

NOTA TÉCNICA

Validación de una metodología analítica para determinar bifenilos policlorados en muestras de plasma sanguíneo

Boris Santiago Ávila, Carolina Ramírez

Grupo de Salud Ambiental y Laboral, Dirección de Investigación en Salud Pública,
Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C, Colombia

Introducción. Los bifenilos policlorados se encuentran entre los cinco contaminantes orgánicos persistentes más tóxicos para los organismos vivos, según la *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) de los Estados Unidos.

Objetivo. Estandarizar y validar un método analítico para la determinación y cuantificación de los bifenilos policlorados indicadores en muestras de plasma sanguíneo, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Materiales y métodos. Se fortificó un *pool* de plasma para hacer los ensayos en la matriz. Además, se utilizó el material de referencia NIST SRM® 1958 (*Organic Contaminants in Fortified Human Serum, Freeze-Dried*) para los ensayos de veracidad y precisión intermedia.

Resultados. Los porcentajes de recuperación obtenidos con la metodología estuvieron entre 88,4 y 97,5 %, y el sesgo fue menor del 20 %. Los límites de detección y cuantificación de los bifenilos policlorados indicadores policlorados fueron de 0,04 µg/L y 0,10 µg/L, respectivamente. La linealidad representada por el coeficiente de determinación (R^2) varió entre 0,9866 y 0,9886. La precisión expresada como desviación estándar relativa fue menor del 20 % en todo el rango lineal de trabajo (0,5-500 µg/L). Por último, se analizaron 115 muestras de población colombiana de diferentes zonas del país y se encontraron 65 muestras positivas, de las cuales dos estuvieron por encima de los valores de control biológico en humanos (*Human Biomonitoring Values*, HBM- II): 7,0 µg/L, $2X\sum_{PCB\ 138,\ 153,\ 180}$ y otras dos, por encima del HBM-I: 3,5 µg/L, $2X\sum_{PCB\ 138,\ 153,\ 180}$.

Conclusión. El método desarrollado resultó ser preciso para el análisis de los bifenilos policlorados en muestras de plasma sanguíneo y se puede utilizar para el control biológico de estos contaminantes en población colombiana.

Palabras clave: bifenilos policlorados; sangre; plasma; cromatografía de gases; espectrometría de masas; química analítica.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3529>

Validation of an analytical methodology to determine polychlorinated biphenyls in samples from blood plasma

Introduction: Polychlorinated biphenyls are among the five most toxic persistent contaminants for living organisms according to the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).

Objective: To standardize and validate an analytical method to determine and quantify polychlorinated biphenyl indicators in samples from blood plasma by means of gas chromatography-mass spectrometry.

Materials and methods: We fortified a plasma pool to do the matrix assays. Additionally, we used the NIST SRM® 1958 reference material for the veracity and intermediate accuracy assays.

Results: Methodology recovery percentages ranged between 88.4 and 97.5%, and the bias was less than 20%. Detection and quantification limits were 0.04 µg/L and 0.10 µg/L, respectively, for all polychlorinated biphenyl indicators. The linearity represented by the determination coefficient (R^2) varied between 0.9866 and 0.9886. Accuracy, expressed as relative standard deviation was less than 20% in all the linear work range (0.5-500 µg/L). Finally, we analyzed 115 samples from Colombian population in various zones of the country and we found 65 positive samples, from which two samples were above HBM-II (7.0 µg/L, $2X\sum_{PCB\ 138,\ 153,\ 180}$), and two, above HBM-I (3.5 µg/L, $2X\sum_{PCB\ 138,\ 153,\ 180}$).

Conclusion: The method we developed is accurate for PCB analysis in blood plasma samples and could be used for biological surveillance of these contaminants in the Colombian population.

Key words: Polychlorinated biphenyls; blood; plasma; chromatography, gas; mass spectrometry; chemistry, analytical.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3529>

Contribución de los autores:

Boris Santiago Ávila: responsable de la metodología, los resultados y su análisis

Carolina Ramírez: participación en todas las etapas de la investigación

Ambos autores participaron en la escritura del manuscrito.

Los bifenilos policlorados son una familia de 209 compuestos orgánicos que constan de dos anillos de benceno unidos por un enlace carbono-carbono. Los átomos de cloro se sustituyen en uno o en los restantes diez lugares disponibles. El número y la posición de los átomos de cloro determinan la clasificación, la geometría y, por ende, las propiedades de las distintas moléculas (figura 1) (1).

Según la *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR), en el 2011, los bifenilos policlorados se catalogaron entre los cinco contaminantes orgánicos más tóxicos para los organismos vivos (2). Se han usado ampliamente en la industria por sus propiedades físicas, ya que son buenos aislantes y no son inflamables. Se encuentran en transformadores, refrigerantes y condensadores eléctricos, así como en muchos otros productos, como barnices, parafinas, resinas sintéticas, pinturas epóxicas y marinas, recubrimientos, lubricantes para corte, fluidos para intercambiador de calor y fluidos hidráulicos (1).

Se ha demostrado que las mezclas de bifenilos policlorados, similares (*dioxin-like*, DL) y no similares a la dioxina (*non-dioxin-like*, NDL), producen efectos endocrinos, inmunológicos y cancerígenos en animales adultos y, en dosis más bajas, también en el desarrollo cerebral del feto (3). En muchos estudios se ha sugerido que existe una relación entre la exposición a los bifenilos policlorados y el aumento del riesgo de padecer cáncer del aparato digestivo, del hígado y de la piel (4). Además, los niveles elevados de bifenilos policlorados en sangre se han relacionado con el cáncer del sistema linfático (4).

La exposición a los bifenilos policlorados puede afectar la reproducción humana, pues se ha asociado con menor fecundidad en las mujeres y disminución del número de espermatozoides móviles en los hombres (4). Durante el embarazo y la lactancia, la exposición se ha relacionado con retraso en el crecimiento y el desarrollo durante la infancia (4), así como con efectos neurológicos, como entumecimiento, dolores de cabeza, mayor frecuencia de infecciones y cambios en la piel, sobre todo sarpullidos y cloracné (4).

Correspondencia:

Carolina Ramírez, Grupo de Salud Ambiental y Laboral, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: 220 7700, extensión 1216
cramirezg@ins.gov.co

Recibido: 28/05/16; aceptado: 19/01/17

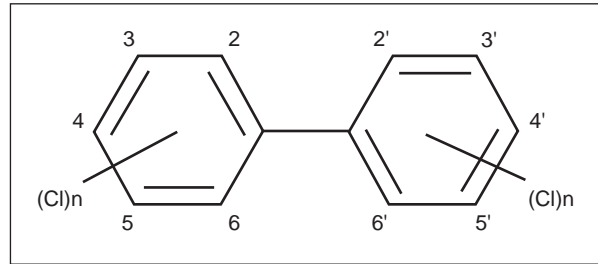


Figura 1. Estructura de la molécula de los bifenilos policlorados

La selección de los bifenilos policlorados indicadores (28, 52, 101, 138, 153 y 180) en el presente estudio, no respondió a un punto de vista toxicológico; sin embargo, se encuentran en mayor proporción los arocloros, con alrededor de 50 % de todos los congéneres bifenilos policlorados presentes en los alimentos de origen animal y en la grasa humana. Además, los bifenilos policlorados 138, 153 y 180 son los más persistentes en el ambiente (5).

La *Human Biomonitoring Commission* ha establecido dos valores críticos de concentración en suero (*Human Biomonitoring Values*, HBM) a partir de la suma de los bifenilos policlorados 138, 153 y 180 multiplicados por un factor de 2: HBM I=3,5 µg/L y HBM II=7,0 µg/L (6,7).

Los valores por debajo del HBM-I indican que no hay riesgo de efectos adversos sobre la salud y, en consecuencia, no es necesario intervenir (7). Los valores por encima del HBM-I y por debajo del HBM-II, indican que hay una fuente de exposición potencial que debe ser detectada para minimizar sus efectos (7). Un valor correspondiente al HBM-II indica que hay riesgo de efectos adversos sobre la salud, por lo cual debe reducirse la exposición y buscarse asesoría biomédica. En general, el valor HBM-I representa un nivel de control y, el HBM-II, un nivel de acción (7).

La *Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail* (Anses) estableció dos valores críticos en sangre a partir de la suma de la concentración de todos los bifenilos policlorados en el total de lípidos de la muestra: 700 ng/g de lípidos para mujeres lactantes y niños menores de tres años de edad, y 1.800 ng/g de lípidos para el resto de la población (8).

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar y validar un método analítico para la determinación y la cuantificación de los bifenilos policlorados indicadores en muestras de plasma sanguíneo, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, con el fin de proporcionar una

herramienta de utilidad para el control biológico de la población colombiana, pues aunque a nivel mundial hay reportes sobre los niveles de bifenilos policlorados en sangre (9-17) y un amplio desarrollo de metodologías analíticas (18-23), en Colombia no existen estudios de control biológico de bifenilos policlorados que permitan a las entidades nacionales tomar decisiones para promover acciones de salud en este campo.

Materiales y métodos

Reactivos y disoluciones

Se utilizaron los estándares de los bifenilos policlorados indicadores 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180, y el estándar interno 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno de la marca Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemania), con una pureza del 99,0 %. También, se usó el estándar subrogado bifenilo policlorado 209 de la marca Ultra Scientific (North Kingstow, Estados Unidos), con una pureza de 98,8 %.

Se prepararon disoluciones madre (*stock*) en concentraciones cercanas a los 200 mg/L de todos los bifenilos policlorados indicadores y los estándares internos; posteriormente, se prepararon cuatro mezclas de trabajo de 2.000, 200, 20 y 2,0 µg/L. Todas las soluciones madre y las disoluciones de trabajo se prepararon en isooctano para análisis de la marca Merck, a excepción del bifenilo policlorado 209, que se preparó en n-hexano. Se almacenaron a -20 ± 2 °C, y la estabilidad de las disoluciones se verificó para un periodo de cuatro meses. Las disoluciones de calibración se prepararon por dilución apropiada de la mezcla de trabajo en el extracto de la matriz.

Con fines de validación, se fortificó un *pool* de plasma humano para hacer los ensayos en la matriz, el cual se obtuvo a partir de tres unidades de plasma sanguíneo suministradas por el Grupo de la Red Nacional de Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Se empleó, además, el material de referencia NIST SRM1958 (*Organic Contaminants in Fortified Human Serum, Freeze-Dried*) para los ensayos de veracidad y presión intermedia.

Instrumentos y equipos

El análisis cromatográfico se hizo en un cromatógrafo de gases HP 6890N® con inyector automático 7683, equipado con un inyector de división conectado a una columna capilar HP-5MS® (30 m, 0,32 mm d.i., 0,25 µm) acoplada a un detector selectivo de masas de cuádruplo simple 5975B® (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). Las

condiciones de operación del equipo fueron las siguientes: volumen de inyección, 2 µl; temperatura del inyector, 280 °C; modalidad de inyección sin división y pulsada a 60 psi durante 0,5 minutos.

El programa de temperatura del horno tuvo la siguiente rampa: temperatura inicial de 100 °C durante un minuto y una rampa de 14 °C por minuto hasta 130 °C, y luego una de 8 °C por minuto hasta 300 °C, la cual se mantuvo por un minuto. La temperatura de la línea de transferencia al espectrómetro de masas se mantuvo en 280 °C. El tiempo de análisis fue de 25,4 minutos con un flujo constante de 1,0 ml por minuto de helio de grado 5,0.

El espectrómetro de masas se operó en el modo de ionización por impacto de electrones a 70 eV y la modalidad de adquisición fue la de monitorización selectiva de iones (*Selected Ion Monitoring*, SIM). En el cuadro 1 se presentan los iones de cuantificación (*target ions*) y de confirmación (Q_1 , Q_2) utilizados para los bifenilos policlorados indicadores y para los estándares internos.

Análisis de las muestras

El análisis de las muestras se hizo en tres etapas: extracción, limpieza y análisis cromatográfico.

Extracción. Se adicionó 1 ml de plasma en un tubo de ensayo de vidrio de 15 ml; se agregaron 20 µl de estándar subrogado (PCB 209) a 200 µg/L y 1 ml de etanol. Esta mezcla se agitó en el mezclador de vórtice durante 10 segundos y, posteriormente, se adicionaron 2 ml de n-hexano y se agitó de nuevo en el mezclador de vórtice durante 1,5 minutos para transferir los bifenilos policlorados indicadores de la matriz a la fase orgánica de n-hexano. Después, se dejó reposar la muestra durante 2 minutos, y la fase orgánica en la parte superior se transfirió con

Cuadro 1. Tiempo de retención (TR), iones de cuantificación y confirmación de los bifenilos policlorados indicadores y los estándares internos

Compuesto	TR (minutos)	Target	Q_1	Q_2
PCB 28	13.181	186	258	256
PCB 52	14.025	290	292	294
PCB 101	16.104	326	324	328
PCB 118	17.568	326	324	328
PCB 138	18.702	360	362	290
PCB 153	18.070	360	362	290
PCB 180	20.210	396	394	324
2,4,5,6-tetracloro-m-xileno (E.I.)	9.863	209	244	242
PCB 209 (E.S.)	23.655	498	500	496

una pipeta Pasteur de vidrio a un tubo de ensayo de vidrio diferente. La extracción se repitió dos veces y se obtuvo un volumen final aproximado de 6 ml de fase orgánica.

El extracto orgánico se llevó hasta el estado de sequedad en el equipo Rapidvap® a una temperatura de 35 °C, una velocidad de agitación de 25 % y 100 mbar de vacío durante 35 minutos; la presión se disminuyó lentamente en 100 unidades de presión por minuto desde 600 hasta 100 mbar.

Limpieza. En esta fase, primero se acondicionó el cartucho de florisil con 25 ml de n-hexano a presión atmosférica. Después, se reconstituyó el extracto orgánico con 6 ml de n-hexano, se vertió en el cartucho de florisil y se lavó el tubo de ensayo tres veces con 2 ml de n-hexano, con lo cual se obtuvo un volumen de carga aproximado de 12 ml. Después, se eluyó el extracto orgánico con 15 ml de n-hexano y se recogió la fracción orgánica limpia (sin lípidos) en un tubo de vidrio de 25 ml. Posteriormente, el extracto orgánico se evaporó en el equipo Rapidvap® a una temperatura de 35 °C, una velocidad de agitación de 20 % y 50 mbar de vacío durante 125 minutos; la presión se disminuyó lentamente en 100 unidades de presión por minuto desde los 600 hasta los 50 mbar.

Análisis cromatográfico. En esta última fase, se reconstituyó el extracto con 20 µl de estándar interno a 200 µg/L y 180 µl de isooctano, se lo transfirió a un inserto de 300 µl en un vial de cromatografía de 2 ml y se inyectó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Validación

Selectividad y especificidad. Estas se determinaron con 10 extracciones del *pool* de plasma, y se verificaron las interferencias de la matriz de los iones seleccionados en el tiempo de retención de cada bifenilo policlorado indicador.

Límites de detección y cuantificación. Los límites de detección y de cuantificación se determinaron con el método propuesto por la *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) (24) con diez extracciones del *pool* de plasma, y se confirmaron con seis extracciones del *pool* de plasma fortificado a 0,04 y 0,1 µg/L.

Linealidad y rango de trabajo, efecto matriz. Se hicieron 12 curvas de calibración en el disolvente (isooctano) y el extracto de la matriz (plasma), en un rango de 0,5 a 500 µg/L (nueve niveles de calibración).

Veracidad y exactitud. La veracidad se calculó como porcentaje de recuperación (% R) extrayendo 12 fortificaciones de cada nivel de calibración (n=108) y, el sesgo (% E), con la extracción del material de referencia NIST SRM 1958 (n=18).

Precisión. Esta se determinó con los resultados obtenidos en los ensayos de veracidad y se expresó como desviación estándar relativa de la repetibilidad y la precisión intermedia de los resultados entre analistas.

Estabilidad. La estabilidad de los bifenilos policlorados indicadores se evaluó en tres ciclos de congelación y descongelación a 7,0 µg/L y en plasma fortificado que se extrajo a los 0, 1, 3, 7, 15, 30, 60 y 120 días. También, se evaluó la estabilidad de las mezclas de trabajo en un periodo de seis horas en el automuestreador y durante cuatro meses en almacenamiento a -20±3 °C.

Incertidumbre. La estimación de la incertidumbre de medida se hizo según la *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (GUM), propuesta por EURACHEM (25).

Análisis de muestras de sangre de la población colombiana

Se analizaron 115 muestras de plasma de la población colombiana de diferentes zonas del país, con el método analítico desarrollado y validado en el Grupo de Salud Ambiental y Laboral del Instituto Nacional de Salud.

Resultados

Selectividad y especificidad

Se examinaron los 10 cromatogramas obtenidos en corriente total de iones (*total ion current*, TIC) y monitorización selectiva de iones (*Selected Ion Monitoring*, SIM). En la figura 2 se presenta un cromatograma TIC de una inyección del extracto de la matriz del *pool* de plasma mencionado anteriormente (en negro) y un nivel de calibración en el extracto de la matriz de los bifenilos policlorados indicadores con sus respectivos estándares internos de calibración y subrogados (en azul), lo cual se hizo con el fin de detectar interferencias de la matriz en los tiempos de retención de los bifenilos policlorados indicadores (26), ya que en el modo de monitorización selectiva de iones se analizaron las interferencias por cada ion y en TIC, se analizaron el conjunto de interferencias y su efecto en la identificación y cuantificación de los bifenilos policlorados indicadores, teniendo en

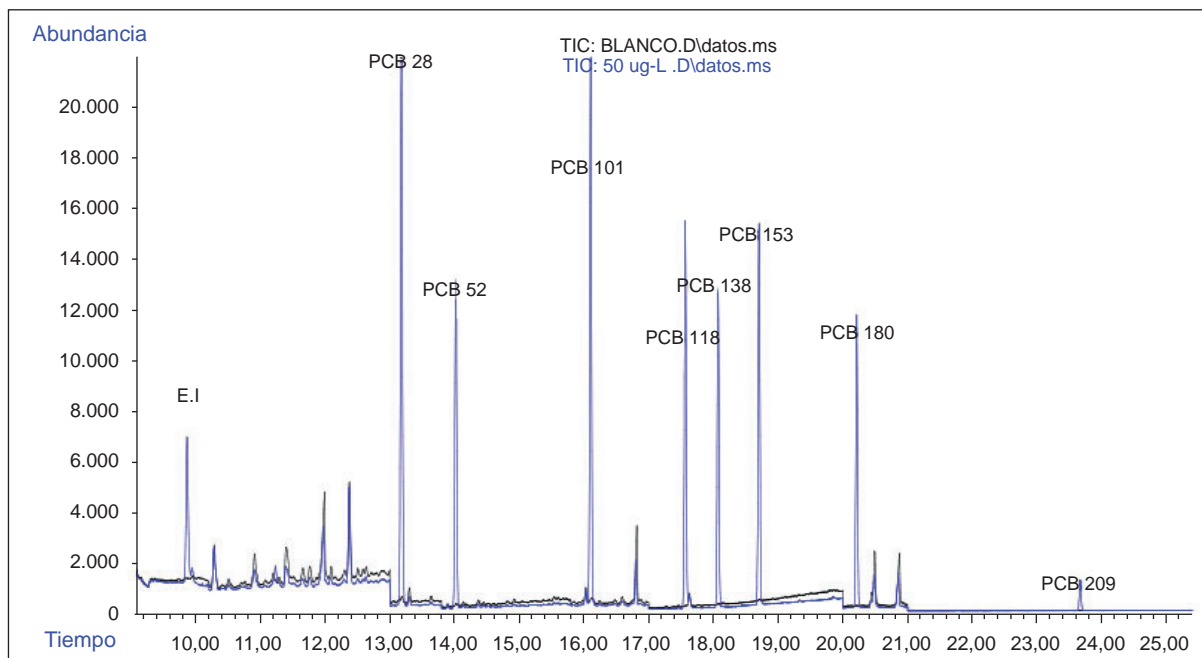


Figura 2. Cromatograma de corriente total de iones de un extracto de la matriz del *pool* de plasma (en negro) y un nivel de 50 µg/L en disolvente de los indicadores de bifenilos policlorados y los estándares internos (en azul)

cuenta una razón iónica inferior a 30 % (26) para la confirmación del indicador en el extracto de la matriz fortificado.

Límites de detección y de cuantificación. Los límites de detección y de cuantificación de los bifenilos policlorados indicadores, estimados y confirmados mediante el método de la US EPA, fueron de 0,04 y 0,10 µg/l, respectivamente. En la figura 3 se presenta un cromatograma de monitorización selectiva de iones del bifenilo policlorado 153 obtenido en la extracción de 0,04 µg/L de plasma sanguíneo fortificado.

Linealidad y rango de trabajo, efecto matriz. Los coeficientes de determinación (R^2) estuvieron entre 0,9866 y 0,9886 en el extracto de la matriz. Para probar la hipótesis, se usaron pruebas como la del intercepto, la de la pendiente, la de correlación y el análisis de varianza (ANOVA). Con dichas pruebas se demostró la linealidad en el rango de 0,5 a 500 µg/L de los bifenilos policlorados indicadores en plasma sanguíneo. En el cuadro 2 se resumen los resultados obtenidos.

Veracidad y exactitud. En el cuadro 3 se presentan los promedios de los porcentajes de recuperación calculados en cada nivel de ensayo y la prueba de Cochran para la homogeneidad de la varianza (G) experimental calculada (G teórica: 0,2568; K=9; n=12).

En el cuadro 4 se presenta el porcentaje de sesgo (% E) obtenido para cada bifenilos policlorados indicadores según las extracciones realizadas por dos analistas del material de referencia NIST SRM 1958 (n=18).

Precisión. Los valores de desviación estándar relativa de la repetibilidad del método estuvieron por debajo de 20 %. La variación de la extracción del material de referencia NIST SRM1958 entre los analistas, fue inferior a 20 %. Con los resultados obtenidos, se demostró que el método desarrollado es preciso (26).

Incertidumbre. La estimación de la incertidumbre (u) de medida se hizo según la guía (GUM) propuesta por EURACHEM. En el cuadro 5 se presentan los valores de incertidumbre expandida y los porcentajes calculados para cada indicador de bifenilos policlorados, con un valor de cobertura k=2 y un nivel de confianza de 95 %.

Resultados de los análisis de las muestras de plasma

Se analizaron 115 muestras de plasma de población colombiana de diferentes zonas del país y se encontraron 65 muestras positivas (concentración por encima de 0,04 µg/L) para uno o varios bifenilos policlorados indicadores. En dos de las 65 muestras positivas se encontraron valores por

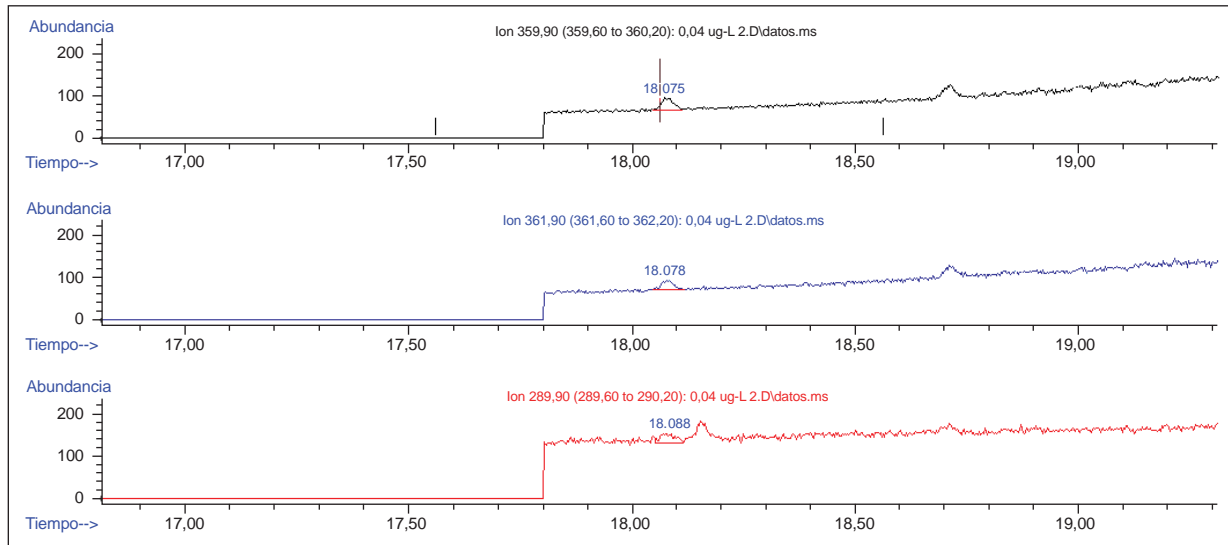


Figura 3. Cromatograma de monitorización selectiva de iones del bifenilo policlorado 153 de un extracto de la matriz fortificado a un nivel de 0,04 µg/L

Cuadro 2. Linealidad de los indicadores de bifenilos policlorados en el extracto de la matriz

PCB	R ²	Pendiente	Intercepto	F _{Experimental}	F _{Crítico}
PCB 28	0,9866	0,1331	0,4256	7724,2	3,85E ⁻¹⁰⁰
PCB 52	0,9886	0,0700	0,1825	9140,9	6,21E ⁻¹⁰⁴
PCB 101	0,9874	0,1127	0,3193	8233,2	1,41E ⁻¹⁰¹
PCB 118	0,9883	0,0966	0,2635	8887,7	2,67E ⁻¹⁰³
PCB 138	0,9886	0,0763	0,2227	9144,6	6,08E ⁻¹⁰⁴
PCB 153	0,9884	0,0838	0,2338	8931,7	2,06E ⁻¹⁰³
PCB 180	0,9868	0,0617	0,1149	7838,7	1,80E ⁻¹⁰⁰

Cuadro 3. Veracidad y porcentaje de recuperación

Concentración	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
0,5 µg/L	76,6	73,2	93,8	95,8	84,1	103,5	84,3
1,0 µg/L	81,4	82,6	94,0	91,9	89,2	85,8	85,1
2,0 µg/L	88,7	86,6	97,4	100,3	94,4	94,2	97,6
3,5 µg/L	85,0	86,6	95,8	95,5	93,6	94,3	98,2
7,0 µg/L	91,3	94,5	98,9	101,3	99,1	97,7	102,0
25 µg/L	99,3	106,6	109,6	111,2	109,9	109,0	110,3
50 µg/L	90,7	91,7	95,5	95,0	95,1	94,4	96,5
100 µg/L	89,3	90,2	92,3	91,3	91,2	90,3	91,5
500 µg/L	92,9	94,9	96,4	95,5	95,0	94,3	99,5
Promedio	88,4	89,7	97,1	97,5	94,6	96,0	96,1
G Exp	0,232	0,2413	0,2396	0,245	0,239	0,2532	0,2249

G Exp: G experimental calculada

Cuadro 4. Veracidad y sesgo (NIST SRM 1958)

	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
Valor del material de referencia ng/kg	402,0	401,0	409,0	412,0	473,0	457,0	459,0
Promedio de analistas 1 y 2 ng/kg	354,2	440,2	334,1	440,2	497,1	443,8	495,8
% E	11,9	9,8	18,3	6,8	5,1	2,9	8,0

% E: porcentaje de sesgo

Cuadro 5. Estimación de la incertidumbre de medida según la guía (GUM) propuesta por EURACHEM

PCB	U (µg/L)	U expandida (µg/L)	% U
PCB 28	0,004	0,008	1,6
PCB 52	0,003	0,006	1,2
PCB 101	0,003	0,007	1,4
PCB 118	0,003	0,007	1,4
PCB 138	0,004	0,007	1,4
PCB 153	0,004	0,008	1,6
PCB 180	0,003	0,006	1,2

U: incertidumbre

encima del HBM- II (7,0 µg/l, $2X_{\sum_{PCB\ 138, 153, 180}}$) y, en otras dos, por encima del HBM-I (3,5 µg/l, $2X_{\sum_{PCB\ 138, 153, 180}}$); todas las demás muestras estuvieron por debajo del valor HBM-I.

Discusión

En la figura 2 se observa que no hubo interferencias en los tiempos de retención de interés confirmados con la evaluación de los cromatogramas de monitorización selectiva de iones, los cuales no presentaron interferencias en dichos iones, ya que en su selección se tuvo en cuenta una intensidad alta de fragmentación ($m/z > 200$). Estos criterios se cumplieron en todos los casos, con excepción del bifenilo policlorado 28, en el cual se escogió un ion de cuantificación de 186 m/z , ya que era el de mayor intensidad y no tenía interferencias. Con estos resultados, se demostró que el método desarrollado fue selectivo y específico para los bifenilos policlorados indicadores que se habían seleccionado.

Con los límites de detección determinados se constató que es posible diferenciar las señales de los iones de cuantificación y de confirmación de los bifenilos policlorados indicadores, en este caso, el bifenilo policlorado indicador 153, del ruido instrumental y de la matriz a 0,04 µg/L. Como se aprecia en la figura 3, en el ion m/z 290, se eluyó una interferencia cercana al tiempo de retención del bifenilo policlorado indicador 153; sin embargo, en los demás iones no se observaron otros picos, por lo cual se tuvo plena certeza de que dicho pico era una interferencia de la matriz en este ion; además, la razón iónica del m/z 290 en el tiempo de retención del bifenilo policlorado 153 fue inferior a 30 % (26).

El límite de cuantificación se determinó como tres veces la concentración del de detección (es decir, 0,10 µg/L) al evaluar la dispersión de las seis extracciones con un criterio de aceptación de la desviación estándar relativa de ≤ 20 %. La

desviación estándar relativa más alta se encontró en el bifenilo policlorado indicador 180, con 7,54 %, por lo cual los límites de detección y de cuantificación de los bifenilos policlorados indicadores finalmente se determinaron en 0,04 µg/L y 0,10 µg/L, respectivamente.

Por otro lado, los valores del valor estadístico F, calculados experimentalmente en el ANOVA, fueron más altos que los F críticos, lo que indicó que existía una relación directamente proporcional entre la respuesta del equipo y la concentración de cada bifenilo policlorado, con un nivel de confianza de 95 %.

El efecto matriz se determinó comparando las pendientes de la curva de cada indicador de bifenilos policlorados en el extracto de la matriz y el disolvente. En el cuadro 6 se presentan las pendientes obtenidas y el intervalo; como se observa, no hubo efecto matriz para el bifenilo policlorado indicador 52, ya que los intervalos de las pendientes en el disolvente y la matriz se superpusieron, a diferencia del resto de los bifenilos policlorados indicadores, en los cuales sí hubo efecto matriz.

Con los resultados del porcentaje de recuperación, se observó que todos los bifenilos policlorados indicadores se encontraban en el rango de 70 a 120 %, lo que indica que bajo el parámetro de exactitud el método tuvo un buen comportamiento (26). También, se pudo reportar un porcentaje de recuperación (% R) del método (promedio) para cada indicador de bifenilos policlorados, ya que la G experimental calculada (prueba de Cochran para la homogeneidad de la varianza) fue menor que la teórica, lo que indica que hubo homogeneidad de varianzas y que la recuperación no se vio afectada por la concentración.

En este orden de ideas, el sesgo para todos los bifenilos policlorados indicadores del estudio fue menor del 20 %, lo que indica que el método fue veraz para el propósito planteado (cuadro 4) (26). Con los resultados de recuperación y sesgo, es posible afirmar que el método desarrollado cumplió con los parámetros de veracidad para todos los bifenilos policlorados indicadores.

Por otro lado, mediante gráficas de control a lo largo de 120 días en condiciones de congelación y con ciclos de congelación y descongelación, se demostró que todos los bifenilos policlorados indicadores eran estables, al igual que las mezclas de trabajo, las cuales también fueron estables a corto, mediano y largo plazo.

Por último, los valores de incertidumbre indican que el método desarrollado demostró un alto grado de confianza de los resultados de concentración de los bifenilos policlorados indicadores en muestras de plasma, además de ser un método útil para investigaciones de control biológico de estos contaminantes orgánicos persistentes en población colombiana.

En el cuadro 7 se presentan los resultados de la validación hecha en otros trabajos de investigación mediante instrumentos, métodos de procesamiento y análisis diferentes, los cuales son comparables con los de este estudio. También, puede concluirse que el método de análisis desarrollado permitió evaluar los niveles de bifenilos policlorados en plasma sanguíneo teniendo en cuenta los valores HBM-I y HBM-II, y según los criterios adecuados de validación internacional consignados en los trabajos consultados.

Cuadro 6. Pendiente de la curva en el disolvente y el extracto de la matriz de los indicadores de bifenilos policlorados (PCB)

PCB	Pendiente de la curva en el disolvente	Pendiente de la curva en la matriz
PCB 28	0,1133 ± 0,0014	0,1331 ± 0,0030
PCB 52	0,0689 ± 0,0004*	0,0700 ± 0,0015*
PCB 101	0,0464 ± 0,0006	0,1127 ± 0,0025
PCB 118	0,0689 ± 0,0005	0,0966 ± 0,0020
PCB 138	0,0592 ± 0,0004	0,0763 ± 0,0016
PCB 153	0,0644 ± 0,0005	0,0838 ± 0,0018
PCB 180	0,0418 ± 0,0005	0,0617 ± 0,0014

*: PCB 52 no tiene efecto matriz

Cuadro 7. Resultados de la validación en diferentes estudios

PCB	Precisión (RSD)	Veracidad (% R)	LD (µg/L)	LC (µg/L)	U %	Referencia
180	12,3	114,7	0,05	0,05	< 25	(28)
180	9,0	86-105	0,03	0,05	nr	(29)
138, 153 y 180	nr	70-98	1,00	nr	nr	(30)
180	nr	86,7	nr	0,05	nr	(31)
180	< 2 %	60	nr	0,08	nr	(32)
180	13,5	96,1	0,04	0,10	1,2	Este estudio

RSD: desviación estándar relativa; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación; nr: no reporta información; U: incertidumbre

Cuadro 8. Resultados de los niveles de los bifenilos policlorados en plasma sanguíneo de diferentes estudios

PCB	Este estudio Rango (µg-L)	Este estudio promedio (µg-L)	Estados Unidos (µg-L)	España (µg-L)	Rumania (µg-L)	Bélgica (µg-L)	Italia (µg-L)
118	nd - 4,35	0,53	0,22 - 0,62	nr	0,02 - 1,12	0,14 - 0,49	nd - 1,58
138	nd - 6,22	0,59	0,76 - 2,59	nd - 0,4	0,11 - 1,10	0,60 - 1,46	nd - 5,39
153	nd - 5,95	0,61	0,94 - 4,14	> 0,15 - 0,60	0,26 - 2,12	1,13 - 3,16	nd - 9,26
180	nd - 3,69	0,39	0,78 - 3,33	> 0,08 - 0,60	0,28 - 2,01	0,92 - 2,75	nd - 13,81

nd: no detectable; nr: no reporta información
Nota: los datos se tomaron de la referencia 29

En el cuadro 8 se presentan los resultados de diversos estudios de evaluación de los bifenilos policlorados indicadores en plasma sanguíneo en otros países del mundo que, comparados con los obtenidos en el presente estudio, se encuentran en el mismo rango. Los valores encontrados fueron, en su mayoría, inferiores al HBM-I y al HBM-II, lo cual indica que los niveles de los bifenilos policlorados indicadores en la población evaluada son bajos.

Se validó, así, una metodología analítica para la determinación de los bifenilos policlorados indicadores en plasma mediante cromatografía de gases con detección selectiva de masas, la cual es específica para los analitos de interés. El método demostró linealidad, precisión y exactitud bajo las condiciones analíticas del proceso y según lo establecido en la bibliografía consultada para la determinación de contaminantes orgánicos persistentes en muestras de sangre (suero o plasma) (26,27).

Agradecimientos

Al Grupo de Red Nacional de Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión del Instituto Nacional de Salud, por suministrar las unidades de plasma sanguíneo para realizar el estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que durante la realización de esta investigación no tuvieron ningún conflicto de intereses.

Financiación

Esta investigación fue financiada por el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible en el marco del convenio especial de cooperación N° FP44842-387-2014 entre el Instituto Nacional de Salud, la Asociación Colombiana para el Avance de la Ciencia y Colciencias.

Referencias

- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA).** Transformadores y condensadores con PCB: desde la gestión hasta la reclasificación y eliminación. Primera edición. Ginebra: PNUMA; 2002. Fecha de consulta: 4 de marzo de 2014. Disponible en: http://www.inti.gob.ar/pcb/documentos/informesReportesDocumentos/Interes/PCBtranscap_s.pdf
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** ToxFaqS™ Polychlorinated biphenyls (PCB). Fecha de consulta: 5 de mayo de 2016. Disponible en: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts17.html
- McGovern V.** PCBs are endocrine disruptors: Mixture affects reproductive development in female mice. *Environ Health Perspect.* 2006;114:A368-9.
- Facts on Health and Environment, Green Facts.** PCB bifenilos policlorados. Fecha de consulta: 5 de mayo de 2016. Disponible en: <http://www.greenfacts.org/es/pcb/l-2/6-effects-human.htm#1>
- European Food Safety Authority.** Results of the monitoring of non-dioxin-like PCBs in food and feed. *EFSA Journal.* 2010;8:1701. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1701>.
- Schettgen T, Alt A, Esser A, Kraus T.** Current data on the background burden to the persistent organochlorine pollutants HCB, p, p-DDE as well as PCB 138, PCB 153 and PCB 180 in plasma of the general population in Germany. *Int J Hyg Environ Health.* 2015;218:380-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.02.006>
- Human Biomonitoring Commission (HBM Commission).** Human biomonitoring (HBM) is an important tool in environmental medicine to assess and evaluate the level of internal exposure of the general population, population groups and individuals to environmental toxins. Fecha de consulta: 12 de junio de 2015. Disponible en: <http://www.umweltbundesamt.de/en/topics/health/commissions-working-groups/human-biomonitoring-commission-hbm-commission>
- Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail - Anses.** Opinion of the French Food Safety Agency on interpreting the health impact of PCB concentration levels in the French population. AFSSA – Request N° 2008-SA-0053. 2010. Fecha de consulta: 12 de junio de 2015. Disponible en: <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP2008sa0053EN.pdf>
- Ayotte P, Dewailly E, Ryan J, Bruneau S, Lebel G.** PCBs and dioxin-like compounds in plasma of adult Inuit living in Nunavik (Arctic Quebec). *Chemosphere.* 1997;34:1459-68.
- Covaci A, Koppen G, Cleuvenbergen RV, Schepens P, Winneke G, van Larebeke N, et al.** Persistent organochlorine pollutants in human serum of 50-65 years old women in the flanders environmental and health study (FLEHS). Part 2: Correlations among PCBs, PCDD/PCDFs and the use of predictive markers. *Chemosphere.* 2002;48:827-32. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00112-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00112-1)
- Anthony P.** Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure assessment by multivariate statistical analysis of serum congener profiles in an adult Native American population. *Environ Res.* 2005;98:284-302. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.09.004>
- Albrecht M, Appel M, Hilger B, Völkel W, Liebl B, Roscher E.** PCBs, PCDD/Fs and PBDEs in blood samples of a rural population in South Germany. *Int J Hyg Environ Health.* 2015;218:41-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.07.004>
- Gabrio T, Piechotowski I, Wallenhorst T, Klett M, Cott L, Friebel P, et al.** PCB-blood levels in teachers, working in PCB-contaminated schools. *Chemosphere.* 2000;40:1055-62. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00353-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00353-7)
- Koppen G, Covaci A, van Cleuvenbergen R, Schepens P, Winneke G, Nelen V, et al.** Persistent organochlorine pollutants in human serum of 50 – 65 years old women in the Flanders Environmental and Health Study (FLEHS). Part 1: Concentrations and regional differences. *Chemosphere.* 2002;48:811-25. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00111-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00111-X)
- Schettgen T, Gube M, Esser A, Alt A, Kraus T.** Plasma polychlorinated biphenyls (PCB) levels of workers in a transformer recycling company, their family members, and employees of surrounding companies. *J Toxicol Environ Health A.* 2012;75:414-22. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.674905>
- Tanabe S, Senthilkumar K, Kannan K, Subramanian N.** Monitoring of PCBs in human blood plasma: Methodological developments and influence of age, lactation, and fish consumption. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1997;32:329-36.
- Wittsiepe J, Fobil J, Till H, Burchard G, Wilhelm M, Feldt T.** Levels of polychlorinated dibenzo-P-dioxins, dibenzofurans (PCDD/Fs) and biphenyls (PCBs) in blood of informal e-waste recycling workers from Agbogbloshie, Ghana, and controls. *Environ Int.* 2015;79:65-73. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.03.008>
- Atuma S, Aune M.** Method for the determination of PCB congeners and chlorinated pesticides in human blood serum. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1999;62:8-15.
- Udai S, Harold M, Wheatley S, Wheatley B.** Congener specific analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs) in serum using GC/MSD. *Chemosphere.* 1995;30:1969-77. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00078-M](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00078-M)
- López R, Goñi F, Etxandia A, Millán E.** Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;846:298-305. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.009>
- Moreno F, Torres M, Garrido A, Martínez J, Olea-Serrano F, Olea N.** Determination of organochlorine compounds in human biological samples by GC-MS/MS. *Biomed Chromatogr.* 2004;18:102-11. <https://doi.org/10.1002/bmc.300>
- Turci R, Franco B, Minoia C.** Determination of coplanar and non-coplanar polychlorinated biphenyls in human serum by gas chromatography with mass spectrometric detection:

- Electron impact or electron-capture negative ionization? *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003;17:1881-8. <https://doi.org/10.1002/rcm.1129>
23. **Vizcaíno E, Arellano L, Fernández P.** Analysis of whole congener mixtures of polybromodiphenyl ethers by gas chromatography-mass spectrometry in both environmental and biological samples at femtogram levels. *J Chromatogr A.* 2009;1216:5045-51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.049>
 24. **Corley J.** Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residue in foods. *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals.* West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.; 2003.
 25. **EURACHEM/CITAC Guide CG 4.** Cuantificación de la incertidumbre en medidas analíticas. Fecha de consulta: 4 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.citac.cc/QUAM2012_P1_ES.pdf
 26. **European Commission.** Safety of the food chain pesticides and biocides, SANTE/11945/2015. Fecha de consulta: 4 de febrero de 2016. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf
 27. **López R, Goñi F, Etxandia A, Milan E.** Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;846:298-305. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.009>
 28. **Turci R, Balducci C, Brambilla G, Colosio C, Imbriani M, Mantovani A, et al.** A Simple and fast method for the determination of selected organohalogenated compounds in serum samples from the general population. *Toxicol Lett.* 2010; 192: 66-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.04.011>
 29. **Lopez R, Goñi F, Etxandia A, Milan E.** Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. *J Chromatogr B.* 2007;846:298-305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.009>
 30. **Arrebola J.P, Cuellar M, Quevedo M, Claire E, Antelo S.R, Mutch E, et al.** Concentration of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum and adipose tissue from Bolivia. *Environ Res.* 2012;112: 40-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2011.10.006>
 31. **Gill U, Schwartz H, Wheatley B.** Congener Specific Analysis of Polychlorinated biphenyls (PCBs) in serum using GC/MSD. *Chemosphere.* 1995;30:1969-77. [http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00078-M](http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535(95)00078-M)
 32. **Lopez R, Goñi F, Etxandia A, Milan E, Amiano P.** High throughput method for the determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum. *J Chromatogr B.* 2007; 852:15-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.12.049>