

COMPARACIÓN DE DIFERENTES APROXIMACIONES PARA ESTIMAR LÍMITES DE DETECCIÓN EN ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS

COMPARISON OF DIFFERENT APPROACHES TO ESTIMATE LIMITS OF DETECTION FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES ABORDAGENS PARA ESTIMAR OS LIMITES DE DETECÇÃO NA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ALIMENTOS

Diego A. Ahumada F.^{1,4}, Danny Rodríguez L.², Adriana Zamudio S.¹, Andrea Mojica C.³

Recibido: 22/04/2012 – Aceptado: 16/07/2012

RESUMEN

El cálculo de los límites de detección (LD) es una práctica que ha generado diversas discusiones en la comunidad científica, debido a las diferentes definiciones y los procedimientos para realizar su estimación. En este estudio se aplicaron, confirmaron y compararon seis de los métodos más empleados en la estimación de LD en el análisis de residuos de plaguicidas. Los métodos evaluados correspondieron a IUPAC (por sus siglas en inglés, International Union of Pure and Applied Chemistry), la EPA (por sus siglas en inglés, Environment Protection Agency), t_{99} , raíz media cuadrática del error (RMSE), Hubaux-Vos y propagación de errores. Este estudio se realizó sobre cinco pro-

ductos vegetales empleando el método QuEChERS en la determinación de 31 plaguicidas, y el análisis de las muestras se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Los resultados mostraron que los LD estimados con los diferentes métodos no presentaron una variación significativa con la matriz de análisis, exceptuando el método de la EPA. Por su parte, en la comprobación de los LD se encontró que los métodos t_{99} , RMSE y Hubaux-Vos mostraron la menor relación señal ruido ($S/R < 3$), mientras que los métodos de IUPAC y propagación de errores presentaron las mejores relaciones S/R. Finalmente, ningún método estimó los LD para todos los compuestos con relaciones S/R adecuadas.

1 Laboratorio de Inocuidad Química. Centro de Bio-Sistemas. Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia.

2 Unidad de Investigación y Desarrollo. Agrilab Ltda. Bogotá, Colombia.

3 Grupo de Investigación en Proteínas. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, carrera 30 N.º 45-03, Bogotá, Colombia.

4 diego.ahumadaf@utadeo.edu.co

Palabras clave: plaguicidas, QuEChERS, límites de detección, alimentos.

ABSTRACT

The limit of detection (LOD) calculation is a practice that has generated several discussions in the scientific community, due to different definitions and procedures for its estimation. The fundamental objective of the present work is to apply, confirm and compare six different recommendations suggested by official guidelines for the estimation of LOD of 31 pesticide residues in five different commodities using the QuEChERS method and ultra fast liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The methods evaluated were IUPAC, EPA, t_{99} , root mean square error (RMSE), Hubaux-Vos and propagation of errors. In this study it was found that limits of detection of the different approaches did not show a significant variation with the commodities tested, excluding the method of EPA. On the other hand, t_{99} , RMSE and Hubaux methods showed the lowest signal to noise ratio ($S/N < 3$). Furthermore, the EPA approach showed the highest S/N , while IUPAC and propagation of errors methods presented the best S/N . Finally, no method estimated the limits of detection for all compounds with ratios S/N appropriate.

Key words: pesticides, QuEChERS, limit of detection, food.

RESUMO

O cálculo dos limites de detecção (LD) é uma prática que tem levado a várias discussões na comunidade científica, devido

a diferentes definições e procedimentos para a sua estimativa. Este estudo aplicou, confirmando e comparados seis dos métodos utilizados na estimativa de LD na análise de resíduos de pesticidas. Os métodos avaliados foram para IUPAC, EPA, t_{99} , erro médio quadrático (RMSE), Hubaux-Vos e propagação de erros. Este estudo foi realizado em cinco produtos de plantas utilizando o método de determinação de pesticidas QuEChERS 31, a análise das amostras foi realizada por espectrometria de massa de cromatografia líquida. Os resultados mostraram que o LD estimada com diferentes métodos não houve variação significativa com a matriz de análise, a não ser o método EPA. Enquanto isso, no controle da LD-se que os métodos de t_{99} , RMSE e Hubaux-Vos apresentaram menor relação sinal-ruído ($S / N < 3$), enquanto os métodos de propagação de erro da IUPAC e teve as melhores relações S / R . Finalmente, o LD qualquer método considerado para todos os compostos, com relações S / R adequados.

Palavras-chave: QuEChERS pesticidas, limites de detecção.

INTRODUCCIÓN

La validación de metodologías analíticas es una herramienta que tiene como objetivo garantizar que un método de análisis genere resultados confiables bajo las condiciones de trabajo disponibles en el laboratorio; de igual manera, permite determinar el alcance de la metodología (1, 2). En las últimas décadas se han publicado un gran número de trabajos acerca de la validación de metodologías analíticas, la mayoría de estas describen diferentes definiciones, parámetros y estrate-

gias para realizar dicho procedimiento, pero en general, se ha establecido que los parámetros mínimos corresponden al límite de detección (LD), al límite de cuantificación (LC), al rango de linealidad, la precisión, la exactitud, la selectividad/especificidad y la robustez (3). En análisis de contaminantes, los LD y LC se destacan por ser dos parámetros de validación de gran relevancia, puesto que definen las mínimas concentraciones que pueden ser identificadas y cuantificadas (3). En la literatura la definición de los LC es bastante homogénea y no ha generado mayor discusión en la comunidad científica, sin embargo, respecto al LD se ha encontrado bastante controversia, debido a las diferentes definiciones existentes, dando lugar a un amplio número de interpretaciones y procedimientos de estimación (4).

En general, la definición de la IUPAC, ha sido ampliamente aceptada por la comunidad científica; sin embargo, esta definición ha evolucionado de acuerdo a diversas investigaciones (5, 6), destacándose la descrita por Voightman, quien presentó una teoría para los LD en sistemas químicos que requieren una medición. Esta teoría se basó en desarrollos teóricos que asumen un sistema lineal univariado en el cual la medida del ruido es aditiva (7). Esta teoría de los LD y los niveles de decisión se encuentra acorde con un trabajo posterior que plantea la inclusión de falsos positivos y negativos, puesto que los LD convencionales ignoraban los falsos negativos (8). En este segundo estudio se demostró que todos los LD establecidos como $k s_B/m$ (siendo k un factor de cobertura, s_B es la desviación estándar del blanco y m es la pendiente de curva de calibración)

cumplen con una distribución t no central modificada, y que el valor de k es un producto que depende de los valores críticos de t o z .; de igual manera, así como existen múltiples conceptos y definiciones relacionados a los LD, existen múltiples formas para determinar su valor, variando según el método que se emplee en este fin (9).

Específicamente, en análisis de residuos de plaguicidas, Corley compiló los métodos más importantes para la estimación de los LD tanto en matrices ambientales como en alimentos (10). Estos métodos corresponden a: 1) método de la IUPAC, el cual depende de la desviación estándar (s_B) de la medida de la señal obtenida para el blanco analítico; 2) el método de propagación de errores (MPE), el cual es una variación del método de la IUPAC, que aparte de emplear el valor de (s_B) adiciona la desviación estándar del intercepto de la curva de calibración; 3) el método de aproximación de Hubaux-Vos, el cual fue la primera aproximación en aplicar la teoría de predicción estadística al problema de los LD, este método involucra la generación de una curva de calibración cercana al valor de LD y la inclusión de falsos positivos y negativos; 4) el método de la EPA, el cual se encuentra compuesto por dos pasos fundamentales, que corresponden a la determinación del límite de detección instrumental (LDI) y la corrección de este LDI con el porcentaje de recuperación de la metodología para calcular el LD; 5) el método RMSE, recomendado por la EPA, estimado a partir del cálculo de la raíz de la suma del error cuadrático (RSME); 6) el método t_{99} , el cual estima el LD a partir del LC, a través de la extracción de n muestras fortificadas

al LC y un estadístico t a una cola, para $n-1$ determinaciones usando un nivel de confianza del 99 % [$t_{99(n-1)}$].

Todos estos métodos tienen ventajas y desventajas desde un punto de vista teórico-práctico; por tanto el presente estudio tiene como objetivo comparar estos métodos de estimación de LD. Para ello se partió de matrices de origen vegetal de diferentes características y se realizó la estimación de los valores de LD en un método multiresiduo para el análisis de plaguicidas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales de referencia, reactivos y soluciones

En este estudio se trabajó con los mismos reactivos, calidad, condiciones de preparación y almacenamiento de estudios previos (11, 12).

Instrumentos y equipos

Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico fue llevado a cabo en un cromatógrafo líquido ultrarrápido (UFLC, por sus siglas en inglés Ultra Fast Liquid Chromatograph) Shimadzu Prominence (Maryland, CA, EUA), acoplado a un detector selectivo de masas LCMS-2020 (11, 12).

Los análisis fueron llevados a cabo en una columna Shim Pack (6 cm × 2 mm d.i., tamaño de partícula de 2,1 μm y fase estacionaria C18), se trabajó en modo de gradiente con ácido fórmico

al 0,1 % (P/V) y acetato de amonio 5 mM en agua Milli-Q (A), y la fase orgánica empleada fue acetonitrilo (B). El programa de elución utilizado expresado como porcentaje de B inicia al 0 % (0 min), aumenta al 20 % en 0,01 min, posteriormente llega hasta el 25 % a los 0,30 min y luego aumenta hasta el 100 % en los siguientes 10 min, finalmente se mantiene por 0,20 min. Para restituir la fase móvil a la condición inicial del análisis se pasa del 100 % al 0 % de B en 2 min, donde se mantiene por 5 min para equilibrar la columna. El tiempo total de análisis fue de 8 min. El volumen de inyección fue 5 μl , la temperatura de columna 45 °C y el flujo de fase móvil 0,3 ml/min.

Condiciones de la interfaz y espectrómetro de masas

El equipo cuenta con una interfaz tipo DUIS [ESI (Electrospray Ionization), APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)], que se operó en modo ESI, con un flujo de gas de secado de 10 L/min y un flujo de gas nebulizador de 1,5 L/min, las temperaturas del bloque de calentamiento y de la línea de eliminación del solvente correspondieron a 200 °C y 250 °C respectivamente.

Los análisis se hicieron de manera simultánea en modo positivo y negativo, el voltaje aplicado en el capilar correspondió a 4500 V y -4500 V respectivamente. Todos los análisis fueron realizados en modo SIM (Por sus siglas en inglés, Selected Ion Monitoring). La Tabla 1 muestra los iones seleccionados y el rango de concentración empleado.

Tabla 1. Iones de cuantificación (IC) para los compuestos estudiados y rangos de concentración utilizados para las curvas de calibración

Compuesto	IC	Rango**(ug/kg)	Compuesto	IC	Rango**(ug/kg)
Tiociclam	182	29,2-87,7	Dicloropropionanilida*	216	3,6-10,9
Acefato	201	7,5-22,5	Pirimetanil	200	3-8,9
Monocrotofos	241	9-26,9	Dimetomorf	390	2,2-6,5
Oxamil	237	1,8-5,4	Azoxistrobina	404	3,7-11,2
Metomil	163	3,6-10,8	Tebuconazol*	308	16,1-48,4
Carbendazim	192	1,8-5,4	Metoxifenoazida	369	7,1-21,4
Imidacloprid*	254	49,2-147,6	Hexaconazol*	358	17,9-53,7
Dimetoato	230	3,8-11,3	Spinosad A	733	18,2-54,7
Tiabendazol	202	1,8-5,4	Benalaxil	326	1,7-5,2
Cymoxanil*	197	106,8-320,4	Difenoconazol	408	14,6-43,7
Tiodicarb	355	1,9-5,6	Azinfosmetil	368	27,8-83,4
Carbofuran	222	3-9,1	Diazinon	305	2,6-7,9
Atrazina	216	2,5-7,5	Spinosad D	747	18,2-54,7
Metalaxil	280	1,8-5,5	Indoxacarb	528	7,4-22,2
Primicarb	239	1,8-5,5	Clorfenaprid*	349	110,9-332,6
Imazalil	297	8,7-26,2			

* Compuestos detectados en modo negativo.

** Para los métodos de Hubaux-Vos, RMSE y propagación de errores.

Método de extracción

Para los estudios realizados se escogieron alimentos que presentaran diferentes características; para ello se empleó la clasificación realizada por la Unión Europea, de esta manera se trabajó con muestras de arroz (*Oryza sativa*), aguacate (*Persea americana*), granadilla (*Passiflora ligularis*), lechuga (*Lactuca sativa*) y tamarillo (*Solanum betaceum*), obtenidas en supermercados de cadena. Se lavaron con abundante agua y se retiró todo material ajeno que pudiera encontrarse en su superficie. Finalmente, para asegurar que las muestras se encontraran libres de plaguicidas, se evaluaron mediante cro-

matografía. Para la obtención de los extractos se empleó el método QuEChERS (11, 12).

Método de limpieza de los extractos

La limpieza de los extractos de arroz, granadilla y tamarillo se realizó adicionando 25 mg de PSA (amina primaria/secundaria) y 150 mg de MgSO₄ anhidro, por cada mililitro de extracto. Luego se agitó con ayuda de un vortex por 30 s y se centrifugó por 2 min a 4500 rpm.

La limpieza del extracto de lechuga se realizó adicionando 25 mg de PSA (amina primaria/secundaria), 7,5 mg de

GCB (carbón grafitizado) y 150 mg de MgSO_4 anhidro por cada mililitro de extracto, luego se agitó con ayuda de un vortex por 5 min y se centrifugó por 2 min a 4500 rpm.

Para la limpieza del extracto de aguacate se adicionaron 25 mg de ODS (octadecilsilano) por cada mililitro de extracto y 150 mg de MgSO_4 . Se agitó por 30 s con ayuda de un vortex y se centrifugó por 2 min a 4500 rpm. Finalmente, el sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana PTFE de 0,22 μm y se transfirió a un vial para el posterior análisis por cromatografía.

Método de estimación de límites de detección

La estimación de los límites de detección se realizó mediante seis métodos comúnmente empleados en el análisis de contaminantes en alimentos y matrices de interés ambiental (10). Estos métodos correspondieron al método IUPAC (6), el método de la EPA (13), el método de la propagación del error (5), el método Hubaux-Vos (14), el método de la raíz cuadrada del error (RMSE, por sus siglas en inglés) (15) y un último método también propuesto por la EPA, conocido como t_{99} (16).

Método de la IUPAC

Para la estimación de los LD mediante el método de la IUPAC se analizaron cinco muestras blanco de cada uno de los productos escogidos, se determinó el ruido en el rango de tiempo de retención donde eluye cada uno de los plaguicidas analizados y se aplicó la ecuación 1:

$$LD = \frac{3xs_B}{m} \quad (1)$$

en la cual s_B corresponde a la desviación estándar de los ruidos medidos en cada muestra y m corresponde a la pendiente de la curva de calibración (concentración vs. altura de la señal cromatográfica).

Método de la propagación de errores

La estimación de los LD mediante este método se realizó por medio del análisis de cinco muestras blanco y el cálculo de la desviación estándar del ruido de estos blancos; adicionalmente se preparó una curva de calibración (con cinco puntos de calibración) para cada uno de los compuestos, en un rango de concentración cercano al LD estimado mediante el método de la IUPAC. La Tabla 1 muestra los rangos de concentración para cada uno de los compuestos. Finalmente, para la estimación de LD, se empleó la ecuación 2:

$$LD = \frac{3x\sqrt{s_B + s_I}}{m} \quad (2)$$

en la cual s_B corresponde a la desviación estándar de los ruidos medidos en cada muestra, s_I corresponde a la desviación estándar del intercepto (I) de la curva de calibración y m corresponde a la pendiente de la curva de calibración (concentración vs. altura de la señal cromatográfica).

Método de Hubaux-Vos

Para la estimación de los LD mediante este método se construyeron curvas de calibración en concentraciones cercanas al LD, se estimó la desviación estándar de los residuales ($s_{y/x}$) y se calculó la concentración crítica (X_c), tal como se muestra en la ecuación 3:

$$X_c = \frac{t_{(0.05, n-2)} \times S_{y/x}}{m} \times \sqrt{1 + \frac{1}{ij} + \frac{X_{pro}^2}{i \sum_{j=1}^n (X_j - X_{pro})^2}} \quad (3)$$

en la cual i corresponde al número de lecturas de cada patrón, j al número de niveles que conforman la curva de calibración, X_j la concentración del patrón j y X_{pro} corresponde al promedio de las concentraciones de todos los patrones. Finalmente, para calcular el límite de detección se emplea la ecuación 4:

$$LD = 2 \times X_c \quad (4)$$

Método de la Agencia de Protección Ambiental (EPA)

Para la estimación de los LD se analizaron cinco muestras blanco de cada una de las matrices, y se estimó el ruido pico a pico en la zona donde eluye cada compuesto. Junto con los blancos se inyectó el nivel más bajo de la curva de calibración y a partir de este, se determinó la concentración que produciría una señal de tres veces el promedio del ruido (LDI); finalmente, para estimar el límite de detección se corrigió esta concentración por el porcentaje de recuperación, esto con el propósito de tener en cuenta las pérdidas originadas por el proceso analítico. Este porcentaje de recupera-

ción se calculó a partir de muestras fortificadas al LC estimado.

Método de la raíz cuadrada del error (RMSE)

Para este método se construyó una curva de calibración compuesta por cinco puntos de calibración a concentraciones cercanas al LD estimado por el método de la IUPAC (ver Tabla 1). Se calculó el valor de la pendiente y el intercepto, y con los valores de la altura de la señal cromatográfica se calcularon los valores de concentración estimados (X_{est}). Finalmente se calculó LD mediante la expresión 5:

$$LD = \frac{3 \times \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (X_j - X_{est j})^2}{n-2}}}{m} \quad (5)$$

Donde X_j corresponde a la concentración del j -ésimo nivel de concentración, n corresponde al número de niveles empleados para la construcción de la curva de calibración y m corresponde a la pendiente de la curva de calibración.

Método t_{99}

La estimación de los LD mediante este método se realizó a partir de la expresión 6:

$$LD = t_{99, n-1} \times s_{LC} \quad (6)$$

Donde t_{99} corresponde a 3,747 para cuatro grados de libertad y s_{LC} corresponde a la desviación estándar del límite

de cuantificación del método, el cual fue estimado previamente mediante el método de la IUPAC (11).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estimación de límites de detección

La Figura 1 resume los resultados obtenidos en la evaluación de los LD, a través de los valores promedios de los LD obtenidos para cada matriz mediante cada método en estudio. En esta figura se observa que el método RMSE estima los LD con los valores más altos, variando ampliamente la magnitud

de este parámetro entre las diferentes matrices en estudio. Por otra parte, mediante el método t_{99} se encuentra que los valores estimados para los LD corresponden a los más bajos en todas las matrices. Por su parte, los promedios de los LD para los métodos de la EPA, la IUPAC, Hubaux-Vos y propagación de errores fueron cercanos entre ellos y, asimismo, se puede observar que los métodos EPA y propagación de errores presentan valores promedio para LD similares entre sí, exceptuando para la matriz de arroz, en donde la EPA genera un valor promedio más bajo.

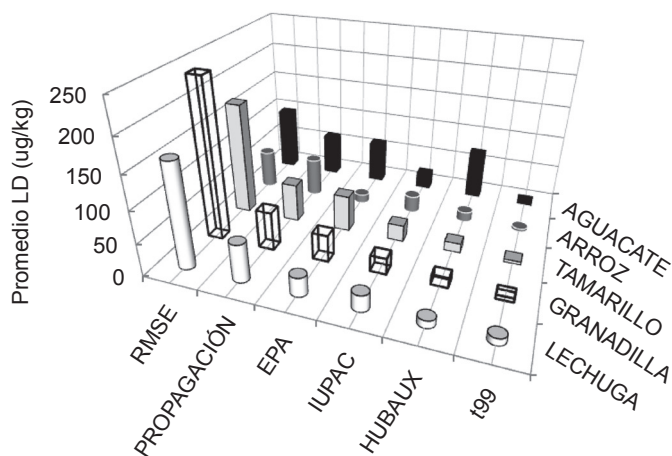


Figura 1. Promedio de LD estimados mediante cada uno de los métodos en las diferentes matrices.

Respecto a los valores para los LD obtenidos en las diferentes matrices, la Figura 1 muestra que las matrices de arroz y lechuga presentan los promedios de LD más bajos, hecho que puede encontrarse asociado a una menor presencia de interferentes en el análisis cromatográfico. En el caso del arroz, se ha reportado que la

extracción de plaguicidas con solventes como acetonitrilo y acetato de etilo extrae una baja cantidad de componentes de esta matriz en comparación con las demás ensayadas, lo que permite obtener mejores respuestas cromatográficas y menor ruido químico (17, 18). Por su parte, la lechuga es una matriz que presenta una alta can-

tividad de pigmentos y clorofilas, lo cual puede interferir o alterar las respuestas cromatográficas, así como generar una mayor cantidad de ruido químico (12). Esta es la principal razón por la cual el proceso de limpieza realizado durante la extracción de los plaguicidas en la matriz de lechuga involucró el uso de dos adsorbentes (PSA + GCB), capaces de reducir considerablemente el número de interferentes (menor ruido), lo que conduce a una disminución de los LD.

La Figura 2 muestra el ruido promedio de la señal cromatográfica que se obtuvo en cada una de las matrices evaluadas. Este ruido se determinó para cada uno de los analitos, en el rango de tiempo de retención en el que eluye cada compuesto. Esta figura permite confirmar que todas las matrices presentan un valor de ruido diferente, siendo mayor para el aguacate y menor para el arroz.

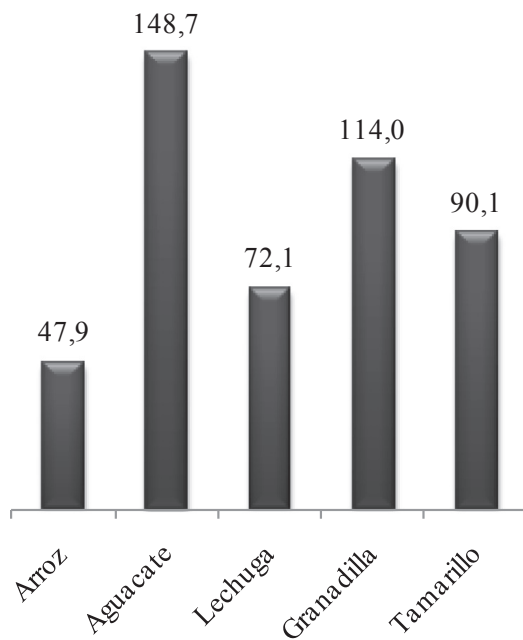


Figura 2. Promedio del ruido (intensidad) de todos los analitos en cada una de las matrices. Para cada matriz se evaluó el ruido en cinco blancos ($n_{\text{total}} = 155$ por cada promedio).

Al correlacionar la información contenida en las figuras 1 y 2 es posible observar que los valores promedios obtenidos para los LD con los métodos de la IUPAC, propagación de errores y t_{99} presentan una baja variación entre

las diferentes matrices, a pesar de que el ruido promedio de la señal cromatográfica cambia notablemente entre una y otra. Esto indica que en estos métodos la magnitud del ruido no hace un aporte notable en la estimación del LD. Este

hecho se cree que no es del todo conveniente, puesto que, para una misma concentración de un plaguicida, se tendrá una relación señal ruido diferente en una u otra matriz, y teniendo en cuenta que en el caso ideal se deben tener relaciones señal-ruido (S/R) iguales a 3 para los LD estimados, se puede llegar a pensar que para algunos de estos casos están subestimando (posibles S/R < 3) o sobreestimando (S/R > 3) los valores de LD.

La Figura 3 muestra la distribución de los LD según una clasificación de rangos de concentración que se realizó a partir de la desviación estándar de todos los límites de detección. En esta figura se encuentra que para el método de la IUPAC no se presentan LD inferiores a 2,5 µg/kg, de igual manera se puede apreciar

que la mayoría de LD se encuentran en el rango de 2,5 µg/kg a 14,5 µg/kg en todas las matrices. Este comportamiento correlaciona con lo mostrado en la Figura 1, en donde al igual que en la Figura 3, se encuentra una independencia del LD con la matriz de análisis. La naturaleza de este comportamiento se cree es debida a diferentes factores, dentro de los que se destacan la alta especificidad que brinda la espectrometría de masas, la mejor resolución cromatográfica del UFLC y el estrecho ancho de las señales cromatográficas, pues bajo estas condiciones se minimiza el mayor número de interferentes que puedan coeluir en el rango de tiempo de retención y, por tanto, a pesar del incremento en la magnitud del ruido, la desviación estándar de este se mantiene constante.

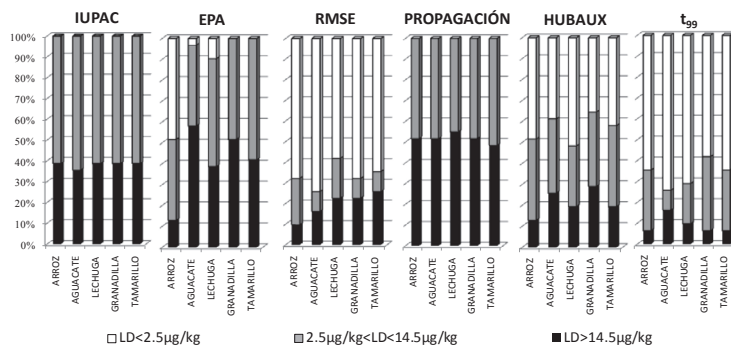


Figura 3. Distribución de los valores de LD estimados mediante las diferentes aproximaciones en las matrices de trabajo.

En contraste con el método de la IUPAC, los LD estimados mediante el método de la EPA varían entre las diferentes matrices, hecho asociado a la naturaleza del cálculo de estos límites, pues este método involucra pérdidas de los compuestos en el proceso de extracción/limpieza, variaciones en las

respuestas cromatográficas ocasionadas por compuestos de la matriz, entre otros factores que afectan directamente el cálculo de los LD (12). Sumado a esto, con este método se encuentra que para arroz, aguacate y lechuga se presentan LD inferiores a 2,5 µg/kg, mientras que para las matrices restantes solo se presentan

LD superiores a este valor. Para el caso del arroz se tiene el más alto porcentaje de compuestos con $LD < 2,5 \mu\text{g/kg}$ respecto a las demás matrices, lo cual se atribuye al bajo ruido químico y a los mayores porcentajes de recuperación que se obtuvieron para esta matriz.

En la Figura 3 se halla que el método RMSE tiene el mayor número de compuestos con $LD < 2,5 \mu\text{g/kg}$, lo cual no se correlaciona del todo con lo presentado en la Figura 1, pues allí se encuentra que mediante este método se tienen los promedios más altos de LD; este fenómeno contradictorio se atribuye a una minoría de compuestos que presentaron LD hasta diez o veinte veces superiores a los de cualquier método y, a pesar de ser solo un 20 % de los compuestos, estos inducen a que se presente el promedio más alto (Figura 1). La estimación del LD con este método se encuentra sujeta a diferentes variables dentro de las que se resalta el ajuste de regresión que se realice en el rango de concentración estudiado; de esta manera, entre mejor sea el ajuste la predicción de valores de concentración mediante el modelo matemático generado, se obtendrá un menor error de estimación, lo que se traduce en una magnitud baja para el numerador de la expresión 5 y por consiguiente un menor LD. Sin embargo, en el caso contrario, en el que la estimación de valores de concentración presente un error alto, se tendrán LD más elevados, hecho que se observa en las figuras 1 y 3, puesto que algunos compuestos presentaron ajustes relativamente pobres, que se reflejaron en LD altos.

En la Figura 3 se observa que el MPE presenta resultados similares a lo encon-

trado mediante el método de la IUPAC, pues para ningún caso se encontró un $LD < 2,5 \mu\text{g/kg}$; por otro lado, respecto a este mismo resultado, se encuentra que existe un incremento en el porcentaje de compuestos con $LD > 14,5 \mu\text{g/kg}$, hecho que es debido a la naturaleza de este método, pues si se observa la expresión 2 se encuentra que además de tener en cuenta la desviación estándar del ruido (IUPAC) se adiciona un término que proviene de la curva de calibración del método.

El método de Hubaux-Vos presenta una distribución más homogénea en los tres rangos de LD; sin embargo, se observa una tendencia a estimar los LD hacia los rangos más bajos. Finalmente, mediante t_{99} se encuentra que la mayoría de los compuestos presentan LD inferiores a cualquier otro método de estimación, hecho que se atribuye al bajo coeficiente de variación que se obtiene en los ensayos de repetibilidad de la metodología al límite de cuantificación, pues para algunos casos se presentan coeficientes de variación inferiores al 5 %, por tanto la estimación mediante la expresión 6 da como resultado valores muy bajos de LD.

Confirmación de las estimaciones

Como se mencionó, con cualquiera de los métodos existe una posibilidad de llegar a subestimar o sobrestimar el valor obtenido para LD, pues esta estimación depende de diferentes variables que involucra cada método de cálculo. Por tal motivo, una vez se tiene un valor estimado para LD, el siguiente paso es la confirmación de este límite. Para ello se fortificó cada una de las matri-

ces a la concentración estimada mediante cada método; posteriormente se realizó el proceso de extracción y se calculó la relación señal ruido para cada uno de los compuestos en cada una de las matrices.

De acuerdo con la EPA, la relación S/R para los límites de detección y de cuantificación debería corresponder a 3 y 10 respectivamente, de esta manera, en el presente estudio se tomaron estos valores de referencia para determinar si los límites calculados se encuentran estimados adecuadamente. En este contexto, los valores de S/R inferiores a 3 se consideran señales que no son diferenciadas adecuadamente del ruido de la matriz, es decir se realizó una subestimación; para relaciones S/R superiores a 10 se considerará que los LD se encuentran sobreestimados, pues son señales bien diferenciadas del ruido de la matriz y se deberían cuantificar (19). Sin embargo, es importante señalar que las relaciones S/R superiores a 10 no son necesariamente sobreestimaciones de los LD, si se tiene en cuenta que de acuerdo a la definición del LD es indis-

pensable que se tenga una diferenciación señal-ruido con bases estadísticas, es decir la concentración que se adopte como LD tiene que provenir de cualquiera de los métodos de estimación y no basta con obtener una relación S/R entre 3 y 10. De tal manera que relaciones S/R superiores a 10 no son ideales, pero satisfacen la definición del LD.

La Figura 4 muestra la distribución de las relaciones S/R para cada uno de los métodos en las diferentes matrices de análisis. En estas gráficas se observa que los métodos t_{99} y RMSE subestimaron el LD para más del 90 % de los compuestos, pues en la mayoría de los casos se presentan relaciones S/R < 3. Respecto a RMSE, se encuentra que la mayoría de las veces, a excepción de un compuesto en aguacate, se presentaron relaciones S/R < 3 o S/R > 10. El tercer método que subestimó el mayor número de LD corresponde al método Hubaux-Vos, sin embargo a diferencia de RMSE y t_{99} , este método permite obtener para más del 40 % de los compuestos relaciones S/R adecuadas.

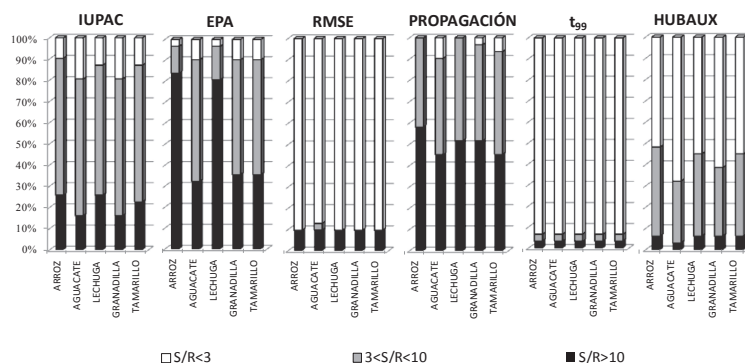


Figura 4. Distribución de la relación señal-ruido para las diferentes matrices obtenidas en la evaluación de los LD.

La subestimación de los LD, mediante el método t_{99} , se atribuye a su dependencia con la dispersión de los límites de cuantificación, pues como se observa en la ecuación 6, al presentar dispersiones bajas se tiende a realizar subestimaciones. Por otro lado, los LD subestimados para los métodos de Hubaux-Vos y RMSE se atribuyen al excelente ajuste por regresión de las curvas de calibración en los rangos de concentración evaluados, lo cual tiene una relación directa con el valor del LD, tal como se observa en las ecuaciones 3 y 5, es decir, entre mejor sea el ajuste menor es el valor de LD. Por otra parte, los métodos de la EPA y de propagación de errores tienden a sobrestimar el LD para más del 30 % de los plaguicidas, siendo crítico en los casos de lechuga y arroz por el método de la EPA, en el que se sobrestima el LD para más del 70 % de los compuestos. Sin embargo, los métodos de la EPA y de propagación de errores presentaron para cerca del 30 % de los compuestos relaciones S/R entre 3 y 10; asimismo, mediante estos dos métodos se presentó el menor número de compuestos con relaciones S/R menores a 3.

La Figura 4 muestra que el método de la IUPAC presenta la distribución más homogénea en los diferentes rangos de relaciones S/R, pues entre cada una de las matrices se observa comportamiento similar en el porcentaje de LD en cada uno de los rangos de S/R. Mediante este método se encuentra el mayor porcentaje de compuestos dentro del rango $3 < S/R < 10$, lo que indica que con esta aproximación se logran obtener los resultados más adecuados. Sin embargo, se puede observar que en todas las matrices se presentan valores subestimados

y sobrestimados, lo que señala que esta aproximación, a pesar de ser la más cercana a los lineamientos de la EPA, no es un método absoluto para la estimación de los LD.

Es importante tener en cuenta que la estimación de los LD para los diferentes métodos es de una u otra manera función de la estimación que se realiza mediante el de la IUPAC; por ejemplo, para las aproximaciones en las que se emplean métodos de regresión, en la literatura se indica que se deben realizar las curvas de calibración en un rango muy cercano al LD, para lo cual se emplea el método de la IUPAC con el fin de establecer el rango de trabajo. Igualmente, para el método de la EPA, los ensayos de recuperación se realizan a partir de la información que brindan los LD de la IUPAC. Respecto a lo que indica el método t_{99} , aunque no se encuentra implícito en el cálculo, los límites de cuantificación para los cuales se realizó los ensayos de repetibilidad sí se relacionan directamente con lo estimado para la IUPAC.

CONCLUSIONES

En este estudio se encontró que los LD obtenidos con los diferentes métodos de estimación generalmente presentan valores en el mismo orden de magnitud, independiente de la matriz bajo estudio, exceptuando algunos casos como en la matriz de granadilla o aguacate, donde los LD presentaron valores relativamente altos. Asimismo, todos los métodos a excepción del método de la EPA, estiman valores de LD similares para las diferentes matrices analizadas. Finalmente, se encontró que el método de la IUPAC permitió estimar para un alto porcen-

taje de compuestos LD con relaciones señal-ruido dentro de un rango aceptable, mientras que los métodos RMSE y t_{99} subestimaron el LD para un alto porcentaje de compuestos, puesto que las relaciones señal-ruido obtenidas fueron inferiores a 3.

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias por la financiación a través del proyecto 120252330394 y a la Dirección de Investigación, Creatividad e Innovación de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, por su apoyo y financiación a través del proyecto 405-08-11:

REFERENCIAS

1. Kaufmann, A. Validation of multi-residue methods for veterinary drug residues; related problems and possible solutions. *Analytica Chimica Acta*. 2009. **637**: 144-155.
2. Schwesig, D. et al. A harmonized European framework for method validation to support research on emerging pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011. **30**: 1233-1242.
3. Soboleva, N. R.; Mageto, Á.; Ambrus, A.; Fajgelj, A. *Principles and practices of method validation*. Cambridge, UK. Royal Society Of Chemistry. 2000. p. 171.
4. Currie, L. A. Detection and quantification limits: basic concepts, international harmonization, and outstanding ("low-level") issues. *Applied Radiation and Isotopes*. 2004. **61**: 145-149.
5. Long, G. L.; Winefordner, J. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry*. 1983. **55**: 712-724.
6. Currie, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities1:(IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta*. 1999. **391**: 105-126.
7. Voigtman, E. Limits of detection and decision. Part 1. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2008, **63**: 115-128.
8. Currie, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Analytica Chimica Acta*. 1999. **391**: 127-134.
9. Currie, L. A. Limits for qualitative detection and quantitative determination. Application to radiochemistry. *Analytical Chemistry*. 1968. **40**: 586-593.
10. Corley, J. *Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods*. New Jersey, USA. John Wiley & Sons. 2003. p. 35.
11. Ahumada, D. A.; Zamudio, A. M. Análisis de residuos de plaguicidas en tomate mediante el uso de QuE-ChERS y cromatografía líquida ultrarápida acoplada a espectrometría de masas. *Rev. Col. Quim.* 2011. **40**: 227-246.
12. Ahumada, D. A.; Zamudio, A. M.; España, J. C. Matrix Effect in Pesticide Analysis by Ultra Fast Liquid

- Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Journal of Chemical Brazilian Society*. 2012. **23**(4): 661-669.
13. US EPA, U. *Title 40 of the US Code of Federal Regulations, Part 136, Appendix B*. Washington D.C., USA. Office of the Federal Register National Archives and Records Administration. 1993.
 14. Hubaux, A.; Vos, G. Decision and detection limits for calibration curves. *Analytical Chemistry*. 1970. **42**: 849-855.
 15. US EPA. *Assigning Values to Non-detected/Non-quantified Pesticide Residues in Human Health Food Exposure Assessments*. 2000. [citado: 2012 22 abril]. Disponible en: <http://www.epa.gov/pesticides/trac/science/trac3b012.pdf>
 16. Smith, R. K. *Handbook of environmental analysis*. New York, USA. Genium Publishing Corp. 1994. p. 171.
 17. Aysal, P.; Ambrus, A.; Lehotay, S. J.; Cannavan, A. Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 2007. **42**: p. 481-490.
 18. Lehotay, S. J. et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*. 2010. **1217**: p. 2548-2560.
 19. Sanco. *Method Validation and quality Control Procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. 2009. [citado: 2012 22 abril]. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf