

TREBALL DE FINAL DE GRAU

FACULTAT DE QUÍMICA



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI
Facultat de Química

Determinació de pesticides organoclorats en aigües de consum mitjançant extracció en fase sòlida i detecció per cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (SPE-GC-MS/MS)

Autor: Èric Macias Balcells

Assignatura: Treball de Fi de Grau

Empresa: Laboratori Roiser SL

Tutora: Rosa Maria Solé Cartaña

13 de juny de 2024

Treball de Fi de Grau

AUTORITZACIÓ

per al dipòsit de la memòria del Treball de Fi de Grau per a la seva avaluació i defensa

Nom de l'alumne/a: Èric Macias Balcells

Títol del TFG: Determinació de pesticides organoclorats en aigües de consum mitjançant extracció en fase sòlida i detecció per cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (SPE-GC-MS/MS)

Nom del director/a del treball: Vicenç Esplugas Esteve

Data: 13/06/2024

Signatura:



Nom del/de la tutor/a acadèmic/a (si s'escau): Rosa Maria Solé Cartaïa

Data: 13/06/2024

Signatura:



ÍNDEX

RESUM.....	1
ABSTRACT	1
1. OBJECTIU.....	2
2. INTRODUCCIÓ	3
2.1. Breu història dels pesticides.....	4
2.2. Situació actual i què es preveu.....	6
2.3. Legislació dels pesticides en aigües de consum	7
2.4. Compostos d'estudi	7
3. TÈCNiques ANALÍTIQUES USADES PER LA DETERMINACIÓ DE PESTICIDES	9
3.1. Tècniques d'extracció	9
3.1.1. Extracció en fase sòlida (SPE)	9
3.1.2. Microextracció en fase sòlida (SPME)	10
3.1.3. Extracció líquid-líquid.....	11
3.2. Tècniques de separació	11
3.2.1. Cromatografia de gasos.....	12
3.2.2. Cromatografia de líquids d'alta resolució	13
3.2.3. Espectrometria de masses.....	14
4. PREPARACIÓ DE LA MOSTRA MITJANÇANT EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA.....	16
5. ANÀLISI INSTRUMENTAL	20
5.1. Condicions cromatogràfiques durant l'anàlisi	21
5.2. Funcionament del software emprat.....	23
5.3. Identificació dels anàlits.....	24
6. VALIDACIÓ DEL MÈTODE ANALÍTIC I RESULTATS OBTINGUTS	26
6.1. Sensibilitat	27
6.2. Selectivitat.....	28
6.3. Interval de treball del mètode	29
6.4. Límits de detecció i quantificació (LOD i LOQ)	35
6.5. Precisió.....	35
6.6. Exactitud.....	39
7. ANÀLISI DE MOSTRES REALS	40
8. CONCLUSIONS	42
9. BIBLIOGRAFIA.....	44

RESUM

En aquesta memòria de final de grau s'optimitza un mètode per analitzar la presència de plaguicides en mostres d'aigua de consum humà. Per posar a punt el mètode, el que es fa és optimitzar totes les condicions per dur a terme una anàlisi el més correcte possible i validar-lo per poder demostrar que els resultats que dona el laboratori són fiables i precisos per transmetre confiança al client. Cal destacar que la metodologia analítica, té en compte la legislació europea vigent de pesticides en aigües de consum humà. Es disposa de material per realitzar l'extracció en fase sòlida i també d'un cromatògraf de gasos acoblat a un espectròmetre de masses de triple quadrupol per determinar-ne els contaminants presents. S'han triat un conjunt de cinc pesticides, tot i que al laboratori se n'han estudiat noranta. L'objectiu és identificar-los i quantificar-los per saber si les mostres d'aigua són aptes per l'ús quotidià.

ABSTRACT

In this final degree project, a method is optimized to analyze the presence of pesticides in samples of water for human consumption. To develop the method, we optimize all the conditions to carry out an analysis as correct as possible and validate it in order to demonstrate that the results given by the laboratory are reliable and accurate to transmit customer confidence. It should be noted that the analytical methodology takes into account the current European legislation on pesticides in water for human consumption. Material is available to perform the extraction in solid phase and also a gas chromatograph coupled to a triple quadrupole mass spectrometer to determine the contaminants present. A set of five pesticides have been chosen, although ninety have been studied in the laboratory. The objective is to identify and quantify them to know if the water samples are suitable for everyday use.

1. OBJECTIU

El principal objectiu proposat del treball és desenvolupar un mètode analític per la determinació de pesticides en aigües de consum mitjançant la tècnica d'extracció en fase sòlida (SPE) i la cromatografia de gasos acoblada a un detector d'espectrometria de masses de triple quadrupol.

Més concretament, es podrien detallar de la següent manera:

- Posar a punt un mètode analític per l'anàlisi qualitativa i quantitativa de pesticides a nivells baixos de concentració.
- Planificar i dur a terme les tasques de laboratori corresponent a l'objectiu final que es té.
- Realitzar la validació del mètode per tal de veure que aquest funciona i que el laboratori domina l'assaig i en fa un ús correcte.
- Decidir quines accions es realitzen una vegada hem obtingut els resultats.
- Aplicar el mètode desenvolupat a fi de fer l'anàlisi en futures mostres que arriben al laboratori.

2. INTRODUCCIÓ

Aquest document constitueix la memòria del Treball de Fi de Grau de Química sota el títol “Determinació de pesticides organoclorats en aigües de consum mitjançant extracció en fase sòlida i detecció per cromatografia de gasos acoblada a l’espectrometria de masses (SPE-GC-MS/MS)”.

La part experimental s’ha realitzat al Laboratori Roiser SL, situat a l’avinguda de la Noguera 8 de Cervera, Lleida entre els mesos d’abril i maig de 2024.

Els plaguicides o pesticides són productes químics aplicats als camps agrícoles per destruir, prevenir o limitar els efectes de fongs, animals o herbes no desitjades que amenacen un cultiu afectant-ne el desenvolupament, rendiment o conservació dels productes alimentaris que s’hi conreen.¹ Es van començar a utilitzar a finals del segle XIX, però no va ser fins després de la Segona Guerra Mundial que l’ús dels pesticides es va generalitzar arreu del món. Actualment, la producció ha augmentat significativament, multiplicant-se fins a 50 vegades, i el seu consum ha arribat fins a les 4 milions de tones anuals.²

Els productes fitosanitaris són plaguicides que s’utilitzen per protegir els cultius d’insectes, les males herbes, fongs o altres plagues. Engloben tot el que va relacionat amb el control de plagues, sigui d’origen animal o vegetal. Aquestes substàncies inclouen herbicides, fungicides, insecticides o acaricides.² Poden ser tòxiques per l’ésser humà i poden tenir efectes crònics per la salut, depenent de la quantitat i del tipus d’exposició. No obstant això, tenen un paper molt important en la producció d’aliments, fent possible un augment del rendiment a causa de l’augment de vegades a l’any que es pot plantar un cultiu en la mateixa terra. Per protegir a tots els consumidors dels efectes negatius dels plaguicides, l’Organització Mundial de la Salut ha elaborat una llista amb els límits màxims de residus acceptables.³ Altrament, l’alliberament d’aquestes substàncies al medi ambient pot provocar la contaminació de les masses d’aigua i, per tant, esdevenir un risc per als ecosistemes aquàtics.

És inevitable anomenar que els pesticides són un gran descobriment en l’àmbit de la química moderna, però, per contra, el seu ús abusiu els darrers anys fa evident que puguin suposar un risc per a la salut humana.

Els pesticides es poden classificar de diverses formes:

- Segons el tipus d’organisme que es vol controlar: Insecticides, acaricides, fungicides, herbicides, mol·lusquicides...
- Segons el grup químic del principi actiu: Organoclorats, organofosforats, carbamats, piretrines...
- Segons la persistència al medi ambient: Persistents, poc persistents i no persistents.

- Segons la toxicitat, el qual es basa en la toxicitat oral provada en rates i ratolins:⁴ Classe IA (extremadament perillosos), Classe IB (altament perillosos), Classe II (moderadament perillosos) i Classe III (lleugerament perillosos).⁵

La que té més interès en l'àmbit sanitari és la que correspon a la seva estructura química, ja que ens indica la incidència que pot tenir en l'organisme humà. Segons la seva estructura química es classifiquen en:

- Organoclorats (utilitzats com insecticides i herbicides): Són els considerats com a més persistents, fonamentalment pel DDT, el qual està prohibit a gairebé tot el món, però que s'empra perquè és molt eficaç i té un baix cost. Altres compostos que compren aquest grup són el lindà, el metoxiclor, l'atrazina, l'aldrin, el dieldrin o la simazina
- Organofosforats (fonamentalment insecticides): Tenen una toxicitat més selectiva que els anteriors i, per tant, els han substituït en gran part. Els més coneguts són el malatió, el paratió o el diazinó
- Carbamats: (insecticides domèstics i agrícoles, herbicides i fungicides): Són menys tòxics que els anteriors. Corresponen a derivats de l'àcid N-metilcarbàmic i els més comuns són el carbofuran, dimetoat...
- Piretrines: Són dels menys utilitzats actualment. El seu principal avantatge és que es degraden ràpidament i no s'acumulen en els organismes
- Altres compostos: Hi ha una gran quantitat de compostos orgànics i inorgànics que s'utilitzen com a plaguicides, més concretament com herbicides i fungicides com poden ser les triazines, els organofluorats i organobromats, les anilines, derivats de mercuri, arseni o sofre...²

2.1. Breu història dels pesticides

Els pesticides tenen origen a l'antic Egipte sobre l'any 1200 aC, quan usaven cicuta (una espècie de verí) i acònit (una planta mortífera) pel control de plagues. A més a més, els Romans usaven el llèbor (planta) per matar insectes i rosegadors.

L'any 1493 neix el filòsof, metge i alquimista "Paracelso" i es converteix en un dels màxims exponents de la toxicologia moderna. Posteriorment, quasi tres-cents anys més tard (1775), el suec Scheele va desenvolupar un pigment de pintura a base d'arseni que va ser una substància tòxica feta servir per matar la plaga de rates que hi havia a la ciutat de París. Des de llavors, es va començar a treballar amb pigments i pols de diferents compostos químics que es veia que eren útils com per exemple el sulfat de coure o la pols de mercuri pel tractament de llavors.

L'any 1901, s'aprova a Califòrnia la primera llei sobre pesticides per tal de prevenir el frau en la venda del pigment a base d'arseni utilitzat a París com a pesticida. El 1910, el congrés aprova la Llei Federal sobre Insecticides, enfocada a protegir als consumidors dels pesticides ineficaços i d'etiquetes enganyoses. L'any 1919, també

a Califòrnia, es crea el Departament d'Agricultura de Califòrnia (CDA) i agafa funcions com la supervisió de granges de llet, viticultura, protecció dels animals, comercialització de fruites i verdures...

L'any 1929 s'empra per primera vegada comercialment el tiocianat de n-butil carbitol com insecticida de contacte, seguit de la introducció del primer fungicida de sofre orgànic dos anys després.

Durant el 1939, el químic Müller, descobreix l'acció d'insecticida del DDT, el qual va ser molt emprat durant la Segona Guerra Mundial per controlar la malària i el tifus entre els ciutadans i les tropes.

A partir de la dècada del 1930 fins a la de 1950, hi ha un notable increment d'ús dels pesticides; l'any 1935 es comptabilitzen un total de 3500 productes de pesticides registrats a Califòrnia, l'any 1945 uns 7000, mentre que l'any 1956 ja n'hi ha uns 12000.

Ja cap a l'any 1954, es prohibeix que es registri qualsevol pesticida d'ús alimentari que deixi residus, excepte quan l'organització emeti una tolerància que n'autoritzi a nivells segurs. Cap al 1957 es prohibeix l'ús del DDT al voltant d'àrees aquàtiques i els següents anys ja es comença a eliminar gradualment fins que el 1972 es prohibeix definitivament als Estats Units.⁶ Cal destacar el paper que va tenir Rachel Carson, la qual va començar a investigar sobre el DDT i els efectes que tenia. S'havia utilitzat durant la Segona Guerra Mundial per controlar els insectes que transmeten malalties com el mosquit de la malària. Aquest, es va convertir en un insecticida d'ús domèstic. Els beneficis n'eren ben coneguts, mentre que els efectes negatius passaven desapercebuts, i és per això, que tant ella com el llibre que va escriure, van rebre forts atacs pel fet que es deia que les dades que havia proporcionat no estaven demostrades i que pels seus descobriments es va prohibir l'ús del DDT als Estats Units. El que ella pretenia no era prohibir l'ús de pesticides i del DDT, sinó que es vigilés més a l'hora d'emprar-los.⁷

El 1992 es crea el DPR (Departament de Reglamentació de Pesticides). Aquest, crea un programa per afavorir un control de plagues menys perillós i és autoritzat per imposar sancions civils per infraccions greus en l'ús de pesticides. A més, proporcionen una eina d'internet per veure informació personalitzada als usuaris de pesticides amb la finalitat de protegir les espècies en perill d'extinció que hi havia i conèixer les limitacions que tenen a l'hora de fer-los servir. Un parell d'anys després, també informen mitjançant internet que han creat una base de dades per veure les possibles lesions i malalties que els pesticides poden causar i així, intentar limitar el risc per a treballadors i persones més concurrents.

L'any 2011, el DPR inicia proves d'aire per detectar-ne els pesticides i l'any següent adopta reglaments per controlar les emissions, establint restriccions sobre alguns pesticides. Actualment, duu a terme avaluacions científiques de pesticides per avaluar el dany potencial a la salut humana i ambiental que pot tenir l'exposició

d'aquests. Inverteix en investigacions innovadores, activitats d'extensió i intentar proporcionar informació sobre els pesticides.⁶

2.2. Situació actual i què es preveu

Des de la dècada dels anys noranta fins a l'actualitat, no s'ha vist un gran canvi respecte a l'ús dels pesticides a Europa, Amèrica del Nord ni Àsia. Per contra, a l'Àfrica, Oceania i Amèrica del Sud sí que hi ha hagut un important creixement. La zona on més pesticides utilitzen és l'Amèrica del Sud amb gairebé 800.000 tones l'any 2020. Europa registra un total d'ús de plaguicides d'aproximadament 470.000 tones l'any.⁸

Aquesta tendència a l'estabilització o lleu baixada del seu ús a Europa pot ser degut a:

- Un augment dels preus en els últims anys de productes agrícoles. Això pot ser degut a causes com la sequera i altres fenòmens meteorològics, el canvi climàtic i el creixement de la població mundial.⁹ Així mateix, també hi ha hagut un fort increment dels costos de producció en el sector primari i en la indústria, la qual cosa se suma a l'augment dels preus de l'energia, sobretot del petroli, fertilitzants i aliments pels animals.¹⁰
- Desenvolupament de la producció integrada, que consisteix en l'establiment de sistemes agrícoles que aprofitin els recursos naturals per produir aliments i productes d'alta qualitat, així com mecanismes de regulació que evitin danys al medi ambient.¹¹
- Enduriment de la normativa que prohibeix o restringeix l'ús de determinats pesticides.

A més, cal remarcar que els pesticides, generen un impacte ambiental important. Poden causar contaminació en l'aire, ja que les partícules són de mida reduïda i poden estendre's a causa dels corrents d'aire, causant contaminació quan actuen en zones diferents de la zona de tractament. Addicionalment, poden contaminar l'aigua pel fet que contenen impureses que poden arribar als humans a través de l'aigua potable o els aliments. Poden ser transmesos a les masses d'aigües naturals a causa de la influència dels corrents d'aire o de la pluja a la superfície terrestre. Com a substàncies persistents difícils de degradar, poden romandre a l'aigua durant llargs períodes de temps. En últim lloc, poden afectar el sòl provenint de tractaments específics com poden ser insecticides aplicats, de contaminants provinents de tractaments que van a parar a terra o de partícules residuals de pluja. El tipus de sòl intervé directament amb el grau de retenció de residus. Sòls orgànics o argilosos retenen més residus que els arenosos.¹²

Cal dir que els plaguicides són molt necessaris per a la producció agrícola, ja que si no molts cultius no serien viables econòmicament i es perdrien o simplement que els productes cultivats no es podrien mantenir guardats i s'acabarien fent malbé.¹³

En un futur pròxim, la Unió Europea recomana una reducció significativa de l'ús de pesticides. Es proposa que l'any 2030, la meitat dels plaguicides químics se substitueixin per altres alternatives com la rotació de cultius o l'agricultura de precisió, que utilitza noves tecnologies per augmentar la productivitat dels cultius i reduir l'impacte mediambiental sense comprometre la seva qualitat. Avui dia, molts governs s'oposen a causa de la crisi alimentària actual i pensen que és inapropiat, ja que Europa necessita aliments.¹⁴

2.3. Legislació dels pesticides en aigües de consum

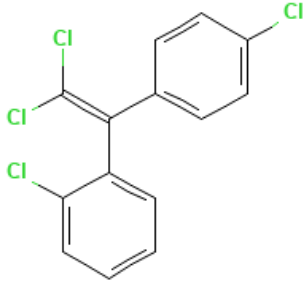
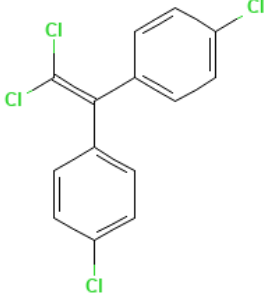
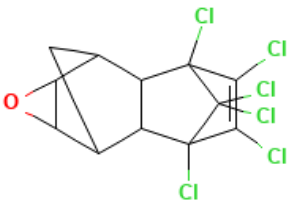
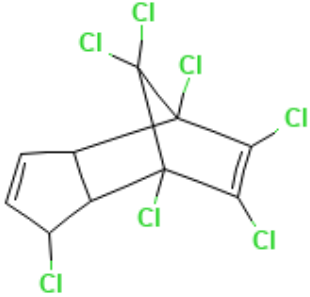
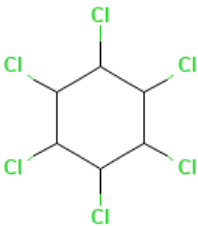
Actualment, els pesticides estan regulats en les aigües de consum, mitjançant un conjunt de normes que marquen els valors establerts de tots els paràmetres. Les aigües de consum humà es consideren totes aquelles que s'utilitzen per preparar aliments, per higiene personal, per beure i cuinar entre altres usos domèstics.

En el document BOE-A-2023-628 del Reial Decret 3/2023 a l'annex 1, part B¹⁵, hi figura la llista dels paràmetres químics a determinar en aigües de consum i el valor paramètric de cada determinació que es fa. Aquest document oficial regula l'explotació i comercialització d'aigües minerals envasades pel consum humà. Concretament, el valor paramètric de concentració màxima que s'estableix per qualsevol plaguicida en mostres d'aigua de consum humà és de 0,10 µg/L si es tracta d'un plaguicida controlat que hagi estat autoritzat l'any anterior o bé, de 0,03 µg/L si el plaguicida controlat està prohibit o no autoritzat. Qualsevol mostra que superi aquest valor de concentració es considera no apta pel consum humà.

2.4. Compostos d'estudi

En aquest estudi, es vol optimitzar el mètode per un nombre bastant elevat de pesticides, cosa que el fa complex i difícil de tractar. És per això, que el treball s'intentarà enfocar amb més simplicitat i focalitzant-se amb un nombre de pesticides més reduït per tal de facilitar-ne el tractament de dades.

Per tal d'optimitzar aquest mètode, cal remarcar que s'utilitzen un conjunt de diferents patrons comercials, els quals contenen els pesticides que es volen optimitzar. En aquests patrons, hi ha pesticides organoclorats, organofosforats, organofluorats, organobromats i fins i tot triazines. En aquesta memòria, s'estudiaran cinc compostos organoclorats, on a continuació (Taula 1), es veuen quins són els seleccionats i algunes de les seves característiques més destacades.

Anàlit	Formula Químic	Pes molecular (g/mol)	Estructura química	Nombre CAS
DDE-o,p ¹⁶	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318,0		3424-82-6
DDE-p,p ¹⁷	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318,0		72-55-9
Endrin ¹⁸	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380,9		72-20-8
Heptaclor ¹⁹	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	373,3		76-44-8
Lindà ²⁰	C ₆ H ₆ Cl ₆	290,8		58-89-9

Taula 1: Presentació dels analits i de les seves característiques

3. TÈCNiques ANALÍTIQUES USADES PER LA DETERMINACIÓ DE PESTICIDES

L'anàlisi de pesticides en aigües de consum no és una tasca fàcil, ja que són compostos que es troben en molt baixa concentració i més si es vol arribar als límits establerts per la legislació. Tots i cada un dels pesticides, presenten propietats físico-químiques diferents, la qual cosa complica encara més la feina. Això fa que no només hi hagi un mètode únic i universal per l'anàlisi de pesticides, sinó que n'hi ha un ampli ventall. Primerament, cal començar buscant bibliografia d'investigacions²¹ ²²similars al mètode que es vol optimitzar, per veure quina és l'opció més viable. Els articles consultats solen contenir una tècnica d'extracció, per poder extreure els anàlits de la matriu i poder-ne augmentar la concentració, seguida d'una tècnica de separació i detecció que en aquest cas, es treballa amb cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses de triple quadrupol.

Seguidament, es descriuen les tècniques d'extracció més utilitzades per a l'anàlisi de pesticides en aigua de consum.

3.1. Tècniques d'extracció

A continuació, es parla de les tres tècniques d'extracció més fetes servir en l'anàlisi de pesticides en mostres d'aigua de consum, que corresponen a l'extracció en fase sòlida, la microextracció en fase sòlida i l'extracció líquid-líquid.

3.1.1. Extracció en fase sòlida (SPE)

Es tracta d'una tècnica en què la mostra es troba en estat líquid i els compostos queden retinguts en un sorbent. Està dissenyada per tal que la preparació sigui ràpida i selectiva per mostres que posteriorment s'analitzaran cromatogràficament.

La SPE és una tècnica que s'utilitza amb molta freqüència, ja que té una sèrie d'avantatges molt destacats, com poden ser:

- Poder dur a terme un canvi de matriu, és a dir, partir de l'original i portar-ho a una més senzilla que sigui compatible amb el mètode cromatogràfic desitjat.
- Concentrar els anàlits, així augmentant-ne la sensibilitat i netejar la mostra, eliminant interferències que poden provocar l'aparició de soroll de fons.²³
- Respecte a l'extracció líquid-líquid, el volum de solvent que s'empra és molt inferior i, per tant, es generen menys residus.

El procediment consisteix a passar una mostra a través d'un cartutx que conté un sorbent de material que extreu selectivament els anàlits d'interès i rebutja els compostos que puguin produir interferències. Aquest procediment es basa en cinc etapes diferenciades (Figura 1):

1. **Condicionament:** es fa passar un volum de dissolvent apropiat a través del cartutx amb la finalitat d'eliminar qualsevol impuresa present i solvatar l'adsorbent, per tal d'afavorir el contacte entre l'anàlit i el sorbent que hi ha en el cartutx.
2. **Càrrega:** en aquesta etapa es fa passar la mostra a través del cartutx. Alguns components de la mostra passen per aquest sense ser retinguts mentre que altres queden retinguts més o menys fortament. Pot ser una etapa automatitzada o manual, però de totes maneres s'ha de controlar el cabal amb què es produeix el pas de la mostra.
3. **Rentat:** tracta d'eliminar els compostos no desitjats que queden adsorbits en la fase sòlida. Es pot emprar un dissolvent o una barreja per tal de millorar l'eficàcia, però sempre anant en compte de no eluir l'anàlit.
4. **Assecat:** si el dissolvent amb el qual eluïrem és immiscible amb aigua, cal tenir present aquesta etapa per tal d'eliminar l'aigua restant que pugui haver-hi
5. **Elució:** amb l'ajuda d'un dissolvent, es recuperen els anàlits que queden adherits a la fase adsorbent. El dissolvent usat ha de tenir màxima interacció amb l'anàlit d'interès. El que es vol és tenir un volum d'elució el menor possible per garantir que hi ha hagut una concentració de l'anàlit.

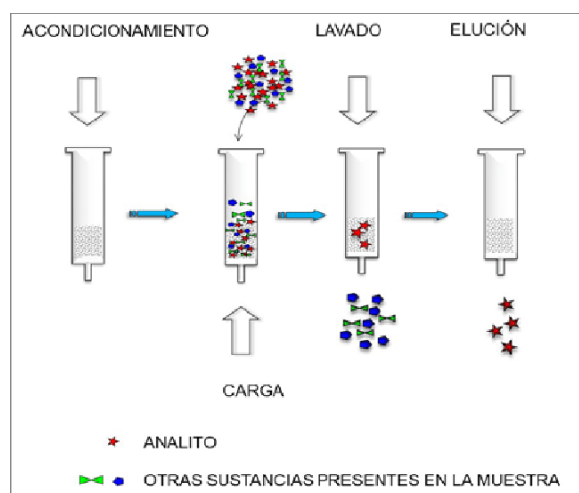


Figura 1: Etapes del procés d'extracció en fase sòlida

3.1.2. Microextracció en fase sòlida (SPME)

És una tècnica que es basa en extreure els anàlits de la matriu de la mostra amb l'ajut d'una fibra de sílice fosa recoberta amb un sorbent. En tenir dimensions reduïdes i forma geomètrica, permet incorporar-la en una mena de xeringa per tal de facilitar el seu ús, així com protegir-la quan no s'utilitzi.²⁴

La principal avantatja que té aquesta tècnica és que no s'utilitza gens de dissolvent. Per contra, aquestes fibres són bastant fràgils i el cost que tenen és elevat. A més, poden tenir l'anomenat efecte memòria, sobretot en compostos que tenen una

massa molecular elevada que poden quedar retinguts de manera irreversible sobre la fibra i generar problemes.²⁵

Consta d'una etapa d'extracció, on la fibra està recoberta de sorbent i es posa en contacte amb la mostra a una temperatura i durant un temps determinat. En aquesta etapa, es produeix una migració dels anàlits de la solució cap a la fibra fins que s'arriba a una situació d'equilibri. Cal destacar que hi ha dues tècniques clarament diferenciades per fer l'extracció: per immersió directa o per espai de cap.

Posteriorment, es realitza la desorció dels anàlits que han quedat retinguts a la fibra.²⁴

3.1.3 Extracció líquid-líquid

És una tècnica que tracta de separar els components dissolts o suspesos en una fase aquosa amb l'acció d'un dissolvent orgànic. Es pot utilitzar per a l'anàlisi de pesticides en aigua, ja que són productes que tenen un grau de volatilitat similar i són sensibles a la temperatura.

És bastant senzilla perquè només es necessita un embut de decantació, dissolvent orgànic, un suport en forma de cèrcol i un erlenmeyer. La principal virtut que ha de tenir el dissolvent és la de dissoldre molt bé els anàlits. Cal remarcar que si volem extreure compostos d'una fase aquosa, el solvent no ha de ser soluble en aigua. S'ha de tenir en compte també que les dues fases a separar siguin immiscibles. Seguidament, només cal agitar bé l'embut per tal que les dues fases assoleixin l'equilibri i esperar que se separin. Posteriorment, per decantació se separen les dues fases i es recull la fase d'interès.

Un dels principals inconvenients de l'extracció líquid-líquid, és sobretot l'elevada quantitat de volum de dissolvent orgànic que s'utilitza i els residus que es generen en forma de contaminació. Addicionalment, també cal remarcar l'aparició d'emulsions que dificulten la tasca de decantació i que és una tècnica difícilment automatitzable.

3.2. Tècniques de separació

Les tècniques analítiques més emprades tant per l'anàlisi quantitativa com qualitativa són tècniques cromatogràfiques. Pot ser amb cromatografia de gasos (GC) o bé amb cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC), les dues acoblades a l'espectròmetre de masses.

La cromatografia és una tècnica de separació de barreges complexes que serveix per identificar, quantificar i separar els components presents en la barreja. S'utilitza el principi de retenció selectiva en el qual s'observa el comportament dels diferents components d'una barreja sobre un suport, ja sigui en forma de paper, líquid, gas o

resina. Per separar els anàlits, identificar-los i quantificar-los es fa a partir de l'anàlisi del temps de retenció.

En cromatografia, els components que s'han de separar es distribueixen en dues fases clarament diferenciades; la fase estacionària, en la qual els components de la mostra queden retinguts en un suport adequat i la fase mòbil, que és l'encarregada de portar la mostra a través de la fase estacionària. Segons l'afinitat dels components amb la fase estacionària, el temps de retenció variarà.

Per triar la tècnica cromatogràfica més adient, es miren les propietats dels anàlits. En general, la cromatografia de gasos permet determinar un ampli ventall de compostos orgànics volàtils i semivolàtils apolars, mentre que la cromatografia de líquids d'alta resolució permet determinar compostos polars, tèrmicament inestables i no volàtils. A banda, també cal considerar la tècnica més adient segons la disponibilitat que es tingui i el cost que es pugui assumir.

3.2.1. Cromatografia de gasos

És una tècnica analítica emprada per separar i analitzar compostos volàtils o semivolàtils que hi ha presents en una mostra. Les substàncies a separar, han de ser tèrmicament estables, ja que si no ho fossin, en aplicar altes temperatures, es podrien degradar.

Aquesta tècnica comprèn una fase mòbil que és un gas inert (normalment heli o nitrogen) i una fase estacionària, que sol ser un líquid adsorbit en un suport inert (GC), encara que també pot ser un adsorbent sòlid (GSC). En aquesta última, els pics que s'obtenen solen tenir més cua i no estar tant ben definits com també així, que la fase estacionària es faci malbé més ràpidament.

Un dels àmbits a destacar de la cromatografia de gasos és que la fase mòbil ha de ser compatible amb el detector, per tal que no es tingui un soroll de fons molt elevat i també amb l'anàlit i que no ens doni interaccions irreversibles amb aquest. La fase mòbil que normalment més s'utilitza és l'heli, ja que és inert, no inflamable i és compatible amb la majoria dels detectors, encara que és bastant car. Per contra, el nitrogen és més econòmic, inert i no inflamable, però la seva volatilitat és inferior per tal d'aconseguir separacions més eficients. Si el gas portador presenta impureses, en el cromatograma es veurà una distorsió de la línia base (soroll de fons), uns pics amb cua i a més a més es podria provocar el que s'anomena el sagnat de la columna o bleeding, que significa que les partícules que formen la fase estacionària surten del sistema i, per tant, es fa malbé.

La columna cromatogràfica conté un suport sòlid inert, que és on es diposita la fase estacionària, i aquest ha de ser resistent a la calor, estable químicament i amb una gran àrea superficial, per tal que la fase estacionària es pugui distribuir de manera uniforme i així tenir una major superfície de contacte amb els anàlits. Se situa dins

d'un forn on es pot programar la temperatura desitjada. En aquesta, té lloc la separació dels anàlits i pot ser generalment de dos tipus: les columnes reblertes o empaquetades, fabricades amb acers inoxidable i les columnes obertes o capil·lars, fetes a partir de sílice fosa o alumini. Aquesta última consta d'un polímer a la part exterior que li dona estabilitat i evita que es trenqui en ser enrotllada, no solen tenir sagnat a menys que no hi hagi un mal ús d'aquesta, és resistent fins a temperatures molt elevades, ens permet un temps d'anàlisi curt i té major reproductibilitat.

Per tal d'introduir la mostra en el corrent gasós, hi ha el que s'anomena sistema d'injecció. Aquest ha de ser un procés ràpid per tal d'evitar que els pics siguin amples. El tipus d'injector més emprat és l'anomenat *Split/Splitless*. Es tracta d'un mateix injector que pot operar de dues formes diferents, *Split* o *Splitless*. En l'*Split* (amb derivació) la vàlvula de divisió està oberta durant la injecció permeten injectar una quantitat de mostra més gran que sigui vaporitzada i després només deixar passar una part d'aquesta a la columna, mentre que la resta de la mostra ja vaporitzada al liner, és residu i va a parar a la purga d'*Split*²⁶. En *Splitless* (sense derivació), la vàlvula de divisió està tancada (sense derivació) i, per tant, tota la mostra injectada va a la columna.²⁷ A continuació, es pot visualitzar un esquema de com funciona un cromatògraf de gasos a la Figura 2.

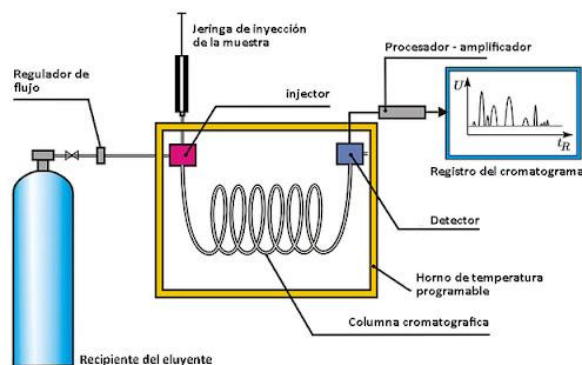


Figura 2: Esquema d'un cromatògraf de gasos.

3.2.2. Cromatografia de líquids d'alta resolució

La cromatografia de líquids d'alta resolució o HPLC és una tècnica molt emprada per l'anàlisi de pesticides. És especialment útil quan els anàlits en qüestió no es poden analitzar eficaçment mitjançant cromatografia de gasos a causa de factors com la seva inestabilitat, alta polaritat o baixa volatilitat. S'utilitza una fase mòbil líquida que flueix a través d'una columna cromatogràfica empaquetada.

Els elements que formen un HPLC per a aquesta tècnica en són quatre: una bomba, un mostrejador automàtic, un compartiment de columnes i un detector.

Diversos factors poden afectar a la separació dels anàlits incloent la composició de la fase mòbil, la composició química de la fase estacionària i la temperatura. El procés de separació es considera reeixit quan els anàlits mostren diferents afinitats

per a la fase estacionària, destacant la importància de seleccionar acuradament la fase estacionària adequada.²⁸

3.2.3. Espectrometria de masses

L'estudi d'una àmplia gamma de compostos, siguin orgànics o inorgànics, és possible gràcies a la utilització de l'espectrometria de masses (MS), una tècnica que proporciona informació tant qualitativa com quantitativa. En aquesta tècnica, les molècules de la mostra s'ionitzen, donant lloc normalment a la formació d'ions positius quan són bombardejats per un feix d'electrons. A continuació, aquests ions són accelerats per un camp elèctric i dirigits el tub analitzador. Dins del tub, es troben amb un camp magnètic perpendicular a la seva trajectòria, que condueix a la seva separació en funció de la seva relació massa/carrega (m/z). L'espectre resultant mostra la intensitat en funció de la relació m/z .²⁹³⁰

Un espectròmetre de masses està constituït per tres elements clarament diferenciats (Figura 3):

- La font de ionització, la qual n'hi ha de dos tipus
 - D'impacte electrònic: les molècules són ionitzades mitjançant un feix d'electrons d'alta energia.
 - De ionització química: s'utilitza un ió com a agent ionitzant per transferir la càrrega a la molècula de la mostra mitjançant una reacció bimolecular.
- L'analitzador de masses, que pot ser:
 - Analitzador magnètic: la seva finalitat és aïllar ions específics amb l'ajuda d'un camp magnètic i guiar-los cap al detector.
 - Analitzador de quadrupol: format per 4 barres metàl·liques circulars paral·leles disposades en una circumferència per tal que el feix de ions incideixi sobre el centre actuant com un filtre de masses.
 - Analitzador de trampa de ions: s'usa una zona de confinament electromagnètic i està format per tres elèctrodes de superfície que formen una cavitat en la qual es produeix la ionització, la fragmentació i l'anàlisi de les masses.
 - Analitzador de temps de vol: els ions generats per la font són accelerats per mitjà d'un potencial elèctric, adquirint una velocitat inversament proporcional a la seva relació m/z .
- El detector, que n'existeixen de 3 tipus:
 - Caixa de Faraday: està format per una caixa, dins la qual hi ha una placa, que quan els ions impacten amb aquesta, capten electrons per neutralitzar la càrrega i es mesura el corrent electrònic necessari per neutralitzar-los.

- Multiplicador d'electrons: usa l'energia cinètica dels ions que incideix sobre una placa i al xocar-hi, emet un corrent d'electrons que són accelerats cap a una segona placa i així successivament.
- Placa fotogràfica: només s'empra quan és necessari tenir una sensibilitat molt alta.³¹

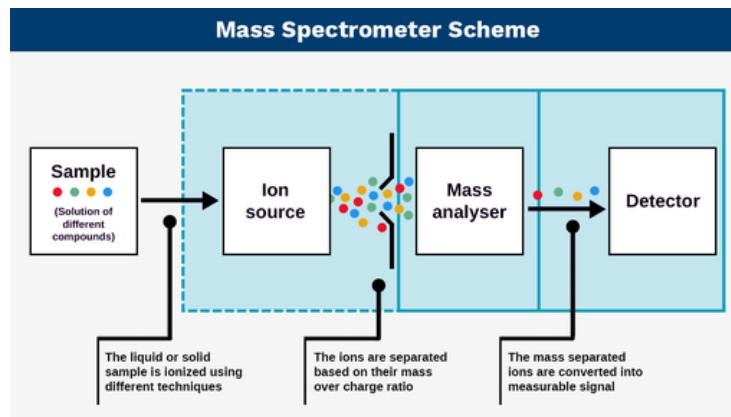


Figura 3: Esquema d'un espectròmetre de masses

Cal remarcar que aquest detector, acostuma a anar acoblat a un cromatògraf de gasos complementant-se acuradament, a causa de característiques com el rang de temperatura de treball, les concentracions baixes (ppm-ppt) i la fase amb què treballen (gasosa). I és per aquest motiu que ens dona un gran rendiment l'ús d'aquest sistema anomenat GC-MS/MS (en tàndem).

A més, es pot emprar segons el mode d'adquisició del corrent iònic com un detector universal (mode *Full-Scan*), com un detector selectiu (mode SIM) i com un sistema altament específic i selectiu. Entre els sistemes de detecció de masses tàndem, cal destacar-ne el de triple quadrupol, el qual és un espectròmetre de masses que té tres analitzadors quadrupolars, el qual el fa molt usat en àmbits com la investigació, anàlisi ambiental, estudi de drogues, anàlisi de residus de plaguicides o per anàlisi de traces en aliments. La configuració en tàndem facilita eluir les estructures químiques, determinar els mecanismes de fragmentació de molècules que han estat ionitzades i fins i tot la composició elemental de ions fragmentats i la seva relació amb els ions precursors. Una vegada s'ha obtingut la resposta de part del detector, al software que s'utilitzi, t'apareixen dues gràfiques: un cromatograma, on s'aprecien els temps de retenció dels anàlits amb la fase estacionària segons la seva interacció i un espectre de masses per cada un dels compostos que s'han eluït.

4. PREPARACIÓ DE LA MOSTRA MITJANÇANT EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA

En aquest apartat, es descriurà detalladament el procediment realitzat per poder dur a terme la preparació de la mostra mitjançant l'extracció en fase sòlida per la determinació dels pesticides organoclorats estudiats en matrius aquoses.

Instrumentació

Es disposa d'un equip amb la finalitat d'executar aquesta tasca. En aquest cas es tracta d'un sistema d'extracció SPE que consta de:

- Una bomba de buit
- Una cubeta de vidre SPE
- Un tub per connectar la bomba de buit a la cubeta de vidre SPE
- Quatre recipients amb la intenció de recol·lectar el líquid que posteriorment es descartarà
- Un suport pels cartutxos
- Uns taps negres per bloquejar la sortida del buit
- Un adaptador pel cartutx
- Taps previst d'un tub per succionar la mostra
- Gradeta especial per suportar els tubs d'assaig

Posteriorment durant el procés d'evaporació, és necessari utilitzar un evaporador de nitrogen, que consta d'unes entrades i sortides (regulades per unes claus de pas i d'uns tubs de plàstic per evaporar) de nitrogen al sistema.

A més a més, es disposa d'una unitat d'aigua ultrapura Purelab UVMK2.

Elecció de la fase sòlida

Primerament, cal mirar i decidir quina serà la naturalesa de la fase sòlida. S'ha d'escollir la que tingui una polaritat més semblant a la dels anàlits a determinar, ja que aquesta tendirà a retenir els compostos que tinguin grups funcionals igual als seus. En aquest cas, és convenient fer servir una fase sòlida que sigui apta per treballar tant amb compostos apolars com amb compostos moderadament polars, pel fet que els anàlits que s'estudien tenen diferent polaritat. És per això que es treballa amb una fase sòlida constituïda per gel de sílice C18.

Material de laboratori

- Matrassos aforats d'1L
- Pipetes Pasteur (per l'enràs)
- Pipetes automàtiques de 100µL del fabricant Brand
- Pipetes automàtiques d'1mL del fabricant HTL
- Pipetes automàtiques de 10mL del fabricant TH Gever

- Cartutxos SPE de 6mL Hypersep subministrades per Bioser
- Tubs d'assaig de 10mL per recol·lectar la mostra
- Vials GC de vidre transparent de 1,5mL, subministrats per Cosela

Reactius

- Metanol LC/MS proveït per Labkem
- Hexà PestiPur - For pesticide analysis proveït per Carlo Erba
- Acetona per pesticides Grade PGR proveït per Labkem
- Aigua ultrapura subministrada per l'equip Purelab UVMK2

Metodologia

En primer lloc, es realitza el muntatge de tots els elements necessaris per portar a terme l'extracció. Posteriorment, es prepara en un vas de precipitats, la barreja de dissolvent orgànic que s'usarà, tant per fer el condicionament, com per eluir que consta d'una solució d'hexà/acetona al 50:50. A continuació, es prepara en un altre vas de precipitats una mica de metanol que serà necessari per condicionar el cartutx i posteriorment addicionar-ne als tubs d'assaig. Finalment, es prepara un vas de precipitats amb aigua ultrapura.

Una vegada està tot preparat i etiquetat, es preparen les mostres a analitzar en un matràs d'un litre. Cal destacar que es treballarà amb un mètode que conté Patró Intern, que és una substància, la qual es coneix la concentració que conté, que s'addiciona a la mostra abans de fer-li cap manipulació. Aquest, s'afegeix amb la finalitat de corregir l'error sistemàtic que hi ha durant l'experimentació. En aquest cas, el patró intern es tracta d'un mix de concentració d'1ppm de tres patrons interns diferents, que són: el Naftalè deuterat, l'Acenaftè deuterat i el Clorpirifos deuterat. En els compostos triats, tots tres treballen amb el mateix Patró Intern, el qual és el Clorpirifos D10.

Es comença amb el procés d'extracció SPE, que consta de les 5 etapes que anteriorment s'han esmentat (Figures 4, 5, 6 i 7)

1. Condicionament: Es fa passar primer 10mL de la barreja d'hexà/acetona, addicionant de 5mL en 5mL. Després, es passen 10mL de metanol, també addicionant-los de 5mL en 5mL i posteriorment el mateix amb l'aigua ultrapura.
2. Es produeix el pas de la mostra mitjançant els taps previstos d'un tub succionador que connecten el matràs amb el cartutx. S'ha de mantenir un flux constant d'uns 10mL per minut.
3. Es renta el cartutx amb aigua ultrapura. Consisteix en afegir 20mL d'aigua ultrapura (de 5mL en 5mL).

4. Es realitza l'assecatge del cartutx, que tracta de deixar tant la bomba de buit com la clau de pas que hi ha en el suport del cartutx ben oberta durant almenys 5 minuts.
5. S'elueixen els compostos que han quedat retinguts en el sorbent. Se substitueixen els recipients recol·lectors de líquids per la gradeta especial que suporta els tubs d'assaig amb els que es recullen el líquid eluït. Per fer-ho, es necessita la barreja de dissolvent orgànic d'hexà/acetona i se n'addicionen 10mL, també de 5 en 5. Cal remarcar que quan s'afegeixen els primers 5mL, és necessari esperar 2 minuts amb la bomba tancada per tal que el dissolvent actuï i posteriorment ja s'afegeixen els altres 5. Aquí, ja es recol·lecta la solució eluïda en un tub d'assaig i s'hi addicionen 500 μ L de metanol, ja que és el dissolvent que posteriorment serà injectat a la columna.

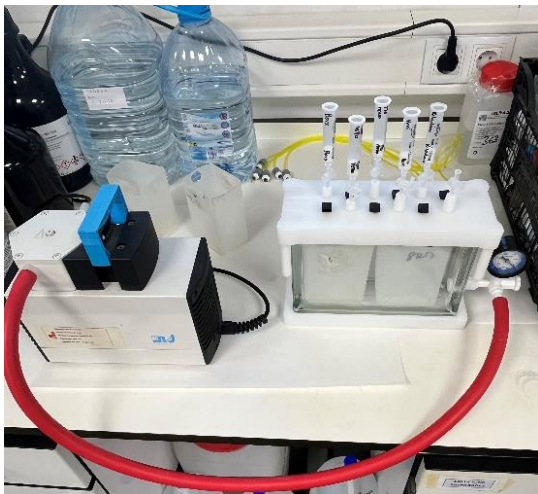


Figura 4: Condicionament de l'extracció SPE

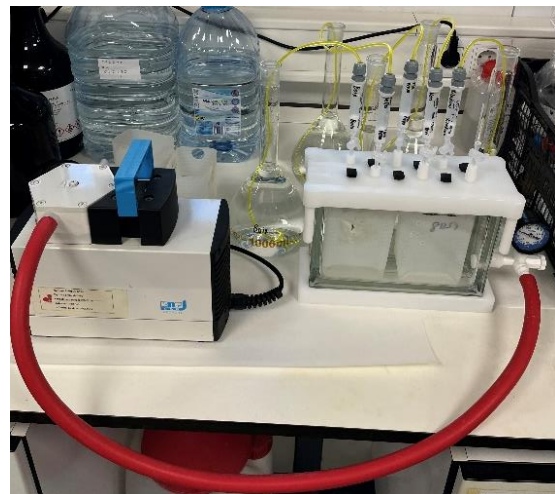


Figura 5: Pas de la mostra



Figura 6: Neteja i assecatge del cartutx



Figura 7: Eluïció dels compostos retinguts

Una vegada ja tenim la solució en el tub d'assaig (solució d'interès), es porta a evaporar sota corrent de nitrogen, sense que aquesta sigui evaporada a gran velocitat (Figura 8). Es deixa un tub d'assaig de referència al costat amb 500 μ L, i s'espera que la solució de la resta de tubs d'assaig quedi igual que la de referència, al voltant dels 500 μ L (la concentració dels anàlits ha augmentat unes 2000 vegades).



Figura 8: Sistema d'evaporació de nitrogen

5. ANÀLISI INSTRUMENTAL

Com s'ha esmentat anteriorment, la tècnica de separació i detecció que s'empra és la cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses de triple quadrupol. Un cop s'ha obtingut la solució després de l'etapa d'extracció, és analitzada mitjançant aquesta tècnica. L'equip que s'utilitza és un cromatògraf de gasos tipus TRACE 1610 que va acoblat a un espectròmetre de masses de triple quadrupol TSQ 9610 i també consta d'un mètode d'extracció per headspace Triplus 500 amb el que es realitzen altres tipus d'anàlisis. Consta d'un injector automàtic AI1610 (Figura 9). Tot aquest, es controla mitjançant un ordinador, el qual té una aplicació que s'anomena Chromeleon 7 que és el software que s'usa per donar-li totes les indicacions corresponents. Tota la instrumentació mencionada anteriorment, correspon a la casa comercial de Thermo Scientific.

A banda, està equipat per una columna capil·lar de 30m de llargària i de 0,25mm de ID (diàmetre intern) que està situada dins d'un forn. La fase estacionària que hi ha dins de la columna és la Thermo Scientific TraceGOLD TG-5SilMS i està disposada en forma d'una làmina de pel·lícula fina de 0,25µm de gruix. La temperatura màxima a la qual la podem sotmetre és d'uns 330-350°C. És una columna de polaritat baixa i està formada per un 5% de difenil i un 95% de dimetil polisiloxà. Es considera de polaritat baixa, ja que els grups metil donen cert caràcter apolar al polisiloxà, i a l'estar present en un 95%, tenen major influència que el caràcter polar que donen els grups difenil.



Figura 9: Cromatògraf de gasos acoblat a l'espectròmetre de masses

5.1. Condicions cromatogràfiques durant l'anàlisi

Abans de executar una anàlisi, cal ajustar les condicions de treball amb les quals tractarem. Si aquestes no són ajustades, els components d'una mescla (pesticides) tindran una mala separació, podent així veure's pics superposats, mala selectivitat i sensibilitat, temps d'anàlisi inadequat (sigui llarg o curt) entre molts altres factors. Algun dels factors, pot ser que sigui imposat i inamovible des d'un primer moment, a causa de la disponibilitat de recursos que es tenen. Un clar exemple podria ser el tipus de gas portador, en aquest cas l'heli.

Hi ha altres condicions de treball que sí que es poden variar per tal d'obtenir una separació cromatogràfica més bona. En les següents taules (Taules 2 i 3), s'observa quines condicions són les tractades per l'anàlisi feta, tant del cromatògraf de gasos com de l'espectròmetre de masses:

CROMATÒGRAF DE GASOS	
Gas Portador	Heli
Columna Cromatogràfica	Thermo Scientific TraceGOLD TG-5SilMS de 30m x 0,25mm
Fase Estacionària	Formada per 5% de difenil i 95% de dimetil siloxà de 0,25µm de gruix.
Mode d'injecció	CT_ <i>Splitless</i>
<i>Split Flow</i>	15mL/min
Temperatura de l'injector	300°C
Volum d'injecció	1µL

Taula 2: Condicions del cromatògraf de gasos

El procediment per l'anàlisi de la mostra és el següent: la mostra que s'ha d'analitzar, s'introdueix al cromatògraf de gasos automàticament. Primer, es neteja la xeringa amb un vial que hi ha ple de metanol diverses vegades. Seguidament, com que al *software* que s'empra se li fica que mesuri una quantitat d'1µL de mostra per injectar, ho agafa i s'assegura que no hi quedi cap bombolla d'aire present. Així mateix, aspira un cert volum d'aire per tal d'evitar que els components de la punta de la xeringa comencin a evaporar-se abans d'hora, perdent així part dels anàlits. Posteriorment, l'agulla de la xeringa s'introdueix dins del port d'injecció a temperatura alta fins a arribar a una cànula de vidre. La xeringa es manté uns segons en la mateixa posició per climatitzar l'agulla i s'injecta la mostra, la qual és immediatament vaporitzada. El gas portador (en aquest cas l'heli) amb flux constant, arrossega la mostra vaporitzada i la porta fins a la columna, on té lloc la separació.

A la Figura 1 es mostra el gradient emprat per dur a terme la separació cromatogràfica:

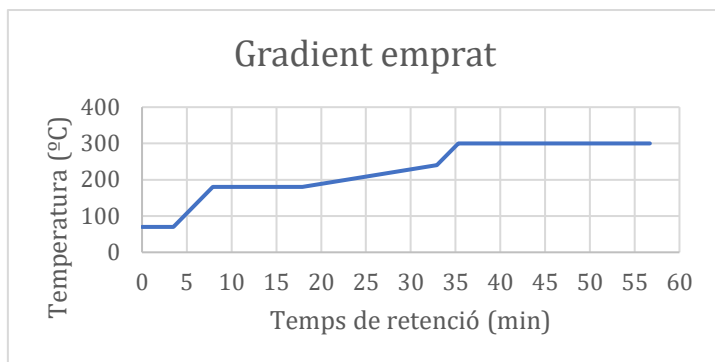


Figura 10: Gradient emprat per la separació cromatogràfica

Com ja s'ha anomenat anteriorment, la columna cromatogràfica es troba dins d'un forn que permet variar la temperatura de treball durant l'anàlisi. Es pot treballar en mode isoterm (mantenint la mateixa temperatura) o, per contra, produint variacions en aquesta (gradient) per afectar a la separació cromatogràfica.

Normalment, la majoria dels gradients amb el que es treballen consten d'una rampa isoterma al principi i al final de l'anàlisi. Al principi, és necessari començar a una temperatura prou baixa per tal que la mostra entri intacta a la columna i només s'elueixi el dissolvent. Ja cap al final de l'anàlisi, es treballa a temperatura isoterma i bastant elevada per netejar la columna i assegurar-se que tots els components han estat eluïts i poder dur a terme la següent anàlisi en bones condicions. En tenir una temperatura alta al final, s'haurà d'esperar que el sistema es refredi per tal de tornar a injectar una mostra.

Entre aquestes dues isoterms, s'augmenta progressivament la temperatura per tal d'eluir tots els components de la mostra analitzada amb els diferents gradients i isoterms mostrats en la Figura 10.

A continuació, es mostren les condicions de l'espectròmetre de masses.

ESPECTRÒMETRE DE MASSES	
Mode de ionització	Ionització electrònica avançada (AEI)
Temperatura de la transfer line	320°C
Temperatura de la font de ions	280°C
Polaritat	Positiva
Energia de ionització	50 eV

Taula 3: Condicions de l'espectròmetre de masses

En aquest cas, es tria el mode d'injecció *Splitless*, ja que és més comú per mostres que presenten una baixa concentració d'anàlits. El procediment que fa és injectar la mostra mentre que la vàlvula està tancada i el dissolvent el que fa és generar una zona saturada al cap de columna que és on queden atrapats els anàlits. Una vegada els anàlits estan a la columna, la vàlvula d'*Split* s'obre per eliminar el material de residu de l'entrada.³²

5.2. Funcionament del software emprat

El software que s'ha utilitzat per operar el cromatògraf de gasos acoblat a l'espectròmetre de masses és el Chromeleon 7. Cada anàlisi es realitza seguint sis passos clarament diferenciats:

1. Iniciar l'aplicació i esperar que es carregui tot
2. Posar a punt l'instrument. Cal assegurar-se que el servei Instrument Controller està en funcionament i que la connexió s'ha establert correctament seleccionant els instruments al tauler de navegació.
3. Crear una seqüència. La seqüència determina el nombre d'injeccions a realitzar. La llista d'injeccions especifica el nombre d'injeccions, el nom de la injecció, el tipus (mostra, estàndard de calibració, blanc,...) i el volum d'injecció. Abans de crear la seqüència, és necessari crear un *instrument method*, un *processing method* i un *report template* (plantilles d'informes).
 - En l'*instrument method*, s'hi introdueix tota la informació rellevant per a la injecció a realitzar, com ara el volum d'aire, el nombre de vegades que s'omple l'injector cromatogràfic o el temps de retard abans i després de la injecció. Posteriorment, a l'apartat *GC Inlet*, se selecciona la temperatura, el mode de divisió (o *split*) que s'emprarà, l'*split flow* i el temps d'*splitless*. Al *GC Oven Settings*, es defineix o modifica el gradient que s'utilitzarà per a l'anàlisi. Finalment, al TSQ, es tria la *MS transfer line temperature* i la *ion source temperature*. A més, també es tria el mètode d'adquisició, que en aquest cas és un *timed mode*. A TSQ, també es mostren tots els compostos analitzats i que prèviament s'han establert mitjançant el seu temps de retenció i les seves masses més significatives. Aquest procediment es va realitzar mitjançant un mètode *full-scan*. En el mateix programa hi ha una llibreria que diu el compost que és més probable que sigui juntament verificant-ho amb les masses que s'han buscat en diferents bibliografies. Cal remarcar que el mètode *full-scan* ja s'havia realitzat quan es va començar a desenvolupar aquest treball escrit. També ens dona informació del temps d'escaneig total o del temps SIM
 - El *processing method* és aquell que ens ajuda a quantificar l'anàlisi elaborada. Conté un conjunt de paràmetres amb els quals s'avaluen els cromatogrames obtinguts. Inclou tots els compostos estudiats juntament amb el seu temps de retenció i amb l'*standard method* que té cadascun d'ells (el patró intern que correspongui, ja que s'utilitza un mix de 3 patrons interns) i els nivells de calibració que s'han realitzat a l'hora de crear la recta de calibratge.
 - El *report template*, és aquell que ens dona la informació final de l'anàlisi en un format similar a un pdf.

4. Adquirir dades. Es posa en marxa la seqüència, fent prèviament un seguit de verificacions per tal de veure que l'equip està funcionant correctament. Durant l'anàlisi pots anar veient resultats obtinguts, però és recomanable deixar acabar l'anàlisi per obtenir els resultats complets.
5. Processar les dades. A la mateixa seqüència creada, hi ha l'opció de veure els resultats obtinguts fent clic a la pestanya *Studio*. Aquí es mostren les injeccions realitzades, la recta de calibratge utilitzada per aquestes injeccions, els canals (*MS Quantitation*) i els components a determinar. Es poden visualitzar els resultats per a cada injecció o bé veure els resultats d'un anàlit concret per a totes les injeccions, segons convingui. Per realitzar una bona quantificació i qualificació d'un cromatograma, tots els pics d'interès haurien de ser detectats i integrats correctament de manera automàtica, encara que és una tasca difícil que passi. Per cada anàlit, obtenim un pic de quantificació i dos o tres pics de confirmació, i per això fa que la tasca que no s'hagi d'integrar algun pic manualment sigui gairebé inevitable.
6. Revisar i informar dels resultats. Es crea un informe amb tots els resultats que s'han obtingut de l'anàlisi feta. Es pot generar per una injecció determinada o bé per tota la seqüència al complet.

5.3. Identificació dels anàlits

En aquest estudi, els anàlits s'identifiquen mitjançant el seu temps de retenció. Aquest, es pot definir com el temps que ha passat des que es produeix la injecció de la mostra fins a l'aparició de la resposta màxima. Cal esmentar que en la identificació dels anàlits, pot utilitzar-se com a ajuda el criteri del temps de retenció, però és insuficient per si mateix per establir la identitat d'un anàlit. És per això que en aquest cas, és vital l'ús de l'espectròmetre de masses amb la finalitat de identificar dels anàlits mitjançant els espectres que proporciona i observant els pics més significatius de l'anàlit. Per fer-ho, s'analitza una solució de concentració coneguda (patró comercial) a efecte de conèixer els pics cromatogràfics que s'obtenen, els seus temps de retenció i seleccionar els ions m/z per la seva quantificació. A més, el programa disposa d'una llibreria que t'ajuda a identificar el compost amb el qual podem estar tractant i quina és la probabilitat que sigui el compost determinat.

Una vegada el tenim identificat, es mostren el temps de retenció de cadascun dels compostos, que en aquest cas són:

Compost	Temps de Retenció (min)
DDE-o,p	22,23
DDE-p,p	24,27
Endrin	25,43
Heptaclor	14,17
Lindà	11,38

Taula 4: Temps de retenció dels anàlits estudiats

Cal remarcar que al treballar amb un equip GC-MS/MS, el primer que es fragmenta és el ió precursor, el qual dona una sèrie de ions producte que posteriorment són fraccionats i es classifiquen com un ió quantificador i dos o tres de confirmació. Els ions m/z de transició quantitativa més representatius per cada compost són:

Compost	Ió (m/z) de transició quantitativa experimental
DDE-o,p	246,00 → 176,00
DDE-p,p	246,10 → 176,00
Endrin	262,80 → 192,90
Heptaclor	271,80 → 236,90
Lindà	181,00 → 145,00

Taula 5: Ió de transició quantitativa per cada compost

Observant els temps de retenció de tots els compostos que apareixen en la Taula 4 i veient que estan prou separats els uns dels altres i que s'observen els ions m/z més destacats per cada compost, concordant amb els bibliogràfics^{33,34}, podem concloure sense cap mena de dubte que els compostos estan perfectament identificats.

6. VALIDACIÓ DEL MÈTODE ANALÍTIC I RESULTATS OBTINGUTS

Una vegada es tenen les condicions i tots els paràmetres optimitzats de l'anàlisi, procedim a realitzar la validació del mètode. El mètode utilitzat al laboratori ha de ser avaluat i sotmès a diverses proves que mostrin que els resultats que proporciona són vàlids i coherents a l'objectiu previst. La validació d'un mètode es realitza mitjançant un conjunt de proves en les que s'obtenen dades sobre exactitud, precisió, determinació de l'interval de linealitat, dels límits de detecció i quantificació, entre altres. És important efectuar la validació d'un mètode perquè es fan moltes proves diàriament que donen suport a l'assistència sanitària, com per exemple comprovar la qualitat de l'aigua potable. Es pot dir que pràcticament tots els aspectes de la societat, estan ajudats d'alguna manera pel treball analític. El que vol aconseguir un laboratori d'anàlisi químic és demostrar que els resultats que donen són el més fiable i precisos possibles gràcies al grau de coneixement que es té, i poder donar confiança al client.

Les etapes que consten en una validació d'un mètode químic són les següents:

1. Definir clarament els objectius i el que es vol aconseguir amb el mètode, incloent-hi els tipus de mostra i els anàlisis d'interès a avaluar.
2. Elecció dels paràmetres a avaluar com la precisió, exactitud, especificitat, sensibilitat, linealitat, rang dels límits de detecció (LOD) i quantificació (LOQ), robustesa i reproductibilitat.
3. Preparació de mostres i estàndards que s'utilitzaran en la validació.
4. Valoració dels resultats obtinguts en la validació.

Es miren els PG del laboratori i l'*Eurachem Guide*³⁵ per decidir el mètode a utilitzar per portar a cap la validació.

Primerament, es busquen una sèrie d'aigües de consum de diferents tipus, unes de les quals siguin envasades i altres de no envasades. De les no envasades, es fa un test de conductivitat per poder veure que totes i cada una d'elles tinguin un valor clarament diferenciat. Més concretament, s'utilitzen un total de deu aigües, de les quals, cinc són envasades i les cinc restants no envasades i amb conductivitats diferents. Les aigües envasades van ser cinc aigües de compra de diferent marca i les no envasades, consten d'una aigua destil·lada, dues aigües de fonts diferents amb clara diferència de conductivitat, una aigua de l'aixeta i una d'una font osmotitzada d'un restaurant.

És necessària la contribució de dos analistes per realitzar la validació, per poder veure la repetibilitat dels analistes a l'hora de fer l'anàlisi corresponent.

A posteriori, es va decidir quin seria l'interval de linealitat amb el que es treballaria, tenint en compte també la legislació que hi ha actual de plaguicides i quins límits hi ha establerts. Es va creure oportú que l'interval de linealitat estigués entre 0,010 i

0,15µg/L, amb lo qual es va constituir una recta de calibratge que consta d'un blanc i de vuit punts a diferents concentracions perfectament conegudes.

Una vegada tenim aquestes dades, es comença a fer una planificació per veure quantes mostres s'han de preparar i la durada que pot tenir la validació. Dins de l'interval de concentracions, es va creure oportú seleccionar unes concentracions determinades, de 0,010 µg/L, 0,050 µg/L i 0,15 µg/L, com a concentracions a rang baix, mig i alt respectivament a més del blanc. Per fer-ne un esquema, quedaria tal que així:

	Codi	ID	Mostra	Blanc	0,010	0,050	0,15
ANALISTA 1	A1	Aigua envasada	FONT VELLA	✓	✓	✓	
					✓	✓	
	A2	Aigua envasada	PLA NOVA	✓	✓	✓	
					✓	✓	
	A3	Aigua envasada	VILADRAU	✓	✓	✓	
				✓	✓		
A4	Aigua NO envasada	Conductivitat Baixa	✓	✓	✓	✓	
				✓	✓	✓	
A5	Aigua NO envasada	Clorada	✓	✓	✓	✓	
				✓	✓	✓	
ANALISTA 2	A6	Aigua envasada	BOIX	✓	✓	✓	
					✓	✓	
	A7	Aigua envasada	VERI	✓	✓	✓	✓
					✓	✓	✓
	A8	Aigua NO envasada	Conductivitat Alta	✓	✓	✓	
				✓	✓		
A9	Aigua NO envasada	Osmotitzada (Nobadis)	✓	✓	✓		
				✓	✓		
A10	Aigua NO envasada	Conductivitat Intermitja	✓	✓	✓	✓	
				✓	✓	✓	

Taula 6: Esquema de la validació de pesticides

Tal com es mostra en la Taula 6, l'analista 1 faria l'anàlisi de les mostres codificades des de la A1 a la A5 i l'analista 2 de les mostres A6 a A10, a les concentracions indicades i veient si s'han de realitzar per duplicat o no.

6.1. Sensibilitat

La sensibilitat analítica és la capacitat que té un mètode de detectar petites quantitats d'un anàlit determinat en una mostra. Com s'ha mencionat anteriorment, quan es va arribar al laboratori per començar a tractar-ne el tema del treball, ja s'havia avaluat la sensibilitat de la calibració. La sensibilitat d'un mètode analític correspon al pendent de la recta de calibratge, encara que molts cops va relacionat amb els límits de detecció per veure si pot ser distingit un senyal d'un anàlit respecte

el senyal d'un blanc. Es pot considerar com el factor de resposta entre la variació d'un senyal associat a un anàlit i la variació de la seva concentració.

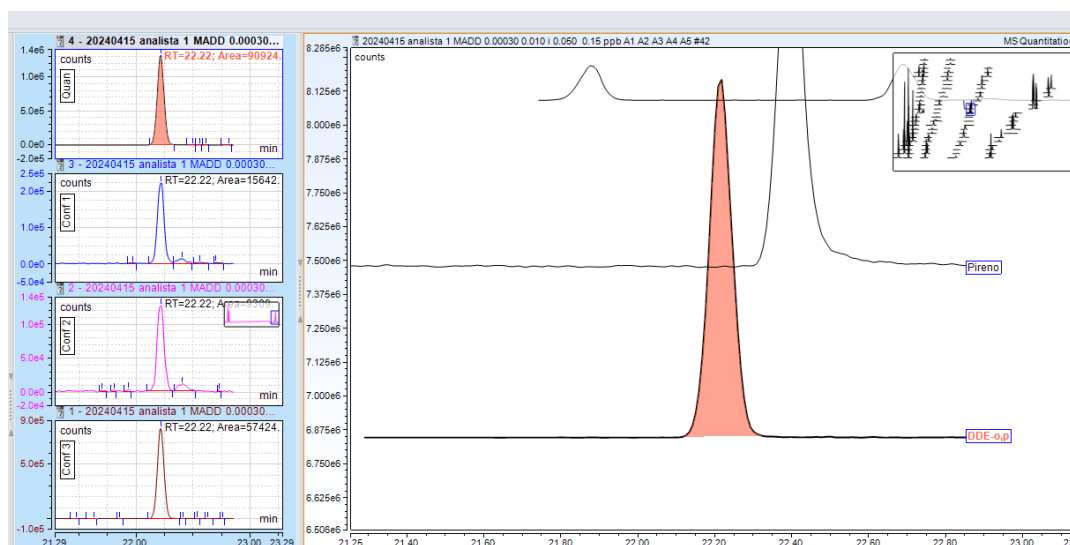
6.2. Selectivitat

Un mètode es considera selectiu quan és capaç de determinar-ne els anàlits d'interès sense que hi hagi la interferència d'un altre component que té un comportament similar a l'anàlit d'interès. Normalment, per avaluar-ne la selectivitat en un laboratori, s'addiciona intencionadament unes interferències específiques, les quals siguin probables de trobar en futures mostres.

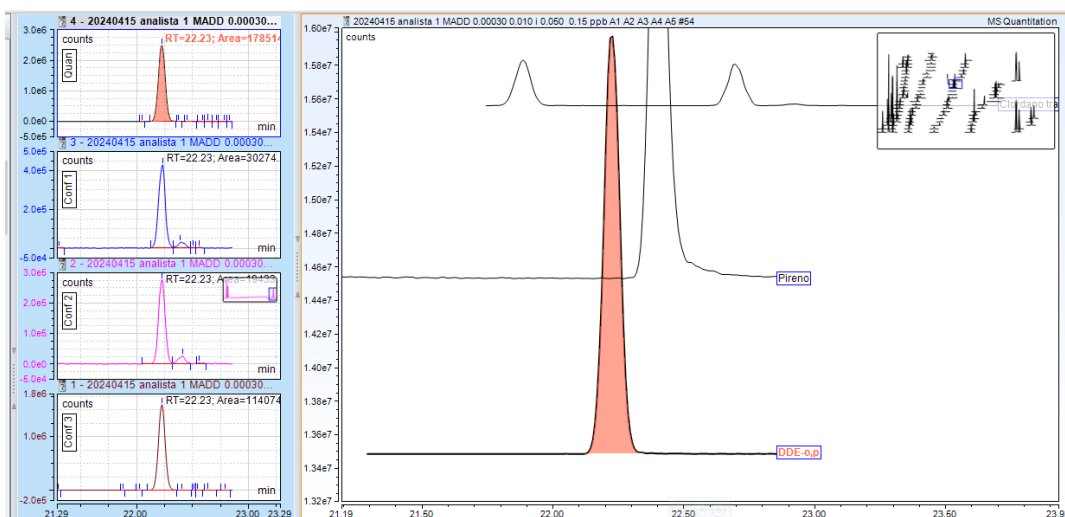
Per estimar la selectivitat, es pot realitzar un estudi d'una matriu blanca per afirmar que no hi ha senyals que puguin interferir amb la detecció de l'anàlit. Això es confirma quan en els cromatogrames dels blancs de les diferents aigües, es visualitza que al voltant dels temps de retenció dels anàlits estudiats, no apareix cap pic que pugui correspondre a un compost determinat i així influir en el resultat obtingut.



Cromatograma 1: Representació del blanc de la mostra A4 pel compost DDE-o,p



Cromatograma 2: Representació de la mostra addicionada a 0,05ppb A4 pel compost DDE-o,p



Cromatograma 3: Representació de la mostra addicionada a 0,05ppb de la mostra A4 pel compost DDE-o,p

En els cromatogrames anteriors (1, 2 i 3), es mostren els pics de quantificació (el primer de dalt a l'esquerra) seguit de tres pics de confirmació pel compost DDE-o,p corresponent a la mostra codificada com A4 a diferents concentracions. A la dreta, més gran i de color vermell, s'observa el pic de quantificació a major escala. Com es veu en el Cromatograma 1, el qual correspon a un blanc de la validació, s'observa clarament que els pics que surten tenen poca àrea i que el que apareix més que res es tracta de soroll de fons. Per contra, en el Cromatograma 2, que correspon a una mostra addicionada a concentració 0,050 ppb de la mateixa aigua, es percep l'aparició d'un pic més definit i amb una àrea superior. A més, també es disposa del cromatograma corresponent a la mostra addicionada de concentració 0,15 ppb (Cromatograma 3), encara amb més àrea i un pic més ben definit.

Veient els resultats obtinguts, podem concloure que és selectiu, ja que no es preveu l'aparició de cap interferència propera al temps de retenció de l'anàlit determinat. Amb la resta d'anàlits estudiats, els cromatogrames de comparativa de blancs i mostres addicionades, es veuen similars als d'aquest compost. Addicionalment, es pot recolzar d'un estudi de recuperacions, en el qual, un valor elevat de recuperació, pot indicar una bona selectivitat.

6.3. Interval de treball del mètode

Es defineix com l'interval de concentració en el que el mètode a optimitzar, proporciona uns resultats amb una incertesa acceptable amb termes de desviació estàndard relativa (%RSD). *L'Eurachem Guide*, suggereix almenys la realització d'un blanc de calibratge i d'entre sis i deu patrons amb una concentració perfectament coneguda i es proposa realitzar una gràfica per donar confirmació visual de si l'interval de treball és lineal o no. Posteriorment, remarca la importància de calcular les estadístiques de regressió adequades com així també els residuals. Si la distribució aleatòria de residuals és molt propera a zero, es confirma la linealitat, també tenint consideració que no tots estiguin per sobre o per sota del valor zero, sinó que es disposin aleatòriament. A més, la linealitat del mètode ve indicada també

pel valor del coeficient de determinació R-quadrat (R^2), el qual ha de ser superior o igual a un valor de 0,99.

Cal esmentar que en aquest cas, es treballa amb una recta realitzada amb la mateixa matriu amb la qual analitzem (aigua de consum) i no amb metanol que és el reactiu que s'injecta al cromatògraf. Això s'anomena recta matriu o "matrix matched calibration", i és un mètode molt emprat en anàlisi de pesticides per facilitar l'efecte corrector, reduir els possibles errors i tenir una major exactitud.³⁶

Cal tenir en compte que al treballar amb Patró Intern, (en tots els casos Clorpirifos D10) al fer la recta de calibratge, a l'eix de les ordenades es fica el valor del quocient de l'àrea de l'anàlit respecte a l'àrea del Patró Intern. A més, es té en compte que l'àrea del Patró Intern ha d'estar entre una acceptació de 50% i 200% de la mitjana de tots els patrons de la recta. En les següents taules (Taulas 7, 8, 9 i 10) es veuen els resultats d'acceptació del Patró Intern, tant per la recta de calibratge de l'analista 1 com per la de l'analista 2.

Analista 1:

Concentració del Patró de la recta	Àrea Patró Intern (Clorpirifos D10)
Blanc	45726
0,010	65979
0,020	64664
0,030	66116
0,050	55478
0,080	52036
0,10	52609
0,15	57034

Taula 7: Àrea del Patró Intern de cada punt de la recta per l'analista 1

Mitjana de les àrees del Patró Intern	58419
Acceptació 50%	29209
Acceptació 200%	116838

Taula 8: Àrea mitjana del Patró Intern i límits d'acceptació per l'analista 1

Analista 2:

Concentració del Patró de la recta	Àrea Patró Intern (Clorpirifos D10)
Blanc	40985
0,010	59162
0,020	55396
0,030	54189
0,050	42176
0,080	39623
0,10	38190
0,15	42688

Taula 9: Àrea del Patró Intern de cada punt de la recta, inclosa la mitjana i els límits d'acceptació de l'analista 2

Mitjana de les àrees del Patró Intern	46660
Acceptació 50%	23330
Acceptació 200%	93320

Taula 10: Àrea mitjana del Patró Intern i límits d'acceptació per l'analista 2

En els següents gràfics (Figures 11 a 15), s'observen tots els resultats de les rectes realitzades:

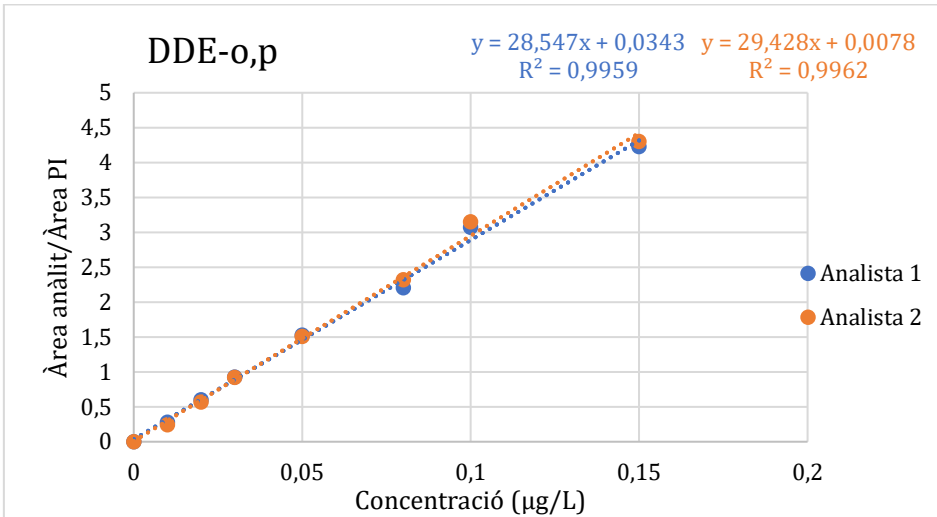


Figura 11: Rectes de calibratge pel compost DDE-o,p per ambdós analistes

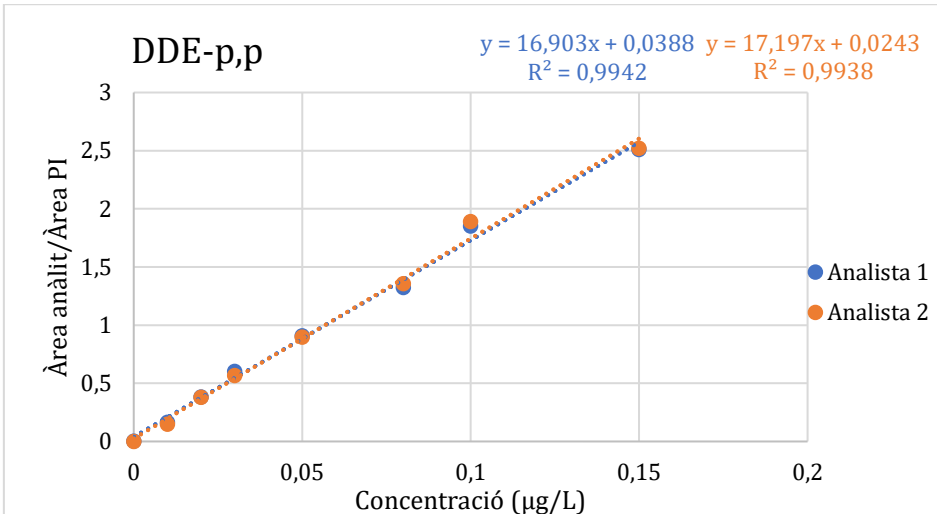


Figura 12: Rectes de calibratge pel compost DDE-p,p per ambdós analistes

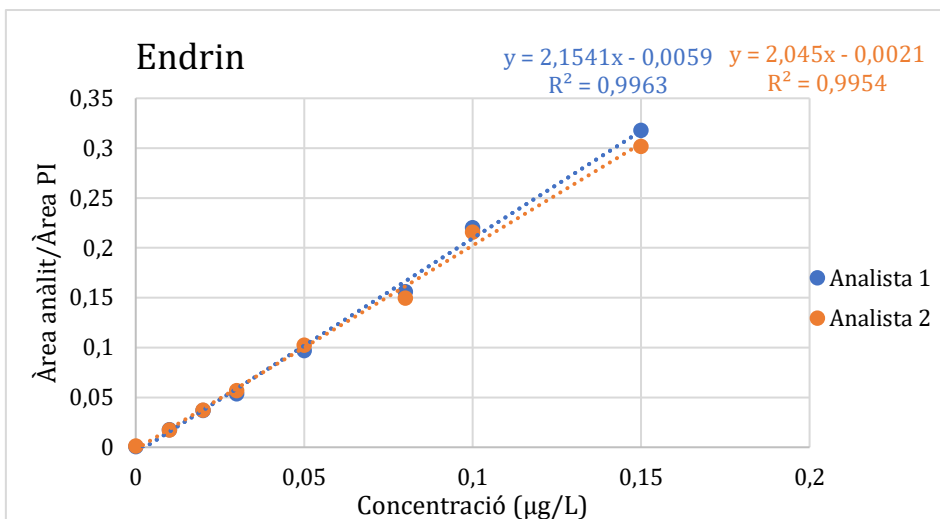


Figura 13: Rectes de calibratge pel compost Endrin per ambdós analistes

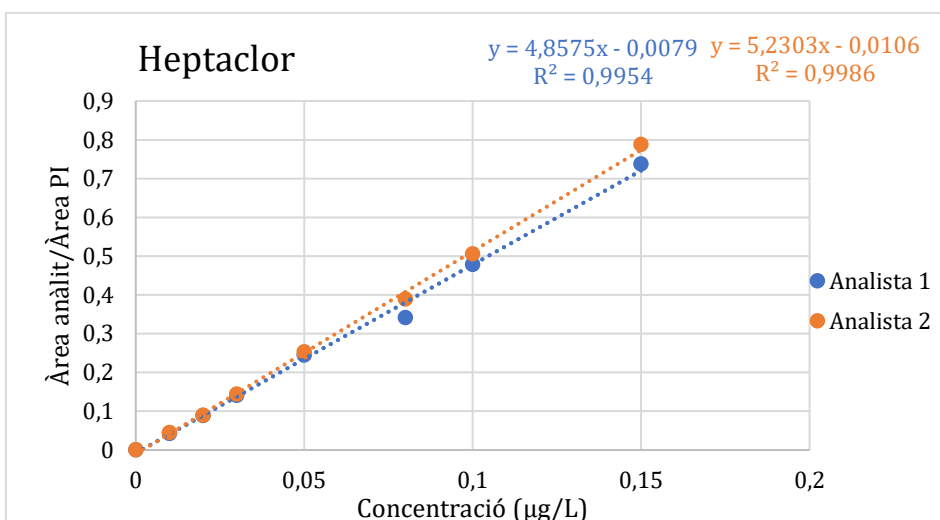


Figura 14: Rectes de calibratge pel compost Heptaclor per ambdós analistes

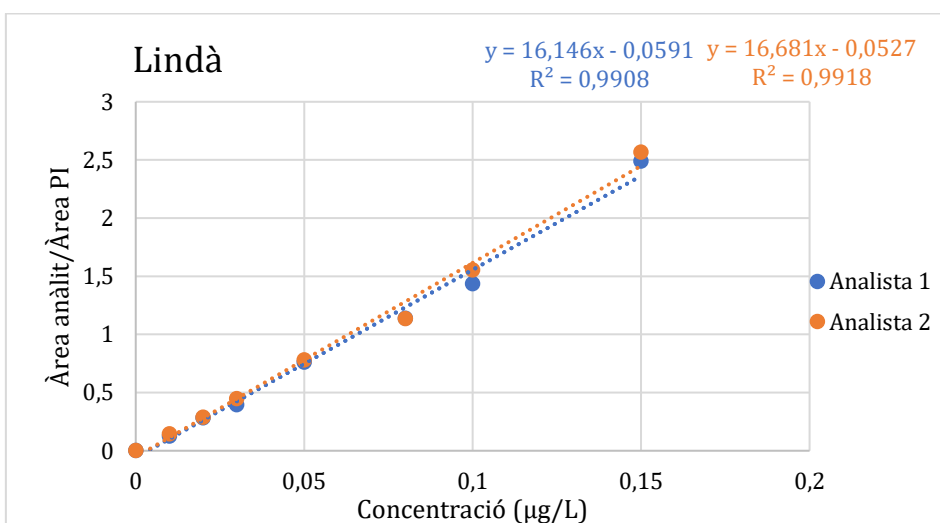


Figura 15: Rectes de calibratge pel compost Lindà per ambdós analistes

Com es pot observar, en totes les rectes de tots els compostos, es compleix els requisits indispensables que l'àrea del Patró Intern compleixi el % d'acceptació d'entre 50 i 200% i totes les rectes realitzades tenen un coeficient de determinació R-quadrat (R^2) superior a 0,99.

Per acabar, si es valoren els residuals (Figures 16 a 25), veiem que en cap dels casos hi ha una tendència per sobre o per sota la línia de la recta, sinó que estan disposats aleatòriament, per tant, podem concloure que la dispersió és independent de la concentració.

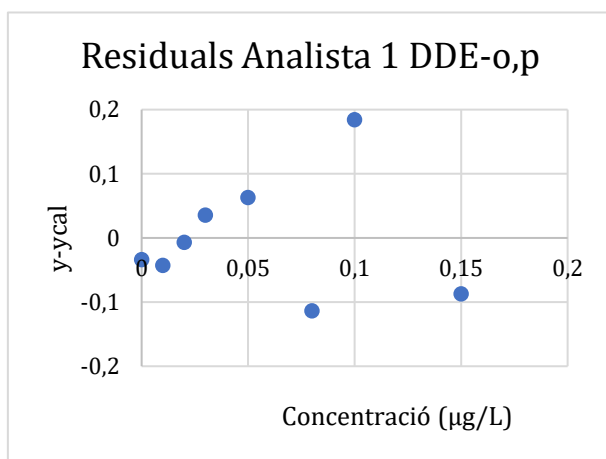


Figura 16: Residuals Analista 1 pel compost DDE-o,p

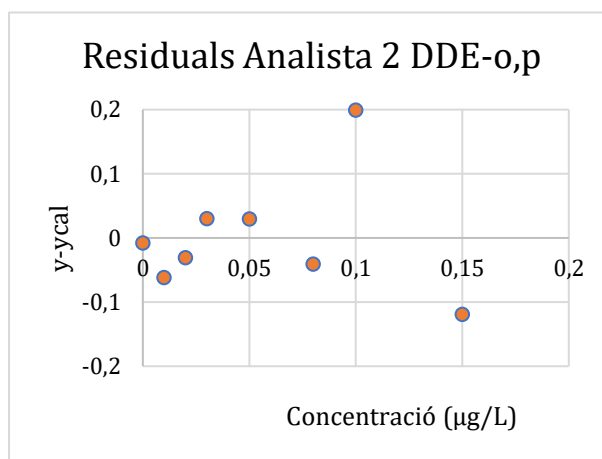


Figura 17: Residuals Analista 2 pel compost DDE-o,p

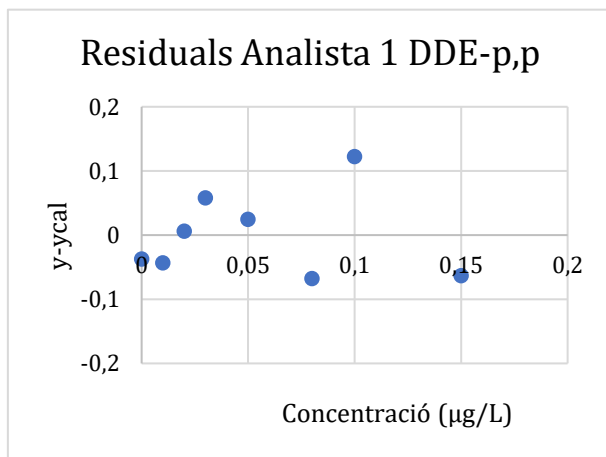


Figura 18: Residuals Analista 1 pel compost DDE-p,p

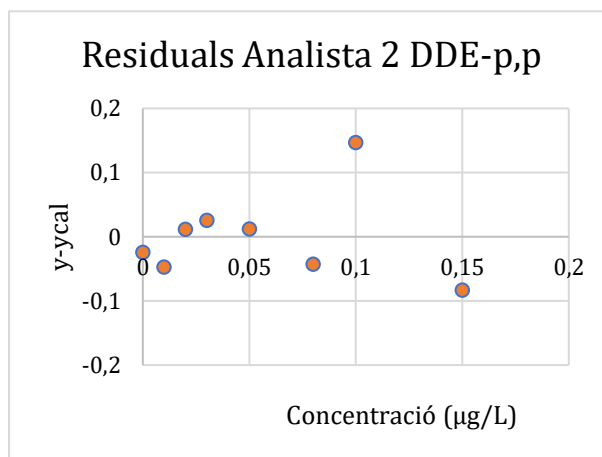


Figura 19: Residuals Analista 2 pel compost DDE-p,p

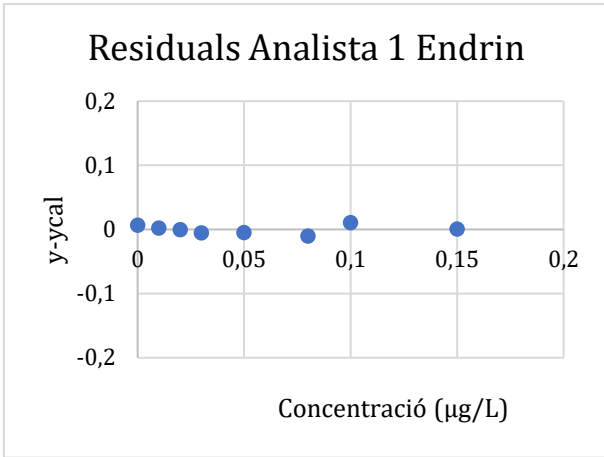


Figura 20: Residuals Analista 1 pel compost Endrin

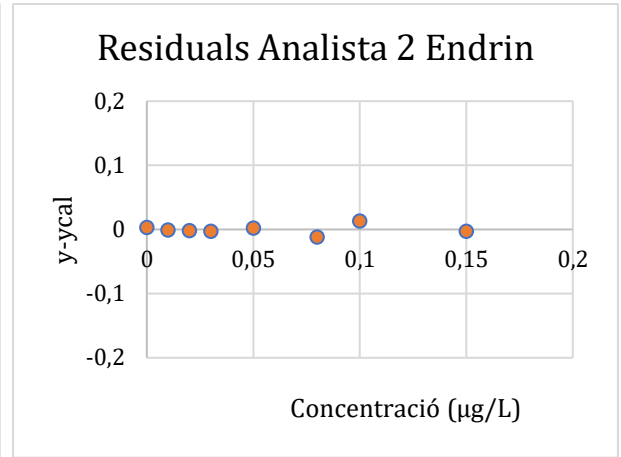


Figura 21: Residuals Analista 2 pel compost Endrin

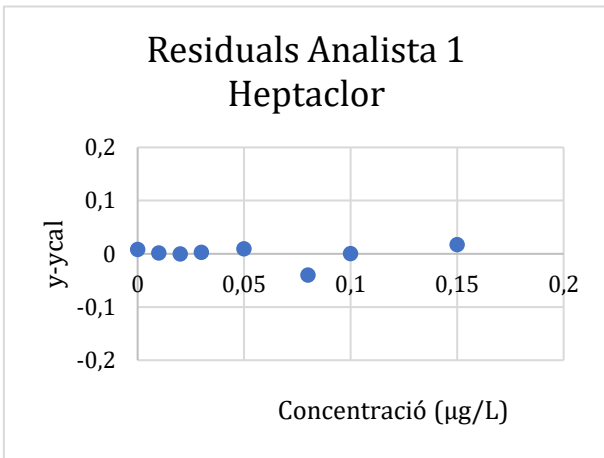


Figura 22: Residuals Analista 1 pel compost Heptaclor

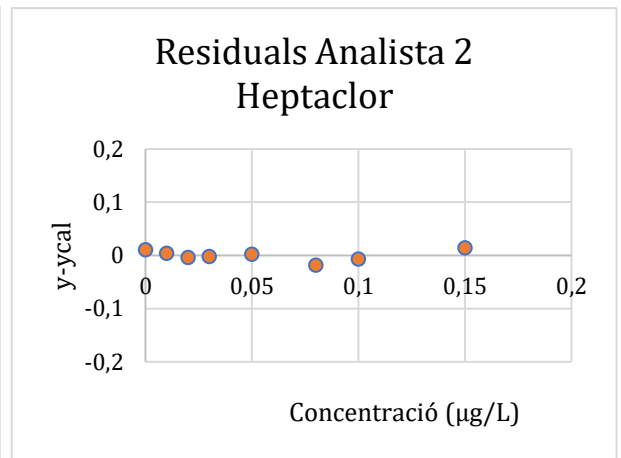


Figura 23: Residuals Analista 2 pel compost Heptaclor

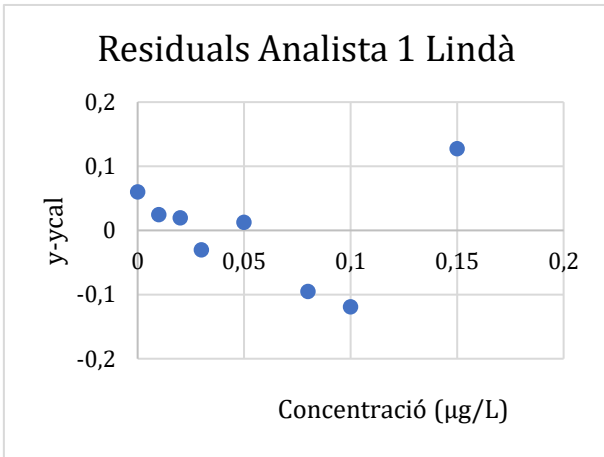


Figura 24: Residuals Analista 1 pel compost Lindà

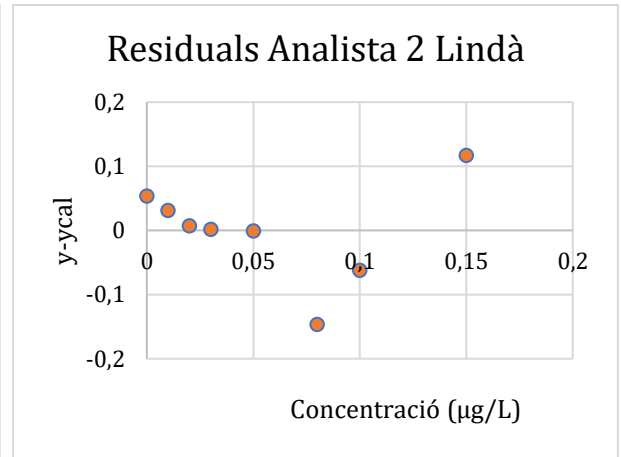


Figura 25: Residuals Analista 2 pel compost Lindà

6.4. Límits de detecció i quantificació (LOD i LOQ)

El límit de detecció és el valor de concentració mínima detectable i en què inferior a aquest, la detecció de l'anàlit s'esdevé un problema. Per tal de saber quin és aquest límit, el que es fa és mesurar diferents mostres de blancs que no continguin quantitats d'anàlit detectable o bé fortificar mostres d'assaig amb una concentració baixa d'anàlit per tal d'obtenir una desviació estàndard diferent de zero. En cas que es fortifiquin mostres amb una concentració d'anàlit baixa, cal que la concentració sigui prou alta per tal que es detectin els pics per sobre del soroll de fons que té l'equip. El LOD es pot calcular com tres vegades l'àrea del blanc de calibratge de la recta corresponent ³⁷. En aquest cas, no s'ha fet un estudi focalitzat a buscar el LOD, però hi ha una funció al software que marca l'àrea amb la qual posteriorment, podem saber el valor concret. El software agafa el blanc i ho compara amb el pic de l'anàlit a una concentració determinada i diu que el senyal/soroll ha de ser tres vegades el senyal del blanc.

Per altra banda, el límit de quantificació, és el valor de concentració mínima quantificable amb una destresa acceptable. A la pràctica, es pot calcular com la concentració d'anàlit corresponent a la desviació estàndard obtinguda a nivells baixos multiplicada per un factor k_Q (10). En aquest cas, el LOQ, l'establim mitjançant la recta perquè segons la norma, es tracta d'un 30% del valor paramètric de cada compost, el qual és 0,03 µg/L, per tant el LOQ correspon a 0,01 µg/L.¹⁵

6.5. Precisió

La precisió del mètode és una mesura que indica quan de propers estan els resultats entre si. Es pot avaluar en diferents condicions: condicions de repetibilitat o bé condicions intermitges.

Per avaluar la repetibilitat del mètode, cal realitzar un mínim de cinc determinacions utilitzant el mètode que es vol validar. Aquestes, les ha de preparar el mateix analista amb els mateixos equips, el mateix laboratori i el mateix dia. A més a més, es pot desenvolupar un dia per un analista i un dia per l'altre i així obtenir la repetibilitat dels diferents analistes.

Aquests resultats s'expressen com el coeficient de variació (%) de les dades obtingudes en aquestes condicions i es calcula com:

$$\%RSD = \frac{\text{desviació estàndard}}{\text{Valor mitjà}} \times 100$$

Cal anomenar que aquest valor no pot superar el 20%, sinó el mètode no tindria suficient precisió.

S'ha estimat la precisió realitzant el mateix procediment per les deu mostres d'aigua i fent-ne un duplicat a les diferents concentracions analitzades pels dos analistes

corresponents, i els resultats es veuen reflectits a les Taules 11 a 22. Cal recordar que, com s'observa a la Taula 5, a les mostres fortificades de concentració de 0,15 µg/L, només s'han realitzat per duplicat en dues de les cinc aigües tractades per cada analista. Això s'ha realitzat d'aquesta manera, ja que no es tenia més temps per fer l'anàlisi degut a que és un procés lent i el nombre de mostres i d'anàlits que s'estudien és elevat.

Analista 1 procedent de mostres fortificades a 0,010 µg/L

	A1.1	A1.2	A2.1	A2.2	A3.1	A3.2	A4.1	A4.2	A5.1	A5.2
DDE-o,p	0,009	0,009	0,008	0,010	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,008
DDE-p,p	0,010	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,008	0,009	0,008
Endrin	0,012	0,012	0,010	0,011	0,011	0,012	0,012	0,009	0,009	0,008
Heptaclor	0,010	0,010	0,009	0,011	0,010	0,010	0,011	0,008	0,010	0,008
Lindà	0,012	0,009	0,009	0,012	0,010	0,010	0,011	0,008	0,011	0,009

Taula 11: Resultats Analista 1 de mostres fortificades a 0,010 µg/L

	Mitjana	Desviació estàndard	%RSD
DDE-o,p	0,009	0,00059	6,69
DDE-p,p	0,009	0,00071	8,01
Endrin	0,010	0,0016	15,41
Heptaclor	0,010	0,0010	10,40
Lindà	0,010	0,0012	12,14

Taula 12: Resultats de mitjana, desviació estàndard i %RSD de l'Analista 1 de mostres fortificades a 0,010 µg/L

Analista 2 procedent de mostres fortificades a 0,010 µg/L

	A6.1	A6.2	A7.1	A7.2	A8.1	A8.2	A9.1	A9.2	A10.1	A10.2
DDE-o,p	0,010	0,010	0,009	0,011	0,009	0,008	0,011	0,010	0,012	0,010
DDE-p,p	0,009	0,010	0,009	0,011	0,009	0,009	0,012	0,010	0,012	0,011
Endrin	0,008	0,011	0,009	0,012	0,010	0,008	0,012	0,011	0,012	0,010
Heptaclor	0,008	0,009	0,011	0,011	0,009	0,010	0,009	0,010	0,010	0,010
Lindà	0,009	0,009	0,011	0,011	0,009	0,011	0,010	0,009	0,011	0,009

Taula 13: Resultats Analista 2 de mostres fortificades a 0,010 µg/L

	Mitjana	Desviació estàndard	%RSD
DDE-o,p	0,010	0,0013	12,66
DDE-p,p	0,010	0,0012	11,56
Endrin	0,010	0,0015	14,70
Heptaclor	0,010	0,00096	9,89
Lindà	0,010	0,0010	10,18

Taula 14: Resultats de mitjana, desviació estàndard i %RSD de l'Analista 2 de mostres fortificades a 0,010 µg/L

Analista 1 procedent de mostres fortificades a 0,050 µg/L

	A1.1	A1.2	A2.1	A2.2	A3.1	A3.2	A4.1	A4.2	A5.1	A5.2
DDE-o,p	0,061	0,052	0,051	0,049	0,049	0,055	0,053	0,046	0,054	0,049
DDE-p,p	0,057	0,054	0,053	0,050	0,047	0,055	0,052	0,047	0,054	0,050
Endrin	0,059	0,057	0,056	0,050	0,056	0,060	0,052	0,054	0,050	0,052
Heptaclor	0,057	0,055	0,052	0,056	0,056	0,056	0,057	0,062	0,050	0,051
Lindà	0,056	0,053	0,047	0,056	0,058	0,057	0,046	0,056	0,055	0,056

Taula 15: Resultats Analista 1 de mostres fortificades a 0,050 µg/L

	Mitjana	Desviació estàndard	%RSD
DDE-o,p	0,052	0,0043	8,25
DDE-p,p	0,052	0,0035	6,65
Endrin	0,054	0,0035	6,42
Heptaclor	0,055	0,0036	6,47
Lindà	0,054	0,0041	7,57

Taula 16: Resultats de mitjana, desviació estàndard i %RSD de l'Analista 1 de mostres fortificades a 0,050 µg/L

Analista 2 procedent de mostres fortificades a 0,050 µg/L

	A6.1	A6.2	A7.1	A7.2	A8.1	A8.2	A9.1	A9.2	A10.1	A10.2
DDE-o,p	0,052	0,053	0,047	0,046	0,045	0,051	0,049	0,053	0,054	0,052
DDE-p,p	0,053	0,054	0,047	0,048	0,048	0,052	0,048	0,054	0,056	0,054
Endrin	0,053	0,053	0,051	0,050	0,050	0,047	0,052	0,053	0,053	0,053
Heptaclor	0,051	0,049	0,047	0,048	0,051	0,045	0,053	0,047	0,054	0,052
Lindà	0,051	0,048	0,046	0,047	0,054	0,046	0,056	0,050	0,053	0,052

Taula 17: Resultats Analista 2 de mostres fortificades a 0,050 µg/L

	Mitjana	Desviació estàndard	%RSD
DDE-o,p	0,050	0,0032	6,37
DDE-p,p	0,051	0,0032	6,31
Endrin	0,051	0,0020	3,87
Heptaclor	0,050	0,0030	5,96
Lindà	0,050	0,0036	7,16

Taula 18: Resultats de mitjana, desviació estàndard i %RSD de l'Analista 2 de mostres fortificades a 0,050 µg/L

Analista 1 procedent de mostres fortificades a 0,15 µg/L

	A4.1	A4.2	A5.1	A5.2
DDE-o,p	0,16	0,16	0,16	0,16
DDE-p,p	0,16	0,17	0,16	0,16
Endrin	0,16	0,16	0,16	0,16
Heptaclor	0,15	0,16	0,16	0,16
Lindà	0,15	0,17	0,17	0,16

Taula 19: Resultats Analista 1 de mostres fortificades a 0,15 µg/L

	Mitjana	Desviació estàndard	%RSD
DDE-o,p	0,16	0,0036	2,29
DDE-p,p	0,16	0,0051	3,13
Endrin	0,16	0,0021	1,32
Heptaclor	0,16	0,0032	2,06
Lindà	0,16	0,0080	4,90

Taula 20: Resultats de mitjana, desviació estàndard i %RSD de l'Analista 1 de mostres fortificades a 0,15 µg/L

Analista 2 procedent de mostres fortificades a 0,15 µg/L

	A7.1	A7.2	A10.1	A10.2
DDE-o,p	0,14	0,15	0,14	0,15
DDE-p,p	0,14	0,16	0,15	0,16
Endrin	0,15	0,16	0,15	0,14
Heptaclor	0,16	0,16	0,17	0,16
Lindà	0,16	0,16	0,15	0,15

Taula 21: Resultats Analista 2 de mostres fortificades a 0,15 µg/L

	Mitjana	Desviació estàndard	%RSD
DDE-o,p	0,15	0,0073	4,99
DDE-p,p	0,15	0,0090	5,86
Endrin	0,15	0,0079	5,16
Heptaclor	0,16	0,0070	4,27
Lindà	0,15	0,0082	5,32

Taula 22: Resultats de mitjana, desviació estàndard i %RSD de l'Analista 2 de mostres fortificades a 0,15 µg/L

Per avaluar-ho en condicions intermitges, es realitzen mínim deu determinacions utilitzant el mètode a validar i s'ha de variar una de les següents variables: analista, equips, recta de calibratge o dia, però fent l'anàlisi en el mateix laboratori. Cal remarcar que si un analista ha fet un mínim de cinc repeticions en condicions de repetibilitat i un altre dia un analista n'ha fet cinc més, el conjunt de les deu mesures són les condicions intermitges. Cal destacar que si s'opta per fer la precisió en

repetibilitat amb duplicats de cada mostra, hi haurà d'haver com a mínim deu determinacions a cada nivell de concentració, de les quals algunes mostres del mateix nivell, han de ser en dies diferents i fetes per analistes diferents.

Com es pot veure en tot el conjunt de taules de resultats, es compleix els criteris d'acceptació establerts (que el valor del %RSD sigui inferior a 20%) en tots els casos, i per tant podem dir que el mètode és suficientment precís.

6.6. Exactitud

L'exactitud expressa la proximitat entre unes mesures individuals i un valor veritable. Es pot dir que engloba els termes de veracitat i de precisió. Amb altres paraules, es refereix a que la mesura a més de ser exacta, també és repetible i consistent.

En aquest estudi, s'avaluen els errors sistemàtics i aleatoris que poden presentar-se al llarg de l'anàlisi. Tracta de determinar el percentatge de recuperació mitjançant l'equació:

$$R (\%) = \frac{\text{mitjana dels valors obtinguts}}{\text{valor real o referencia}} \times 100$$

El criteri que s'ha de complir per avaluar l'exactitud, és que els percentatges de recuperació estiguin entre 70% i 120%

	%R (0,010 µg/L)	%R (0,050 µg/L)	%R (0,15 µg/L)
DDE-o,p	93,3	104,6	101,5
DDE-p,p	94,9	104,8	105,6
Endrin	103,5	105,4	104,6
Heptaclor	96,6	104,3	106,9
Lindà	100,2	102,6	105,6

Taula 23: Resultats dels percentatges de recuperació per avaluar l'exactitud del mètode

Com s'observa a la Taula 23, tots els valors es troben dins de l'interval d'entre 70-120% de recuperació i per tant, fa que es compleixi el criteri d'acceptació plantejat.

7. ANÀLISI DE MOSTRES REALS

Una vegada s'ha realitzat el procés de validació al complet, es procedeix a aplicar el mètode optimitzat per analitzar mostres d'aigua de consum humà que arriben al laboratori. Per això, es disposa d'un seguit d'aigües, a poder ser, envasades en recipients de vidre de més d'un litre i refrigerades prèviament a la seva anàlisi. Posteriorment, es realitza tot el procediment que s'ha mencionat anteriorment per preparar la mostra i poder-la injectar al cromatògraf de gasos amb les condicions esmentades.

Prèviament a la preparació de les mostres reals, es preparen els patrons de la recta de calibratge, constant d'un blanc i de diferents patrons de concentració coneguda: 0,010 µg/L, 0,020 µg/L, 0,030 µg/L, 0,050 µg/L, 0,080 µg/L, 0,10 µg/L i 0,15 µg/L.

Una vegada s'han analitzat els patrons de la recta, s'obtenen els resultats mostrats a la Taula 24 així com també, l'equació de la recta pel compost Endrin. (Per tots els compostos es fa igual)

Concentració (µg/L)	Àrea
Blanc	10
0,010	976
0,020	1742
0,030	2643
0,050	4063
0,080	5632
0,10	8246
0,15	12885

Taula 24: Valors de concentració i àrea obtinguda per la recta de calibratge pel compost Endrin

L'àrea del patró intern per a tots els compostos (Clorpirifos D10) en el calibratge és de 40914.

L'equació de la recta és: $y = 2,02x - 0,001$, amb un coeficient de correlació R^2 de 0,9903.

A continuació, a la Taula 25 es mostra el valor de l'àrea pel compost Endrin per cada una de les cinc mostres reals, les seves respectives àrees del Patró Intern per cada una de les mostres i la concentració que s'obté d'aquest mateix compost com a resultat final. Per fer el càlcul, s'ha substituït la y de la recta pel valor del quocient de l'àrea del compost respecte l'àrea del Patró Intern i s'ha buscat el valor de la x .

Codi Mostra	Àrea Mostra	Àrea Patró Intern	Concentració (µg/L)
M1	34	35492	<0,010
M2	18	35877	<0,010
M3	28	28937	<0,010
M4	34	34876	<0,010
M5	29	39711	<0,010

Taula 25: Valors de concentració i àrea obtinguda per les mostres analitzades pel compost Endrin

Per poder detectar i quantificar les mostres, els valors obtinguts han de ser superiors als LOD i LOQ. En aquest cas, com que el valor de concentració es inferior al valor del LOQ, no podem assegurar que es pot quantificar el compost i es fica que el valor és inferior al LOQ (<0,010 µg/L).

Per últim, a les Taules 26 i 27, s'observen els resultats per a tots els compostos estudiats en aquest estudi de les cinc mostres analitzades:

Codi Mostres	Àrea				
	DDE-o,p	DDE-p,p	Endrin	Heptaclor	Lindà
M1	101	55	34	15	561
M2	12	17	18	8	123
M3	57	26	28	8	54
M4	15	95	34	8	15
M5	9	52	29	26	115

Taula 26: Valors d'àrea per tots els compostos i per totes les mostres reals analitzades

A continuació, amb ajuda de la recta, es quantifiquen els resultats, que han sigut els següents:

Codi Mostres	Àrea				
	DDE-o,p	DDE-p,p	Endrin	Heptaclor	Lindà
M1	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
M2	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
M3	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
M4	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
M5	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
LOQ	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010

Taula 27: Valors de concentració per tots els compostos i per totes les mostres reals analitzades

Com es pot veure, en cap de les cinc aigües analitzades s'ha vist presència suficient de cap dels anàlits estudiats, ja que els valors obtinguts de concentració sempre seran inferiors al LOD i al LOQ, per la qual cosa es pot dir que no es detecta presència d'aquests compostos i per tant podem concloure que no superen el límit establert per legislació i per tant, l'aigua no conté suficient quantitat d'aquests compostos i seria apta pel consum humà.

8. CONCLUSIONS

El mètode analític desenvolupat en aquest treball, ha demostrat l'eficàcia de la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (GC-MS) combinada amb l'extracció en fase sòlida (SPE) per la detecció de pesticides organoclorats en aigües de consum humà. S'han estudiat cinc compostos específics en profunditat i els resultats obtinguts han estat satisfactoris, ja que són inferiors als especificats per la legislació vigent respecte a termes de sensibilitat, selectivitat, límit de detecció i quantificació, precisió i exactitud.

Al llarg de l'estudi, s'han optimitzat un seguit de condicions experimentals per tal de dur a terme l'anàlisi, tant de l'extracció en fase sòlida com de les condicions cromatogràfiques, aconseguint una recuperació adequada dels pesticides i una identificació precisa per cada compost. La realització de la validació del mètode indica que el mètode és prou útil, robust i reproduïble per la determinació de pesticides en aigües de consum humà de manera rutinària.

Cal destacar que es vol demostrar que la qualitat de l'aigua destinada al consum humà és molt important de cara a la protecció de la salut pública de tots els consumidors. En aquest mètode només s'han estudiat cinc compostos profundament, però aquests obren la porta a futures investigacions per tal d'ampliar la llista de compostos analitzats i millorar els mètodes de detecció.

En resum, la combinació de SPE i GC-MS es presenta com una tècnica poderosa i eficient pel control de pesticides en aigües de consum per tal d'assegurar que els nivells d'aquests contaminants es mantinguin dins dels intervals segurs i acceptables. És essencial que es pugui continuar investigant i millorant aquests mètodes per tal d'assegurar la qualitat l'aigua que utilitzem dia a dia. Se sap que hi ha mètodes d'extracció més automatitzats de SPE, encara que no s'han disposat en la realització d'aquest estudi.

Es pot concloure que el mètode posa en manifest la necessitat de la col·laboració entre els centres de recerca, les institucions públiques i les empreses privades per tal de desenvolupar i implementar les tecnologies a unes de més eficaces i avançades. Si hi ha una acció conjunta per totes les parts, es podrà assolir l'objectiu de proporcionar a la població una aigua de consum segura i de qualitat, contribuint en el benestar i la salut de la societat. És fonamental que es continuï investigant en aquest camp, per millorar els processos analítics i afrontar possibles reptes que puguin sorgir en el futur.

The analytical method developed in this work has demonstrated the efficacy of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) combined with solid phase extraction (SPE) for the detection of organochlorinated pesticides in human consumption waters. Five specific compounds have been studied and the results obtained have been satisfactory, since they are lower than those specified by current legislation in terms of sensitivity, selectivity, detection and quantification limit, precision and accuracy.

Throughout the study, a series of experimental conditions have been optimized in order to carry out the analysis, both of the solid phase extraction and of the chromatographic conditions, achieving an adequate recovery of pesticides and a precise identification for each compound. The validation of the method indicates that the method is useful, robust and reproducible enough for the determination of pesticides in water of human consumption routinely.

It should be noted that the aim is to demonstrate that the quality of water intended for human consumption is very important in terms of protecting the public health of all consumers. In this method only five compounds have been studied deeply, but these open the door to future research to expand the list of compounds analyzed and improve detection methods.

In summary, the combination of SPE and GC-MS is presented as a powerful and efficient technique for controlling pesticides in drinking water to ensure that the levels of these contaminants are kept within safe and acceptable intervals. It is essential that these methods can continue to be researched and improved to ensure the quality of the water we use every day. It is known that there are more automated extraction methods of SPE, although they have not been used to carry out this study.

It can be concluded that the method highlights the need for collaboration between research centres, public institutions and private companies in order to develop and implement technologies in more efficient and advanced ones. If there is joint action by all parties, the objective of providing the population with safe and quality drinking water can be achieved, contributing to the well-being and health of society. It is essential to continue researching in this field, for improve analytical processes and face possible challenges that may appear in the future.

9. BIBLIOGRAFIA

- (1) España; Francisco J; Palau; Roger. Els Pesticides i El Medi Ambient. pp 21–25. <https://www.semanticscholar.org/paper/3bec117cf61cd2bce4dbacb2d4f25c57a1ac4812>. (accessed 2024-06-12).
- (2) Doménech, J. *Plaguicidas: Sus Efectos En La Salud Humana. Ámbito Farmacéutico:Sanidad Ambiental*; 2004; Vol. 23.
- (3) Organización Mundial de la Salud. *Residuos de plaguicidas en los alimentos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>. (accessed 2024-04-16).
- (4) Definición. 1.Generalidades 1.1 Plaguicidas. https://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/milla_c_o/generalidades.pdf. (accessed 2024-04-30).
- (5) Martínez Escudera, C. Aplicación de Solarización y Ozonización Para La Eliminación de Residuos de Plaguicidas En Suelos Agrícolas, Universidad de Murcia, 2022. <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/122670/1/Tesis%20Carmen%20Mar%C3%ADa%20Mart%C3%ADnez%20Escudero%20impresi%C3%B3n%20TAPA%20DURA%20OFICIAL.pdf>. (accessed 2024-05-02).
- (6) Una Breve Historia de la Reglamentación de Pesticidas. Departamento de Reglamentación de Pesticidas. 2017, pp 1–8. https://www.cdpr.ca.gov/docs/pressrls/dprguide/spanish/historical_timeline_sp.pdf. (accessed 2024-04-30).
- (7) Angulo, E.; Mujeres con ciencia. *El caso de Rachel Carson*. <https://mujeresconciencia.com/2015/06/22/el-caso-de-rachel-carson/>. (accessed 2024-04-30).
- (8) Bär, J.; Bickel, U.; Bollmohr, S.; Mies Bombardi, L.; Bourgin, C.; Bödeker, W.; Brühl, C.; Butscher-Schaden, H.; Von Der Decken, H.; Goulson, D.; Gräub, B.; Haffmans, S.; Heimrath, J.; Hoinkes, C.; Holdinghausen, H.; Lemken, D.; Liebetrau, L.; Mertens, M.; Nabel, M.; Prescher, A.; Quijano, I.-I.; Satzger, A.; Spiller, A.; Tostado, L.; Wenz, K.; Zaller, J.; Zühlsdorf, A. *El Atlas de Los Pesticidas*; 2023; pp 1–62.
- (9) Romera, J.; Juárez, M. *El campo sube los precios cuatro puntos más que los súper y “caliente” la inflación*. <https://www.eleconomista.es/retail-consumo/noticias/12628982/01/24/el-campo-sube-los-precios-cuatro-puntos-mas-que-los-super-y-caliente-la-inflacion.html>. (accessed 2024-04-30).
- (10) Ibáñez de Aldecoa Fuster, J. *El aumento del precio de los alimentos en España: ¿qué esperar?* <https://www.caixabankresearch.com/es/analisis-sectorial/agroalimentario/aumento-del-precio-alimentos-espana-esperar>. (accessed 2024-04-30).

- (11) Gencat. *Definició i sistemes de control*. Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural. Gencat.
<https://agricultura.gencat.cat/ca/ambits/agricultura/produccio-integrada/dar-definicio-sistemes-control/>. (accessed 2024-04-30).
- (12) Del Puerto Rodríguez, A. M.; Suárez Tamayo, S.; Palacio Estrada, D. E. Efectos de Los Plaguicidas Sobre El Ambiente y La Salud. *Rev Cubana Hig Epidemiol* **2014**, 372–387.
- (13) Ministerio del Gobierno. *Impacto de los nitratos y pesticidas en el uso y calidad de las aguas*. <https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/proteccion-nitratos-pesticidas/impacto-calidad-agua.html>. (accessed 2024-05-02).
- (14) Pitchers, C. *50% menos de pesticidas en la UE para 2030* | Euronews. <https://es.euronews.com/my-europe/2022/06/22/50-menos-de-pesticidas-en-la-ue-para-2030>. (accessed 2024-05-02).
- (15) BOE-A-2023-628. Real Decreto 3/2023, de 10 de Enero, Por El Que Se Establecen Los Criterios-Sanitarios de La Calidad Del Agua de Consumo, Su Control y Suministro. Boletín Oficial Del Estado.
<https://Www.Boe.Es/Buscar/Pdf/2023/BOE-A-2023-628-Consolidado.Pdf>.
- (16) *o,p*-DDE ; CAS NO 3424-82-6 ; PubChem: Washington DC, EUA.
- (17) *p,p'*-DDE; CAS NO 78-55-9; PubChem: Washington DC, EUA.
- (18) *Endrin*; CAS NO 128-10-9; PubChem: Washington DC, EUA.
- (19) *Heptachlor* ; CAS NO 76-44-8; PubChem: Washington DC, EUA.
- (20) *Hexachlorocyclohexane* ; CAS NO 58,89,9; PubChem: Washington DC, EUA.
- (21) de Almeida Azevedo, D.; Lacorte, S.; Vinhas, T.; Viana, P.; Barceló, D. Monitoring of Priority Pesticides and Other Organic Pollutants in River Water from Portugal by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00372-1. Published Online: May 19, 2000. <https://Pubmed.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/10870692/>.
- (22) Planas, C.; Puig, A.; Rivera, J.; Caixach, J. Analysis of Pesticides and Metabolites in Spanish Surface Waters by Isotope Dilution Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Previous Automated Solid-Phase Extraction Estimation of the Uncertainty of the Analytical Results. DOI:10.1016/j.Chroma.2006.07.091. Published Online: Sep 08, 2006. <https://Pubmed.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/16962600/>. *J Chromatogr A* **2006**, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.091>.
- (23) Merck. *Extracción en fase sólida (SPE)*. <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/applications/analytical->

- [chemistry/sample-preparation/solid-phase-extraction](#). (accessed 2024-05-06).
- (24) Recasens R.M. Aplicación de La Microextracción En Fase Sólida al Análisis Medioambiental. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, ES, 2002.
- (25) Montesdeoca Esponda, S. Desarrollo de Metodologías de Extracción y Microextracción Combinadas Con Sistemas Cromatográficos Para La Determinación de Fármacos y Productos de Cuidado Personal En Muestras Ambientales, Las Palmas de Gran Canaria, 2013.
- (26) Agilent Technologies. *Fundamentos de La Cromatografía de Gases Hardware*; 2016.
- (27) *Cromatografía de Gases*.
https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf. (accessed 2024-05-08).
- (28) *Thermo Fisher Scientific, Centro de aprendizaje de HPLC*.
<https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information.html>. (accessed 2024-05-07).
- (29) *Microtrac - Belmass II: Evaluación de catalizadores - Medición por adsorción de gas*. <https://www.microtrac.es/es/productos/medicion-por-adsorcion-de-gas/evaluacion-de-catalizadores/belmass-ii/>. (accessed 2024-05-09).
- (30) Harris, D. C. *Análisis Químico Cuantitativo*, 3ª Ed.; Editorial Reverté SA, Ed.; California.
- (31) Espectrometría de Masas.
https://Www.Mncn.Csic.Es/Docs/Repositorio/Es_ES/Investigacion/Cromatografia/Espectrometria_de_masas.Pdf.
- (32) Hernández Ching, R. C. *Modern Injection Techniques for Gas Chromatography: A Practical Guide*, Universidad Nacional Costa Rica, 2006.
- (33) Molina, J. R. *Desarrollo de Metodologías Analíticas Mediante Cromatografía/Espectrometría de Masas Para El Control de Contaminantes Orgánicos Prioritarios y Emergentes En Aguas Residuales y Superficiales*, Universidad de Jaen, ES, 2017.
- (34) Instituto de Hidrología, M. y E. A. *Instructivo de Ensayo, Determinación de Pesticidas En Sedimentos Mediante Extracción En Fase Dispersa (MSPD) y Análisis Por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas Triple Cuadrupolo (GC-QqQ)*; 2021.
<http://sgi.ideam.gov.co/documents/412030/97658415/M-S-LC-1028+INSTRUCTIVO+DE+ENSAYO.+DETERMINACION%20DE+PLAGUICIDAS+ORGANOFOSFORADOS+EN+AGUA+SUPERFICIAL.pdf/f5c6e2f1-6740-4100-b00b-f89cd63fa11f?version=1.0>. (accessed 2024-06-07).

- (35) Eurachem. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods : A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2^a Ed.; 2014.
- (36) Fu, Y.; Zhang, J.; Qin, J.; Dou, X.; Luo, J.; Yang, M. Representative Matrices for Use in Matrix-Matched Calibration in Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues in Different Types of Food-Medicine Plants. DOI: 10.1016/j.jfca.2022.104617. Published Online: Aug, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104617>.
- (37) Fisher Scientific Inc, T. *CHROMELEON Chromatography Management System*. 2005. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Man-Chromeleon-680-EN.pdf>. (accessed 2024-06-12).