameters related to the analytical instrumentation available, leading to satisfactory results from the quantitative and qualitative point of view.

1. Objectiu

L'objectiu principal que es vol demostrar en el treball és el desenvolupament i la validació d'un mètode analític per determinar la presència de plaguicides en mostres d'aigua de consum mitjançant la cromatografia líquida amb detector d'espectrometria de masses amb analitzador de triple quadrupol (LC-MS/MS).

S'han seleccionat compostos que tenen especial dificultat analítica degut a la seva elevada polaritat i per tenir una certa toxicitat que fa molt necessari que aquests anàlisis no estiguin presents en les mostres perquè aquestes siguin aptes per al consum.

Per poder assolir l'objectiu principal s'ha establert com objectius específics:

- Entendre el funcionament de la tècnica per adquirir les mostres analitzades.
- Desenvolupar mètodes multiresiduals per la determinació de plaguicides.
- Validar el mètode seguint els criteris establerts en la legislació europea vigent per tal d'aconseguir resultats fiables.

2. Introducció, antecedents i fonaments

L'aigua és vital per a la natura i la salut de les persones i dels animals i, per això, és necessari que l'aigua sigui de bona qualitat i amb la menor quantitat possible de compostos que puguin suposar un risc per la salut. Entre aquests els compostos es poden trobar els plaguicides, que són tòxics i la seva presència en mostres d'aigua de consum és perjudicial a partir d'una certa concentració. Aquesta concentració queda fixada per la legislació vigent⁶ i qualsevol mostra d'aigua de consum humà no pot superar aquesta concentració perquè sigui apta per al consum.

En aquest apartat es parlarà de l'activitat de l'empresa, del mètode analític utilitzat, dels compostos analitzats en el mètode i de la legislació que es segueix per dur a terme l'experiment.

2.1. Activitat de l'empresa

L'Empresa Municipal Mixta d'Aigües de Tarragona S.A. (EMATSA) gestiona el cicle integral de l'aigua, els serveis d'enginyeria, d'obres i del laboratori i garanteix el subministrament de l'aigua amb la màxima qualitat i amb el mínim impacte ambiental.

El laboratori d'EMATSA té com a objectiu principal controlar la qualitat de l'aigua distribuïda per la xarxa pública i, per això, té una àmplia gamma de serveis com el control analític de l'aigua, el control en el medi ambient, el treball de camp, l'enginyeria i l'assessorament tècnic i la participació en projectes de I+D+i (investigació, desenvolupament i innovació).

El projecte d'EMATSA ha fet que la qualitat i acreditació sigui de total confiança per qualsevol tipus de clients (administració pública, indústries, sector turístic, hospitals, centres d'investigació, universitats, etc.).

2.2. Importància del mètode analític

La tècnica de la cromatografia líquida amb detector d'espectròmetre de masses (LC-MS/MS) és molt útil per poder analitzar contaminants en mostres d'impacte mediambiental i agroalimentària^{1,2,3} a concentracions molt petites (de l'ordre de ng/L).

És important trobar la concentració present de cadascun dels anàlits a les mostres d'aigua de consum i un mètode per poder-la trobar és realitzant una recta de calibratge amb diverses solucions de concentració coneguda (patrons) i obtenir una equació lineal per interpolat amb el valor donat per la mostra i així trobar la concentració.

Cal que les concentracions dels patrons que formen la recta de calibratge cobreixin tota la recta, és a dir, que s'han de distribuir bé els punts en tot l'interval de linealitat estudiat i no agafar molts punts a concentracions molt baixes i pocs punts a concentracions altes. Es prepararan una sèrie de patrons que cobreixin tot l'interval de linealitat i s'estudiaran una sèrie de paràmetres (límit de detecció i quantificació, precisió, veracitat, incertesa) per poder assolir l'objectiu de validar el mètode analític.

2.3. Plaguicides

Un plaguicida⁴ és una substància química d'origen natural o sintètic que s'utilitza àmpliament en àrees agrícoles (figura 1), forestals i industrials i l'existència a l'atmosfera, al sòl i a les aigües s'ha d'atribuir a l'activitat humana.



Figura 1. Plaguicides en àrees agrícoles. Font: Gencat

Són tòxics i presenten un important risc de bioacumulació al llarg de la cadena tròfica o cadena alimentària i poden donar lloc a concentracions molt altes. Alguns d'aquests plaguicides tenen una elevada persistència en el medi ambient per la seva baixa degradabilitat.

Els plaguicides es poden classificar segons la composició química i segons el seu ús i aplicació:

- **Segons la composició química:**

- Plaguicides inorgànics: compostos d'arsènic, fluor o sofre.
- Plaguicides orgànics d'origen natural: nicotina, piretrina.
- Plaguicides orgànics sintètics: organoclorats, organofosforats, N-metilcarbamats, ditiocarbamats, dinitrofenols, triazines, derivats del benzimidazol, fenil urees, fenoxiàcids, tioèters, piretroides, etc.

- **Segons el seu ús i aplicació:**

- Control d'invertebrats: insecticides, molusquicides, nematocides.
- Control de vertebrats: rodenticides, avicides, piscicides, repel·lents.
- Control de plantes: herbicides, reguladors del creixement, defolians i dessecants.
- Control de microorganismes: fungicides i bactericides, alguicides i desinfectants.

Els compostos que s'han seleccionat en aquest treball per detectar i quantificar són herbicides, fungicides i insecticides.

2.3.1. Herbicides

Un herbicida és un producte que evita el desenvolupament de les males herbes. Els herbicides tenen una classificació àmplia però en aquest treball la majoria dels compostos estudiats formen part de la família de les triazines.

Les triazines són una família de tres compostos orgànics (veure figura 2) que tenen estructures químiques, propietats i configuracions diferents. Solen tenir un aspecte de pols blanca humida, concentrada o en forma de granulat i tenen com a principal aplicació la terra i l'agricultura. Són químicament estables en condicions normals i són incompatibles amb agents oxidants forts.

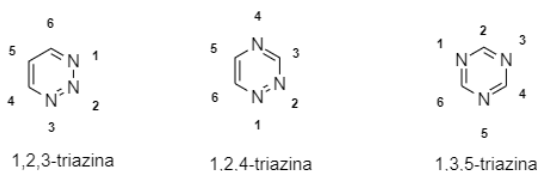


Figura 2. Estructures de les triazines

La seva estructura és la d'una estructura heterocíclica anàloga al benzè on s'han substituït 3 àtoms de carboni per 3 àtoms de nitrogen. Això dona lloc a tres possibles isòmers: 1,3,5-triazina, 1,2,4-triazina i 1,2,3-triazina, estructures que es mostren a la figura 2.

Els herbicides estudiats en aquest treball es mostren a la figura 3 i es caracteritzen per ser derivats de la 1,3,5-triazina, a excepció del diuron que no és una triazina sinó un herbicida.

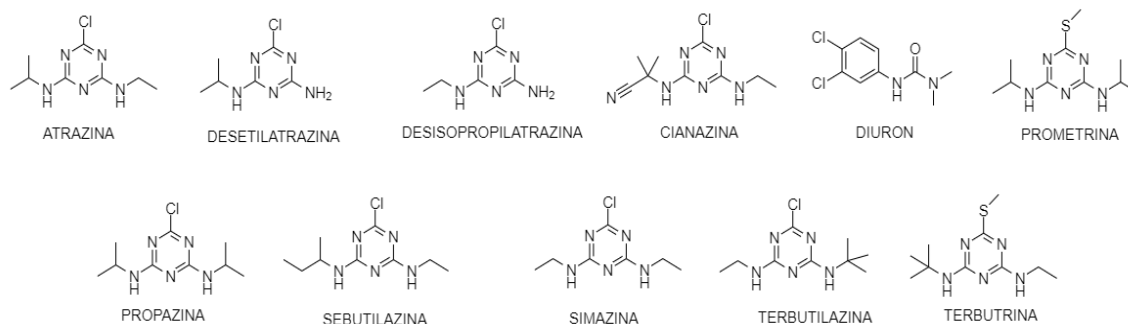


Figura 3. Herbicides analitzats al mètode

L'estabilitat de les triazines és deguda a la configuració electrònica de l'anell heterocíclic semblant a la del benzè. Els dos sistemes estan estabilitzats per electrons π deslocalitzats, però en el cas de les triazines els electrons π tendeixen a localitzar-se als àtoms de nitrogen i són susceptibles a un atac nucleòfil per la deficiència d'electrons.

Les diferències principals en les propietats fisicoquímiques dels compostos estudiats tenen a veure amb les propietats àcid-base, i en la solubilitat i la polaritat.

La basicitat dels herbicides es veu afectada pel substituent en posició 2 augmentant la basicitat en l'ordre $\text{Cl}^- < \text{SCH}_3 < \text{OCH}_3$ degut a la relació càrrega/radi (q/r). Els grups amina en posicions 4 i 6 afecten lleugerament el caràcter bàsic però incrementa quan augmenta el nombre d'àtoms d'hidrogen units als grup amina i quan augmenta la longitud i el nombre de ramificacions de la cadena alquílica.

La solubilitat i la polaritat dels herbicides depèn del substituent en posició 2 augmentant en l'ordre $\text{SCH}_3 < \text{Cl}^- < \text{OCH}_3$ degut a que l'oxigen és més electronegatiu que el clor i el sofre i fa que la polaritat augmenti. També depèn de si s'utilitzen dissolvents polars (ex: H_2O) o apolars (ex: CH_2Cl_2), fent que els compostos polars es dissolguin en dissolvents polars i a l'inversa. Els substituents en posicions 4 i 6 fa que la solubilitat disminueixi quan augmenta la longitud de la cadena alquílica.

Els herbicides estudiats es caracteritzen per tenir punts de fusió i ebullició elevats (superiors a 150°C i alguns es poden descompondre a la temperatura d'ebullició) i per tenir una densitat superior a 1 degut a que tenen clor o sofre en la seva estructura.

Existeixen diferents mètodes per sintetitzar les 1,3,5-triazines. D'entre ells, el més eficient i simple és la síntesi de 1,3,5-triazin-2-amines (veure figura 4). Aquest mètode utilitza imidats, guanidines, amides o aldehids com a material de partida, carbonat de cesi (Cs_2CO_3) com a base i dimetilformamida (DMF) com a solvent, donant lloc a rendiments alts amb una àmplia gamma de grups funcionals.

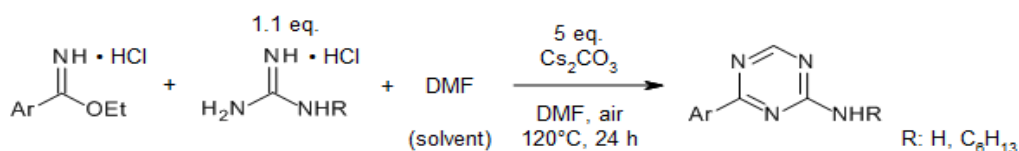


Figura 4. Obtenció de 1,3,5-triazines. Font: Organic Chemistry Portal.

2.3.2. Fungicides

Un fungicida és un producte químic i biològic capaç d'eliminar els fongs per evitar una pèrdua de rendiment, de qualitat i de l'aprofitament de les collites. També destaca en l'ús com a protector de la fusta o com producte antifúngic per combatre les afeccions per fongs en la salut humana. Els compostos fungicides que s'analitzen són els mostrats a la figura 5.

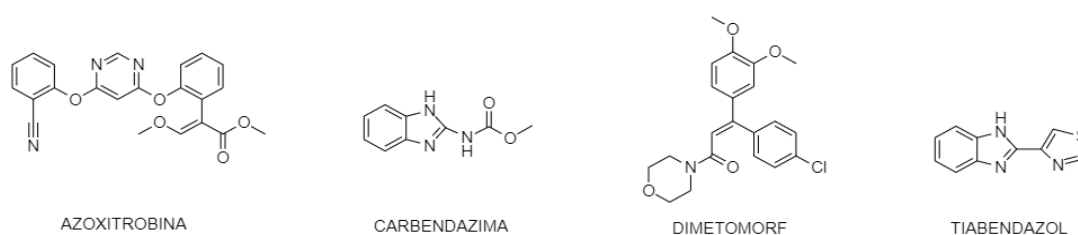


Figura 5. Fungicides analitzats en aquest mètode

A diferència de les triazines, els fungicides tenen una estructura més diversa i fa que les propietats fisicoquímiques que posseeixen puguin ser molt diferents. Com passa en les triazines també destaquen per tenir un punt de fusió elevat i una densitat per sobre de 1 i són estables en condicions normals i són incompatibles amb agents oxidants. Tenen una certa solubilitat en aigua i en alguns dissolvents orgànics com el metanol, el toluè i l'acetona, però són molt solubles en acetat d'etil, en acetonitril i en clorur de metilè (CH_2Cl_2).

2.3.3. Insecticides

Un insecticida és un compost químic utilitzat per combatre les plagues d'insectes i per eliminar els que afecten a la salut humana i animal.

Dels compostos que s'analitzen en aquest treball només l'imidacloprid (figura 6) és un insecticida.

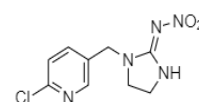


Figura 6. Imidacloprid

2.4. Fonament de la tècnica

La cromatografia líquida amb detector d'espectrometria de masses (LC-MS/MS) (figura 7) és un mètode analític àmpliament utilitzat en l'anàlisi de contaminants al medi ambient, en aliments i a la salut pública. Aquesta tècnica permet utilitzar un mètode multiresidual per analitzar diversos compostos a la vegada, mesurar els ions amb massa exacta i establir rutes de fragmentació de les molècules. Aquesta tècnica té com a avantatges que pot aportar injeccions d'extractes líquids directes i una alta sensibilitat i selectivitat per l'afinitat dels anàlits per la fase estacionària de la columna i per la relació massa/càrrega (m/z), evitant així anàlisis exhaustius. En canvi, la supressió de la senyal analítica degut a les



Figura 7. Tècnica del LC-MS/MS

interferències de l'efecte matriu i l'elevat cost són els principals inconvenients d'aquesta tècnica. L'efecte matriu es pot corregir amb l'ús de patrons interns, encara que en el mètode utilitzat en aquest treball no serà necessari utilitzar-los.

El sistema està format per dues parts funcionals: el detector d'espectròmetre de masses i el cromatògraf líquid.

2.4.1. Detector d'espectrometria de masses

El detector d'espectrometria de masses⁷ conté dos analitzadors de masses acoblats (MS/MS). Aquests analitzadors separen els ions en fase gasosa que s'han format a la font d'ionització i en funció de la relació massa/càrrega (m/z) treballant a molt baixes pressions.

El sistema utilitzat utilitza un analitzador de triple quadrupol (sovint s'anomena QqQ), que es mostra a la figura 8. L'analitzador de triple quadrupol utilitza una tècnica d'ionització suau que els espectres que s'obtenen estan dominats per la molècula protonada $[M+H]^+$ (ESI +).

Quan entra la mostra pel plat d'entrada (1) passa per una guia d'ions QJet (2), que guia la mostra cap a una sèrie de quadrupols començant per la regió Q0 (3) i, posteriorment, passant pel Q1 (4). Aquest quadrupol filtra i classifica els ions abans que entrin a la cel·la de col·lisió Q2 (5), on l'energia interna d'un ió augmenta amb la col·lisió amb molècules de gas fins que

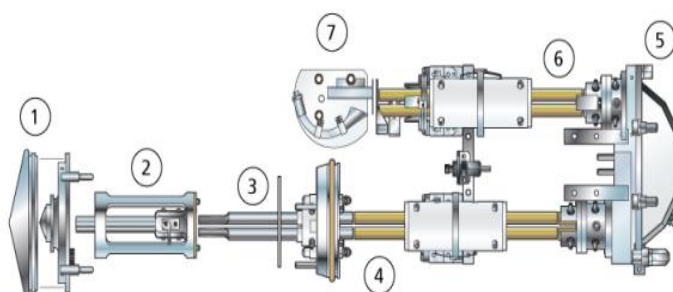


Figura 8. Analitzador de triple quadrupol (QqQ). Font: 6500 and 6500+ Series of Instruments (SCIEX).

els enllaços moleculars es trenquen creant ions productes. Posteriorment els ions productes entren al quadrupol Q3 (6) mitjançant un filtrat addicional i acaben entrant al detector (7), on es crea un corrent convertit en un pols de tensió. Els polsos de tensió són directament proporcionals a la quantitat d'ions que entren al detector. El sistema monitoritza aquest voltatge i converteix la informació en un senyal que representa la intensitat dels ions per un valor de m/z particular.

El sistema conté una trampa d'ions lineal (LIT) que proporciona una sèrie de modes de funcionament millorats en que els ions estan atrapats a la regió del Q3 i s'escanegen per produir dades d'espectre complet.

2.4.2. Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Per poder analitzar diversos plaguicides a la vegada s'han d'utilitzar mètodes multiresiduals altament sensibles, selectius i fiables. El mètode multiresidual que s'ha utilitzat en aquest treball és el *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), que és el mode d'adquisició més utilitzat i permet obtenir cromatogrames amb alta sensibilitat i selectivitat fent-lo útil per analitzar substàncies molt concretes en que es sap el pes molecular del compost inicial i del compost fragmentat.

2.4.3. Interfases

Quan un detector de masses va acoblat a un cromatògraf de líquids implica un canvi d'estat de líquid a gas i implica utilitzar interfases, en que la ionització es realitza a pressió atmosfèrica. Hi ha tres tipus d'interfases:

- Ionització química a pressió atmosfèrica (APCI)
- Fotoionització a pressió atmosfèrica (APPI)
- Ionització per electroesprai (ESI)

L'equip utilitza la ionització per electroesprai (ESI), en que les molècules d'anàlit en dissolució donen lloc a una reacció de transferència protònica en fase vapor amb les molècules de la fase mòbil per obtenir molècules d'anàlit protonades, desprotonades o adductes amb molècules de solvent de la pròpia fase mòbil o amb modificadors afegits (els de sodi i amoni són els més comuns).

La tècnica de la ionització per electroesprai (ESI) s'utilitza en polaritat positiva per tots els anàlisis seleccionats aplicant el mètode MRM.



Figura 9. Corrent de nitrogen

El corrent de nitrogen (figura 9) permet la formació d'un esprai estable, nebulitza la mostra i evapora el dissolvent abans de passar per l'analitzador de triple quadrupol i gràcies a l'alta temperatura que hi circula requereix d'un flux de fase mòbil d'ordre molt petit ($\mu\text{L}/\text{min}$).

2.5. Legislació

El procés experimental que es duu a terme s'ha de basar segons indiqui la legislació corresponent. Per assolir l'objectiu de la validació del mètode analític, es segueix la legislació vigent que indica el Reial Decret 140/2003, del 7 de febrer⁶.

En aquest Reial Decret s'estableixen els criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum humà i les instal·lacions que permeten el seu subministrament des de la captació fins a l'aixeta del consumidor i el seu control en la qualitat i neteja amb la finalitat de protegir la salut de les persones dels efectes adversos derivats de qualsevol tipus de contaminació d'aigües.

Les aigües de consum humà són aquelles que s'utilitzen per beure, cuinar, preparar aliments, higiene personal i per altres usos domèstics i es subministren per consum humà degut a una activitat comercial o pública.

En el Reial Decret s'estableixen valors paramètrics per les variables a controlar (pH, conductivitat, nitrats, clorurs, etc.), és a dir, que per a cada paràmetre se li ha d'establir un nivell màxim o mínim de concentració present a les mostres a analitzar. El valor paramètric de concentració màxima que estableixen per qualsevol plaguicida en mostres d'aigua de consum humà és màxim de $0.10 \mu\text{g}/\text{L}$, per tant, per sobre d'aquesta concentració qualsevol mostra es considera no apta per al consum humà.

El Reial Decret també inclou el percentatge del valor paramètric en termes d'exactitud, precisió i límit de detecció i el valor indica la referència que s'ha de complir quan es treballa amb aigua de consum humà a aquell nivell de concentració. Un cop obtinguts els resultats de l'anàlisi s'ha de comprovar que els resultats que s'obtenen estiguin per sota dels valors que recullen el Reial Decret a nivell del valor paramètric establert ($0.10 \mu\text{g}/\text{L}$).

3. Part experimental

Per validar el mètode s'ha de seguir un procés experimental. Per això s'ha de conèixer l'equip utilitzat per dur a terme les anàlisis, les millors condicions de l'equip per obtenir bons resultats, el programari utilitzat per adquirir les mostres, la preparació de les fases mòbils i dels patrons utilitzats i el tractament previ fet a les mostres analitzades.

3.1. Components i optimització de les condicions de l'equip

3.1.1. Cromatografia líquida

El cromatògraf de líquids Exion LC⁸ (figura 10) és on té lloc l'inici de l'anàlisi de les mostres analitzades. Està format pels següents components:

- Botelles de dipòsit: contenen les fases mòbils que s'extreuen i es bombegen pels tubs.
- Desgasificador: elimina l'aire dissolt de la fase mòbil evitant les bombolles d'aire i irregularitats en la línia base degut a l'aire dissolt.
- Bomba: envia la fase mòbil a través del mostreig automàtic, la columna, el detector i al contenidor de residus.
- Mesclador: millora l'eficiència de la mescla de les fases mòbils.
- Mostrejador automàtic: injecta automàticament la mostra a les línies de flux.
- Columna: separa els components mitjançant les interaccions mútues de la fase mòbil i l'empaquetament de la columna (fase estacionària).
- Detector: detecta els components eluïts de la columna i envia les dades del senyal a l'ordinador d'adquisició.
- Contenidor de residus: hi drena la fase mòbil que prové del detector.
- Controlador: pot controlar un màxim de 8 components LC i un màxim de 4 unitats bomba.

Les condicions del cromatògraf líquid a optimitzar són la columna cromatogràfica, la fase mòbil, el tipus d'elució, la temperatura i el flux.

- Columna cromatogràfica: la fase estacionària de la columna és Omega Polar C18 (figura 11). Aquesta fase estacionària serveix per la tècnica de la cromatografia líquida d'ultra alt rendiment (UHPLC) i és capaç de proporcionar una bona selectivitat i retenció tant per anàlisis polars com no polars. El lligand C18 ofereix interaccions hidrofòbiques i la superfície modificada de la partícula proporciona una major retenció de compostos polars i estabilitat aquosa.



Figura 10. Exion LC



Figura 11. Columna Omega Polar C18. Font: Phenomenex.

- **Fase mòbil:** en la cromatografia líquida s'utilitzen una o diverses fases mòbils líquides constituïdes per una mescla de dissolvents de diferent força eluotròpica, que va fluint per la columna que conté la fase estacionària i és fonamental a l'hora d'obtenir resultats ideals per poder identificar bé els pics al cromatograma.
- **Tipus d'elució:** com s'ha observat en els valors de referència dels anàlits⁵, aplicant un tipus d'elució isocràtic (composició fase mòbil constant) fa que en alguns anàlits la separació sigui adequada però hi ha d'altres que apareixen bastant més tard fent que es perdi molt de temps d'anàlisi⁵. Per tal d'escurçar el temps d'anàlisi s'estableix una elució en gradient de cadascun dels eluents A i B preparats (veure apartat 3.3.2) i es va variant la composició de cadascuna de les fases mòbils al llarg del temps, tal i com indica la taula 1.

Taula 1. Gradient optimitzat de fase mòbil durant l'anàlisi

Temps (min)	Flux (ml/min)	Concentració eluent	
		A (%)	B (%)
-	0.5	95	5
1	0.5	60	40
10	0.5	5	95
14	0.5	5	95
14.1	0.5	95	5
18	0.5	95	5

- **Temperatura:** s'optimitza depenent de les característiques de la fase mòbil i la fase estacionària. Un augment de temperatura implica un temps d'anàlisi més curt i un augment de l'eficàcia degut a la disminució de la viscositat de la fase mòbil. No s'ha de pujar molt la temperatura establerta perquè pot afectar també a la resolució, que es veu disminuïda amb l'augment de temperatura. A l'experimentació duta a terme s'estableix una temperatura de 40°C.
- **Flux:** depèn del tipus i mida de columna utilitzada, no afecta molt a la resolució dels pics cromatogràfics però afecta al temps d'anàlisi i a la pressió del sistema. S'estableix un flux de 0.5 ml/min.

3.1.2. Detector d'espectròmetre de masses

El sistema⁷ utilitzat (figura 12) està destinat a l'anàlisi qualitatiu i quantitatiu d'espècies químiques.






El sistema està format pel panell de símbols, la bomba de xeringa, la font d'ions i una vàlvula desviadora.

El panell de símbols està format pels símbols mostrats a la taula 2, amb el color que hi apareixen i el seu significat.



Figura 12. Detector d'espectròmetre de masses

Taula 2. Significat dels símbols del panell

LED	Color	Nom	Significat
	Verd	Encès	S'encén quan el sistema està encès
	Verd	Buit	S'encén quan s'aconsegueix el buit correcte. Durant el bombeig o la ventilació el buit no és correcte i la llum parpelleja
	Verd	Llest	S'encén quan el sistema està a punt. Un cop assolit aquest punt ja es pot començar a operar
	Blau	Escaneig	Va parpellejant la llum mentre es va adquirint les dades
	Vermell	Problema	S'encén quan en el sistema hi ha algun problema intern que fa que no es pugui manipular

La bomba de xeringa s'utilitza per una infusió contínua amb alt flux al LC i els estàndards carregats a la xeringa s'infonen a la fase mòbil a gran cabal a través d'un connector.

La font d'ions ionitza la mostra que hi arriba mitjançant un voltatge que depèn de la polaritat de cada compost i afecta a la sensibilitat i a la estabilitat de l'esprai.

La vàlvula desviadora (figura 13) és una vàlvula que conté dues posicions (mode injector i mode desviador) i sis ports.

Es pot modificar les condicions de la vàlvula desviadora controlant la fracció de mostra injectada que es rebutja i la fracció que es porta al detector.

La vàlvula ho té assignat amb les lletres A i B, depenent de si es vol que la mostra vagi al detector o es rebutgi, respectivament.

Durant els primers instants d'anàlisi cal rebutjar la mostra perquè a l'hora de la primera injecció no és gaire fiable i amb injeccions successives es va aconseguint més fiabilitat. Un cop passat el temps en que l'espectròmetre de masses hagi assimilat tota la mostra, abans d'acabar el temps d'anàlisi cal tornar a la posició de rebuig de la mostra perquè l'última part de mostra ja no interessa i no influeix en el resultat.

Les condicions programades de temps en cada posició són les mostrades a la taula 3.

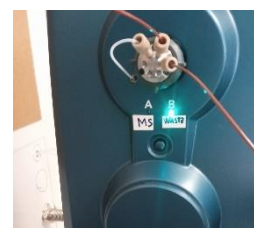


Figura 13. Vàlvula desviadora

Taula 3. Temps establert per cada posició de la vàlvula desviadora

Temps total (min)	Posició
0.1	B
0.2	A
17.8	B

A l'apartat 2.4.1 ja s'ha descrit l'analitzador de triple quadrupol i del seu funcionament. Es poden optimitzar les condicions de l'analitzador pel mètode d'adquisició MRM establint el pes molecular de cada anàlit (*ió precursor*) i dues transicions importants per cadascun dels anàlits. D'aquesta manera, es dona dos ions fragmentats de diferents pesos moleculars (*ions producte*).

La primera transició assignada per cada anàlit és per detectar en quina quantitat hi estan presents mentre que la segona transició és per confirmar la seva presència.

Per cada transició característica de cada anàlit s'han d'optimitzar tres paràmetres que es defineixen a continuació:

- Potencial de desglossament (*Declustering Potential*) (DP): controla la tensió a l'orifici, que controla la capacitat de separar els ions entre l'orifici i la guia d'ions IonDrive™ QJet. És utilitzat per minimitzar els cúmuls de dissolvent que poden romandre en els ions de la mostra després d'entrar a la cambra de buit o per fragmentar els ions. Com més gran és la tensió més gran és l'energia impartida als ions. Amb un valor de DP massa alt pot succeir una fragmentació no desitjada.
- Energia de col·lisió (*Collision Energy*) (CE): quantitat d'energia que reben els ions precursors quan acceleren fins a la cel·la de col·lisió Q2, que xoquen amb molècules de gas i es fragmenten. La seva funció és controlar la diferència de potencial entre la regió Q0 i la cel·la de col·lisió Q2. Només s'utilitza en MS/MS d'escaneig.
- Potencial de sortida de la cel·la de col·lisió (*Collision Cell Exit Potential*) (CXP): només s'utilitza en tipus d'exploració Q3 i MS/MS i transmet els ions al quadrupol Q3.

Les dades emprades per a cada anàlit es poden trobar als annexos i a la bibliografia⁵. Un cop establerts els paràmetres anteriors per a tots els anàlits, el mètode calcula automàticament tres paràmetres més que depenen de la quantitat de compostos a analitzar.

- Temps de permanència (*Dwell time*): el temps dedicat a adquirir una transició MRM específica durant un cicle. Quants més compostos, el *dwell time* serà major. El temps que passa entre una transició i una altra d'un compost és d'ordre molt petit (ms).
- Cicle de treball (*Duty cycle*): temps dedicat a supervisar els anàlits escollits afectant a la resolució cromatogràfica, ja que requereix d'un cicle de treball particular i està inversament relacionat amb el nombre d'anàlits afectant al temps de permanència.
- Temps de cicle de treball (*Cycle time*): temps necessari perquè es pugui formar el pic cromatogràfic. La situació ideal és que el pic s'ha de prendre entre 8 i 10 vegades per tal d'obtenir una mesura precisa de la seva àrea per tots els anàlits.

3.2. Programari utilitzat

3.2.1. Analyst software

El *Analyst software*⁹ és un programari que funciona amb l'espectròmetre de masses i el sistema de cromatografia líquida (LC) per poder controlar el sistema i l'adquisició de dades.

Per tal de que es pugui posar en marxa l'anàlisi de les mostres amb el programa i l'equip requereix dels següents modes d'operació:

- Perfils de hardware i projectes: indica al programari com es configura i es connecta l'espectròmetre de masses i els dispositius a l'ordinador. Tots els dispositius han d'estar inclosos en el hardware.
- Sintonització i calibració: és necessari sintonitzar i calibrar l'espectròmetre de masses abans de realitzar les anàlisis per tal d'optimitzar la resolució i obtenir una millor sensibilitat i rendiment del sistema.
- Lots: són una recopilació d'informació sobre les mostres que s'han d'analitzar i indiquen al programa l'ordre en que s'analitzen. Quan es comença el temps d'anàlisi es va analitzant les mostres en l'ordre establert del mètode d'adquisició seleccionat.
- Mètode d'adquisició: necessari per crear un experiment i un període pel sistema.

Podem trobar diferents mètodes d'adquisició com el *Enhanced Multiply-Charged* (EMC), *Enhanced Product Ion* (EPI) (*second survey scan*), *Enhanced MS* (EMS), *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), *Neutral Loss* (NL), *Precursor Ion* (Prec) i Q3 MS.

Com que l'objectiu és establir un mètode multiresidual per determinar una sèrie de plaguicides, s'utilitza el *Multiple Reaction Monitoring* (MRM).

- Cromatogrames: les dades adquirides són enviades al programari i es poden mostrar espectres de masses complets, la intensitat d'ions únics o múltiples i el recompte total d'ions al llarg del temps. El programa té dues maneres d'ensenyar els cromatogrames:
 - Total ion chromatogram (Cromatograma d'ions totals) (TIC): representa el gràfic del corrent d'ions totals en funció del temps.
 - Extracted ion chromatogram (Cromatograma iònic extret) (XIC): pren valors d'intensitat en un valor de massa discret o en un rang de massa a partir d'una sèrie d'exploracions espectrals de masses. Indica el comportament d'una massa determinada o rang de massa en funció del temps.

3.2.2. SCIEX OS

El programa SCIEX OS¹⁰ porta el control de l'instrument, l'adquisició i el processament de les dades i la funcionalitat de la generació d'informes.

El programa mostra els resultats obtinguts de forma quantitativa i qualitativa per cadascun dels anàlisis presents en les mostres analitzades (veure figura 14).

L'anàlisi quantitatiu s'utilitza per determinar la concentració dels anàlisis en una mostra. Cal dir-li al

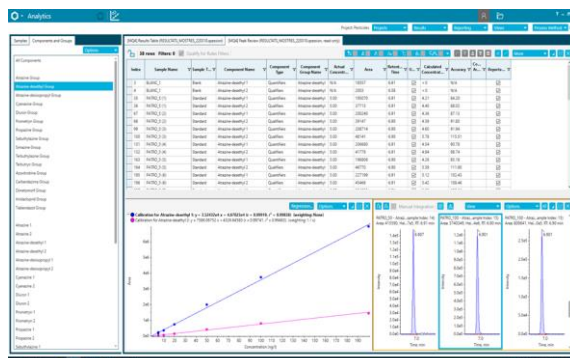


Figura 14. Anàlisi quantitatiu i qualitatiu

programa els patrons utilitzats i la seva concentració perquè el programa trobi la recta de calibratge i per després calcular la concentració de cada anàlit a cadascuna de les mostres analitzades.

L'anàlisi qualitatiu és la identificació d'un compost objectiu o desconegut. La confiança en identificar compostos es pot augmentar utilitzant la precisió de les masses, els temps de retenció, el patró d'isòtops i la cerca de biblioteca i de fórmules.

El software gestiona les gràfiques per diferents tipus de regressió (lineal, quadràtica, exponencial, etc.). Com que es vol saber la concentració d'anàlit a les mostres analitzades cal que la recta de calibratge sigui lineal. El *software* també permet ponderar la recta depenent de si ens interessa la part baixa o la part alta de la gràfica. Per això és necessari calcular un factor *w* de ponderació i la fórmula per calcular-ho depèn del tipus de ponderació que s'utilitza:

Taula 4. Tipus de ponderació per la recta de calibratge

TIPUS DE PONDERACIÓ	PONDERACIÓ (w)
Cap	Sempre és 1
1/x	$w = 1/ x $
1/x ²	$w = 1/ x^2 $
1/y	$w = 1/ y $
1/y ²	$w = 1/ y^2 $
ln x	$w = \ln(x) $
ln y	$w = \ln(y) $

3.3. Anàlisis

3.3.1. Reactius utilitzats

Els reactius utilitzats per la preparació de les fases mòbils i dels patrons es mostren a la taula 5 on també es mostren les propietats i la toxicitat que presenten cadascun dels reactius i com s'ha d'actuar per poder-los utilitzar correctament.

Taula 5. Reactius utilitzats i característiques

REACTIU	PROPIETATS	TOXICITAT	MANIPULACIÓ
Aigua milliQ	Aigua ultrapura	-	-
Formiat d'amoni (HCOONH ₄)	99.995% puresa Sòlid blanc Inodor Higroscòpic PM = 63.06 g/mol T _{fusió} = 115-120°C	Irritant	Ús de guants Ulleres de seguretat
Àcid fòrmic (HCOOH)	99% puresa Líquid incolor T _{fusió} = 8°C T _{ebullició} = 100.7°C Olor irritant Totalment soluble en aigua Propietats reductores notables PM = 46.03 g/mol	Corrosiu Nociu per ingestió Tòxic per inhalació Cremades greus	Ús de guants Ulleres de seguretat
Metanol (CH ₃ OH)	99.9% puresa Soluble en aigua T _{fusió} = -97°C T _{ebullició} = 64.7°C Incolor Densitat = 0.7918 g/cm ³ PM = 32.04 g/mol	Inflamable Tòxic per inhalació Tòxic per ingestió Tòxic per contacte en la pell	Sota campana extractora Ús de guants
Acetonitril (CH ₃ CN)	99.9% puresa Soluble en aigua i en dissolvents orgànics Líquid incolor Densitat = 0.786 g/cm ³ PM = 41.05 g/mol T _{fusió} = -45°C T _{ebullició} = 82°C	Inflamable Nociu per inhalació Tòxic per ingestió Molt tòxic per contacte en la pell Irritant	Sota campana extractora Ús de guants

3.3.2. Preparació de les fases mòbils

Es preparen dos eluents que contenen aigua MilliQ, àcid fòrmic, format d'amoni i metanol.

L'àcid fòrmic i el format d'amoni actuen com a solució tampó i neutralitzen les càrregues a la solució per controlar el pH de la fase mòbil per tal de realitzar quantificacions fiables d'un anàlit amb pics cromatogràfics ben resolts.

Per cada eluent es prepara 1 L de dissolució amb una concentració de format d'amoni de 5 mM i d'àcid fòrmic 0.01%. Per saber la quantitat que s'ha d'afegir de cadascun dels reactius a cadascun dels eluents es realitzen els càlculs següents:

$$1 \text{ L dissolució} * \frac{5 \text{ mmol HCOONH}_4}{1 \text{ L dissolució}} * \frac{1 \text{ mol HCOONH}_4}{1000 \text{ mmol HCOONH}_4} * \frac{63.06 \text{ g HCOONH}_4}{1 \text{ mol HCOONH}_4} = \mathbf{0.3153 \text{ g HCOONH}_4}$$

$$1000 \text{ ml dissolució} * \frac{0.01 \text{ ml HCOOH}}{100 \text{ ml dió}} * \frac{1000 \mu\text{l HCOOH}}{1 \text{ ml HCOOH}} = \mathbf{100 \mu\text{L HCOOH}}$$

Les quantitats afegides de cadascun dels reactius en cada eluent són els mostrats a la taula 6.

Taula 6. Quantitats de cada reactiu per preparar cada fase mòbil

FASE MÒBIL	HCOONH ₄	HCOOH	AIGUA MILLIQ	METANOL
A	0.3153 g	100 μL	1L	-
B	0.3153 g	100 μL	-	1L

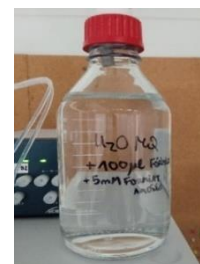


Figura 15. Fase mòbil A

Un cop preparades les fases mòbils es porten al cromatògraf Exion LC i es purga durant 5 minuts cadascuna de les fases mòbils per tal de que es barregin els dos eluents i s'estabilitzi el sistema per aconseguir millors resultats a l'anàlisi.

3.3.3. Preparació dels patrons

Per tal de poder preparar les diferents solucions patró amb els compostos d'interès i, per posteriorment, fer els càlculs corresponents per validar el mètode analític, és necessari tenir en compte les condicions de la taula 7.

Taula 7. Característiques dels anàlits determinats al mètode

COMPOST	CONCENTRACIÓ (mg/L)	PURESA (%)	DISSOLVENT	INCERTESA (%)
Atrazina	10	98.8	Metanol	±0.5
Desetilatràzina	10	99.0	Metanol	±0.5
Desisopropilatrazina	10	99.0	Metanol	±0.5
Cianazina	10	97.4	Metanol	±0.5
Prometryn	10	99.9	Metanol	±0.5
Propazina	10	99.3	Metanol	±0.5
Sebutilazina	10	95.5	Metanol	±0.5
Simazina	10	99.0	Metanol	±0.5
Terbutilazina	10	99.2	Metanol	±0.5
Terbutryn	10	98.1	Metanol	±0.5
Azoxitrobina	100	99.9	Acetonitril	±0.5
Carbendazima	100	99.9	Acetonitril	±0.5
Dimetomorf	100	99.0	Acetonitril	±0.5
Diuron	100	99.9	Acetonitril	±0.5
Imidacloprid	100	99.4	Acetonitril	±0.5
Tiabendazol	100	99.2	Acetonitril	±0.5

Els compostos provenen de dues solucions comercials en que una conté les triazines (10 mg/L) preparada en metanol i, en l'altra, els fungicides (100 mg/L) preparada en acetonitril, segons la taula 7.

En la legislació vigent, com s'ha explicat a l'apartat 2.5, el valor paramètric de concentració màxima de qualsevol plaguicida en mostres d'aigua de consum ha de ser de 100 ng/L, fent que sigui necessari preparar una sèrie de dilucions (en vitrina) per establir la recta de calibratge.

Es fa una dilució 1:10 de la solució dels fungicides enrasat amb acetonitril per posar-ho a la mateixa concentració que la solució de les triazines. Per saber el volum a agafar de la solució de 100 ppm per preparar la de 10 ppm es fa el següent càlcul:

$$2 \text{ ml} * \frac{10 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} * \frac{1000 \text{ mL}}{100 \text{ mg}} * \frac{1000 \text{ }\mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 200 \text{ }\mu\text{L dió. 100 ppm}$$

La solució de les triazines i dels fungicides de 10 ppm es dilueixen per separat a 100 ppb, la primera enrasada en metanol i la segona en acetonitril i, posteriorment, un patró de 1 ppb contenint tant les triazines com els fungicides en metanol. La quantitat de patró i aigua MilliQ preparades per cada dilució es mostra a la taula 8.

Taula 8. Dilucions fetes per preparar el patró de 1 ppb

NUM. DILUCIÓ	CONCENTRACIÓ INICIAL	CONCENTRACIÓ FINAL	VOLUM PATRÓ (μL)	VOLUM FINAL (mL)
1	10 mg/L	100 $\mu\text{g/L}$	20	2
2	100 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	20	2

3.3.5. Gestió de residus

Un cop analitzats els patrons i les mostres es llença el contingut de cadascun dels vials. Com que la major part del contingut dels vials és aigua es poden llençar per la pica.

Els vials utilitzats es llencen al contenidor de vidre mentre que el tap que porten per tancar el recipient es llença al contenidor de plàstic.

Quan no tenim prou quantitat dels eluents utilitzats per dur a terme les anàlisis es llença el que falta per gastar i es preparen de nou. El eluent A es pot llençar per la pica ja que la major part és aigua i el eluent B, que conté metanol, s'aboca en un altre recipient que s'utilitzarà com a metanol de neteja.

Els guants que s'han utilitzat per manipular els reactius es llencen a un contenidor específic per llençar els guants de làtex.

4. Resultats, càlculs i discussió

Una validació d'un mètode analític¹¹ consisteix en una verificació de determinats paràmetres d'un mètode en la que els requisits especificats per aquests demostren que el mètode és idoni per un ús previst. En aquest mètode s'identificarà el temps de retenció de cada anàlit i s'avaluarà el límit de detecció (LOD), el límit de quantificació (LOQ), la precisió, la veracitat i la incertesa que acompanya al resultat. Això servirà per veure si els resultats obtinguts són adequats pel mètode analític i que ens cal esperar de cara a analitzar futures mostres.

4.1. Identificació dels anàlits

Com s'ha comentat a l'apartat 3.2.1 cal establir un mètode d'adquisició per tal de que el programari pugui analitzar i adquirir les dades que s'obtenen. Les dades establertes són les mencionades a l'apartat 3.1 tant per al cromatògraf líquid com per a l'espectròmetre de masses.

Tal com s'ha comentat a l'apartat 3.1.2 s'optimitzen uns valors de *declustering potential* (DP), *collision energy* (CE) i *collision cell exit potential* (CXP) per a cada transició de cada anàlit. En aquest cas només s'optimitzen les dades dels fungicides i insecticides ja que les dades dels herbicides ja estaven optimitzades. En canvi, no s'estableix un temps de retenció per als anàlits perquè és necessari saber el temps exacte en que surt cada anàlit amb les condicions aplicades.

Per això es deixa la columna en blanc, s'estableixen les altres condicions, ja que aquestes són fixes, i es fa un anàlisi per veure els temps de retenció de cada anàlit, en que el programa SCIEX OS els identifica.

El temps de retenció és el temps que tarda un anàlit en anar des del punt de la injecció fins al detector.

Un cop acabada l'anàlisi el programa SCIEX OS mostra els temps de retenció de cada anàlit, que són els mostrats a la taula 10.

Taula 10. Temps de retenció obtingut per cada anàlit

COMPOST	TEMPS RETENCIÓ (min)
Atrazina	9.29
Desetilatrazina	7.04
Desisopropilatrazina	6.16
Cianazina	7.91
Diuron	9.33
Prometryn	10.92
Propazina	10.17
Sebutilazina	10.05
Simazina	8.31
Terbutilazina	10.34
Terbutryn	11.06
Azoxitrobina	10.20
Carbendazima	6.58
Dimetomorf	10.32
Imidacloprid	6.12
Tiabendazol	7.30

Observant els resultats de la taula 10, la diferència entre els temps de retenció de tots els compostos és menor i el programa SCIEX OS els identifica perfectament. Un cop determinats els temps de retenció de cada anàlit, es corregeixen les dades inicials establertes dels temps de retenció pels valors donats per cada anàlit. La taula completa de les dades optimitzades per cada anàlit es troba als annexos (veure taula 40).

4.2. Càlcul del límit de detecció i del límit de quantificació

El límit de detecció (LOD)¹⁰ és la concentració o quantitat real d'anàlit present en el material objecte que, amb una probabilitat (1- α), porta a la conclusió de que la concentració o quantitat d'anàlit és major en el material analitzat que en el material de referència.

El límit de quantificació (LOQ)¹⁰ és una característica del funcionament del mètode que se sol expressar com senyal del valor de la mesura que produirà estimacions amb una desviació estàndard relativa generalment del 10%.

Per poder calcular el límit de detecció i de quantificació és necessari trobar la mitjana i la desviació estàndard d'una sèrie de resultats obtinguts per un estudi d'un patró de baixa concentració. És necessari realitzar entre 6 i 10 repeticions de l'anàlisi del patró de més baixa concentració per poder calcular-los.

La mitjana (\bar{x}) és igual a la suma de tots els valors d'una mostra o mesura dividit pel nombre de lectures.

$$\bar{x} = \frac{\sum_n x_i}{n}$$

La desviació estàndard (s) es calcula com el promig de la distància entre els valors obtinguts respecte de la mitjana (\bar{x}).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Per tal de poder determinar experimentalment el LOD i el LOQ, es realitza l'anàlisi de 10 patrons de 1 ppt, que és el patró de mínima concentració utilitzada.

Per al cas de l'atrazina, els valors obtinguts d'àrea són els mostrats a la taula 11. Els valors de les àrees obtingudes s'obtenen en unitats de recomptes per segon (cps), ja que es mesura la intensitat de la radiació i expressa un valor per unitat de temps registrada per un instrument que monitoritza la radiació.

Taula 11. Valors d'àrea obtinguda de l'atrazina

DETERMINACIÓ	ÀREA OBTINGUDA
1	175870
2	76850
3	74765
4	89278
5	81696
6	72516
7	173060
8	90044
9	117678
10	98144

Com s'observa a la taula 11 es pot veure que els valors de les determinacions 1 i 7 donen aproximadament el doble respecte la resta de valors obtinguts. Pels altres anàlisis també passa el mateix, per tant, aquests valors es rebutgen i es calcula el LOD i LOQ amb 8 valors per a tots els anàlisis.

La mitjana i la desviació estàndard dels resultats obtinguts de les àrees dels pics de cada compost són els que es mostren a la taula 12.

Taula 12. Mitjanes i desviacions estàndard de les àrees obtingudes per a cada anàlit

COMPOST	MITJANA ÀREA	DESVIACIÓ ESTÀNDARD ÀREA
Atrazina	87621	14963
Desetilatrazina	47950	6460
Desisopropilatrazina	8212	2061
Cianazina	32892	5078
Diuron	32102	3392
Prometryn	232786	46037
Propazina	92171	13029
Sebutilazina	100444	14765
Simazina	25327	3703
Terbutilazina	127067	21507
Terbutryn	362377	63175
Azoxitrobina	537183	83755
Carbendazima	695947	105665
Dimetomorf	74424	13352
Imidacloprid	27611	3098
Tiabendazol	197310	31647

Per poder calcular el límit de detecció i el límit de quantificació de cada anàlit s'apliquen les següents fórmules:

$$LOD = 2 * t_{(1-\alpha;v)} * S_0 \qquad LOQ = 10 * S_0$$

On t (95%. $n=8$) = 1.860 segons el valor trobat a les taules que es troben als annexos (veure figura 23) i S_0 és 14963 per l'atrazina.

Es fa el càlcul amb les desviacions estàndard dels valors trobats i, posteriorment, es fa una regla de tres per obtenir els límits en concentració.

Aplicant les fórmules anteriors:

$$LOD (\text{àrea}) = 2 * 1.812 * 14963 = 55664 \qquad LOQ (\text{àrea}) = 10 * 14963 = 149630$$

Per aquests valors de LOD i LOQ cal fer una regla de tres per trobar-ne la concentració.

<u>Concentració (ppt)</u>	<u>Àrea</u>
1	87621
x (LOD)	55664
y (LOQ)	149634

$$LOD(x) = \frac{55664 * 1}{87621} = 0.64 \text{ ppt} \qquad LOQ(y) = \frac{149634 * 1}{87621} = 1.71 \text{ ppt}$$

Aquests càlculs es fan per la resta de compostos i s'obtenen els valors mostrats a la taula 13.

Taula 13. LOD i LOQ calculats a una concentració de 1 ppt per cada anàlit

COMPOST	LÍMIT DE DETECCIÓ (ppt)	LÍMIT DE QUANTIFICACIÓ (ppt)
Atrazina	0.64	1.71
Desetilatrazina	0.50	1.35
Desisopropilatrazina	0.93	2.51
Cianazina	0.57	1.54
Diuron	0.39	1.06
Prometryn	0.74	1.98
Propazina	0.53	1.41
Sebutilazina	0.55	1.47
Simazina	0.54	1.46
Terbutilazina	0.63	1.69
Terbutryn	0.65	1.74
Azoxitrobina	0.58	1.56
Carbendazima	0.56	1.52
Dimetomorf	0.67	1.79
Imidacloprid	0.42	1.12
Tiabendazol	0.60	1.60

Per tal que el mètode pugui detectar i quantificar els anàlits, el valor de concentració del patró preparat ha de ser superior al LOD i LOQ, respectivament. Com que en aquest cas aquesta concentració és d'1 ppt, aquí els anàlits es poden detectar però no es poden quantificar.

Per tal de que es puguin quantificar els anàlits cal fer el mateix que en el patró de 1 ppt però amb un patró de concentració major. Es va fer la mateixa prova que abans però amb un patró de concentració de 5 ppt realitzant 10 repeticions. Els valors obtinguts de l'àrea mitjana i la seva desviació estàndard i els valors calculats de LOD i LOQ són els mostrats a la taula 14.

Taula 14. Valors de LOD i LOQ obtinguts a una concentració de 5 ppt

COMPOST	MITJANA ÀREA	DESVIACIÓ ESTÀNDARD ÀREA	LÍMIT DE DETECCIÓ (ppt)	LÍMIT DE QUANTIFICACIÓ (ppt)
Atrazina	394092	28871	1.33	3.66
Desetilatrazina	206186	11279	0.99	2.74
Desisopropilatrazina	29080	2723	1.70	4.68
Cianazina	148333	9885	1.21	3.33
Diuron	127347	9159	1.30	3.60
Prometryn	1049125	61405	1.06	2.93
Propazina	381870	30771	1.46	4.03
Sebutilazina	440116	31424	1.29	3.57
Simazina	110772	7252	1.19	3.27
Terbutilazina	554893	31695	1.03	2.86
Terbutryn	1635394	108299	1.20	3.31
Azoxitrobina	2236125	151072	1.22	3.38
Carbendazima	2560134	161623	1.14	3.16
Dimetomorf	317405	20013	1.14	3.15
Imidacloprid	97024	5397	1.01	2.78
Tiabendazol	870866	68591	1.43	3.94

Com s'observa en els resultats de la taula anterior, a diferència dels resultats obtinguts en el patró de 1 ppt, es pot dir que a una concentració de 5 ppt de patró sí que es poden detectar i quantificar els anàlits presents.

Per a la desisopropilatrazina dona un valor de LOQ proper a 5 ppt i podria ser que el mínim valor de l'interval de linealitat de la desisopropilatrazina no sigui 5 ppt. Aquest fet es comprovarà posteriorment amb els càlculs de la precisió, veracitat i incertesa del mètode.

Per ara, s'estableix un valor mínim general de concentració de 5 ppt per dur a terme l'anàlisi.

4.3. Determinació de l'interval de linealitat

Un cop trobat el límit de detecció (LOD) i de quantificació (LOQ) es confirma l'interval de linealitat¹⁰ de la recta de calibratge.

La linealitat és la capacitat d'un mètode d'anàlisi de donar resultats instrumentals que siguin proporcionals a la quantitat d'anàlit, dins d'un interval determinat i que s'ha de determinar en les mostres de laboratori. Per establir la linealitat del mètode cal un mínim de 4 patrons per analitzar.

És necessari que la concentració dels patrons cobreixin tot l'interval i no agafar molts punts a concentracions baixes i pocs punts a concentracions altes, per tal de tenir suficient informació en tot l'interval de linealitat.

Per això es prepara una sèrie de patrons de concentracions 5, 10, 20, 50, 100 i 200 ppt. Un cop realitzat l'anàlisi cromatogràfica cal obtenir la recta de calibratge i els valors del pendent, l'ordenada a l'origen coeficient de correlació (r) i de determinació (r²).

L'expressió de la equació de la recta és:

$y = m \cdot x + n$, on m és el pendent de la recta, x és la concentració, y és la variable mesurada i n és l'ordenada a l'origen.

El pendent (m) és el quocient entre el canvi en la indicació d'un sistema de mesura i el canvi corresponent en el valor de la quantitat objecte de la mesura.

$$m = \frac{\sum X_i Y_i - (\sum X_i \sum Y_i / n)}{\sum X_i^2 - ((\sum X_i)^2 / n)}$$

L'ordenada a l'origen (n) és el valor que correspon al punt de tall amb el eix y.

El coeficient de correlació (r) indica el grau de relació entre la concentració (variable x) i la resposta (variable y). El coeficient de correlació pot prendre valors de -1 a 1. Quan r pren els valors límits -1 o 1 indica que té una correlació perfecte entre la variable x i y. Quan r és 0 no hi ha correlació.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 * \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

El coeficient de determinació (r²) se sol emprar per determinar la qualitat de la regressió i representa el percentatge de la variància total. Els valors oscil·len entre 0 i 1 i és el quadrat del valor del coeficient de correlació (r). Perquè un model sigui acceptat, tant els coeficients de correlació com de determinació han d'estar per sobre de 0,99 en valor absolut.

El programari SCIEX OS facilita dues rectes de calibratge, tal i com s'observa a la figura 19, per un mateix compost en que la corba blava correspon a la corba quantitativa i primera transició de l'anàlisi i la corba rosa correspon a la corba qualitativa i segona transició establerta.

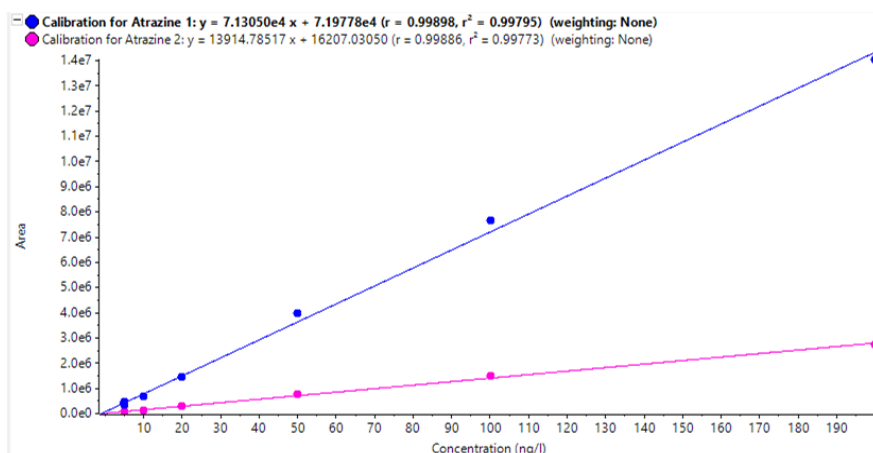


Figura 19. Rectes de calibratge quantitativa i qualitativa de l'atrazina

La segona transició no cal tenir-la en compte pels càlculs ja que indica la presència de cadascun dels anàlits. Per tant, només cal tenir en compte la corba blava, ja que pertany a l'anàlisi quantitatiu.

Es preparen els patrons de la recta de calibratge obtenint els valors de pendent, ordenada a l'origen i coeficient de determinació (r^2) mostrats a la taula 15.

Taula 15. Valors dels coeficients de la recta per cada anàlit

COMPOST	Pendent	Ordenada origen	Coeficient de determinació (r^2)
Atrazina	71305	71978	0,9980
Desetilatrazina	35243	46702	0,9984
Desisopropilatrazina	4413	12003	0,9920
Cianazina	30563	-6378	0,9998
Diuron	23008	20128	0,9985
Prometryn	202231	67548	0,9994
Propazina	72284	39838	0,9992
Sebutilazina	78950	100364	0,9963
Simazina	20908	13892	0,9987
Terbutilazina	105975	62444	0,9987
Terbutryn	308027	272102	0,9973
Azoxitrobina	431130	198514	0,9989
Carbendazima	448600	551409	0,9978
Dimetomorf	63093	16703	0,9993
Imidacloprid	20095	-7515	0,9999
Tiabendazol	168621	99105	0,9984

Els coeficient de determinació de tots els anàlits estan per sobre de 0,99 i, per tant, s'accepta el model.

4.4. Veracitat i precisió

Un cop s'ha obtingut el LOD, LOQ i l'interval de linealitat de cadascun dels anàlits s'estudia la màxima dispersió en els resultats obtinguts (precisió intermèdia)¹⁰.

La màxima dispersió en els resultats obtinguts es pot realitzar de diverses maneres: variar l'analista, el material utilitzat, les condicions de treball, etc. En aquest cas es varia els dies que es duu a terme l'anàlisi i durant 10 dies s'estudia la precisió en termes de reproductibilitat, la veracitat i la incertesa dels resultats obtinguts.

La precisió es pot establir en termes de repetibilitat i reproductibilitat.

La repetibilitat són les condicions en que els resultats s'obtenen amb el mateix mètode, és a dir, amb les mateixes eines, en el mateix laboratori i dut a terme pel mateix operador utilitzant el mateix equip en intervals curts de temps.

La reproductibilitat, que és la que s'aplicarà en aquest cas, són les condicions on els resultats s'obtenen amb el mateix mètode però en condicions diferents, és a dir, de laboratori, diferents operadors, diferents equips, etc. Com s'ha comentat, en aquest cas, es varien els dies d'anàlisi.

La veracitat és el grau de concordança entre el resultat d'un assaig i el valor de referència.

Per poder explicar la precisió i la veracitat de resultats obtinguts en un laboratori, s'utilitza l'exemple d'una diana com les que s'utilitza per tirar amb arc.

Tal com mostra la figura 20, el centre de la diana indica el punt més alt de precisió i exactitud entre els resultats obtinguts, ja que és el punt del valor esperat. Això vol dir que com més lluny estiguin aquests punts del centre més baixa serà la exactitud i com més dispersos siguin els resultats més baixa serà la precisió.

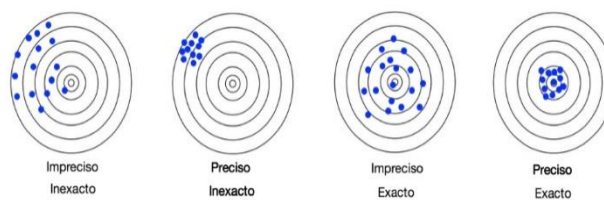


Figura 20. Exemple d'exactitud i precisió. Font: Ministerio de Educación y Formación Profesional-INTEF.

En aquest apartat es calcularà la precisió i la veracitat en unitats de percentatge, tal i com ho calculen a l'empresa.

4.4.1. Càlcul de la precisió

Es troba la precisió en els resultats a nivells de concentració baixos, mitjans i alts de l'interval de linealitat. Els nivells de concentració estudiats són a 5, 50, 100 i 200 ppt.

Les àrees trobades a cada nivell de concentració per cada dia d'anàlisi es mostren a la taula 16.

Taula 16. Valors d'àrea d'atrazina obtinguts per cada dia d'anàlisi

DIA	ÀREA PATRONS			
	5 ppt	50 ppt	100 ppt	200 ppt
1 (15/3/22)	339128	4114364	8277407	14912845
2 (16/3/22)	390589	3508680	7731668	13994782
3 (17/3/22)	367427	4153423	7920891	15264698
4 (18/3/22)	437853	4819982	9478732	17620117
5 (21/3/22)	481768	5181252	10749828	19582130
6 (22/3/22)	499648	4906006	9491086	18750822
7 (23/3/22)	443500	3894243	9950290	17838193
8 (24/3/22)	366729	3792010	7425641	14877346
9 (25/3/22)	405911	4552454	8776034	17100242
10 (28/3/22)	414908	4444373	9279570	18634449

Cada dia en que s'ha fet l'estudi de la reproductibilitat, s'han analitzat també els patrons de la recta de calibratge. Els valors donats de la recta de calibratge del primer dia d'anàlisi es mostren a la taula 17.

Taula 17. Coeficients de la recta de calibratge per cada anàlit

COMPOST	Pendent	Ordenada origen
Atrazina	66037.9	277981.4
Desetilatrazina	34303.7	135477.4
Desisopropilatrazina	4405.5	22576.2
Cianazina	26889.2	135742.9
Diuron	24322.2	101754.7
Prometrina	170458.3	938482.4
Propazina	67818.6	272439.6
Sebutilazina	77074.1	287680.8
Simazina	19627.3	86982.1
Terbutilazina	98794.1	331832.8
Terbutrina	283983.8	1274851.5
Azoxitrobina	423207.0	1243112.3
Carbendazima	437519.5	1417648.2
Dimetomorf	60542.3	211783.0
Imidacloprid	18986.0	57903.9
Tiabendazol	173570.1	93459.2

Per veure que no hi ha diferències significatives entre els resultats, es calcula el coeficient de variació percentual, definit com el resultat de la desviació estàndard dividit per la mitjana.

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Els valors obtinguts per cada dia amb la corresponent mitjana, desviació estàndard i coeficient de variació calculats es mostren a la taula 18.

Taula 18. Valors de concentració per cada dia d'anàlisi i valors calculats del coeficient de variació (CV)

DIA	5 ppt	50 ppt	100 ppt	200 ppt
1 (15/3/22)	0.93	58.09	121.13	221.61
2 (16/3/22)	2.12	44.70	102.36	187.88
3 (17/3/22)	4.94	50.26	95.35	183.24
4 (18/3/22)	1.58	51.02	103.57	195.41
5 (21/3/22)	5.62	55.20	113.96	207.15
6 (22/3/22)	3.39	51.26	101.08	201.67
7 (23/3/22)	5.65	44.28	112.07	200.36
8 (24/3/22)	4.51	55.18	108.93	219.15
9 (25/3/22)	2.75	54.41	107.04	210.75
10 (28/3/22)	5.09	51.87	108.00	216.60
Mitjana (\bar{X})	3.66	51.63	107.35	204.38
Desviació estàndard (s)	1.74	4.47	7.31	13.06
Coeficient de variació (CV (%))	47.57	8.65	6.81	6.39

El resultat obtingut es compara amb un coeficient tabulat anomenat *coeficient de variació de Horwitz*.

El coeficient de variació de Horwitz (CV_h) prediu la desviació estàndard de reproductibilitat en funció de la concentració.

Agafant una sèrie de dades s'observa que el coeficient de variació dels valors mitjans pels diferents laboratoris augmenta quan disminueix la concentració d'anàlit, comportant-se com es pot veure a la gràfica de la figura 21 mostrada a continuació:

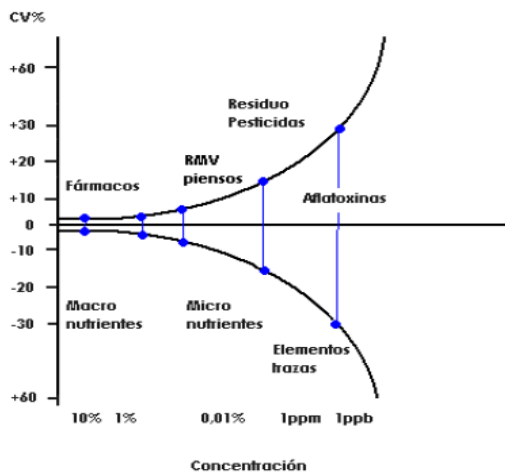


Figura 21. Variació del CV en front la concentració. Font: Validación de Métodos y Determinación de La Incertidumbre de La Medición: "Aspectos Generales Sobre La Validación de Métodos".

L'equació utilitzada per calcular el coeficient de variació de Horwitz és la següent:

$$CV_h(\%) = 2^{1-0.5 \cdot \log C}$$

On c és el valor nominal de l'anàlit expressat en potència de 10. Exemple: $1 \text{ mg/L} = 10^{-6}$.

Per la reproductibilitat interlaboratori: $CV_R(\%) < CV_h(\%)$. Per la reproductibilitat interna (intralaboratori): $CV_{Ri}(\%) < (2CV_h\%/3)$.

Per tant, per calcular el coeficient de variació percentual de Horwitz s'ha d'aplicar l'equació següent:

$$CV_{hRi}(\%) = \frac{2 * 2^{1-0.5 \cdot \log C}}{3}$$

La *reproductibilitat d'intralaboratori* és la precisió dins un laboratori utilitzant un mètode en concret. La *reproductibilitat d'interlaboratori* és la reproductibilitat quan participen diferents laboratoris utilitzant el mateix mètode en un interval de temps establert.

En tots els compostos el coeficient de variació percentual de Horwitz a 5 ppt serà el mateix, igual que serà a 50, 100 i 200 ppt. Aplicant la fórmula anterior a cada concentració s'obté els següents valors:

$$C_1 = 5 \text{ ppt} = 5 \text{ ng/L} = 5 * 10^{-9} \rightarrow CV_{hRi}(\%) = 23.7 \%$$

$$C_2 = 50 \text{ ppt} = 50 \text{ ng/L} = 5 * 10^{-8} \rightarrow CV_{hRi}(\%) = 16.7 \%$$

$$C_3 = 100 \text{ ppt} = 100 \text{ ng/L} = 1 \cdot 10^{-7} \rightarrow CV_{\text{hRi}}(\%) = 15.1 \%$$

$$C_4 = 200 \text{ ppt} = 200 \text{ ng/L} = 2 \cdot 10^{-7} \rightarrow CV_{\text{hRi}}(\%) = 13.6 \%$$

Si es comparen aquests valors amb els obtinguts es pot veure que el coeficient de variació percentual a 5 ppt és més gran que el coeficient de variació de Horwitz. Això és degut a que els resultats són més dispersos a aquesta concentració mentre que a 50, 100 i 200 ppt no són tan dispersos i fa que el coeficient de variació percentual estigui per sota del coeficient de variació de Horwitz.

També és degut a que la recta final depèn més dels valors grans de concentració que no pas dels valors petits. Com que ens interessa que el pes de la recta recaigui majoritàriament per valors petits que per valors grans de concentració, porta a establir un tipus de ponderació tal i com s'ha comentat a l'apartat 3.2.2 S'agafa el tipus de ponderació $w=1/x$ i fa variar els coeficients de la recta sense variar els resultats obtinguts de l'àrea per cada concentració.

El programa SCIEX OS et dona els coeficients pel tipus de ponderació⁹ escollit però es poden calcular de la següent manera:

$$Pendent(m) = \left(\sum w \sum wxy - \sum wx \sum wy \right) / D_x$$

$$Ordenada \text{ origen } (b) = \left(\sum wx^2 \sum wy - \sum wx \sum wxy \right) / D_x$$

En que,

x: valor de concentració de cada patró utilitzat per la recta de calibratge.

y: valor d'àrea obtinguda de cada patró utilitzat per la recta de calibratge.

w: factor de ponderació de cada patró. En aquest cas apliquem un factor $w=1/x$.

D_x : factor que es calcula amb la fórmula següent: $D_x = \sum w \sum wx^2 - (\sum wx)^2$

Per cada dia que s'ha fet l'anàlisi dels patrons s'ha aplicat les fórmules anteriors per trobar el pendent i l'ordenada a l'origen. El factor de ponderació calculat es troba a la taula 19.

Taula 19. Factor de ponderació calculat a cada concentració

Concentració actual (ppt) (x)	Àrea (y)	Factor ponderació (w)
5	220805	0.2
10	822644	0.1
20	1578325	0.05
50	3834912	0.02
100	7511183	0.01
200	13124602	0.005

Per trobar D_x s'utilitza la fórmula mencionada anteriorment i els valors de la taula obtenint un valor de 112.225. Amb aquest valor ja es pot trobar el pendent i l'ordenada a l'origen amb les fórmules mencionades anteriorment. Els valors es mostren a la taula 20.

Taula 200. Valors de pendent i ordenada a l'origen pels diferents anàlits

COMPOST	Pendent	Ordenada origen
Atrazina	70340.4	1901.9
Desetilatrazina	36333.3	5247.1
Desisopropilatrazina	4637	7718.8
Cianazina	28829.7	11227.2
Diuron	25858.2	3194.5
Prometrina	183982	70711.5
Propazina	71804.6	16669.2
Sebutilazina	81446.7	7102.3
Simazina	20873.9	6988.3
Terbutilazina	104564.4	-38426.2
Terbutrina	303582.2	17291.7
Azoxitrobina	443574.9	-63830
Carbendazima	457715.3	121750.7
Dimetomorf	63853.4	-677.8
Imidacloprid	19677.2	13549.7
Tiabendazol	177459.8	-156123.9

Aquestes dades corresponen al primer dia de l'estudi de la precisió. Aquest procés s'ha repetit cada dia. Els coeficients de la taula 20 s'utilitzen per trobar la concentració a cada nivell de concentració. Els resultats de concentració que s'obtenen per cada dia de l'estudi de la precisió són els mostrats a la taula 21 pel cas de l'atrazina.

Taula 21. Valors millorats de concentració (ppt) mitjançant la recta ponderada

DIA	5 ppt	50 ppt	100 ppt	200 ppt
1 (15/3/22)	4.79	58.47	117.65	211.98
2 (16/3/22)	4.25	45.37	101.05	183.63
3 (17/3/22)	4.54	50.16	95.56	184.04
4 (18/3/22)	5.16	52.27	102.36	189.88
5 (21/3/22)	5.72	55.22	113.88	206.91
6 (22/3/22)	5.05	51.62	100.07	197.92
7 (23/3/22)	5.00	44.06	112.60	201.87
8 (24/3/22)	4.86	55.23	108.67	218.24
9 (25/3/22)	4.46	54.68	105.85	206.68
10 (28/3/22)	5.44	51.94	107.74	215.70
Mitjana (\bar{x})	4.93	51.90	106.54	201.69
Desviació estàndard (s)	0.45	4.48	6.92	12.56
Coefficient de variació (CV (%))	9.09	8.63	6.49	6.23

Observant els valors donats i comparant amb els valors calculats de CV a la taula de l'atrazina, es compleix el criteri d'acceptabilitat establert, ja que el valor del coeficient de Horwitz és major que el coeficient calculat amb les dades obtingudes.

S'aplica el procediment anterior per a la resta de compostos obtenint els valors de la taula 22 pel que fa a mitjana i desviació estàndard dels 10 dies d'anàlisi per tots els anàlits.

Taula 22. Valors de mitjana i desviació estàndard per cada anàlit a cada nivell de concentració

COMPOST	5 ppt		50 ppt		100 ppt		200 ppt	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Atrazina	4.93	0.45	51.90	4.48	106.54	6.92	201.69	12.56
Desetilatrazina	4.82	0.45	53.23	3.69	107.92	6.04	199.60	13.27
Desisopropilatrazina	4.95	0.89	52.88	4.08	108.25	4.63	197.44	15.41
Cianazina	5.12	0.60	50.45	5.87	104.67	6.93	206.54	13.00
Diuron	4.96	0.51	52.42	3.80	104.47	6.33	202.51	12.74
Prometrina	5.18	0.41	50.97	5.09	105.53	7.80	204.80	12.58
Propazina	5.13	0.39	52.05	4.69	105.57	5.63	202.75	12.37
Sebutilazina	4.99	0.54	51.38	4.72	105.97	6.32	202.14	11.68
Simazina	4.93	0.51	52.14	4.30	105.51	5.80	201.37	13.27
Terbutilazina	5.13	0.44	51.97	4.92	105.48	6.96	203.11	14.32
Terbutrina	5.14	0.38	51.29	5.25	105.60	6.16	204.35	13.15
Azoxitrobina	4.88	0.36	52.51	3.50	105.24	6.28	201.82	12.82
Carbendazima	4.70	0.52	55.38	2.61	106.95	6.01	199.25	15.62
Dimetomorf	4.83	0.38	51.82	3.73	104.13	6.77	201.92	13.09
Imidacloprid	5.11	0.57	51.32	3.67	103.63	6.99	205.91	12.02
Tiabendazol	4.86	0.57	56.11	5.15	105.05	6.16	201.58	17.09

Un cop obtinguts els resultats de la mitjana i desviació estàndard per cadascun dels anàlits es troba el coeficient de variació percentual a cada nivell de concentració fent el mateix que en el cas de l'atrazina obtenint els valors de la taula 23.

Taula 23. Coeficients de variació percentual calculats per cada anàlit

COEFICIENTS DE VARIACIÓ PERCENTUAL (%)				
COMPOST	5 ppt	50 ppt	100 ppt	200 ppt
Atrazina	9.1	8.6	6.5	6.2
Desetilatrazina	9.3	6.9	5.6	6.6
Desisopropilatrazina	17.9	7.7	4.3	7.8
Cianazina	11.7	11.6	6.6	6.3
Diuron	10.2	7.2	6.1	6.3
Prometrina	7.9	10.0	7.4	6.1
Propazina	7.7	9.0	5.3	6.1
Sebutilazina	10.8	9.2	6.0	5.8
Simazina	10.3	8.3	5.5	6.6
Terbutilazina	8.5	9.5	6.6	7.0
Terbutrina	7.5	10.2	5.8	6.4
Azoxitrobina	7.4	6.7	6.0	6.3
Carbendazima	11.1	4.7	5.6	7.8
Dimetomorf	7.8	7.2	6.5	6.5
Imidacloprid	11.2	7.2	6.7	5.8
Tiabendazol	11.8	9.2	5.9	8.5

Els valors obtinguts és el resultat de l'error aleatori. Amb els valors obtinguts es pot dir que es compleix el criteri d'acceptabilitat establert per tots els anàlits ja que el valor de cada CV és inferior al CV de Horwitz en cada concentració.

4.4.2. Càlcul de la veracitat

El biaix és la diferència entre la mitjana d'una sèrie de resultats i el valor esperat. El biaix és el error sistemàtic total en contraposició a l'error aleatori. En aquest cas el valor esperat és cadascuna de les concentracions estudiades (5, 50, 100 i 200 ppt). Els resultats del biaix a cada nivell de la concentració per cada dia es mostren a la taula 24.

Taula 24. Biaix a cada nivell de concentració de l'atrazina per a cada dia d'anàlisi

ATRAZINA								
Dia	5 ppt	Biaix 5	50 ppt	Biaix 50	100 ppt	Biaix 100	200 ppt	Biaix 200
1	4.79	0.21	58.47	8.47	117.65	17.65	211.98	11.98
2	4.25	0.75	45.37	4.63	101.05	1.05	183.63	16.37
3	4.54	0.46	50.16	0.16	95.56	4.44	184.04	15.96
4	5.16	0.16	52.27	2.27	102.36	2.36	189.88	10.12
5	5.72	0.72	55.22	5.22	113.88	13.88	206.91	6.91
6	5.05	0.05	51.62	1.62	100.07	0.07	197.92	2.08
7	5.00	0.00	44.06	5.94	112.60	12.60	201.87	1.87
8	4.86	0.14	55.23	5.23	108.67	8.67	218.24	18.24
9	4.46	0.54	54.68	4.68	105.85	5.85	206.68	6.68
10	5.44	0.44	51.94	1.94	107.74	7.74	215.70	15.70

Per trobar l'error en el biaix es fa la mitjana del biaix obtingut cada dia i es divideix pel valor de la concentració. S'expressa en tant per cent.

$$5 \text{ ppt} \rightarrow \text{Mitjana biaix} = 0.3462; \text{Error (\%)} = \frac{0.3462}{5} * 100 = 6.9\%$$

$$50 \text{ ppt} \rightarrow \text{Mitjana biaix} = 4.0168; \text{Error (\%)} = \frac{4.0168}{50} * 100 = 8.0 \%$$

$$100 \text{ ppt} \rightarrow \text{Mitjana biaix} = 7.4290; \text{Error (\%)} = \frac{7.4290}{100} * 100 = 7.4\%$$

$$200 \text{ ppt} \rightarrow \text{Mitjana biaix} = 10.5913; \text{Error (\%)} = \frac{10.5913}{200} * 100 = 5.3\%$$

Un cop trobat l'error en el biaix la diferència en percentatge correspon a la veracitat:

$$5 \text{ ppt} \rightarrow \text{Veracitat (\%)} = 100 - 6.9 = 93.1 \%$$

$$50 \text{ ppt} \rightarrow \text{Veracitat (\%)} = 100 - 8.0 = 92 \%$$

$$100 \text{ ppt} \rightarrow \text{Veracitat (\%)} = 100 - 7.4 = 92.6 \%$$

$$200 \text{ ppt} \rightarrow \text{Veracitat (\%)} = 100 - 5.3 = 94.7 \%$$

Es repeteix els mateixos càlculs per la resta de compostos analitzats obtenint els resultats de mitjana del biaix de la taula 25.

Taula 25. Mitjana calculada del biaix de cada anàlit

COMPOST	5 ppt	50 ppt	100 ppt	200 ppt
Atrazina	0.3462	4.0168	7.4290	10.5913
Desetilatrazina	0.3513	4.3469	8.6553	10.3122
Desisopropilatrazina	0.7268	3.9851	8.4156	12.6536
Cianazina	0.4964	4.3862	6.2688	12.4277
Diuron	0.4573	3.6731	6.8627	11.0969
Prometrina	0.3657	3.8962	7.6798	11.7327
Propazina	0.3313	4.2948	6.3430	9.8126
Sebutilazina	0.4423	3.8352	6.8223	13.4152
Simazina	0.4257	4.0752	6.3751	11.0612
Terbutilazina	0.3594	4.4830	7.2812	12.0810
Terbutrina	0.3385	4.1287	6.5528	11.8505
Azoxitrobina	0.3154	3.5464	6.7200	10.7542
Carbendazima	0.4632	5.3795	8.2789	12.6715
Dimetomorf	0.3218	3.2947	6.6998	10.4949
Imidacloprid	0.4653	2.8874	6.3886	10.7548
Tiabendazol	0.5119	6.1123	6.7600	14.2707

Com en el cas de l'atrazina es divideix cada valor de la mitjana del biaix per la concentració i multiplicant per 100 per trobar el percentatge d'error en el biaix. La diferència correspon a la veracitat, resultats que es mostren a la taula 26.

Taula 26. Valors de veracitat calculats per cada anàlit

COMPOST	5 ppt	50 ppt	100 ppt	200 ppt
Atrazina	93.1	92.0	92.6	94.7
Desetilatrazina	93.0	91.3	91.3	94.8
Desisopropilatrazina	85.5	92.0	91.6	93.7
Cianazina	90.1	91.2	93.7	93.8
Diuron	90.8	92.6	93.1	94.4
Prometrina	92.7	92.2	92.3	94.1
Propazina	93.4	91.4	93.7	95.1
Sebutilazina	91.1	92.3	93.2	93.3
Simazina	91.5	91.8	93.6	94.5
Terbutilazina	92.8	91.0	92.7	94.0
Terbutrina	93.2	91.7	93.4	94.1
Azoxitrobina	93.7	92.9	93.3	94.6
Carbendazima	90.7	89.2	91.7	93.7
Dimetomorf	93.6	93.4	93.3	94.7
Imidacloprid	90.7	94.2	93.6	94.6
Tiabendazol	89.8	87.8	93.2	92.9

Els valors calculats de veracitat compleixen els requisits establerts per la legislació vigent, per tant, també es consideren vàlids.

4.5. Càlcul de la incertesa

La concentració d'anàlit d'una mostra sempre ha de tenir associada un valor d'incertesa¹⁰, que caracteritza la dispersió dels valors que poden ser atribuïts al mesurador.

Per estimar la incertesa de mesura dels mètodes químics i fisicoquímics en laboratoris individuals s'utilitza la norma ISO 11352¹², que explica les dades de validació i resultats analítics de control de qualitat obtinguts de l'anàlisi de l'aigua.

S'aplica a un conjunt de resultats d'un assaig i suposa una combinació de components aleatoris i un component comú d'error sistemàtic (o biaix).

Els errors aleatoris són aquells errors que no es poden evitar i impossibles de controlar durant el procés de mesura. Poden ser deguts a diferents factors, són difícils d'identificar i no es poden corregir. Exemple: l'error de paral·laxi, que depèn de l'observador i de la seva capacitat pel límit separador de l'ull.

Els errors sistemàtics es produeixen en totes les mesures d'igual manera. Està condicionat per algun factor diferent a l'atzar. Exemple: l'error de les masses patró del laboratori es transfereix sistemàticament quan es calibra la balança, és a dir, que és una component de l'error de mesura que es manté constant o varia de manera prevista.

A partir d'aquí es passa a calcular la incertesa en el resultat i trobem dos tipus d'incertesa:

La incertesa combinada és la combinació d'errors aleatoris i sistemàtics.

La incertesa expandida és el producte d'una incertesa estàndard combinada i d'un factor superior a 1. És necessària per incrementar el valor amb un factor de seguretat, que segons el interval de confiança elegit, cobreixi una àmplia fracció de la distribució dels valors que raonablement poden ser atribuïts al mesurador.

Es calcula la incertesa tal i com ho fan a l'empresa calculant els termes mencionats anteriorment. Per calcular la incertesa s'ha de tenir en compte els errors que s'han comès durant el procés. La incertesa és l'arrel quadrada de la suma de l'error aleatori (calculat en l'apartat de precisió) al quadrat i l'error sistemàtic al quadrat. Per calcular l'error sistemàtic cal tenir en compte l'error en el biaix calculat a l'apartat de veracitat i l'error en l'addició realitzada. El resultat final s'expressa en percentatge.

Per poder expressar l'error en el biaix calculat en percentatge cal sumar els quadrats dels biaixos calculats a partir de les dades obtingudes.

Els resultats calculats del biaix es troben a la taula 27 per al cas de l'atrazina.

Taula 27. Càlcul del sumatori dels biaixos elevats al quadrat

CONCENTRACIÓ	5 ppt		50 ppt		100 ppt		200 ppt	
	Biaix	Biaix ²	Biaix	Biaix ²	Biaix	Biaix ²	Biaix	Biaix ²
1	0.21	0.04	8.47	71.66	17.65	311.50	11.98	143.58
2	0.75	0.56	4.63	21.47	1.05	1.10	16.37	267.89
3	0.46	0.21	0.16	0.03	4.44	19.74	15.96	254.62
4	0.16	0.03	2.27	5.16	2.36	5.55	10.12	102.42
5	0.72	0.51	5.22	27.24	13.88	192.58	6.91	47.81
6	0.05	0.0028	1.62	2.61	0.07	0.0046	2.08	4.34
7	0.0044	0.00002	5.94	35.31	12.60	158.65	1.87	3.48
8	0.14	0.02	5.23	27.39	8.67	75.09	18.24	332.77
9	0.54	0.30	4.68	21.95	5.85	34.19	6.68	44.65
10	0.44	0.19	1.94	3.76	7.74	59.90	15.70	246.46
Sumatori		1.86		216.58		858.30		1448.03

Posteriorment, es calcula la desviació típica ($\sqrt{\frac{\sum \text{biaix}_i^2}{n}}$) i es divideixen per la concentració de patró i es multiplica per 100, obtenint els següents resultats en percentatge. Per últim, a aquests resultats es divideixen per la concentració i es multiplica per 100 per obtenir el valor de la incertesa en el biaix.

Taula 28. Càlcul de la desviació típica i el % corresponent

ATRAZINA	Sumatori biaix ²	$\sqrt{\frac{\sum \text{biaix}_i^2}{n}}$	$\frac{\sqrt{\frac{\sum \text{biaix}_i^2}{n}}}{\text{Concentració}} * 100$ (%)
5 ppt	1.86	0.431	8.6
50 ppt	216.58	4.654	9.3
100 ppt	858.30	9.264	9.3
200 ppt	1448.03	12.033	6.0

Es fa el mateix per la resta de compostos obtenint els resultats de la taula 29 de la incertesa del biaix.

Taula 29. Valors del % de desviació típica del biaix per cada anàlit

COMPOST	5 ppt	50 ppt	100 ppt	200 ppt
Atrazina	8.6	9.3	9.3	6.0
Desetilatrazina	9.3	9.5	9.8	6.3
Desisopropilatrazina	16.9	9.6	9.3	7.4
Cianazina	11.7	11.2	8.1	7.0
Diuron	9.7	8.7	7.5	6.2
Prometrina	8.6	9.8	9.2	6.4
Propazina	7.9	9.8	7.7	6.0
Sebutilazina	10.2	9.4	8.5	9.2
Simazina	9.8	9.2	7.8	6.3
Terbutilazina	8.7	10.1	8.6	7.0
Terbutrina	7.8	10.3	8.1	6.6
Azoxitrobina	7.2	8.3	7.9	6.1
Carbendazima	11.5	11.8	9.0	7.4
Dimetomorf	8.0	7.9	7.6	6.3
Imidacloprid	11.1	7.4	7.6	6.4
Tiabendazol	11.2	15.6	7.7	8.1

Els valors obtinguts de la taula 29 s'utilitzaran posteriorment pel càlcul de l'error sistemàtic. Falta calcular l'error en l'addició realitzada, que inclou la incertesa del patró i el material volumètric utilitzat.

Com s'ha explicat a l'apartat dels compostos a analitzar les solucions comercials que s'han utilitzat per preparar els patrons venien amb una incertesa associada ($\pm 0.5\%$). Aquesta incertesa s'ha de dividir per un valor de k que inclou el certificat, que en aquest cas és 2. Per tant l'error en el patró utilitzat és de 0.25%.

El material volumètric utilitzat també implica errors en la mesura i, per això, aquests errors es recullen en dues normes ISO1042:1998 i ISO8655-2:2002.

La norma ISO 1042:1998¹³ especifica el material, les dimensions, la designació, la construcció i els requisits metrològics (errors màxims permesos) per matrassos aforats d'una marca utilitzats per la preparació de solucions estàndard i són l'eina més important d'un químic analític, a part de la balança.

La norma ISO8655-2:2002¹⁴ especifica els requisits metrològics, els errors màxims permesos, els requisits de marcatge i la informació que s'ha de proporcionar als usuaris per a pipetes de pistó amb desplaçament d'aire (tipus A) i desplaçament positiu (tipus D).

En cada material s'especifica la tolerància màxima o l'error aleatori i sistemàtic que té el material. Aquests errors són recollits per les dues normes mencionades i es representen a la taula 30.

Taula 30. Material volumètric utilitzat i error associat

Equips	Volum (ml)	Error sistemàtic (μl)	Error aleatori (μl)	Tolerància màxima (ml)	Tolerància (%)
Matràs aforat	2			0.025	1.2%
Micropipeta	0.005	0.125	0.075	0.000145774	2.9%
Micropipeta	0.05	0.5	0.2	0.000538516	1.1%
Micropipeta	0.1	0.8	0.3	0.0008544	0.8%
Micropipeta	0.2	1.6	0.6	0.001708801	0.8%

Per calcular la tolerància màxima de l'instrument (en ml) es fa l'arrel quadrada de la suma de quadrats de l'error sistemàtic i l'error aleatori. Com que ens interessa tenir la tolerància en tant per cent es divideix cada una de les toleràncies màximes pel volum i es multiplica per 100.

Per saber la tolerància total degut a la instrumentació utilitzada per cada concentració es fa l'arrel quadrada de la suma de quadrats de les diferents toleràncies.

$$U_{\text{Volum}} = \sqrt{U_{\text{Matràs}}^2 + U_{\text{micropipeta}}^2}$$

$$5 \text{ ppt} \rightarrow U_{\text{Volum}} = \sqrt{1.2^2 + 2.9^2} = 3.2\%$$

$$50 \text{ ppt} \rightarrow U_{\text{Volum}} = \sqrt{1.2^2 + 1.1^2} = 1.6\%$$

$$100 \text{ ppt} \rightarrow U_{\text{Volum}} = \sqrt{1.2^2 + 0.8^2} = 1.5\%$$

$$200 \text{ ppt} \rightarrow U_{\text{Volum}} = \sqrt{1.2^2 + 0.8^2} = 1.5\%$$

Tant el valor de la tolerància del patró afegit com el del material utilitzat són els mateixos per tots els compostos, mentre que varia la incertesa en percentatge del biaix.

Un cop trobats els valors de percentatges d'error de cadascun dels errors de la component sistemàtica es fa de nou l'arrel quadrada de la suma de quadrats de cadascuna de les components per trobar l'error sistemàtic. Pel cas de l'atrazina en cadascuna de les concentracions es realitza el càlcul de la següent manera:

$$U_{\text{sistemàtica}} = \sqrt{U_{\text{biaix}}^2 + U_{\text{patró}}^2 + U_{\text{material}}^2}$$

$$5 \text{ ppt} \rightarrow U_{\text{sistemàtica}} = \sqrt{8.6^2 + 0.25^2 + 3.17^2} = 9.2\%$$

$$50 \text{ ppt} \rightarrow U_{\text{sistemàtica}} = \sqrt{9.31^2 + 0.25^2 + 1.65^2} = 9.5\%$$

$$100 \text{ ppt} \rightarrow U_{\text{sistemàtica}} = \sqrt{9.26^2 + 0.25^2 + 1.51^2} = 9.4\%$$

$$200 \text{ ppt} \rightarrow U_{\text{sistemàtica}} = \sqrt{6.02^2 + 0.25^2 + 1.51^2} = 6.2\%$$

Per poder calcular la incertesa combinada per cadascuna de les concentracions es fa el següent:

$$U_{\text{combinada}} = \sqrt{U_{\text{aleatori}}^2 + U_{\text{sistemàtica}}^2}$$

$$5 \text{ ppt} \rightarrow U_{combinada} = \sqrt{9.1^2 + 9.2^2} = 12.9\%$$

$$50 \text{ ppt} \rightarrow U_{combinada} = \sqrt{8.6^2 + 9.5^2} = 12.8\%$$

$$100 \text{ ppt} \rightarrow U_{combinada} = \sqrt{6.5^2 + 9.4^2} = 11.4\%$$

$$200 \text{ ppt} \rightarrow U_{combinada} = \sqrt{6.2^2 + 6.2^2} = 8.8\%$$

A aquest error se li multiplica un factor de seguretat k, que depenent del nivell de confiança aplicat va variant (figura 22). En aquest mètode es treballa a un 95,45% de confiança, que correspon a un valor de k de 2. Aplicant el càlcul es troba la incertesa expandida:

$$U_{expandida} = \pm k * U_{combinada}$$

$$5 \text{ ppt} \rightarrow U_{expandida} = 2 * 12.9 = 25.8\%$$

$$50 \text{ ppt} \rightarrow U_{expandida} = 2 * 12.8 = 25.6\%$$

$$100 \text{ ppt} \rightarrow U_{expandida} = 2 * 11.4 = 22.8\%$$

$$200 \text{ ppt} \rightarrow U_{expandida} = 2 * 8.8 = 17.6\%$$

Es fa el mateix per la resta d'anàlits obtenint els resultats de la taula 31.

Taula 31. Valors d'incertesa a cada nivell de concentració per cada anàlit

COMPOST	5 ppt	50 ppt	100 ppt	200 ppt
Atrazina	25.8	25.6	22.8	17.6
Desetilatrazina	27.0	23.8	22.7	18.6
Desisopropilatrazina	49.7	24.9	20.8	21.7
Cianazina	33.7	32.4	21.1	19.0
Diuron	28.9	22.9	19.5	17.9
Prometrina	24.2	28.3	23.9	18.0
Propazina	22.9	26.8	19.0	17.4
Sebutilazina	30.4	26.5	20.9	21.9
Simazina	29.2	25.0	19.3	18.5
Terbutilazina	25.2	27.9	21.8	20.1
Terbutrina	22.5	29.2	20.2	18.7
Azoxitrobina	21.7	21.6	20.1	17.9
Carbendazima	32.5	25.7	21.4	21.8
Dimetomorf	23.2	21.7	20.3	18.3
Imidacloprid	32.1	20.9	20.5	17.6
Tiabendazol	33.2	36.4	19.6	23.7

Si s'observa la taula 31 es pot veure que en molts anàlits els valors d'incertesa són semblants a qualsevol nivell de concentració. En canvi es pot veure en la desisopropilatrazina que el valor d'incertesa a 5 ppt s'allunya considerablement dels valors d'incertesa a més altes

Nivel de confianza p (%)	Factor de cobertura k _p
68,27	1
90	1,645
95	1,960
95,45	2
99	2,576
99,73	3

Figura 22. Factors de cobertura per cada nivell de confiança. Font: Formación Metrológica Calibración Laboratorios

concentracions. A més cal considerar segons la legislació permesa que el valor màxim d'error per una concentració estudiada sigui d'un 50% i en aquest cas no el supera però frega el límit.

Això ens porta a la conclusió que l'interval de linealitat per la desisopropilatrazina va de 10 a 200 ppt mentre que pels altres anàlisis van de 5 a 200 ppt.

4.6. Anàlisi de mostres reals

Un cop validat el model s'analitzen 5 mostres que havien arribat al laboratori. Es realitza el pretractament comentat en l'apartat 3.3.4 i s'enrasa a 1 ml en 5 vials per portar-los a analitzar. A part es preparen els patrons de la recta de calibratge (5,10,20,50,100 i 200 ppt).

Un cop analitzats els patrons s'obtenen els resultats mostrats a la taula 32 pel cas de l'atrazina.

Taula 32. Àrea obtinguda per la recta de calibratge

Concentració actual (ppt)	Àrea
5	370360
10	937390
20	1589111
50	4361467
100	9123849
200	18052935

L'equació de la recta obtinguda és: $y = 90904x - 93798$. En aquest cas no apliquem cap tipus de ponderació per una equació lineal.

Si es substitueix cadascun dels valors obtinguts de l'àrea de les mostres mostrats a la taula 33 a l'equació de la recta s'obté el valor de concentració de l'atrazina a les mostres.

Taula 33. Valors de concentració calculats d'atrazina a les mostres

Codi mostra	ATRAZINA	
	Àrea mostra	Concentració (ppt)
140392	57228	1.66
140393	193875	3.16
140397	161884	2.81
140400	22684	1.28
140813	14461	1.19

Per tal de poder detectar i quantificar les mostres els valors obtinguts han de ser superior al LOD i LOQ, respectivament. Si observem els valors de LOD i LOQ calculats pel cas de l'atrazina en que el LOD és 1.33 ppt i el LOQ és 3.66 ppt, significa que solament en les mostres 140392, 140393 i 140397 es pot detectar l'atrazina però en cap mostra l'arriba a quantificar.

Això vol dir que encara que es pugui calcular la concentració sempre ha de tenir una incertesa corresponent i, en aquest cas, aquesta incertesa no es pot calcular.

Per la resta de compostos en cada mostra els resultats es mostren a la taula 34.

Taula 34. Concentració de cada anàlit a cada mostra

COMPOST	Mostra Tipus ^{a)}	CONCENTRACIÓ (ppt)					LOD	LOQ
		140392	140393	140397	140400	140813	(ppt)	(ppt)
Atrazina	H	1.66	3.16	2.81	1.28	1.19	1.33	3.66
Desetilatraxina	H	6.03	8.08	7.65	1.11	1.07	0.99	2.74
Desisopropilatrazina	H	9.61	85.19	78.91	1.08	1.16	1.70	4.68
Cianazina	H	2.72	2.73	2.72	2.72	<0	1.21	3.33
Diuron	H	<0	1.12	1.21	1.07	1.10	1.30	3.60
Prometrina	H	2.28	2.25	2.27	2.26	2.27	1.06	2.93
Propazina	H	1.49	1.43	1.41	1.39	1.46	1.46	4.03
Sebutilazina	H	1.44	2.64	2.52	1.55	1.41	1.29	3.57
Simazina	H	2.49	35.48	35.05	1.28	1.37	1.19	3.27
Terbutilazina	H	0.96	1.66	1.73	0.92	0.98	1.03	2.86
Terbutrina	H	2.20	2.17	2.15	2.16	2.17	1.20	3.31
Azoxitrobina	F	<0	<0	<0	<0	<0	1.22	3.38
Carbendazima	F	<0	<0	<0	<0	<0	1.14	3.16
Dimetomorf	F	<0	<0	<0	<0	<0	1.14	3.15
Imidacloprid	I	<0	<0	<0	<0	<0	1.01	2.78
Tiabendazol	F	<0	<0	<0	<0	<0	1.43	3.94

a) H: herbicida; F: fungicida; I: insecticida

Podem concloure que a les mostres analitzades no hi ha fungicides ni insecticides però podem trobar una certa concentració dels diferents herbicides. Alguns d'aquests herbicides es poden detectar però no quantificar d'acord amb els valors del corresponent límit de detecció (LOD) i quantificació (LOQ) calculats a l'apartat 4.2 i inclosos a la taula també a la taula 34.

Dels resultats de la taula anterior els únics valors que es poden quantificar són la desetilatraxina i la desisopropilatrazina de les mostres 140392, 140393 i 140397, i la simazina de les mostres 140393 i 140397.

Com s'ha comentat a l'apartat 4.5, el resultat d'una mostra ve associat amb un valor d'incertesa.

En aquest apartat es calcularà la incertesa de la manera que s'ha ensenyat a la facultat fent ús dels següents paràmetres per poder arribar a calcular-la:

Els residuals (e_i) són la diferència entre el valor obtingut experimentalment i el valor obtingut per la recta.

L'error estàndard (S_e) és la desviació estàndard de la seva distribució o una estimació de la desviació. Es calcula amb la fórmula següent:

$$s_e = \sqrt{\frac{\sum e_i^2}{n-2}}$$

Un cop trobat l'error estàndard es pot trobar l'error degut a la recta (s_{x_0}), que es calcula amb la següent fórmula:

$$s_{x_0} = \frac{s_e}{b_1} * \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b_1^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

Per últim, cal trobar l'error degut a l'anàlisi de la mostra i, per això, s'ha de tenir en compte tot allò que hagi influït en l'anàlisi i el tractament de la mostra com la tolerància màxima del material utilitzat i l'error de la recta. Per calcular l'error es pot expressar amb la fórmula següent:

$$U_{\text{anàlit}} = M_{\text{anàlit}} * \sqrt{\left(\frac{U_{\text{recta}}}{C_{\text{recta}}}\right)^2 + \left(\frac{U_{V2}}{V_2}\right)^2 + \left(\frac{U_{V1}}{V_1}\right)^2}$$

A continuació calcularem la incertesa per a cadascun dels anàlisis que superen el LOQ en les mostres que s'han mencionat anteriorment. En concret, per a la desetilatraxina es donen els valors de la taula 35 amb la corresponent equació de la recta i coeficient de determinació:

$$y = 44834x - 44885 \quad r^2 = 0.99979$$

Taula 35. Càlculs per trobar els residuals

Concentració (ppt) (x)	Àrea obtinguda (y)	Valor àrea predit per la recta	Residuals (e_i)	e_i²	(x_i-x_{mitjana})²
5	198805	179283	19522	381110115	3501
10	477389	403451	73938	5466833501	2934
20	792241	851787	-59546	3545722401	1951
50	2170656	2196795	-26139	683246798	201
100	4406316	4438475	-32159	1034202909	1284
200	8946219	8921835	24384	594574778	18451
Mitjana	Mitjana			Sumatori	Sumatori
64.167	2831937.667			11705690502	28321

Un cop obtinguts el sumatori dels residuals al quadrat es troba l'error estàndard:

$$s_e = \sqrt{\frac{11705690502}{6 - 2}} = 54096.41971$$

A continuació es calcula la desviació estàndard degut a la recta amb la següent equació:

$$s_{x_0} = \frac{54096.41971}{44834} * \sqrt{1 + \frac{1}{6} + \frac{(225543 - 2831937.667)^2}{44834^2 * 28321}} = 1.3683$$

Com s'ha fet en la validació del mètode per trobar la incertesa combinada es fa la suma de quadrats de l'error aleatori més l'error sistemàtic. Per la mostra 140392 es fa el següent:

$$U_{\text{anàlit}} = 6.03 * \sqrt{\left(\frac{1.3683}{6.03}\right)^2 + \left(\frac{0.025}{2}\right)^2 + \left(\frac{0.00171}{0.2}\right)^2} = 1.3754$$

Com s'ha fet en la validació del mètode cal multiplicar la incertesa combinada obtinguda per un factor de seguretat k que depèn de l'interval de confiança en que es treballa. En aquest cas també es treballa amb un 95% de confiança i el factor k és 2.

$$U_{\text{expandida}} = \pm k * U_{\text{combinada}} = \pm 2 * 1.3754 = 2.7508$$

Un cop arribat a aquest punt arriba la part important d'expressar el resultat amb el nombre de valors adequat, o el que és el mateix, el nombre de xifres significatives en que s'ha d'expressar el resultat final. Les xifres significatives s'utilitzen per expressar el resultat final d'un assaig i és el mínim nombre de dígit necessaris per escriure un valor en notació científica sense perdre l'exactitud.

Per saber quants dígit s'han d'agafar de la incertesa per expressar el resultat, es considera els dos primers dígit de la incertesa. Si aquests són superior o igual a 25 s'expressa el resultat amb 1 xifra significativa i si és inferior, s'expressa amb 2 xifres.

Com que els dos primers dígit de la incertesa expandida (27) és superior a 25 s'expressa el resultat amb 1 xifra significativa, per tant:

[desetilatrazina] mostra 140392 = **[6 ± 3] ppt desetilatrazina**

Es fa el mateix per les altres dues mostres per la desetilatrazina, obtenint els resultats de la taula 36.

Taula 36. Interval de confiança d'atrazina en cada mostra

CODI MOSTRA	DESETILATRAZINA		
	140392	140393	140397
RESULTAT	[6 ± 3] ppt	[8 ± 3] ppt	[8 ± 3] ppt

Com que els valors de la taula 36 no superen el límit establert per la legislació vigent de 100 ppt de plaguicida individual, les mostres són aptes per al consum. A continuació es repetirà el procediment per a la desisopropilatrazina i la simazina. Els resultats de les àrees obtingudes i els residuals elevat al quadrat són els que es mostren a la taula 37.

Taula 37. Valors de residuals per la desisopropilatrazina i simazina

Concentració (ppt) (x)	Àrea obtinguda desisopropilatrazina (y)	Àrea obtinguda simazina (y)	e_i^2 desisopro- pilatrazina	e_i^2 simazina
5	24073	106472	2181	7068068
10	63763	284249	117087998	2271444650
20	96255	461810	205418483	1626600989
50	290204	1277208	44637458	466067331
100	567057	2635797	22011254	85402041
200	1149769	5284434	2461448	5570321
Mitjana	Mitjana	Mitjana	Sumatori	Sumatori
64.167	365186.8333	1674995	391618822	4462153400

L'error estàndard de la recta per la desisopropilatrazina i la simazina es calcula de la mateixa manera que en el cas de la desetilatraxina, obtenint els següents valors:

$$S_e \text{ (desisopropilatrazina)} = 9894.7$$

$$S_e \text{ (simazina)} = 33399.7$$

Ara es procedeix a calcular l'error degut a la recta pels dos anàlits tal i com s'ha fet amb la desetilatraxina, obtenint els següents valors:

$$S_{\text{recta}} \text{ (desisopropilatrazina)} = 1.9357$$

$$S_{\text{recta}} \text{ (simazina)} = 1.4346$$

Per últim, es calcula la incertesa combinada i expandida associada a la concentració de cada anàlit per a cada mostra tenint en compte els errors que s'han comès durant el procés, que són els mateixos que s'han tingut en compte que en el cas de la desetilatraxina, obtenint els valors de la taula 38.

Taula 38. Incerteses combinades i expandides calculades per la desisopropilatrazina i per la simazina

ANÀLIT CODI MOSTRA	DESISOPROPILATRAZINA		SIMAZINA	
	U combinada	U expandida	U combinada	U expandida
140392	1.3862	2.7724	-	-
140393	2.3970	4.7940	1.5951	3.1902
140397	2.2795	4.5589	1.5899	3.1799

Tal com ha passat en la desetilatraxina, el dos primers dígits de la incertesa expandida per totes les mostres en la desisopropilatrazina i simazina són superiors a 25, per tant, la incertesa s'expressa amb 1 xifra significativa.

Els intervals de confiança dels anàlits presents en cada mostra es troben a la taula 39 mostrant a més el límit inferior i superior de l'interval:

Taula 39. Resultat final de cada anàlit en cada mostra

CODI MOSTRA	Desetilatrazina	Desisopropilatrazina	Simazina
140392	[6 ± 3] ppt 3-9 ppt	[10±3] ppt 7-13 ppt	-
140393	[8 ± 3] ppt 5-11 ppt	[85±5] ppt 80-90 ppt	[35±3] ppt 32-38 ppt
140397	[8 ± 3] ppt 5-11 ppt	[79±5] ppt 74-84 ppt	[35±3] ppt 32-38 ppt

Si observem els valors del límit inferior i superior de l'interval de confiança dels resultats anteriors es pot dir que aquestes mostres són aptes per al consum ja que no superen el valor màxim permès pel Reial Decret 140/2003, que són de 100 ppt per plaguicida individual.

5. Conclusions

Català

Es pot donar el mètode analític per vàlid ja que els resultats obtinguts en termes de veracitat, precisió, límit de detecció i quantificació i incertesa per tots els compostos (atrazina, desetilatrazina, desisopropilatrazina, cianazina, diuron, prometrina, propazina, sebutilazina, simazina, terbutilazina, terbutrina, azoxitrobina, carbendazima, dimetomorf, imidacloprid i tiabendazol) es troben per sota dels límits establerts per la legislació vigent.

La desisopropilatrazina ha sigut l'anàlit més problemàtic ja que és més sensible que la resta de compostos donant resultats alts a concentracions baixes que ha portat a la conclusió que la mínima concentració de l'interval és de 10 ppt i no de 5 ppt com passa en els altres compostos.

Les mostres analitzades són aptes per al consum ja que el resultat final està per sota del límit segons els criteris establerts per la legislació vigent.

L'ús de la cromatografia líquida amb detector d'espectròmetre de masses i el desenvolupament del mètode MRM han sigut molt útils per determinar els anàlits objectiu i ha fet que sigui una tècnica adient per determinar la presència i la concentració d'aquests compostos en mostres d'aigua a nivells molt baixos, fet que en altres tècniques seria molt més complicat.

English

The analytical method can be considered valid as the results obtained in terms of veracity, accuracy, limit of detection and quantification and uncertainty for all the compounds (atrazine, desethylatrazine, desisopropylatrazine, cyanazine, diuron, prometrina, propazine, sebutylazine, simazine, terbutylazine, terbutrina, azoxystrobin, carbendazim, dimethomorph, imidacloprid and thiabendazole) are below the limits set by current legislation.

Desisopropylatrazine has been the most problematic analyte as it is more sensitive than other compounds giving high results at low concentrations which has led to the conclusion that minimum concentration of the range is 10 ppt and not 5 ppt as is the case in the other compounds.

The samples analysed are suitable for consumption as the final result is below the limit according to the criteria established by current legislation.

The use of liquid chromatography with mass spectrometer detector and the development of the MRM method have been very useful in determining the target analytes and have made it a suitable technique for determining the presence and concentration of these compounds in water samples at very low levels, fact that in other techniques it would be much more complicated.

6. Bibliografia

- 1) Zou, A.; Pillai, S.; Kornas, P.; Schober, M.; Zhao, L. Comprehensive LC / MS / MS Workflow of Pesticide Residues in Food Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole LC / MS System. *Agil. Technol.* 2020, 1–10. Disponible en línea: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-pesticide-residues-lc-ms-ms-5994-2370en-agilent.pdf> [consulta: 18 abril 2022]
- 2) Naegele, E. Pesticide Analysis with Agilent 1260 Infinity II Prime LC Ultivo Triple Quad LC/MS. 2021. Disponible en línea: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-pesticide-analysis-1260-infinity-ii-prime-lc-ultivo-lc-ms-ms-5994-1889en-agilent.pdf> [consulta: 18 abril 2022]
- 3) Tauseef, M.; Rafique, N.; Ahmad, I.; Ishtiaq, M.; Samad, A.; Saba, S.; Ahad, K.; Mehboob, F. Analysis of Multiple Pesticide Residues in Rice by LC–MS/MS. *Chem. Pap.* 2021, 75, 2871–2879. <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01533-x>. <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01533-x>. Disponible en línea: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11696-021-01533-x.pdf> [consulta: 1 juny 2022]
- 4) Hernández, F.; Beltrán, J. *Análisis de Residuos de Plaguicidas En Aguas*; J.M.Gonzalo, I. A., Ed.; 1995. Disponible en línea: https://abe.ufl.edu/faculty/carpena/files/pdf/zona_no_saturada/avances_en_la_investigacion_v2/c23_p321_356.pdf [consulta: 18 abril 2022]
- 5) BfR-Bundesinstitut für Risikobewertung. Liste Der Pestizide , Zu Denen Methodische Informationen Verfügbar Sind. 2020. Disponible en línea: https://www.bfr.bund.de/cm/349/list_of_pesticides_for_which_methodological_data_ist_available_at_present.pdf [consulta: 18 abril 2022]
- 6) Ministerio de la Presidencia. *Real Decreto 140/2003, de 7 de Febrero, Por El Que Se Establecen Los Criterios Sanitarios de La Calidad Del Agua de Consumo Humano*; 2003; p 18. Disponible en línea: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2003/BOE-A-2003-3596-consolidado.pdf> [consulta: 11 maig 2022]
- 7) AB Sciex. *6500 and 6500+ Series of Instruments. System User Guide*; 2015. Disponible en línea: https://collateral.sciex.com/manuals/6500-6500plus-system-user-guide-en/6500-6500plus-system-user-guide.pdf?_ga=2.218031958.1186320802.1601489922-752934932.1598145728 [consulta: 12 març 2022]
- 8) AB Sciex. *ExionLC™ AD System Hardware User Guide*; 2015. Disponible en línea: <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/customer-docs/user-guide/exionlc-ad-system-hardware-user-guide-en.pdf> [consulta: 1 maig 2022]

- 9) AB Sciex. *Analyst Software Reference Guide*; 2011. Disponible en línea: https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/software/an_ref_d1000064246_en.pdf [consulta: 18 abril 2022]
- 10) AB Sciex. *SCIEX OS Para Sistemas de Triple Cuadrupolo. Guía de Usuario Del Software*; 2021. Disponible en línea: <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/customer-docs/user-guide/sciex-os-tnt-software-user-guide-es.pdf> [consulta: 18 abril 2022]
- 11) Duffau, B.; Rojas, F.; Guerrero, I.; Roa, L.; Rodríguez, L.; Soto, M.; Aguilera, M.; Sandoval, S. Validación de Métodos y Determinación de La Incertidumbre de La Medición: “Aspectos Generales Sobre La Validación de Métodos”; 2010; p 70. Disponible en línea: https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%20de%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf [consulta: 3 maig 2022]
- 12) International Organization for Standardization. (2012) *Water quality – Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data* (ISO Standard no. 11352). Disponible en línea: <https://www.sis.se/api/document/preview/914875/> [consulta: 2 juny 2022]
- 13) International Organization for Standardization. (1999) *Laboratory glassware – One-mark volumetric flasks* (ISO standard no. 1042:1999). Disponible en línea: http://www.ydystandards.org.cn/static/down/pdf/EN%20ISO%201042-1999_en.pdf [consulta: 2 juny 2022]
- 14) International Organization for Standardization. (2002) *Piston-operated volumetric apparatus — Part 2: Piston pipettes*. (ISO standard no. 8655-2:2002). Disponible en línea: http://www.sartorius.co.rs/contentFiles/files/ISO_8655-2_2002.pdf [consulta: 2 juny 2022]

7. Annexos

Dades optimitzades compostos

Taula 40. Dades optimitzades per cada transició de cada anàlit

Massa Q ₁ (Da)	Massa Q ₃ (Da)	t _R (min)	Compost	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
216.1	174	9.29	Atrazine 1	66	28	10
216.1	104.1	9.29	Atrazine 2	66	39	10
188	146	7.04	Atrazine-desethyl 1	31	25	10
188	104	7.04	Atrazine-desethyl 2	31	33	10
174.1	96	6.16	Atrazine- desisopropyl 1	81	27	10
174.1	62	6.16	Atrazine- desisopropyl 2	81	65	10
241.1	214.1	7.91	Cyanazine 1	71	25	10
243.1	216.1	7.91	Cyanazine 2	71	25	10
233	72	9.33	Diuron 1	86	39	10
235	72	9.33	Diuron 2	86	39	10
242.1	158.1	10.92	Prometrina 1	86	33	10
242.1	200.1	10.92	Prometrina 2	86	25	10
230.1	188	10.17	Propazine 1	71	25	10
230.1	146	10.17	Propazine 2	71	35	10
230.1	174.1	10.05	Sebuthylazine 1	70	25	10
230.1	96	10.05	Sebuthylazine 2	70	36	10
202.1	124.1	8.31	Simazine 1	86	25	10
202.1	132	8.31	Simazine 2	86	25	10
230	174	10.34	Terbuthylazine 1	81	23	10
230	104	10.34	Terbuthylazine 2	81	45	10
242.1	186.1	11.06	Terbutrina 1	81	25	10
242.1	96	11.06	Terbutrina 2	81	41	10
404.1	371.9	10.20	Azoxitrobina 1	34	19	10
404.1	343.9	10.20	Azoxitrobina 2	34	29	10
192.1	160	6.58	Carbendazima 1	31	25	10
192.1	132	6.58	Carbendazima 2	31	41	10
388.1	301.1	10.32	Dimetomorf 1	41	27	10
388.1	165	10.32	Dimetomorf 2	41	43	10
256.1	175	6.12	Imidacloprid 1	49	25	10
256.1	208.9	6.12	Imidacloprid 2	49	21	10
202	131.1	7.30	Tiabendazol 1	59	43	10
202	174.9	7.30	Tiabendazol 2	59	35	10

Taula estadística

t-STUDENT (2 cues)

	$\alpha/2$												
	0,0005	0,001	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4	0,45	0,475
1	636,619	318,309	63,657	31,821	12,706	6,314	3,078	1,376	1,000	0,727	0,325	0,158	0,079
2	31,599	22,327	9,925	6,965	4,303	2,920	1,886	1,061	0,816	0,617	0,289	0,142	0,071
3	12,924	10,215	5,841	4,541	3,182	2,353	1,638	0,978	0,765	0,584	0,277	0,137	0,068
4	8,610	7,173	4,604	3,747	2,776	2,132	1,533	0,941	0,741	0,569	0,271	0,134	0,067
5	6,869	5,893	4,032	3,365	2,571	2,015	1,476	0,920	0,727	0,559	0,267	0,132	0,066
6	5,959	5,208	3,707	3,143	2,447	1,943	1,440	0,906	0,718	0,553	0,265	0,131	0,065
7	5,408	4,785	3,499	2,998	2,365	1,895	1,415	0,896	0,711	0,549	0,263	0,130	0,065
8	5,041	4,501	3,355	2,896	2,306	1,860	1,397	0,889	0,706	0,546	0,262	0,130	0,065
9	4,781	4,297	3,250	2,821	2,262	1,833	1,383	0,883	0,703	0,543	0,261	0,129	0,064
10	4,587	4,144	3,169	2,764	2,228	1,812	1,372	0,879	0,700	0,542	0,260	0,129	0,064
11	4,437	4,025	3,106	2,718	2,201	1,796	1,363	0,876	0,697	0,540	0,260	0,129	0,064
12	4,318	3,930	3,055	2,681	2,179	1,782	1,356	0,873	0,695	0,539	0,259	0,128	0,064
13	4,221	3,852	3,012	2,650	2,160	1,771	1,350	0,870	0,694	0,538	0,259	0,128	0,064
14	4,140	3,787	2,977	2,624	2,145	1,761	1,345	0,868	0,692	0,537	0,258	0,128	0,064
15	4,073	3,733	2,947	2,602	2,131	1,753	1,341	0,866	0,691	0,536	0,258	0,128	0,064
16	4,015	3,686	2,921	2,583	2,120	1,746	1,337	0,865	0,690	0,535	0,258	0,128	0,064
17	3,965	3,646	2,898	2,567	2,110	1,740	1,333	0,863	0,689	0,534	0,257	0,128	0,064
18	3,922	3,610	2,878	2,552	2,101	1,734	1,330	0,862	0,688	0,534	0,257	0,127	0,064
19	3,883	3,579	2,861	2,539	2,093	1,729	1,328	0,861	0,688	0,533	0,257	0,127	0,064
20	3,850	3,552	2,845	2,528	2,086	1,725	1,325	0,860	0,687	0,533	0,257	0,127	0,063
21	3,819	3,527	2,831	2,518	2,080	1,721	1,323	0,859	0,686	0,532	0,257	0,127	0,063
22	3,792	3,505	2,819	2,508	2,074	1,717	1,321	0,858	0,686	0,532	0,256	0,127	0,063
23	3,768	3,485	2,807	2,500	2,069	1,714	1,319	0,858	0,685	0,532	0,256	0,127	0,063
24	3,745	3,467	2,797	2,492	2,064	1,711	1,318	0,857	0,685	0,531	0,256	0,127	0,063
25	3,725	3,450	2,787	2,485	2,060	1,708	1,316	0,856	0,684	0,531	0,256	0,127	0,063
26	3,707	3,435	2,779	2,479	2,056	1,706	1,315	0,856	0,684	0,531	0,256	0,127	0,063
27	3,690	3,421	2,771	2,473	2,052	1,703	1,314	0,855	0,684	0,531	0,256	0,127	0,063
28	3,674	3,408	2,763	2,467	2,048	1,701	1,313	0,855	0,683	0,530	0,256	0,127	0,063
29	3,659	3,396	2,756	2,462	2,045	1,699	1,311	0,854	0,683	0,530	0,256	0,127	0,063
30	3,646	3,385	2,750	2,457	2,042	1,697	1,310	0,854	0,683	0,530	0,256	0,127	0,063
31	3,633	3,375	2,744	2,453	2,040	1,696	1,309	0,853	0,682	0,530	0,256	0,127	0,063
32	3,622	3,365	2,738	2,449	2,037	1,694	1,309	0,853	0,682	0,530	0,255	0,127	0,063
33	3,611	3,356	2,733	2,445	2,035	1,692	1,308	0,853	0,682	0,530	0,255	0,127	0,063
34	3,601	3,348	2,728	2,441	2,032	1,691	1,307	0,852	0,682	0,529	0,255	0,127	0,063
35	3,591	3,340	2,724	2,438	2,030	1,690	1,306	0,852	0,682	0,529	0,255	0,127	0,063
α	0,001	0,002	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8	0,9	0,95

Figura 23. Taula t-Student de 2 cues