Informes Técnicos Ciemat

1409

Septiembre, 2017

Estudio Pormenorizado de la Incertidumbre Asociada al Empleo de la Cromatografía de Gases para la Determinación de Ciertos Pesticidas Organoclorados y Bifenilos Policlorados en Muestras de Interés Medioambiental

O. Pindado Jiménez
S. García Alonso
R. Mª. Pérez Pastor

GOBIERNO DE ESPAÑA

MINISTERIO DE ECONOMÍA, INDUSTRIA Y COMPETITIVIDAD

Ciemat
Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas

Informes Técnicos Ciemat

1409

Septiembre, 2017

Estudio Pormenorizado de la Incertidumbre Asociada al Empleo de la Cromatografía de Gases para la Determinación de Ciertos Pesticidas Organoclorados y Bifenilos Policlorados en Muestras de Interés Medioambiental

O. Pindado Jiménez
S. García Alonso
R. Mª. Pérez Pastor

Departamento de Tecnología

Toda correspondencia en relación con este trabajo debe dirigirse al Servicio de Información y Documentación, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Ciudad Universitaria, 28040-MADRID, ESPAÑA.

Las solicitudes de ejemplares deben dirigirse a este mismo Servicio.

Los descriptores se han seleccionado del Thesauro del DOE para describir las materias que contiene este informe con vistas a su recuperación. La catalogación se ha hecho utilizando el documento DOE/TIC-4602 (Rev. 1) Descriptive Cataloguing On-Line, y la clasificación de acuerdo con el documento DOE/TIC.4584-R7 Subject Categories and Scope publicados por el Office of Scientific and Technical Information del Departamento de Energía de los Estados Unidos.

Se autoriza la reproducción de los resúmenes analíticos que aparecen en esta publicación.

Catálogo general de publicaciones oficiales
http://www.060.es

Depósito Legal: M-26385-2011
ISSN: 1135-9420
NIPO: 058-17-038-9

Editorial CIEMAT

CLASIFICACIÓN DOE Y DESCRIPTORES

S37
GAS CHROMATOGRAPHY; CALIBRATION; ORGANIC COMPOUNDS;
CHEMICAL ANALYSIS; DATA ANALYSIS

Estudio Pormenorizado de la Incertidumbre Asociada al Empleo de la Cromatografía de Gases para la Determinación de Ciertos Pesticidas Organoclorados y Bifenilos Policlorados en Muestras de Interés Medioambiental

Pindado Jiménez, O.; García Alonso, S.; Pérez Pastor, R. Mª.
110 pp. 52 refs. 6 figs. 35 tablas

Resumen:

Se presenta un estudio sobre la evaluación de las principales contribuciones de incertidumbre asociadas al método analítico desarrollado para la determinación de algunos compuestos organoclorados por cromatografía gases con detección selectiva de masas (CG/MS) en muestras de aguas continentales y sedimentos. El principal objetivo fue proporcionar una medida de las dispersiones de los valores de concentración medidos y por tanto de la fiabilidad de dichos resultados para los siguientes compuestos organoclorados: Endrín, Aldrín, Dieldrín, Isodrín, Simazina, Atrazina, Terbutilazina, Metacloro, α-HCH, ß-HCH, γ-HCH, Hexaclorobenceno, Pentaclorobenceno, p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT, o,p'-DDE, o,p'-DDD,o,p'-DDT, PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-118, PCB-138, PCB-153 y PCB-180.

Detailed Study of Uncertainty Associated to Using Gas Chromatography to Determine Several Organochlorine Pesticides and Polychloride Biphenyls into Interest Environmental Samples"

Pindado Jiménez, O.; García Alonso, S.; Pérez Pastor, R. Mª.
110 pp. 52 refs. 6 figs. 35 tables

Abstarct:

It has been presented an evaluation study for the main contributions to uncertainty related to the developed analytical method to analyze several organochlorine compounds by gas chromatography and mass spectrometry detection (GC/MS) in continental waters and sludge samples. The aim of the study was provide a measure of the dispersions reached by the values measured by the analytical methodology and therefore the reliability of the results may be demonstrated for several organochlorine compounds: Endrin, Aldrin, Dieldrin, Isodrin, Simazine, Atrazine, Terbutilazine, Methaloclhor, α-HCH, ß-HCH, γ-HCH, Hexachlorobenzene, Pentachlorobenzene, p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT, o,p'-DDE, o,p'-DDD, o,p'-DDT, PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-118, PCB-138, PCB-153 y PCB-180.

Siglas y acrónimos. 7

1. OBJETIVOS 9

2. INTRODUCCIÓN 11

2.1. Pesticidas organoclorados 14

2.1.1. Derivados de la Triazina 15

2.1.2. Derivados del DDT 16

2.1.3. Derivados del hexaclorociclohexano 17

2.1.4. Aldrín, Dieldrín, Endrín e Isodrín 18

2.1.5. Derivados del clorobenceno 19

2.2. PCBs 19

2.3. Metodología analítica 21

2.3.1. Procedimientos de extracción 21

2.3.1.1. Extracción de matrices sólidas 21

2.3.1.2. Extracción en fase sólida 22

2.3.2. Procedimiento de análisis 25

2.3.2.1. Cromatografía de gases 25

2.3.2.2. Detector de espectrometría de masas 26

2.4. Validación e incertidumbre analítica asociada 28

2.4.1. Validación de la metodología analítica 28

2.4.1.1. Repetitividad y reproducibilidad 29

2.4.2. Incertidumbre de medida 30

3. PARTE EXPERIMENTAL 33

3.1. Instrumentación, materiales y reactivos 33

3.1.1. Instrumentación 33

3.1.2. Materiales 33

3.1.3. Patrones, reactivos y gases 33

3.2. Procedimiento de limpieza del material de vidrio 34

3.3. Preparación de las disoluciones de calibrado 35

3.3.1. Patrón interno 35

3.3.2. Patrón de sustitución (surrogate) 35

3.3.3. Patrones de calibración 35

3.4. Conservación y mantenimiento de las muestras 37

3.5. Tratamiento de las muestras de aguas continentales 37

3.5.1. Extracción en fase sólida 38

3.5.2. Concentración del extracto 39

3.6. Tratamiento de las muestras de lodos de aguas continentales 40

3.7. Análisis cromatográfico 40

3.7.1. Condiciones de operación 40

3.7.2. Identificación de los compuestos 42

3.7.3. Cuantificación 43

3.7.4. Calibración 44

3.7.5. Análisis de la muestra 45

3.7.6. Estudio de recuperación con patrones de sustitución 45

3.7.7. Cambio del *liner* del inyector PTV 46

4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS 47

4.1. Parámetros analíticos 47

4.1.1. Linealidad 47

4.1.2. Estudio de recuperación 49

4.1.2.1. Aguas continentales. 49

4.1.2.2. Muestras de sedimentos 51

4.1.2.2.1. Sesgo proporcional 52

4.1.2.2.2. Sesgo constante 54

4.1.3. Trazabilidad y exactitud 58

4.1.3.1. Aguas continentales 58

4.1.3.2. Muestras de sedimentos 60

4.1.4. Precisión intermedia 61

4.1.4.1. Aguas continentales 61

4.1.4.2. Sedimentos 62

4.1.5. Límites de detección y cuantificación 65

4.1.6. Sensibilidad y selectividad 66

4.2. Incertidumbre de medida 71

4.2.1. Incertidumbre asociada a la calibración del GC/MS 71

4.2.1.1. Contribución de las disoluciones de calibración. 72

4.2.1.2. Contribución de la recta de calibrado 72

4.2.1.2.1. Incertidumbre de la señal analítica ($u^2_{y'}$) 73

4.2.1.2.2. Incertidumbre de la ordenada en el origen (u^2_b) y pendiente (u^2_m) 75

4.2.2. Incertidumbre asociada al análisis del material de referencia 80

4.2.2.1. Muestras de sedimentos 80

4.2.2.2. Muestras de aguas continentales 81

4.2.3. Incertidumbre asociada al tratamiento de las muestras 82

4.2.3.1. Muestras de sedimentos 82

4.2.3.2. Muestras de aguas continentales 83

4.2.4. Incertidumbre combinada 83

5. CONCLUSIONES 87

6. ANEXOS 91

Anexo A: Patrones comerciales. 91

Anexo B: Esquema de los métodos de análisis. 93

Anexo C: Espectros de masas. 95

7. REFERENCIAS 105

Siglas y acrónimos.

ASE: Extracción acelerada de disolventes *(Accelerated Solvent Extraction).*

CRM: Material de referencia certificada *(Certified Reference Material)*

DDDs: Diclorodifenildicloroetanos.

DDEs: Diclorodifenildicloroetilenos.

DDTs: Diclorodifeniltricloroetanos.

ECD: Detector de captura electrónica (*Electronic Capture Detector*).

ENAC: Entidad nacional de acreditación.

HCHs: HexacloroCiclohexanos.

IUPAC: Unión internacional de química pura y aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

FID: Detector de ionización de llama (*Flame Ion Detector*).

GC: Cromatografía de gases.

LOD: Límite de determinación.

LOQ: Límite de cuantificación.

MSD: Detector de espectrometría de masas.

PAHs: Hidrocarburos policíclicos.

PCBs: Bifenilos policloroados.

PCDDs: Dibenzodioxinas policloradas.

PCDFs: Dibenzofuranos policlorados.

POPs: Contaminantes orgánicos persistentes (*Persistent Organic Pollutants*).

PTV: Vaporización con temperatura programable **(***Programable Temperature Vaporization)*.

QuEChERS: Acrónimo en inglés *(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe).*

RSD: Desviación típica relativa (*Relative Standard Deviation).*

SIM: Monitorización de iones simple (*Simple Ion Monitoring*).

SPE: Extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction).*

SPME: Microextracción en fase sólida *(Solid Phase MicroExtraction).*

Uma: Unidad de masa atómica.

USEPA: Agencia de protección del medioambiente de Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency).*

1. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de la metodología analítica para la determinación de compuestos organoclorados en sedimentos y aguas continentales. En particular, se han incluido los derivados del diclorodifenil etano (o,p'-DDD, o,p'-DDE, o,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT), los isómeros del Hexaclorociclohexano (α-HCH, β-HCH y γ-HCH), los derivados de la Triazina (Simazina, Atrazina, Terbutilazina), los derivados de los ciclodienos (Endrín, Dieldrín, Aldrín e Isodrín), ciertos bifenilos policlorados, los derivados clorados del benceno (Hexaclorobenceno, Pentaclorobenceno y Pentaclorofenol) y el Metacloro.

Para la optimización de la metodología de análisis de estos compuestos en sedimentos y aguas continentales se ha considerado la cromatografía de gases capilar con detección por espectrometría de masas como técnica analítica. Para el tratamiento de las muestras de sedimentos se ha escogido la técnica de extracción simple mediante ultrasonidos y agitación mecánica, mientras que para el análisis de los compuestos en aguas continentales se ha empleado la extracción en fase sólida.

Con el objetivo de demostrar la validez de la metodología desarrollada, se ha realizado los pertinentes estudios de reproducibilidad, repetitividad, precisión intermedia, recuperación, exactitud, robustez, sensibilidad, selectividad y se han estimado los límites de cuantificación reales a lo largo de un periodo de tiempo de 9 meses.

Asimismo, se ha llevado a cabo una estimación de incertidumbres asociadas al método de determinación de los organoclorados en muestras reales de sedimentos y aguas continentales. Se han establecido las etapas analíticas con mayor contribución a la incertidumbre de medida, de acuerdo con los estudios previos realizados en el laboratorio y realizando la correspondiente estimación matemática para evaluar las contribuciones más significativas.

2. INTRODUCCIÓN

Los contaminantes orgánicos persistentes, conocidos por sus siglas en ingles POPs, son un grupo de compuestos definidos por el programa de medioambiente de las Naciones Unidas en el año 1995, y que se ha ido ampliando con el tiempo. Actualmente dentro de esta lista se incluyen algunos pesticidas organoclorados como el Aldrín, Dieldrín, Clordano, DDT, Endrín, Heptacloro, Hexaclorobenceno, Lindano, Mirex y Toxafeno, la familia de las dibenzodioxinas policloradas (PCDDs), los dibenzofuranos policlorados (PCDFs), los bifenilos policlorados (PCBs) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Los compuestos que se catalogan como POPs tienen una amplia variedad de propiedades, aunque todos ellos presentan algunas características comunes como son sus elevados niveles de estabilidad, toxicidad, movilidad y persistencia en el medioambiente. Además se acumulan en los tejidos grasos de los seres vivos [1].

Dentro de los POPs, los pesticidas organoclorados y los PCBs, han sido motivo de preocupación en todo el mundo debido al impacto negativo que producen en el ser humano y en la vida animal [2]. Han sido catalogados como uno de los grupos de compuestos químicos sintetizados por el hombre más problemáticos [3]. Hay numerosos estudios que han establecido los efectos nocivos que producen en la reproducción, desarrollo y en las funciones inmunológicas de los seres vivos. [3-5].

Se han detectado pesticidas organoclorados y PCBs en zonas muy alejadas de sus focos de emisión. Estos compuestos son semivolátiles y por ello puede viajar largas distancias a través de la atmósfera como gases o en aerosoles, acumulándose en las regiones más frías, para finalmente condensarse y depositarse. Hay evidencias de que las zonas polares están contaminadas por POPs [2, 3, 6-10]

Debido a la extensa contaminación de los ecosistemas acuáticos y suelos ha forzado la adopción de medidas legislativas para proteger el medioambiente frente a la contaminación. Por ejemplo la decisión nº 2455/2001/EC, que cambia la directiva 2000/60/EC, incluyendo una lista de sustancias prioritarias [11]. Para proteger las cuencas de los ríos, se ha desarrollados legislación europea sobre medioambiente

como por ejemplo la directiva 76/464/CEE relativa al análisis de 132 compuestos tóxicos y persistentes en matrices medioambientales, la directiva del marco del agua (2006/11/CE) centrada en mejorar la calidad del agua superficial y la disposición común EC Nº 372008 que incluye una proposición de concentraciones medioambientales máximas para el agua [12]. De acuerdo a la USEPA, la concentración de PCBs debe ser menor a 14 mg/L en agua para ser considerada seguro para la salud humana y la vida acuática [13].

En la figura 1 se presentan las estructuras químicas de los compuestos organoclorados que se estudian en este documento.

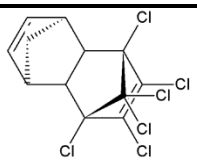
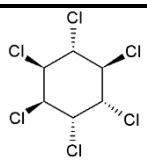
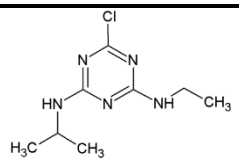
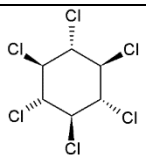
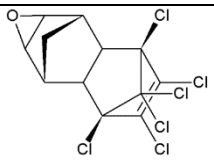
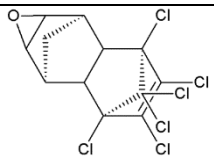
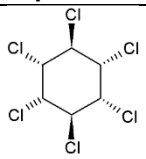
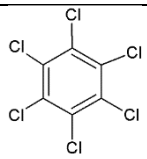
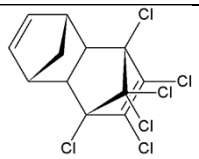
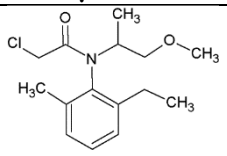
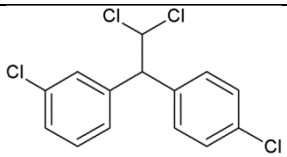
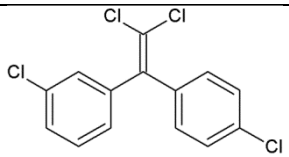
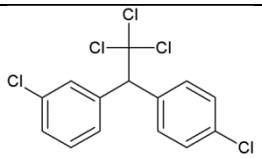
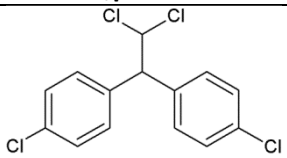
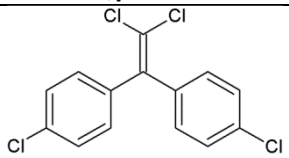
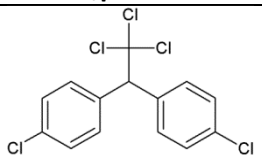
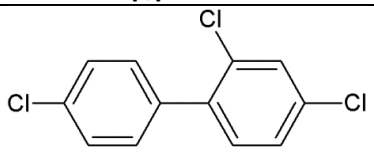
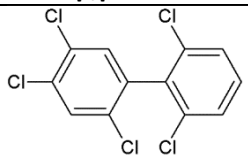
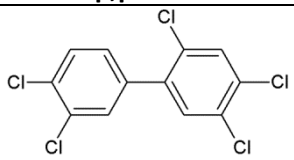
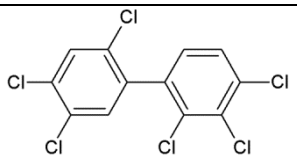
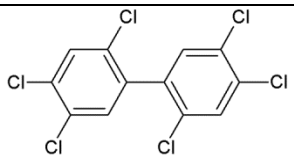
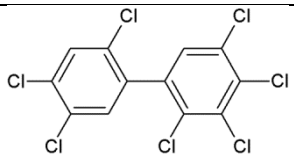
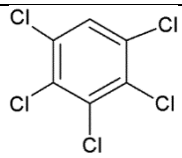
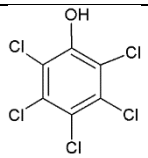
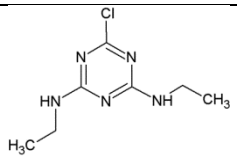
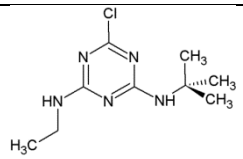
 Aldrín	 α-HCH	 Atrazina
 β-HCH	 Dieldrín	 Endrín
 γ-HCH	 Hexaclorobenceno	 Isodrín
 Metacloro	 o,p'-DDD	 o,p'-DDE
 o,p'-DDT	 p,p'-DDD	 p,p'-DDE
 p,p'-DDT	 PCB-28	 PCB-101
 PCB-118	 PCB-138	 PCB-153
 PCB-180	 Pentaclorobenceno	 Pentaclorofenol
 Simazina	 Terbutilazina	

Figura 1: Estructura química de los compuestos organoclorados.

De acuerdo a su estructura química los compuestos estudiados en este procedimiento se pueden agrupar en varias familias: derivados del diclorodifenil etano (o,p'-DDD, o,p'-DDE, o,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT), los isómeros del HexacloroCiclohexano (α-HCH, β-HCH y γ-HCH), los derivados de la Triazina (Simazina, Atrazina, Terbutilazina), los derivados de los ciclodienos (Endrín, Dieldrín, Aldrín e Isodrín), los bifenilos policlorados, los derivados clorados del Benceno (Hexaclorobenceno, Pentaclorobenceno y Pentaclorofenol) y el Metacloro.

2.1. Pesticidas organoclorados

Los pesticidas son un conjunto de sustancias sintéticas que se usan para el control de plagas para mejorar la producción agrícola [14]. En el caso de los pesticidas organoclorados, las mayores emisiones se producen en los países en vías de desarrollo de las áreas tropicales y subtropicales, donde son usados para el control de la malaria y para la agricultura. Los pesticidas organoclorados se emiten en menor medida en los países desarrollados desde que fueron prohibidos en la convención de Estocolmo [3, 15, 16].

A pesar de estar prohibido su uso en los países desarrollados, las características físico-químicas de estos compuestos han hecho que aún sean detectados en diferentes matrices medioambientales. Los pesticidas organoclorados son resistentes a la degradación fotoquímica, biológica y química por un largo periodo de tiempo. Debido a su estabilidad, se han detectados en aguas superficiales, mares, ríos, sedimentos y asociados a tejidos de organismos acuáticos [11, 12, 14, 15, 17-21]. Debido a sus características los pesticidas se absorben en la materia orgánica contenida en los sedimentos. Los sedimentos son considerados como el sumidero de los pesticidas introducidos en el medioambiente. Los contaminantes tienden a asociarse a las partículas en suspensión y por consiguiente se depositan en la sedimentación [15]. Los sedimentos de rio dan una información sobre la contaminación histórica y sobre la calidad de las aguas superficiales [17]. Los grandes ríos que desembocan en el mediterráneo, como el Rodano, Po y el Ebro están contaminados por PCBs,

hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), disolventes orgánicos, además de ser una fuente importante de pesticidas ya que pasan por zonas extensamente cultivadas [20].

En tabla 1 se presentan principales propiedades físicas y químicas de los compuestos estudiados.

Tabla 1: Principales propiedades físico – químicas de los pesticidas organoclorados estudiados.

Compuesto clorado	Número CAS	PM (uma)	T. fusión (ºC)	Solubilidad (mg/L)	Log K_{ow}	P. vapor (mmHg)
p,p-DDD	72-54-8	320,05	76-78	0,1	5,87	$1,94 \cdot 10^{-5}$
p,p-DDE	72-55-9	318,03	87,4	0,011	7	$6,2 \cdot 10^{-6}$
p,p-DDT	50-29-3	354,49	74,2	0,005	6,79	$1,1 \cdot 10^{-7}$
o,p-DDD	53-19-0	320,05	109	0,090	6,02	$1,35 \cdot 10^{-6}$
o,p-DDE	3424-82-6	318,03	89,9	0,14	6,51	$6,0 \cdot 10^{-6}$
o,p-DDT	789-02-6	354,49	109,9	0,085	6,91	$1,6 \cdot 10^{-7}$
α-HCH	319-84-6	290,83	156	2	3,8	$4,5 \cdot 10^{-5}$
β-HCH	319-85-7	290,83	296,85	0,2	3,78	$3,6 \cdot 10^{-7}$
γ-HCH	319-86-8	290,83	113,85	7,3	3,72	$3,5 \cdot 10^{-5}$
Atrazina	1912-24-9	215,68	177,35	33	2,61	0,03
Simazina	122-34-9	201,66	229,78	5	122	$6,1\ 10^{-9}$
Metacloro	51218-45-2	283,794	-	530	2820	0,127
Terbutila.	5915-41-3	229,71	176,08	8.5	1096	$1,12\ 10^{-6}$
Aldrín	309-00-2	364,91	49-60	$8,2 \cdot 10^{-5}$	4,96	$6,6 \cdot 10^{-6}$
Dieldrín	60-57-1	380,909	175-176	$3,5 \cdot 10^{-4}$	3,23	$3 \cdot 10^{-6}$
Endrín	72-20-8	380,909	226-230	$3,6 \cdot 10^{-4}$	4,93	$3 \cdot 10^{-6}$
Isodrín	465-73-6	364,91	240-242	0,014	6,75	0,330
HexClBen	118-74-1	284,782	228,12	0,005	5,5	0,817
PentClben	608-93-5	250,337	86	0,55	5,17	1,590
PentClFen	87-86-5	266,337	190,69	14	5,01	0,00011

2.1.1. Derivados de la Triazina

La familia de las triazinas incluye a compuestos como Atrazina, Simazina, Terbutilazina, y Metacloro. Se emplean como herbicidas en zonas agrícolas. Tienen alta movilidad y solubilidad en agua y han sido clasificadas como cancerígenas para el ser humano.[22]. En España son muy empleados entre abril y octubre, y debido a sus características, la presencia de triazinas en agua subterráneas es común, encontrándose valores de µg/L en zonas de mucha actividad agrícola. En el suelo, las

triazinas son degradadas por reacciones redox, por lo que pueden encontrarse también sus productos de degradación. La vida media de la Atrazina es 60 días [18].

2.1.2. Derivados del DDT

El DDT es un insecticida organoclorado que se ha empleado ampliamente para el control de plagas. Sus primeros usos datan de la década de 1940s. El DDT afecta al transporte de iones Na^+ y K^+ en las membranas de las células nerviosas. Debido a su toxicidad existe numerosa literatura en relación con los efectos negativos del DDT en el medioambiente y en el ser humano [6, 9, 23, 24]. Por ello, el empleo de DDT ha sido prohibido en algunos países, concretamente en España su uso está prohibido desde el año 1985. Además, se han buscado sintetizar derivados más biodegradables del DDT mediante la sustitución de los átomos de cloro por grupos funcionales más polares.

La presencia de DDT en el medioambiente está condicionada por sus características físico-químicas. El DDT en el aire es degradado rápidamente por acción de la luz solar, por lo que su presencia en este vector es menos probable. En el suelo, el DDT se degrada por acción de microorganismos, en función del suelo la persistencia varía entre 2 – 15 años, formándose principalmente el DDD y DDE. El DDT y sus productos de degradación son poco solubles en agua, aun así una parte puede pasar a las aguas subterráneas y de ahí a las cuencas de los ríos. Por otro lado, estos insecticidas pueden bioacumularse en los tejidos grasos de animales y en plantas.

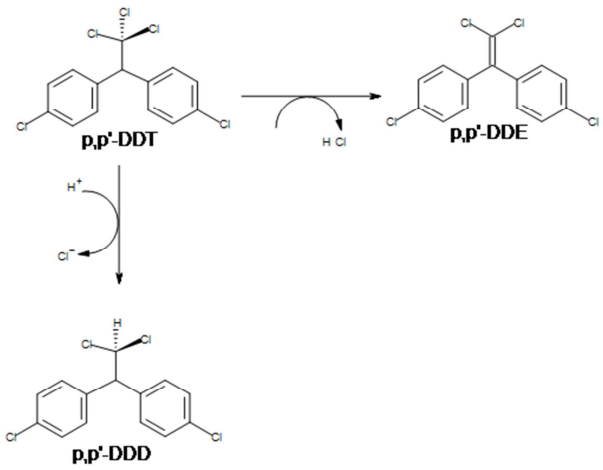


Figura 2 Esquema de la degradación del DDT.

2.1.3. Derivados del hexaclorociclohexano

El gamma-HCH, también conocido como Lindano, es un insecticida que se ha sido utilizado ampliamente en la agricultura. Se presentaba como mezcla de sus tres isómeros, α-HCH, β-HCH y γ-HCH, aunque este último es el único con verdadera capacidad insecticida. Debido a propiedades dañinas para el ser humano y para el medioambiente, su uso ha sido prohibido en varios países. En España, se ha producido Lindano hasta la década de los 90, generando una importante contaminación en la provincia de Huesca, que ha contaminado algunos ríos afluentes del rio Ebro.

El Lindano es muy persistente en el medioambiente. En el suelo suele ser muy estable debido a la alta afinidad que tiene por la materia orgánica. Allí es degradado lentamente por algas, hongos y bacterias. En suelos con poca materia orgánica el Lindano puede lixiviarse y pasar a las aguas subterráneas, donde es muy estable. Por ello, el Lindano es capaz de bioacumularse en los animales, principalmente acuáticos.

Comparado con otros pesticidas organoclorados, los HCH son más solubles en agua y más volátiles, lo que explica que los HCH sean detectados en todos los vectores

medioambientales. Las propiedades físicas y químicas de los diferentes isómeros del HCH son diferentes [21].

2.1.4. Aldrín, Dieldrín, Endrín e Isodrín

El Aldrín es un pesticida organoclorado que fue sintetizado en la década de los 1950s, mientras que el Dieldrín, el estereoisómero del Aldrín, se sintetizó posteriormente con la finalidad de obtener un compuesto menos volátil. Debido a sus características, el Aldrín fue empleado principalmente en el suelo de plantaciones agrícolas, mientras que el Dieldrín se aplicó principalmente sobre los cultivos y el follaje de las plantas. La efectividad de estos pesticidas, que actúan contra el sistema nervioso, era menor que las obtenidas por el DDT [23].

Con el paso del tiempo se demostró que el empleo de estos pesticidas afectaba negativamente al medioambiente y que tienen propiedades cancerígenas para el ser humano, por lo que su uso fue disminuyendo hasta su prohibición.

En el medioambiente el Aldrín se degrada rápidamente a Dieldrín, que a su vez se degrada formando principalmente Dieldrín cetona. La luz solar es capaz de degradar estos compuestos, formándose unos productos que son más solubles en agua por lo que son más peligrosos para la vida acuática.

El Endrín fue empleado por primera vez en la década de 1950s, de forma similar al Aldrín y Dieldrín, obteniendo los mejores resultados al aplicarse como insecticida en el cultivo de algodón, maíz, arroz en zonas tropicales y también como plaguicida para el control de roedores. El Isodrín es el estereoisómero del Endrín.

El Endrín actúa contra el sistema nervioso, aunque es más tóxico para las especies no objetivo que el Aldrín y Dieldrín. Sin embargo, se acumula en menor medida ya que se degrada más rápidamente. Debido a sus propiedades dañinas para el medioambiente y la salud humana su uso está prohibido en numerosos países [23].

2.1.5. Derivados del clorobenceno

El Hexaclorobenceno es un pesticida organoclorado que se ha usado como fungicida en las cosechas de cereales, principalmente en las semillas de trigo. Su uso fue prohibido en Europa en el año 1998. Actualmente el Hexaclorobenceno se puede generar como subproducto en la combustión de algunos procesos de la industria química. Además puede presentarse como contaminante de la producción de Pentaclorofenol. Este compuesto es muy volátil y se degrada lentamente en el aire, por lo que pueden viajar largas distancias. Es un compuesto poco soluble en agua, por lo que suele asociarse a las partículas en suspensión y depositarse en los sedimentos donde puede ser degradado con los años. Además tiende a acumularse en los tejidos grasos de los seres vivos.

El Pentaclorobenceno es un compuesto sintético que se ha usado como plaguicida, retardante y en fluidos eléctricos en combinación con PCBs. Además puede ser subproducto en la síntesis de otros compuestos como el Pentaclorofenol. Es poco soluble en agua y tiende a bioacumularse en los organismos acuáticos, siendo además muy tóxico. En aire, el Pentaclorobenceno puede permanecer largos periodos de tiempo sin degradarse.

El Pentaclorofenol es una sustancia sintética que se usa como plaguicida y que actualmente su uso está muy restringido. Se emplea en industrias para el tratamiento de madera y textiles que no vayan a estar en contacto con el ser humano. Debido a sus características suele acumularse en los sedimentos Es un compuesto muy peligroso, siendo muy tóxico para organismos acuáticos y plantas.

2.2. PCBs

Los PCBs son una familia de compuestos sintéticos, integrada por 209 congéneres. Son bifenilos en los que se han introducido diferentes átomos de cloro, desde especies monocloradas a un compuesto con diez átomos de cloro. Los PCBs se clasifican en función del número de cloros que tienen en la estructura. En la tabla 2 se

presentan las principales propiedades físicas y químicas de los PCBs estudiados en este procedimiento.

Tabla 2 Principales propiedades físico – químicas de los PCBs estudiados.

Numero PCB	Número CAS	PM (uma)	T. fusión (ºC)	Solubilidad (mg/L)	Log K_{ow}	P. vapor (mmHg)
PCB-28	7012-37-5	257,5	57	0,00016	5,80	-
PCB-52	35693-99-3	292	87	0,000030	6,10	0,037
PCB-101	37680-73-2	360,9	76,35	0,00001	6,40	0,0011
PCB-118	31508-00-6	326,4	-	0,0000134	7,12	$6{,}531 \cdot 10^{-6}$
PCB-138	35065-28-2	360,9	78,5-80	0,0000159	7,0	$4 \cdot 10^{-6}$
PCB-153	35065-27-1	360,9	103-104	0,00000091	6,90	$3{,}8 \cdot 10^{-7}$
PCB-180	35065-29-3	395,32	109-110	0,0000003	6,70	-

Las características químicas de estos compuestos como su estabilidad química (resistencia a ácidos, bases, a materiales orgánicos, no sufren casi reacciones de oxidación y reducción), estabilidad térmica, baja volatilidad y excelentes aislantes eléctricos hicieron que sus usos en la industria fuese muy generalizado. Se han empleado abundantemente en aparatos eléctricos, condensadores, revestimientos de superficies, tintas, adhesivos, retardarte de llamas y pinturas. Los PCBs se han usado normalmente en mezclas muy complejas, como por ejemplo los Aroclor. Desde el punto de vista medioambiental las mezclas que han generado mayor contaminación han sido aquellas que contiene entre un 40 – 60 % de cloro [25]. Sin embargo, debido a sus riesgos medioambientales fueron prohibidos en algunos países en la década de los 70s.

Actualmente, los PCBs pueden liberarse al medioambiente por medio de la incineración o almacenamiento de los residuos que los contienen en los vertederos. Además, a elevadas temperaturas, los PCBs pueden arder y generar como subproductos PCDDs.

2.3. Metodología analítica

2.3.1. Procedimientos de extracción

Los procedimientos de extracción tienen como principal objetivo la separación eficaz de los analitos de interés de la matriz a la que estén asociados. Un método de extracción ideal debe ser selectivo, para extraer únicamente analitos objetivo, eficaz para obtener recuperaciones del 100%, inerte para no transformar los analitos de interés en otros compuestos, rápido, barato y respetuoso con el medioambiente. Sin embargo, para los análisis de POPs a nivel de trazas en muestras de interés medioambiental, las condiciones ideales no se producen y es necesario llegar a un compromiso que permitida realizar eficazmente los análisis.

Existen varias alternativas para realizar la extracción de POPs en matrices medioambientales, en función de que la matriz sea líquida o sólida. Entre las alternativas más empleadas se pueden citar la extracción líquido-liquido, el Soxhlet, el empleo de radiación de microondas, el empleo de baños de ultrasonidos, la extracción acelerada de disolventes (ASE), el empleo de fluidos supercríticos, los líquidos iónicos, la extracción en fase sólida (SPE), la micro-extracción en fase sólida (MSPE) o el empleo de QuEChERS seguido de extracción en fase sólida dispersiva. Todos estos métodos de extracción han sido empleados en mayor o menor medida y con resultados satisfactorios para el análisis de POPs en matrices complejas [6, 11, 14, 17, 18, 26-32].

2.3.1.1. Extracción de matrices sólidas

Como se comentó anteriormente existen diferentes alternativas para la extracción de POPs adsorbidos en matrices sólidas, siendo las más empleadas el Soxhlet, el microondas, el ultrasonidos o el ASE. En este procedimiento la extracción de los POPs adsorbidos en una muestra sólida se realiza con mezcla de disolventes orgánicos y la utilización conjunta de agitación mecánica y ultrasonidos.

Existe un procedimiento, el protocolo EPA 3550B, para el empleo de ultrasonidos para la extracción de compuestos orgánicos no volátiles y semivolátiles de muestras sólidas [33]. La experiencia de los autores permitió optimizar este

procedimiento para el análisis algunos POPs en muestras de suelos, quedando los resultados del desarrollo y validación del proceso publicado a la comunidad científica [34]. Este protocolo presentó unos resultados satisfactorios para el análisis de los compuestos seleccionados, pero aún podía ser más optimizado gracias a la miniaturación del proceso. Con el objetivo de disminuir el coste y tiempo empleado, en este documento se presenta un nuevo enfoque que pretende utilizar conjuntamente la agitación mecánica y el ultrasonido empleando menos volumen de disolvente y cantidad de muestra sin perder eficacia en la extracción.

El empleo de diferentes mezclas de disolventes orgánicos permite disolver los POPs que estén retenidos en las partículas de suelo. La mezcla de hexano/acetona ha sido ampliamente utilizada para la extracción de mezclas de pesticidas y PCBs en muestras sólidas. La agitación mecánica de la muestra favorece la mezcla de los disolventes orgánicos con la matriz, mejorando la eficacia de la extracción. El empleo de ondas de ultrasonidos, favorece la disolución de los analitos en la mezcla orgánica, ya que este fenómeno produce un aumento de la temperatura. El proceso de extracción se realiza por triplicado con pequeñas cantidades de disolvente orgánico para permitir la extracción eficaz de los compuestos retenidos en la matriz sólida.

2.3.1.2. Extracción en fase sólida

La SPE es un método de extracción en el cual los analitos que están disueltos o suspendidos en un líquido son separados de la matriz. Se basa en la diferente afinidad que tienen los compuestos por un sólido, denominado adsorbente, por el cual pasa la muestra liquida que contiene a los analitos. Como resultado, los analitos que tengan afinidad por la fase estacionaria quedarán retenidos, mientras que el resto pasará sin retenerse, produciéndose la separación. Mediante la adición de un eluyente adecuado, se eluyen los analitos retenidos en el adsorbente, produciéndose de este modo la extracción y concentración de los analitos de interés.

En función de las características de los adsorbentes utilizados y el tipo de matriz líquida se pueden clasificar como extracción de fase sólida en fase normal y fase inversa, (separación analitos en función de la polaridad) y en extracción en fase sólida

de intercambio ionico, de cationes o aniones (separación en función de las interacciones electroestáticas).

Para el análisis de residuos de POPs en matices acuosas, donde existen un amplio rango de compuestos con polaridades diferentes, la alternativa más empleada es la extracción en fase sólida de fase inversa con adsorbentes poliméricos [35].

Los cartuchos "*OASIS HLB*" presentan un copolímero macroporoso formado a partir de dos monómeros diferentes: el divinilbenceno, que otorga propiedades lipofílicas, y el N-vinilpirrolidina, que le confiere características hidrofílicas (figura 3).

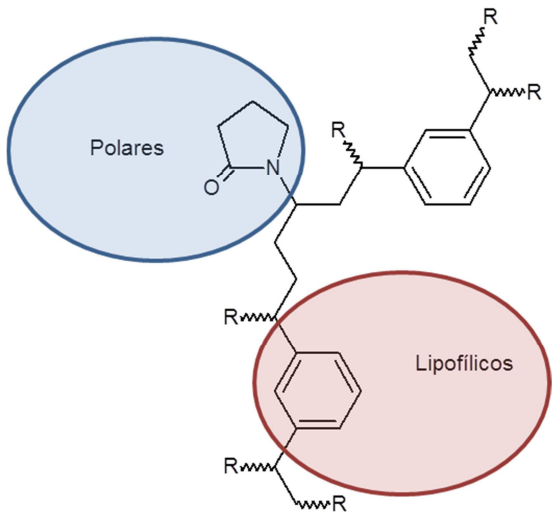


Figura 3: Copolímero (divinilbenceno y N-vinilpirrolidina) del adsorbente de los OASIS-HLB

Este adsorbente de fase inversa presenta un balance hidrofílico y lipofílico, capaz de extraer un amplio rango de compuestos. En comparación con los adsorbentes basado en grupos silanol, los adsorbentes polímericos presentan varias ventajas [36]. Son estables en todos los rasgos de pH, presentan mayor área específica, lo que les confiere una mayor capacidad de carga y una menor posibilidad de alcanzar el volumen de ruptura. El copolímero es muy permeable al agua, por lo que se ve menos influenciado por la pérdida de eficacia que se produce en otros adsorbentes cuando se secan en la etapa de carga de la muestra, ya que la muestra es capaz de penetrar en los poros fácilmente.

Todo proceso de SPE sigue un protocolo genérico para activar correctamente los cartuchos. El método consiste en una primera etapa de activación, seguido de una etapa de acondicionamiento, la carga de la muestra, lavado, secado y finalmente la elución de los analitos retenidos. En la figura 4 se presenta el esquema del proceso de SPE empleado para el análisis de POP en matrices acuosas.

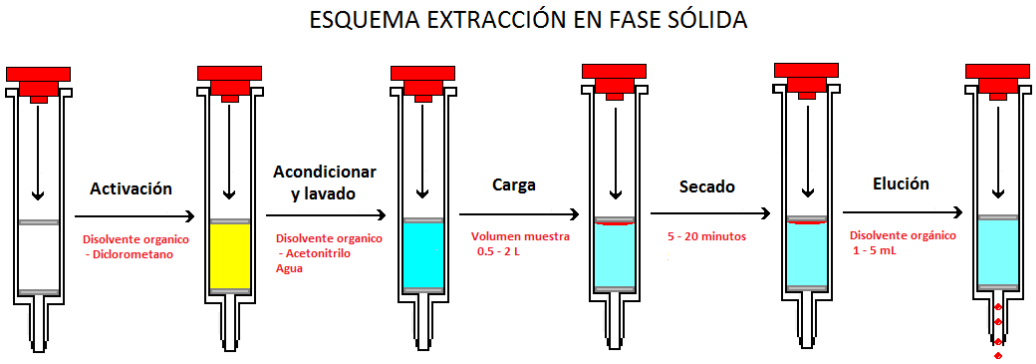


Figura 4: Esquema del acondicionamiento de un cartucho de SPE

Para activar el cartucho, se emplea un disolvente orgánico. El volumen de disolvente necesario debe ser como al menos 2 veces el volumen del cartucho. El acondicionamiento tiene como objetivo eliminar el disolvente orgánico del adsorbente. Para ello se pasa secuencialmente acetonitrilo y agua. El acetonitrilo es miscible con los disolventes orgánicos, por lo que lo arrastra y deja el adsorbente limpio. A continuación se hace pasar el agua, que elimina los restos de acetonitrilo y deja el adsorbente activado y en medio acuoso. A continuación se debe pasar la muestra acuosa a través del cartucho. El volumen de muestra que se pasa dependerá de las características del cartucho (volumen de ruptura y capacidad de retención). Para el análisis de POPs en muestras acuosas suele emplearse entre 0.5 – 2 L de muestra. La velocidad de carga debe ser lo suficientemente lenta para permitir que los analitos disueltos en el agua entren en contacto con el adsorbente, sin aumentar mucho el tiempo de análisis. Normalmente se aplica un flujo constante entre 5 – 10 mL/min. Después, el cartucho se lava con agua, para eliminar posibles impurezas. Acto seguido

se realiza el secado (aplicar de vacío, pasar una corriente de nitrógeno o centrifugar). La finalidad es eliminar completamente los restos de agua, para permitir la posterior entrada del eluyente en los puntos activos y permitir la elución de los analitos retenidos. Se debe llegar a un compromiso en el tiempo de secado sin tener pérdidas de los compuestos más volátiles. El tiempo de secado oscila entre 5 – 20 minutos. Por último, se produce la elución de los analitos retenidos en le adsorbente, mediante la aplicación de un pequeño volumen de disolventes orgánicos. Suelen emplearse entre 1-5 mL adsorbente, consiguiéndose concentraciones que varían entre 100 – 1000 veces.

2.3.2. Procedimiento de análisis

2.3.2.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es un procedimiento físico de separación, donde una mezcla de compuestos orgánicos en estado gaseoso son arrastrados por una corriente de gas portador (normalmente He) y entran en contacto con la fase estacionaria, depositada en el interior de una columna capilar. Si la afinidad de los compuestos de la mezcla por la fase estacionaria es ligeramente diferente se puede producir la separación de los compuestos. La cromatografía por sí sola no puede detectar los compuestos separados, por lo que es necesario acoplar un detector al final de la columna cromatográfica, los detectores más empleados en cromatografía de gases son el detector de ionización de llama (FID), el detector de captura electrónica (ECD) y el detector de espectrometría de masas (MSD).

El empleo de un inyector PTV en lugar de un inyector *Split/Splitless* convencional radica principalmente en la posibilidad de controlar la temperatura de la cámara de inyección [37]. Esto permite la inyección a bajas temperaturas y la posibilidad de aumentar rápidamente la temperatura de la cámara para favorecer la vaporización de la muestra. Otra de las ventajas del inyector PTV es que permite realizar múltiples inyecciones repetidas, gracias a que *liner* del PTV es usado como una trampa fría y la válvula de venteo se abre para eliminar el exceso de disolvente en estado gaseoso. A continuación la cámara de inyección se calienta rápidamente

permitiendo la entrada de los compuestos volatilizados en la cabeza de columna de una forma más puntual y en mayor grado, lo que conlleva a la obtención de picos cromatográficos más estrechos y definidos, mejorando considerablemente la sensibilidad.

La desventaja que presenta los *liner* de un inyector PTV es que son más pequeños que un *liner* de un inyector *Split/Splitless*, por lo que es más susceptible a saturarse y ensuciarse por lo que es necesario cambiarlos más habitualmente. El inyector PTV tiene un *liner* de 200 µL. Al ser el volumen del *liner* más pequeño, y al realizar inyecciones repetidas, el *liner* se ensucia rápidamente. Cuando se produce, los compuestos más pesados no entran en la columna y su sensibilidad disminuye drásticamente.

2.3.2.2. Detector de espectrometría de masas

El analizador es el corazón del detector de espectrometría de masas (Figura 5). Los componentes de la muestra fluyen desde la columna cromatográfica hasta la fuente de iones. En la fuente de iones las moléculas son ionizadas y fragmentadas. Los iones resultantes, normalmente positivos, son repelidos desde la fuente de iones hacia el filtro de masas de cuadrupolo, que se encarga de seleccionar los iones que pasan a través del filtro y golpean al detector, el cual genera una señal de corriente proporcional al número de iones que lo golpea.

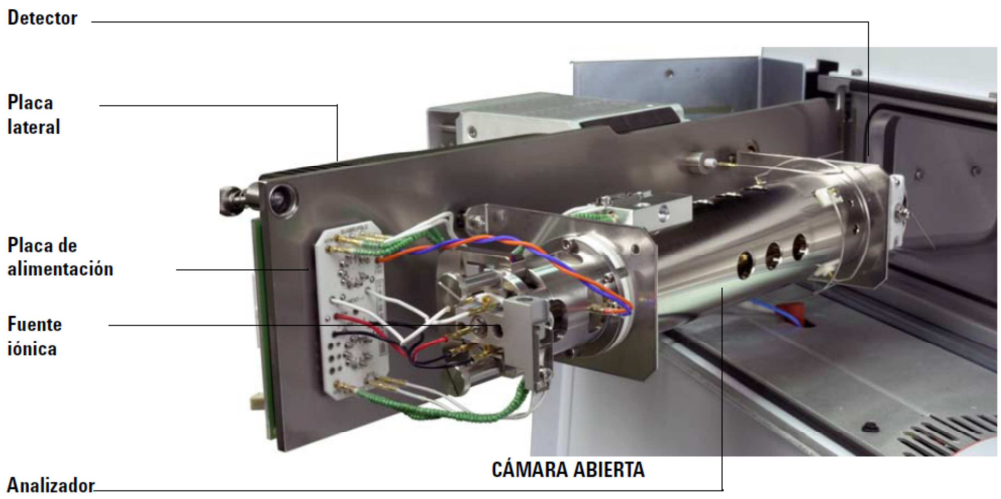


Figura 5: Analizador de espectrometría de masas.

El cuerpo de la fuente de iones es un cilindro que contiene las otras partes de la fuente de iones, incluyendo el conjunto de lentes. Junto con el *repeller* y la placa extraíble forma la cámara de ionización, que es el espacio donde se forman los iones.

La fuente de iones tiene dos filamentos. Una corriente de emisión calienta el filamento activo (230 ºC) causando que se emitan electrones de alta energía. Estos electrones chocan con las moléculas de la muestra, transfiriendo directamente su energía y produciendo la ionización de las moléculas de la muestra. La energía de los electrones se puede regular, aunque normalmente se ajusta a -70 eV, ya que con esta energía las moléculas de una determinada sustancia se fragmentan en patrones bastante predecibles, por lo que los espectros de masas obtenidos pueden ser comparables.

La carga positiva del *repeller* empuja a los iones cargados positivamente fuera de la fuente hacia una serie de lentes. Los iones reciben aproximadamente el 20 % de la energía del *repeller*. Un voltaje pequeño del *repeller* genera una pobre sensibilidad y baja respuesta de masas, mientras que si se eleva el voltaje se producen más iones, que se filtran peor, y por lo tanto disminuye la resolución de las masas bajas.

El haz de iones sale de la cámara de ionización a través del agujero de la placa extraíble entrando en un cilindro en el que se alojan las lentes. Las ranuras del cilindro permiten al gas portador y a las moléculas no fragmentadas ser expulsadas por acción de la bomba de vacío. El voltaje de las lentes focalizadoras puede variarse para mejorar la sensibilidad de los iones formados.

El filtro de masa separa los iones en función de su relación masa carga (m/z). En un momento dado, solo los iones de la relación carga masa seleccionada puede pasar a través del filtro de masas del detector, el cual es un cuadrupolo. Un cuadrupolo es un tubo de cuarzo recubierto por una fina capa de oro. La combinación de una corriente continua y una señal de radiofrecuencias se aplican en los dos segmentos, conectados dos a dos. Las cuatro superficies hiperbólicas crean un campo eléctrico complejo responsable de la selección de las masas. La magnitud de la radiofrecuencia determina la relación m/z de los iones que pasan por el filtro de masas y llegan al detector. La relación de la corriente continua y radiofrecuencia determina la resolución de los picos de masas.

El detector es un diodo conversor de alta energía acoplado a un multiplicador de electrones. Está colocado al final del cuadrupolo y recibe a los iones que pasan a través del filtro de masas. El detector genera una señal electrónica proporcional al número de iones que lo golpean.

2.4. Validación e incertidumbre analítica asociada

2.4.1. Validación de la metodología analítica

La validación de una metodología analítica, de acuerdo a la IUPAC, conlleva la determinación de hasta 14 parámetros analíticos diferentes sin incluir la incertidumbre la medida. Normalmente las variables determinadas en una validación analítica son la linealidad, sesgo, exactitud, trazabilidad, precisión intermedia, repetitividad, reproducibilidad, límite de cuantificación(LOQ) y límite de determinación (LOD) [38, 39].

2.4.1.1. Repetitividad y reproducibilidad

La repetitividad y reproducibilidad son términos asociados a la medida de precisión de un método analítico. En la práctica, la precisión realmente se expresa en términos de "imprecisión" mediante el cálculo de desviaciones estándar o desviaciones estándar relativas.

La estimación de la repetitividad y/o reproducibilidad se lleva a cabo en determinadas condiciones de medida. Las condiciones de repetitividad se definen como aquellas en las que los resultados de un método analítico se han obtenido con idénticos elementos de ensayo en el mismo laboratorio, con el mismo operador, utilizando el mismo equipo y en un corto periodo de tiempo. Por ello, la repetitividad es una medida extremadamente limitada de precisión analítica, porque supone aplicar condiciones de trabajo del sistema analítico muy idealizadas. Las condiciones de reproducibilidad afectan de manera mucho más real al valor de precisión analítica, ya que se establecen como aquellas en las que los resultados se han obtenido en diferentes laboratorios, con diferentes operadores y utilizando diferentes equipos [40].

En definitiva, mientras la repetitividad corresponde a la "imprecisión" más baja esperada, la reproducibilidad afecta al máximo valor de ésta. A menudo, los estudios inter-laboratorio no son una opción, por lo que la estimación de reproducibilidad como tal no puede llevarse a cabo. En estos casos, una interesante alternativa es efectuar evaluaciones en condiciones intermedias. Así, las condiciones de precisión intermedia son las mismas a las establecidas como condiciones de reproducibilidad, salvo en que un único laboratorio es el que efectúa las medidas analíticas. Los principales factores de medida que pueden ser modificados incluyen fecha de análisis, operador, calibración o incluso equipo. Así pues, la estimación de precisiones intermedias expresa el intervalo de valores posibles del resultado teniendo en cuenta parámetros más generales, a largo plazo y que son más reales a la hora de establecer la significancia de una medida analítica. Hasta aquí queda constancia del mayor interés que tiene desde el punto de vista analítico establecer precisiones intermedias, calculando desviaciones estándar obtenidas en condiciones intermedias.

2.4.2. Incertidumbre de medida

La incertidumbre de una medida se puede definir como "el parámetro asociado con el resultado de una medida analítica que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse razonadamente con el mensurando" [38, 41-43].

Existen diferentes alternativas matemáticas para determinar y establecer la incertidumbre de una medida analítica. En procesos químicos complejos, como son los relacionados con la determinación de POPs en muestras medioambientales, la aproximación más empleada es la *bottom-up*. En esta aproximación, el método de análisis se divide en diferentes etapas. A continuación se identifican, cuantifican y combinan cada una de las fuentes de incertidumbre, empleando los parámetros de la validación analítica obtenidos de la repetición de análisis con un determinado método analítico.

Una vez se ha definido el mensurando, la incertidumbre asociada a la medida de un POP en una matriz medioambiental, se debe hacer un listado de las principales fuentes de incertidumbre.

El cálculo de cada uno de las incertidumbres asociadas debe ser realizado, para poder así determinar cuáles son las principales contribuciones y que fuentes de incertidumbre pueden ser desestimadas. El cálculo individual de cada una de las fuentes de incertidumbre es laborioso en tiempo y coste, por la necesidad de aplicar desarrollos matemáticos complejos y tediosos y la necesidad de realizar ensayos adicionales. Para simplificar estas etapas, actualmente la tendencia es agrupar términos y calcular la incertidumbre de forma global, despreciando aquellas contribuciones que no sean suficientemente significativas, reduciendo la dedicación en tiempo y ensayos adicionales. De acuerdo a la experiencia obtenida en anteriores estudios de la evaluación de la incertidumbre analítica [34, 44-48], en este trabajo se han establecido 3 etapas analíticas como componentes principales de incertidumbre que afectan al resultado final de la medida analítica:

1. Recta de calibrado que englobaría el propio análisis cromatográfico y la obtención de la recta de calibrado a partir del análisis de disoluciones patrón.

2. Estudio de la recuperación del proceso de extracción mediante el análisis de material de referencia. Por tanto, implica el análisis de muestras homogéneas

3. Finalmente, el análisis de muestras reales, en el que se incorpora una importante fuente de incertidumbre asociada a la variabilidad de las matrices debida a su heterogeneidad.

El cálculo correspondiente se ha realizado en base a las recomendaciones dadas por la Guía Eurachem/Citac y ENAC [39, 41, 49].

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentación, materiales y reactivos

3.1.1. Instrumentación

- Cromatógrafo de gases Agilent 6890 con un sistema de inyección PTV, inyector automático Agilent 7683 y acoplado a un detector de espectrometría de masas Agilent serie 5975.
- Distribuidor de vacío Agilent de 12 puertos.
- Bomba de membrana ME1.
- Agitador tipo vortex.
- Vitrina extractora.
- Sistema de evaporación con corriente de nitrógeno.
- Sistema de agua desionizada.

3.1.2. Materiales

- Columna cromatográfica de sílice fundida HP5-MS (30 m. longitud; 0.25 mm. diámetro interno; 0.25 µm. fase estacionaria 5% de fenilmetilsilosano).
- Cartuchos de extracción en fase sólida OASIS HLB 6cc (500 mg).
- Tuberías y adaptadores de teflón.
- Jeringas de 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 µL (Hamilton y SGE).
- Probetas de 25 y 1000 mL.
- Vasos de precipitados.
- Tubos de ensayo.
- Pipetas Pasteur.
- Viales de vidrio de 2 mL.
- Insertos para viales de 250 µL.
- Otro material de vidrio de laboratorio (embudos, barras agitadoras y botellas).
- Desecadores.
- Papel de aluminio.

3.1.3. Patrones, reactivos y gases

- o-terfenilo: 500 mg puro. (Supelco) utilizado como patrón interno.

- Antraceno D_{10}: 10 mL de disolución de 10 ng/µL en Ciclohexano (Dr. Ehrenstorfer GmbH) utilizado como patrón de sustitución.
- Pentaclorobenceno: 10 mL de disolución de 10 ng/µL en Ciclohexano (Dr. Ehrenstorfer GmbH).
- Pentaclorofenol: 10 mL de disolución de 10 ng/µL en Ciclohexano (Dr. Ehrenstorfer GmbH).
- Pesticide Mix-5: 10 mL de disolución de o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDT, p,p'-DDT, Dieldrín y Endrín de 10 ng/µL en Ciclohexano (Dr. Ehrenstorfer GmbH).
- Pesticide Mix-7: 10 mL de disolución de α-HCH, β-HCH, δ-HCH, γ-HCH de 10 ng/µL en Ciclohexano (Dr. Ehrenstorfer GmbH).
- Pesticide Mix-31: 10 mL de disolución de Atrazina, Atrazina desetil, Metazacloro, Metacloro, Simazina y Terbutilazina de 10 ng/µL en acetona (Dr. Ehrenstorfer GmbH).
- Pesticide Mix-33: 1 mL de disolución de Aldrín, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, Diclorobenil, Dieldrín, α-endosulfan, Endrín, α-HCH, β-HCH, γ-HCH, Heptaclor, Heptaclor exo epóxido, Heptaclor endo epóxido, Hexaclorobenceno, Hexacloro-1,3-butadieneo, Isobezan, Isodrín, Quintoceno, PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-118, PCB-138, PCB-153 y PCB-180 de 10 ng/µL en Isooctano (Dr. Ehrenstorfer GmbH).
- Materiales de referencia certificada: WatRTM Supply Pesticides, number 709 (ERA), WatRTM Pollution organochlorine pesticides, number 713 (ERA) y material de referencia certificado CNS391 (CRM).
- Acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano, y hexano de calidad cromatográfica (J.T. Baker).
- Agua desionizada.
- Sulfato de sodio anhidro (Merck).
- Gas Helio (N50 /B50) como gas portador y gas nitrógeno (N50 / B50) para la concentración de los extractos (Air Liquid).

3.2. Procedimiento de limpieza del material de vidrio

Limpiar muy cuidadosamente todo el material de vidrio empleado en la preparación de patrones y muestras, lavando repetidamente con detergente y agua caliente y enjuagando sucesivas veces. Calentar a 100 ºC en estufa, asegurando

completo secado del material de vidrio y almacenar hasta su uso. Previo a su uso, enjuagar con diclorometano un par de veces y dejar secar.

3.3. Preparación de las disoluciones de calibrado

3.3.1. Patrón interno

En primer lugar se prepara una disolución de *o*-terfenilo de 100 ng/µL en hexano. Para ello se pesan 2.5 mg del *o*-terfenilo y se diluye con 25 mL de hexano. A partir de esta disolución madre, se realiza una dilución para obtener un patrón de 10 ng/µL de *o*-terfenilo en hexano, que será empleado como patrón interno.

3.3.2. Patrón de sustitución (surrogate)

Patrón de sustitución o surrogate: Se prepara una disolución de Antraceno D_{10} de 1 µg/mL en hexano, tras dilución 1:10 de la disolución comercial en concentración de 10 µg/mL.

3.3.3. Patrones de calibración

A continuación, se preparan por separado disoluciones de 1 ng/µL de cada uno de los patrones comerciales. Para ello se toman 100 µL de los patrones comerciales y se diluyen con 900 µL de hexano. Estos patrones se mantienen cerrados herméticamente a -20 ºC. Bajo estas condiciones, los patrones tienen una validez de una 1 semana.

Las concentraciones de cada uno de los analitos presentes en los patrones comerciales, así como otra información de interés, están resumidas en el Anexo A.

A partir de los patrones de 10 y 1 ng/µL se preparan por dilución las diferentes disoluciones de calibrado (Tablas 3-9).

Tabla 3: Disoluciones de calibrado para el patrón Mix-5.

Concentración (ng/mL)	Vol. Mix 5 (µL)	Vol. terfenilo (µL)	Vol. Hexano (µL)	Volumen total (µL)
50	5 (1 ng/µL)	10	85	100
100	10 (1 ng/µL)	10	80	100
500	50 (1 ng/µL)	10	40	100
1000	10 (10 ng/µL)	10	80	100

Tabla 4: Disoluciones de calibrado para el patrón Mix-7.

Concentración (ng/mL)	Vol. Mix 7 (µL)	Vol. terfenilo (µL)	Vol. Hexano (µL)	Volumen total (µL)
50	5 (1 ng/µL)	10	85	100
100	10 (1 ng/µL)	10	80	100
500	50 (1 ng/µL)	10	40	100
1000	10 (10 ng/µL)	10	80	100

Tabla 5: Disoluciones de calibrado para el patrón Mix-31.

Concentración (ng/mL)	Vol. Mix 31 (µL)	Vol. terfenilo (µL)	Vol. Hexano (µL)	Volumen total (µL)
50	5 (1 ng/µL)	10	85	100
100	10 (1 ng/µL)	10	80	100
500	50 (1 ng/µL)	10	40	100
1000	10 (10 ng/µL)	10	80	100

Tabla 6: Disoluciones de calibrado para el patrón Mix-33.

Concentración (ng/mL)	Vol. Mix 33 (µL)	Vol. terfenilo (µL)	Vol. Hexano (µL)	Volumen total (µL)
50	5 (1 ng/µL)	10	85	100
100	10 (1 ng/µL)	10	80	100
500	50 (1 ng/µL)	10	40	100
1000	10 (10 ng/µL)	10	80	100

Tabla 7: Disoluciones de calibrado para el patrón de Pentaclorobenceno.

Concentración (ng/mL)	Pentaclorobenceno (µL)	Vol. terfenilo (µL)	Vol. Hexano (µL)	Volumen total (µL)
50	5 (1 ng/µL)	10	85	100
100	10 (1 ng/µL)	10	80	100
500	50 (1 ng/µL)	10	40	100
1000	10 (10 ng/µL)	10	80	100

Tabla 8: Disoluciones de calibrado para el patrón de Pentaclorofenol.

Concentración (ng/mL)	Pentaclorofenol (µL)	Vol. terfenilo (µL)	Vol. Hexano (µL)	Volumen total (µL)
500	5 (10 ng/µL)	10	85	100
1000	10 (10 ng/µL)	10	80	100
2500	25 (10 ng/µL)	10	65	100
4000	40 (10 ng/µL)	10	50	100

Tabla 9: Disoluciones de calibrado para el patrón de sustitución.

Concentración (ng/mL)	Vol. antraceno D_{10} (µL)	Vol. terfenilo (µL)	Vol. Hexano (µL)	Volumen total (µL)
50	5 (1 ng/µL)	10	85	100
100	10 (1 ng/µL)	10	80	100
500	50 (1 ng/µL)	10	40	100
1000	10 (10 ng/µL)	10	70	100

3.4. Conservación y mantenimiento de las muestras

El laboratorio debe recibir las muestras de aguas continentales en botellas de vidrio completamente llenas y perfectamente cerradas. El volumen mínimo de muestra necesario para realizar los análisis es de 1 L. Preferiblemente, hay que recibir al menos 3 L de muestra.

La recepción de la muestra de lodo en el laboratorio debe ser en frascos de vidrio debidamente cerrados. Como mínimos es necesario recibir 20 gramos de muestra para poder realizar el análisis.

Una vez recibidas las muestras, se mantiene a 4 ºC hasta la realización de los análisis.

3.5. Tratamiento de las muestras de aguas continentales

El esquema del procedimiento analítico necesario para analizar los pesticidas y los PCBs en las muestras de agua se puede ver en el Anexo B.

3.5.1. Extracción en fase sólida

Con una probeta de 1000 mL, se mide el volumen de muestra a analizar (1 L), que se deposita en un recipiente adecuado, como una botella de vidrio de 1 L de volumen. A continuación, se añaden, con la ayuda de una jeringa de 10 µL, el patrón de sustitución a la muestra: 5 µL de la disolución de antraceno D_{10} de 10 ng/µL.

Se conecta el distribuidor de vacío a una bomba de membrana. En el interior del distribuidor de vacío se introducen dos vasos de precipitados de 250 mL para recoger la muestra. Los cartuchos OASIS HLB se colocan en las llaves del distribuidor.

Para acondicionar los cartuchos de SPE es necesario hacer pasar secuencialmente varios disolventes. Los cartuchos OASIS HLB se acondicionan con los siguientes disolventes.

(1) 12 mL de diclorometano.
(2) 12 mL de acetonitrilo.
(3) 12 mL de agua desionizada.

Estos volúmenes se miden con una probeta de 25 mL. Estos disolventes, con ayuda de vasos de precipitados de 25 mL, se van depositando en el cuerpo del cartucho para, a continuación, abrir la llave de paso y aplicar un ligero vacío (2-3 pulgadas de Hg). Los disolventes van pasando a través del cartucho evitando que se seque el mismo. Una vez terminado de acondicionar los cartuchos, se cierra la llave de paso.

Se acoplan los adaptadores de teflón al cuerpo del cartucho y se introduce el tubo de teflón en la muestra. A continuación se abren las llaves de paso y se comienza a aplicar vacío para conseguir un caudal entre 5 – 10 mL/min. El vacío que se debe aplicar en la bomba de membrana varía en función del número de cartuchos conectados (entre 5 – 15 pulgadas de Hg).

En función del número de cartuchos conectados (máximo 4 cartuchos por distribuidor de vacío), cada 15 – 20 minutos, se tiene que ir eliminando la muestra acuosa que pasa por los cartuchos y se recoge en los vasos de 250 mL. Para realizar

esta operación, se deben cerrar las llaves de paso y apagar el vacío generado por la bomba de membrana. Una vez desechado el agua, se vuelve a aplicar el vacío y se abren las llaves de paso hasta conseguir un caudal entre 5 – 10 mL/min.

Una vez ha pasado todo el volumen de muestra, los cartuchos se lavan con 6 mL de agua desionizada y se procede al secado de los cartuchos. Para ello, se abren las llaves de paso y se aplica vacío (15 pulgadas de Hg) durante 20 minutos. La humedad de las llaves de paso se elimina con papel de filtro.

Por último se procede a la elución de la muestra retenida en el adsorbente. Para ello se hace pasar secuencialmente los siguientes disolventes orgánicos:

(1) 2,5 mL de la mezcla acetonitrilo / diclorometano (1:1).
(2) 3,2 mL de diclorometano.

Para la elución es necesario aplicar un ligero vacío (1-2 pulgadas de Hg) para conseguir un caudal de 1 – 2 mL/min. El eluato se recoge en tubos de ensayo.

Debido a que en la muestra se encuentran juntos tres disolventes: agua, acetonitrilo y diclorometano, los cuales son miscibles dos a dos (agua con acetonitrilo, y acetonitrilo con diclorometano) se observan 2 fases en la muestra. La fase inferior, la más abundante, se corresponde con el diclorometano y/o acetonitrilo y la superior, en torno a 1 mL, se corresponde con el acetonitrilo y/o agua.

3.5.2. Concentración del extracto

El eluato se concentra con una ligera corriente de nitrógeno hasta los 3 mL. Para eliminar los restos de agua se añade 1 – 2 gramos de sulfato de sodio anhidro. Para eliminar el sulfato de sodio anhidro, los extractos se pasan a viales de 5 mL con ayuda de una jeringa de 1 mL lavando con acetato de etilo. Por último, el extracto se termina de concentrar en viales de cromatografía con insertos hasta un volumen final de 90 µL de acetato de etilo.

3.6. Tratamiento de las muestras de lodos de aguas continentales

El esquema del procedimiento analítico necesario para analizar los pesticidas y los PCBs en las muestras de lodo se puede ver en el Anexo B.

Para proceder a la extracción de una muestra, se pesan entre 0,5 y 2 g, con una precisión de al menos 0,001g, en tubo roscado y se añaden 10 µL de disolución patrón antraceno D_{10} (10 µg/mL). Se añaden entonces 2,5 mL de una mezcla hexano/acetona en proporción 1:1 y se agita primero mediante agitación mecánica, durante unos segundos, y después con baño de ultrasonidos durante al menos 10 minutos.

Tras el proceso de extracción, se centrifuga la mezcla a 2500 rpm durante 3 minutos, obteniéndose dos fases líquidas bien diferenciadas: una acuosa inferior, y otra sobrenadante de hexano, que se recoge y vierte en tubo graduado de fondo cónico. Sobre el depósito sólido con fase acuosa se añaden de nuevo 1 mL de mezcla hexano/acetona (1:1) y se aplica un segundo ciclo de agitación según se ha descrito.

Recogido de nuevo el sobrenadante de hexano tras la centrifugación, éste se reúne con el primer extracto en tubo graduado de fondo cónico. El procedimiento de extracción se repite aplicando un tercer ciclo de agitación y centrifugación, reuniendo finalmente todos los extractos de hexano en tubo graduado de fondo cónico.

Por último, se concentra dicho extracto bajo corriente de nitrógeno lenta y cuidadosamente hasta sequedad para llevar a un volumen final de 1 mL en hexano.

3.7. Análisis cromatográfico

3.7.1. Condiciones de operación

Para el análisis de los diferentes pesticidas organoclorados y PCBs se definen las condiciones óptimas de operación. En la Tabla 10 se resumen los parámetros optimizados del GC/MS. Información detallada de los cromatogramas de estos

compuestos puede verse en los procedimientos normalizados de trabajo: Determinación de compuestos organoclorados en lodos de aguas continentales (QM-PT-TC-10) y Determinación de pesticidas y PCBs en aguas continentales (QM-PT-TC-11).

Tabla 10: Condiciones óptimas de operación del GC-MS para el análisis de pesticidas y PCBs.

PESTICIDAS_Flix 2			
HORNO			
Columna: **HP-5MS** (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) 5 % Fenil-metil-silosano			
Flujo **1 mL/min** He		Presión **9,95 psi**	
Modo presión constante: **68,6 KPa**			
Temperatura auxiliar: **250 ºC**			
Programa de temperatura:			
		T_0 = 100 ºC	**t_0 = 4 min.**
	8 ºC/min	**T_1 = 250 ºC**	**t_1 = 1 min.**
	8 ºC/min	**T_2 = 290 ºC**	**t_2 = 0 min.**
Run time: 28,75 min			
INYECTOR			
Inyector **PTV.**	Modo **Splitless**	Liner: **5183-2037**	
Programa de temperatura:			
		T_0 = 110 ºC	**t_0 = 0,5 min.**
	500 ºC/min	**T_1 = 200 ºC**	**t_1 = 1 min.**
Flujo purga: **40 mL/min**		Tiempo purga: **1 min**	
Jeringa: 9301-0713		Volumen: 10 µL	
Lavado pre-inyección		1 x Acetona	1 x Hexano
Lavado muestra: 1		Bombeos muestra: 4	
Volumen inyección: **1 µL**		Repeticiones: **3**	Delay: **0 seg**.
Lavado post-inyección		2 x Acetona	2 x Hexano
DETECTOR			
Temperatura fuentes iones: **230 ºC**			
Temperatura cuadrupolo: **150 ºC**			
Modo **SIM (70 eV)**			
Ventana 1 (t_r 5,0 a 17,5 min)			
109 / 142 / 165 / 173 / 181 /188 / 200 / 201 / 214 / 219 / 249 / 250 / 266 / 284			
Ventana 2 (t_r 17,50 a 20,10 min)			
66 / 162 / 186 / 220 / 230 /239 / 256 / 263 / 292			
Ventana 3 (t_r 20,10 a 22,80 min)			
79 / 176 / 184 / 193 / 235 /246 / 254 / 263 /318 /326			
Ventana 4 (t_r 22,80 a 28,75 min)			
165 / 184 / 199 / 207 / 235 / 254 / 263 / 281 / 290 / 324 / 326 / 360 / 396			

3.7.2. Identificación de los compuestos

La identificación de los compuestos se realiza a través del espectro de masas. Para determinar los espectros de masas de cada compuesto los patrones preparados se han inyectado en modo *scan.* Los espectros de masas de cada compuesto estudiado están recogidos en el Anexo C.

Los espectros de masas de cada uno de los compuestos presentan iones característicos, como el ion molecular que define el peso molecular del compuesto y el ion base, que es el ion más estable y por tanto es el mayoritario. El ion base de cada compuesto ha sido seleccionado para ser medido en modo sim (tabla 10).

La identificación de los compuestos en modo SIM se realiza a través de los tiempos de retención. Para establecer los tiempos de retención de cada compuesto se realizan varias inyecciones a lo largo de un periodo de 72 horas. Se define la ventana de tiempo de retención como el tiempo de retención promedio más menos tres veces la desviación estándar. Los tiempos de retención de los compuestos estudiados en el momento de la redacción de este procedimiento están recogidos en la tabla 11.

Tabla 11: Tiempos de retención promedio para los pesticidas y PCBs de acuerdo a las condiciones óptimas.

Compuesto	t_R (A) (min)	t_R (B) (min)	t_R (C) (min)	t_R (D) (min)	t_R (min)
Pentaclorobenceno	12,129	12,134	12,129	12,129	**12,130 ± 0,008**
α-HCH	16,09	16,088	16,088	16,09	**16,089 ± 0,003**
Hexaclorobenceno	16,312	16,312	16,312	16,313	**16,312 ± 0,001**
Simazina	16,605	16,606	16,609	16,612	**16,608 ± 0,009**
Atrazina	16,765	16,765	16,766	16,768	**16,766 ± 0,004**
β-HCH	16,866	16,866	16,866	16,867	**16,866 ± 0,002**
Pentaclorofenol	16,948	16,944	16,938	16,937	**16,942 ± 0,016**
γ-HCH	17,044	17,047	17,044	17,044	**17,045 ± 0,002**
Terbutilazina	17,179	17,18	17,179	17,181	**17,180 ± 0,003**
PCB 28	17,51	17,51	17,506	17,506	**17,507 ± 0,007**
PCB 52	18,426	18,427	18,426	18,426	**18,426 ± 0,003**
Aldrín	19,978	19,976	19,977	19,979	**19,978 ± 0,004**
Metacloro	20,002	20,004	20,004	20,005	**20,004 ± 0,004**
PCB 101	20,659	20,659	20,659	20,659	**20,659 ± 0,003**
Isodrín	20,747	20,743	20,743	20,745	**20,745 ± 0,006**
o,p'-DDE	21,737	21,736	21,737	21,737	**21,737 ± 0,002**
PCB 118	22,206	22,206	22,208	22,205	**22,206 ± 0,004**
p,p'-DDE	22,518	22,519	22,521	22,521	**22,520 ± 0,004**
Dieldrín	22,612	22,612	22,613	22,611	**22,612 ± 0,004**
o,p'-DDD	22,743	22,744	22,745	22,745	**22,744 ± 0,003**
PCB 153	22,744	22,748	22,746	22,748	**22,746 ± 0,005**
Endrín	23,185	23,184	23,186	23,187	**23,186 ± 0,004**
PCB 138	23,456	23,457	23,459	23,458	**23,457 ± 0,005**
p,p'-DDD	23,607	23,609	23,609	23,611	**23,609 ± 0,004**
o,p'-DDT	23,717	23,718	23,719	23,719	**23,719 ± 0,003**
p,p'-DDT	24,649	24,649	24,652	24,651	**24,650 ± 0,004**
PCB 180	25,277	25,283	25,278	25,278	**25,278 ± 0,009**

3.7.3. Cuantificación

La cuantificación de los pesticidas y PCB se realiza en modo SIM. Para cada compuesto se define un ion cuantificador y dos iones cualificadores. Esto iones son escogidos en función de la intensidad que presenten el espectro de masa y su especificidad para cada compuesto. Para aumentar la sensibilidad, se han definido 4 ventanas de integración (Tabla 12) en la que se han definido cuatro grupos de m/z en función de los compuestos que eluyen en ese rango de tiempos de retención.

Tabla 12: Ventanas de integración y selección de los iones cuantificadores y calificadores.

Compuesto	m/z			Ventana
	Cuantificador	Calificador 1	Calificador 2	integración
Pentaclorobenceno	250	-	-	Grupo 1
α-HCH	181	219	109	Grupo 1
Hexaclorobenceno	284	142	249	Grupo 1
Simazina	201	173	188	Grupo 1
Atrazina	200	173	201	Grupo 1
β-HCH	181	219	109	Grupo 1
Pentaclorofenol	266	165	-	Grupo 1
γ-HCH	181	219	109	Grupo 1
Terbutilazina	214	173	109	Grupo 1
PCB 28	256	186	220	Grupo 2
PCB 52	292	220	256	Grupo 2
Aldrín	263	66	256	Grupo 2
Metacloro	162	239	66	Grupo 2
PCB 101	326	254	184	Grupo 3
Isodrín	193	263	79	Grupo 3
o,p'-DDE	246	318	176	Grupo 3
PCB 118	326	324	254	Grupo 3
p,p'-DDE	246	318	176	Grupo 3
Dieldrín	79	263	193	Grupo 3
o,p'-DDD	235	176	318	Grupo 3
PCB 153	360	290	254	Grupo 4
Endrín	263	281	207	Grupo 4
PCB 138	360	290	254	Grupo 4
p,p'-DDD	235	165	199	Grupo 4
o,p'-DDT	235	165	199	Grupo 4
p,p'-DDT	235	165	207	Grupo 4
PCB 180	396	326	207	Grupo 4

3.7.4. Calibración

La respuesta del detector de espectrometría de masas es lineal para los compuestos estudiados hasta 1000 ng/mL. La calibración se basa en el análisis de 4 disoluciones de calibrado. Las disoluciones se calibrado se analizan según las condiciones citadas anteriormente.

Para cada compuesto se representa la curva de respuesta del detector, relativo al patrón interno, frente a la concentración del compuesto inyectado, a partir de la cual se deducirá la concentración de la sustancia de interés.

3.7.5. Análisis de la muestra

La muestra proveniente de las aguas continentales se encuentra diluida en 90 µL de acetato de etilo. Se debe añadir 10 µL del patrón interno (*o*-terfenilo de 10 ng/µL) e inmediatamente inyectar según las condiciones de operación descritas.

La muestra proveniente de los lodos de las aguas continentales se encuentra diluida en 1 mL de hexano. De esta disolución se prepara para análisis una dilución 1/10 en hexano, previamente añadidos 10 µL de disolución patrón interno (*o*-terfenilo, 10 µg/mL).

En caso de tratarse de muestras con muy bajos contenidos de los analitos, se preparará directamente la disolución hasta un volumen final de 100 µL tras adición de hexano, previamente añadidos los 10 µL de disolución patrón interno (*o*-terfenilo, 10 µg/mL).

3.7.6. Estudio de recuperación con patrones de sustitución

Para evaluar la eficacia del procedimiento analítico para determinar la concentración de pesticidas y PCBs en la muestra de agua se emplea un patrón de sustitución. Este patrón de antraceno D_{10} y, se ha introducido en la muestra justo antes de comenzar a realizar el procedimiento.

El patrón de sustitución se somete a todo el proceso analítico y finalmente es analizado. Estudiando la concentración del patrón de sustitución antes y después de realizar el proceso analítico podemos determinar la eficacia del proceso analítico.

Para calcular la concentración del patrón de sustitución, se realizó un calibrado de este compuesto de acuerdo al punto 3.4.3. de este informe.

La eficacia del proceso analítico se calcula en función de la recuperación obtenida para estos patrones, de acuerdo a la siguiente expresión.

$$Recuperación(Surrogate) = \frac{Conc_{inicial}}{Conc_{final}}$$

3.7.7. Cambio del *liner* del inyector PTV

El inyector PTV tiene un *liner* más pequeño que un inyector *split-splitless*. Este volumen del *liner* tiene la ventaja de producir picos cromatográficos más estrechos. Además gracias a la posibilidad de realizar varias inyecciones consecutivas a baja temperatura se puede producir la concentración de los analitos en el inyector, aumentando considerablemente la sensibilidad del método de análisis.

Sin embargo el inyector de PTV se ensucia rápidamente. Cuando se produce, los compuestos más pesados no entran en la columna y su sensibilidad disminuye drásticamente. Se ha observado este comportamiento en los compuestos que eluyen a un tiempo de retención superior a los 22 minutos, principalmente los PCBs y los DDTs. Mediante la inyección de patrones se ha determinado que el *liner* debe ser remplazado cada 15-20 muestras (unas 50 inyecciones).

4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

4.1. Parámetros analíticos

4.1.1. Linealidad

La linealidad de la respuesta del espectrómetro de masas para el análisis de todos los compuestos organoclorados estudiados se ha probado mediante la inyección repetida de varias disoluciones de calibrado de diferente concentración a lo largo de 9 meses. De forma general, la representación gráfica y el coeficiente de correlación obtenido mediante el ajuste por mínimos cuadrados ha demostrado que la respuesta es lineal para todos los compuestos en el rango comprendido entre 50 – 1000 ng/L. En la tabla 13 se resumen las variables relacionadas con la linealidad para cada compuesto.

Cada calibrado estaba formado, como mínimo, por cuatro niveles de concentración. Los calibrados se han realizado en condiciones reales de trabajo, junto con el análisis de muestras de sedimentos y aguas continentales contaminadas por compuestos organoclorados. Se ha podido demostrar la robustez de la linealidad obtenida ya que las diferentes disoluciones de calibrado no se inyectaron en las condiciones óptimas para la correcta separación y análisis cromatográfico. Durante el periodo de tiempo estudiado, los calibrados se inyectaron en el sistema de inyección con *liner* usado y nuevo, además se usaron dos columnas cromatográficas diferentes, una de ellas nueva y otra empleada durante 6 meses.

Tabla 13: Linealidad obtenida para los diferentes compuestos a lo largo del tiempo

Compuesto	Nº calibrados	Periodo	Intervalo r^2	Linealidad (ng/L)
PeClBcno	8	9 meses	0,97 – 0,9997	50 – 1000
HxClbecno	7	9 meses	0,995 – 0,997	50 – 1000
o,p'-DDE	9	9 meses	0,990 – 0,9991	50 – 1000
p,p'-DDE	13	9 meses	0,989 – 0,99993	50 – 1000
o,p'-DDD	9	9 meses	0,990 – 0,9997	50 – 1000
p,p'-DDD	13	9 meses	0,97 – 0,99995	50 – 1000
o,p'-DDT	9	9 meses	0,989 – 0,9998	50 – 1000
p,p'-DDT	13	9 meses	0,979 – 0,999992	50 – 1000
Aldrín	7	9 meses	0,997 – 0,99997	50 – 1000
Isodrín	7	9 meses	0,997 – 0,99996	50 – 1000
Dieldrín	15	9 meses	0,991 – 0,99998	50 – 1000
Endrín	15	9 meses	0,989 – 0,99993	50 – 1000
Simazina	9	9 meses	0,96 – 0,9997	50 – 2000
Atrazina	9	9 meses	0,989 – 0,9997	50 – 2000
Terbutilazina	9	9 meses	0,997 – 0,9997	50 – 2000
Metacloro	9	9 meses	0,995 – 0,99997	50 – 2000
α-HCH	16	9 meses	0,994 – 0,99996	50 – 1000
β-HCH	16	9 meses	0,991 – 0,99997	50 – 1000
γ-HCH	16	9 meses	0,993 – 0,999990	50 – 1000
PCB 28	8	9 meses	0,994 – 0,9998	10 – 1000
PCB 52	8	9 meses	0,994 – 0,99991	10 – 1000
PCB 101	8	9 meses	0,978 – 0,99993	10 – 1000
PCB 118	8	9 meses	0,983 – 0,99995	10 – 1000
PCB 153	8	9 meses	0,961 – 0,99998	10 – 1000
PCB 138	8	9 meses	0,928 – 0,99991	10 – 1000
PCB 180	8	9 meses	0,985 – 0,99998	10 – 1000

Como se puede apreciar en la tabla 13, la linealidad se ha mantenido a lo largo de los 9 meses estudiados para todos los calibrados registrados en el rango comprendido entre los 50 – 1000 ng/L. De todos los compuestos estudiados las peores linealidades se obtuvieron para los p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT y los PCB menos volátiles. Se debe a que la repetición de inyecciones va ensuciando lentamente el *liner* del sistema de inyección, generando que la señal analítica de estos compuestos vaya disminuyendo. De este modo, la linealidad del calibrado de estos compuestos se ve afectada en mayor medida. Así pues, la perdida de linealidad de estos compuestos se ha tomado como una indicación para proceder a cambiar el *liner* del sistema de

inyección. Por norma general éste se ha sido sustituido cada 2-3 semanas, después de realizar unas 50 inyecciones.

4.1.2. Estudio de recuperación

4.1.2.1. Aguas continentales.

Se ha realizado un estudio de la recuperación del proceso de análisis de pesticidas en aguas continentales. Para ello, alícuotas de 500 mL de agua continental se han marcado con pesticidas a unas concentraciones individuales de 250, 500 y 1000 ng/L. Estas muestras se han analizado por duplicado a lo largo de tres semanas. Los resultados obtenidos están reflejados en las tablas 14, 15 y 16.

Tabla 14: Recuperaciones obtenidas al marcar alícuotas de agua continental con una mezcla de pesticidas (10 µl de Mix 5, Mix 7 y Mix 31 de 10 mg/L) analizadas a lo largo de tres semanas

Compuesto	% Recuperación (Marcado de 1000 ng/L)							
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	Media	RDS
o,p'-DDE	30	29	31	35	39	30	**33**	**4**
p,p'-DDE	31	30	32	35	40	29	**34**	**4**
o,p'-DDD	34	33	58	65	64	44	**51**	**14**
p,p'-DDD	58	55	59	67	65	39	**61**	**10**
o,p'-DDT	31	28	46	41	-	-	**36**	**8**
p,p'-DDT	40	34	72	55	-	-	**50**	**17**
Dieldrín	67	68	84	81	76	64	**75**	**8**
Endrín	72	71	96	86	118	49	**89**	**23**
Simazina	119	127	122	121	111	83	**120**	**16**
Atrazina	113	105	122	112	99	79	**110**	**15**
Terbutilazina	114	110	116	110	96	84	**109**	**12**
Metacloro	112	112	111	111	100	88	**109**	**10**
α-HCH	118	133	121	116	99	97	**117**	**14**
β-HCH	120	130	119	107	105	61	**116**	**24**
γ-HCH	120	121	126	110	102	72	**116**	**20**

Tabla 15: Recuperaciones obtenidas al marcar alícuotas de agua continental con una mezcla de pesticidas (5 µl de Mix 33 de 10 mg/L) analizadas a lo largo de tres semanas

Compuesto	% Recuperación (Marcado de 500 ng/L)							
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	Media	RDS
α-HCH	115	110	123	118	95	106	**111**	**10**
Hexaclorobenceno	96	112	83	79	51	44	**78**	**26**
β-HCH	118	113	133	124	109	106	**117**	**10**
γ-HCH	119	116	126	122	94	103	**113**	**12**
Aldrín	88	82	29	43	24	30	**49**	**28**
Isodrín	93	83	32	54	31	32	**54**	**28**
Dieldrín	130	106	97	122	79	68	**101**	**24**
p,p'-DDE	85	61	37	51	103	100	**73**	**27**
Endrín	120	133	103	137	-	-	**123**	**16**
p,p'-DDD	125	87	76	114	76	55	**89**	**26**
p,p'-DDT	127	79	33	62	-	-	**75**	**40**

Tabla 16: Recuperaciones obtenidas al marcar alícuotas de agua continental con una mezcla de pesticidas (2.5 µl de Mix 5, Mix 7 y Mix 31 de 10 mg/L) analizadas a lo largo de tres semanas

Compuesto	% Recuperación (Marcado de 250 ng/L)							
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	Media	RDS
o,p'-DDE	55	37	37	42	30	47	**41**	**9**
p,p'-DDE	60	44	42	32	40	54	**45**	**10**
o,p'-DDD	72	54	60	47	54	75	**60**	**11**
p,p'-DDD	93	61	66	49	67	81	**70**	**15**
o,p'-DDT	49	36	50	37	-	-	**43**	**8**
p,p'-DDT	72	59	81	61	-	-	**68**	**10**
Dieldrín	77	62	-	-	94	117	**88**	**24**
Endrín	77	61	72	63	72	93	**73**	**12**
Simazina	105	105	135	113	109	110	**113**	**11**
Atrazina	105	110	136	114	118	122	**117**	**11**
Terbutilazina	63	82	93	75	69	73	**76**	**11**
Metacloro	81	98	107	95	81	86	**91**	**10**
α-HCH	96	152	131	117	91	96	**114**	**24**
β-HCH	93	118	120	95	104	106	**106**	**11**
γ-HCH	75	125	132	136	102	104	**112**	**23**

Según los resultados la recuperaciones obtenidas para los pesticidas está comprendida entre el 40 – 120 %. En el caso de los pesticidas derivados del Lindano (α-HCH, β-HCH y γ-HCH), las recuperaciones son superiores al 100 %, con una desviación estándar comprendida entre el 10 – 25 %. La mayor desviación se produce a los niveles

más bajos de concentración. Para el caso de las recuperaciones de los pesticidas del Mix 33 (Atrazina, Simazina, Terbutilazina y Metacloro), las recuperaciones oscilan entre 76 – 120 % y con desviaciones inferiores al 20 %. Al igual que ocurría anteriormente, el método es capaz de extraer efectivamente estos compuestos.

Para el caso de los derivados del DDE, DDD y DDT, las recuperaciones son ligeramente inferiores. Los resultados han presentado valores comprendidos entre el 40 y el 90 %, con unas desviaciones inferiores al 30 %. En el caso de que las recuperaciones de estos compuestos fuesen inferiores al 40 % el análisis de estos compuestos mediante este procedimiento debería ser reevaluado. Además estos compuestos tienen la problemática de que son degradados en el sistema de inyección del GC-MS [50].

Para el resto de pesticidas estudiados, Hexaclorobenceno, Endrín, Aldrín, Isodrín y Dieldrín, las recuperaciones están comprendidas entre 50-90 %, con desviaciones inferiores al 30 %.

4.1.2.2. Muestras de sedimentos

Se llevaron a cabo ensayos de recuperación para evaluar la posible existencia de errores sistemáticos, denominados sesgos, asociados a los resultados analíticos. En particular, se investigó la presencia de sesgo proporcional, cuando los errores dependen de la concentración de la muestra y de la presencia de sesgo constante, cuando dichos errores no dependen de la concentración de la muestra. El cálculo se realizó asumiendo la que la precisión es aproximadamente constante o tiene una variación de tipo lineal. En el caso de encontrar sesgo significativo, será necesario corregir los resultados analíticos de acuerdo al valor de sesgo establecido.

Para la evaluación del sesgo en la medida se seleccionaron 3 lodos con diferentes niveles de concentración de los compuestos de interés: niveles muy bajos (lodo C15), niveles bajos (lodo A15) y niveles extremadamente altos (lodo B15).

Para evaluar el sesgo proporcional, se analizaron alícuotas de las muestras lodo C15 y lodo A15 (sedimentos con baja concentración) marcadas con compuestos

organoclorados (adición de diferentes volúmenes de disolución patrón de un 1 µg/mL). Los resultados finales se expresaron como recuperaciones obtenidas.

Para el cálculo del sesgo constante se aplicó el método Youden [51], que supone analizar 2 cantidades de muestra diferentes. El estudio se efectuó analizando 2 alícuotas diferentes de la muestra más contaminada y heterogénea (lodo B15) y comparando los resultados obtenidos. Los resultados finales se expresaron en unidades de fracción de masa.

4.1.2.2.1. Sesgo proporcional

El estudio de recuperación se efectuó tras el marcado con disoluciones patrón de dos muestras con bajos contenidos. En particular alícuotas de 1.2 g del lodo C15 y lodo A15 fueron enriquecidas con volúmenes de 50 y 200 µl de disolución patrón Mix 33 de 1 µg/mL (fracciones de masa de 50 y 200 ng de cada pesticida). Las muestras fueron analizadas por duplicado según el procedimiento desarrollado (Volumen final de 100 µL).

En particular cada valor de recuperación R_{ij} se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$R_{ij=}\frac{C_{encontrada}}{C_{adición}}$$

siendo *i* el índice asignado a cada tipo de muestra y *j* el número de medidas efectuadas para calcular cada valor promedio de recuperación. El término $C_{adición}$ se corresponde a la fracción de masa de analito que se añadió a partir de un volumen de disolución estándar y $C_{encontrada}$ se dedujo como la diferencia entre la fracción de masas medida en la muestra marcada (C_{medida}) y la correspondiente a la muestra sin marcar ($C_{sin\ marcar}$) de acuerdo a la siguiente expresión:

$$C_{encontrada} = C_{medida} - C_{\mathrm{sin}\,marcar}$$

La Recuperación promedio y su desviación típica relativa se indican como $\bar{R}_{ij}$ y rsd respectivamente. Finalmente, a partir de estos resultados de recuperación, se

calculó un valor promedio final, denotado como $\bar{R}_{prom}$ y un valor de incertidumbre asociada, u($\bar{R}_{prom}$), que fue calculada como la desviación típica relativa intermedia

$$u_{\bar{R}prom} = \sqrt{\frac{\sum rsd^2(n-1)}{\sum(n-1)}}$$

Y un test de significancia fue entonces utilizado para verificar si la recuperación fue significativamente diferente de 100 %.

$$t_{exp} = \frac{\left|\bar{R}_{prom} - 1\right|}{u_{\bar{R}prom}}$$

En los casos en el parámetro t_{exp} calculado experimentalmente es superior al parámetro t_{tab} tabulado para a una probabilidad de α=0,05 (t_{tab}=3.2) se puede concluir que existe sesgo proporcional, es decir errores en la medida debido al nivel de concentración del analito.

La tabla 17 recopila los valores promedio de rendimientos obtenidos junto con los valores de parámetro t_{exp} obtenido experimentalmente para evaluar cuándo la recuperación media fue significativamente diferente de 100 % y por tanto un factor de corrección (1/R) tendría que ser aplicado a los valores de concentración obtenidos.

Tabla 17: Resultados medios de recuperación (expresados en %) obtenidos a partir de los análisis de sub-muestras marcadas a dos niveles de concentración: alícuotas de 1,2 g se marcaron con 50 y 200 ng de compuestos organoclorados mediante adición de volúmenes una disolución patrón

	Adicción de 50 ng				Adicción de 200 ng						
	Lodo C16		Lodo A15		Lodo C16		Lodo A15		R_{prom}	$u(R_{prom})$	
	R_{11}	rsd_{11}	R_{21}	rsd_{21}	R_{12}	rsd_{12}	R_{22}	rsd_{22}	(%)	(%)	t
α-HCH	62	9	85	1,7	56	5,2	87	2,5	72	5,3	**5**
β-HCH	134	6,3	126	5	123	6,0	126	4,7	127	5,6	**5**
γ-HCH	71	1,0	89	5,3	67	4,3	93	0,8	80	3,5	**6**
HexClbenc.	59	17	122	20,2	59	7,0	100	6,1	85	14	**1,1**
p,p'-DDE	103	1,6	75	1,2	92	3,9	82	5,7	88	3,6	**3,3**
p,p'-DDD	129	5,7	104	5,8	124	2,9	82	0,8	109	4,3	**2,2**
p,p'-DDT	96	1,3	26	3,5	88	1,6	15	1,5	56	2,2	**20**
PCB 28	108	2,6	137	6,0	99	5,8	89	16	108	9,3	**0,9**
PCB 52	112	1,1	109	2,9	101	2,7	111	7,5	108	4,3	**1,9**
PCB 101	120	1,2	101	3,3	112	3,5	104	4,3	109	3,3	**2,8**
PCB 118	113	4,0	103	3,6	118	2,4	104	1,6	110	3,1	**3,1**
PCB 138	120	1,5	90	4,6	114	1,1	92	1,1	104	2,5	**1,6**
PCB 153	120	0,7	94	3,7	113	1,9	97	1,5	106	2,3	**2,6**
PCB 180	129	1,2	82	8	123	0,9	79	1,1	103	4,2	**0,8**

Como puede apreciarse se obtuvieron rendimientos de recuperación muy bajos en el caso de los compuestos α-HCH, γ-HCH, p,p'-DDE y p,p'-DDT en torno 60-70%, incluso inferior (caso del p,p'-DDT, con un 40%). En estos casos el parámetro t_{exp} correspondió con un valor significativamente más elevado que t_{tab}=3.2. Estas diferencias pueden justificarse en base a la variabilidad analítica asociada a las medidas de α-HCH y γ-HCH en base a su volatilidad. En el caso de la familia de los DDE/DDT su variabilidad analítica está altamente influenciada con su tendencia a participar en reacciones de degradación, con posibilidad de formación de los isómeros DDE y DDD, que justificarían esta significativa reducción en los valores de recuperación por posibles efectos de matriz en la muestra.

4.1.2.2.2. Sesgo constante

Cuando no existen blancos de las muestras a analizar, como sucede con las muestras de lodos objeto de interés en este trabajo, la existencia o no de un sesgo constante en las medidas analíticas debe realizarse mediante el método de Youden.

Básicamente supone analizar dos o más cantidades diferentes de alícuotas representativas de las muestras de rutina y a partir de las los resultados obtenidos en unidades de fracción de masa para el analito de interés, establecer la siguiente igualdad:

$$\frac{\overline{x_1} - b_{cte}}{aliq_1} = \frac{\overline{x_2} - b_{cte}}{aliq_2}$$

donde:

- b_{cte} corresponde al valor de sesgo constante, expresado en unidades de fracción de masas (µg).
- $aliq_1$ y $aliq_2$ son los dos pesos de alícuota investigados (g).
- $\overline{x_1}$ y $\overline{x_2}$ corresponden al valor promedio expresado en µg de cada compuesto estudiado.

Despejando la constante b_{cte} de esta ecuación, se deduce la expresión para el cálculo del posible sesgo analítico según:

$$b_{cte} = \left(\frac{aliq_1 \cdot \bar{x}_2 - aliq_2 \cdot \bar{x}_1}{aliq_2 - aliq_1}\right)$$

Para el cálculo de estos sesgos constantes, se consideraron los valores promedio de fracción de masa (µg) deducidos como el producto de los niveles de concentración multiplicados por peso de alícuota (tabla 16).

Asimismo, a partir de esta expresión y aplicando la ley propagación de errores se dedujo la correspondiente contribución de incertidumbre debida a la presencia de sesgo constante teniendo en cuenta que es expresada como incertidumbre relativa:

$$\frac{u^2(b_{cte})}{(b_{cte})^2} = \frac{(aliq_2)^2}{(aliq_1 - aliq_2)^2} \cdot \frac{u^2(\overline{x_1})}{\overline{x_1}^2} + \frac{(aliq_1)^2}{(aliq_1 - aliq_2)} \cdot \frac{u^2(\overline{x_2})}{\overline{x_2}^2}$$

$$u(b_{cte})\% = \frac{u\ (b_{cte})}{(b_{cte})} = \frac{1}{(aliq_1 - aliq_2)} \sqrt{\left(aliq_2 \cdot \frac{u(\overline{x_1})}{\overline{x}_1}\right)^2 + \left(aliq_1 \cdot \frac{u(\overline{x_2})}{\overline{x}_2}\right)^2}$$

siendo $u(\overline{x_1})/\overline{x_1}$ y $u(\overline{x_2})/\overline{x_2}$, las componentes de incertidumbre asociadas a los resultados analíticos expresadas como desviaciones estándar relativas. Considerando que solo se dispone de dos medidas analíticas para cada muestra, se estableció como

desviación típica, $u(x_i)$ el valor correspondiente a cada desviación típica sd_i dividido por la $\sqrt{2}$ tras considerar las dos medidas como independientes y evitar una sobre-estimación del valor de desviación estándar [52].

$$\frac{u(\overline{x_1})}{\overline{x}_1} = \frac{sd_i/\sqrt{n}}{\overline{x_i}}$$

Por último, para establecer el nivel de significancia de la constante deducida, se calculó el estadístico $t_{cte\,b}$ como

$$t_{cte\,b} = \frac{b_{cte}\%}{u(b_{cte})\%}$$

Teniendo en cuenta que este parámetro $t_{cte\ b}$ debe ser adimensional, los correspondientes valores de sesgo constante se transformaron en su respectiva forma relativa. Para ello se realizaron las siguientes transformaciones matemáticas:

$$\frac{\overline{x_1} - b_{cte}}{aliq_1} = \frac{\overline{x_2} - b_{cte}}{aliq_2}$$

$$\frac{\overline{x_1}}{aliq_1} - \frac{b_{cte}}{aliq_1} = \frac{\overline{x_2}}{aliq_2} - \frac{b_{cte}}{aliq_2}$$

$$b_{cte}\% = \frac{b_{cte}/aliq}{\bar{x}/aliq} = \frac{b_{cte}}{\bar{x}}$$

Se han analizado por triplicado tres alícuotas (m_1=0,6 g, m_2=1,6 g y m_3=2,6 g) del sedimento lodo B15 para evaluar el sesgo constante. Los resultados obtenidos al comparar los valores obtenidos al analizar 0,6 g y 1,6 g de sedimento se incluyen en las tabla 18.

Tabla 18: Parámetros correspondientes al estudio sobre posible existencia de sesgo constante a partir del análisis del lodo B15 con alícuotas de muestra de 0.6 y 1.6 g

Lodo B15	W_1=0,6 g	W_2=1,6 g						
	X_1 (ng)	X_2 (ng)	$s(x_1)$ (ng)	$s(x_2)$ (ng)	b_{cte}	b_{cte} (%)	$u(b_{cte})$ %	t_{cte}
α-HCH	3	15	0,013	0,105	4	1,41	0,066	**22**
β-HCH	61	145	0,044	0,115	11	0,18	0,098	**1,8**
γ-HCH	8	18	0,117	0,063	2	1,10	0,190	**5,8**
HexClbenc.	3524	8451	0,034	0,014	594	0,17	0,055	**3,1**
o,p'-DDE	4	11	0,036	0,022	0,4	0,11	0,059	**1,9**
p,p'-DDE	23	52	0,053	0,018	7	0,28	0,085	**3,3**
o,p'-DDD	44	102	0,068	0,029	10	0,24	0,109	**2,2**
P,p'-DDD	45	99	0,043	0,070	14	0,30	0,080	**3,7**
PCB 28	442	997	0,064	0,045	112	0,25	0,105	**2,4**
PCB 52	143	352	0,073	0,042	19	0,19	0,119	**1,6**
PCB 101	68	178	0,049	0,052	3	0,04	0,085	**0,5**
PCB 118	30	63	0,095	0,040	11	0,36	0,154	**2,3**
PCB 138	3	8	0,027	0,044	1	0,20	0,050	**3,9**
PCB 153	10	22	0,036	0,053	3	0,29	0,065	**4,5**
PCB 180	14	25	0,088	0,060	7	0,52	0,144	**3,6**

Como puede apreciarse, los valores deducidos en este estudio fueron superiores al valor estipulado (t_{tab}=3,2) en el caso de α-HCH, γ-HCH, p,p'-DDE, p,p'-DDD, PCB 138, PCB 153 y PCB 180, por lo que para tales casos es necesario corregir el resultado analítico final por diferencia del sesgo deducido cuando se emplean alícuotas de 0,5 g.

Considerando los elevados niveles de concentración del lodo en estudio y la potencial influencia de la heterogeneidad de la muestra, el protocolo analítico debe ser revisado y corregido para aumentar el tamaño de alícuota por encima de 1 gramo. Los resultados obtenidos al analizar por duplicado 1,6 g y 2,6 g de sedimento se incluyen en las tabla 19.

Tabla 19: Parámetros correspondientes al estudio sobre posible existencia de sesgo constante a partir del análisis del lodo B15 con alícuotas de muestra de 1,6 y 2,6 g

Lodo B15	W_1=1,6 g	W_2=2,6 g						
	X_1 (ng)	X_2 (ng)	$s(x_1)$ (ng)	$s(x_2)$ (ng)	b_{cte}	b_{cte} (%)	$u(b_{cte})$ %	t_{cte}
α-HCH	15	41	0,105	0,104	27	1,88	0,319	**5,9**
β-HCH	145	261	0,115	0,042	40	0,28	0,306	**0,9**
γ-HCH	18	40	0,063	0,210	18	0,99	0,373	**2,7**
HexClbenc.	8451	13832	0,014	0,022	154	0,02	0,049	**0,4**
o,p'-DDE	11	17	0,022	0,140	0,6	0,05	0,231	**0,2**
p,p'-DDE	52	78	0,018	0,099	8,9	0,17	0,165	**1,0**
o,p'-DDD	102	160	0,029	0,122	7,5	0,07	0,209	**0,4**
P,p'-DDD	99	143	0,070	0,041	29	0,29	0,195	**1,5**
PCB 28	997	1607	0,045	0,061	23	0,02	0,152	**0,1**
PCB 52	352	6	0,042	0,072	7,1	0,02	0,158	**0,1**
PCB 101	178	252	0,052	0,008	60	0,34	0,135	**2,5**
PCB 118	63	104	0,040	0,038	1,5	0,02	0,120	**0,2**
PCB 138	8	13	0,044	0,060	1,4	0,18	0,149	**1,2**
PCB 153	22	40	0,053	0,053	5,2	0,23	0,162	**1,4**
PCB 180	25	38	0,060	0,063	3,8	0,15	0,186	**0,8**

En este caso y teniendo en cuenta que los grados de libertad el parámetro t_{tab} tabulado para a una probabilidad de α=0,05 es t_{tab}=4.3. Como puede apreciarse, el parámetro t_{cte} fue de nuevo superior solo en el caso del α-HCH, compuesto de mayor volatilidad, si bien su magnitud disminuyó significativamente respecto a los deducidos en el caso anterior (tabla 18).

Así pues, en el caso de estudiar sedimentos muy heterogéneos el sesgo constante debe tenerse en cuenta, ya que se ha demostrado la existencia de variación en los niveles estudiados en función de la masa analizada.

4.1.3. Trazabilidad y exactitud

4.1.3.1. Aguas continentales

Se dispone de dos materiales certificados para evaluar la trazabilidad y exactitud del análisis de varios pesticidas en agua. Concretamente son el material de referencia ERA 709 y ERA 713.

Para analizar estos materiales, se debe diluir 1 mL del material de referencia en 1 litro de agua desionizada. A continuación se procede a realizar el proceso de análisis según se ha descrito en el presente informe. Cada material de referencia se ha analizado por duplicado. El material ERA 713 se ha analizado al principio del estudio, mientras que el material ERA 709 se ha analizado 9 meses después de comenzar el estudio, con el objetivo de demostrar la robustez del procedimiento desarrollado.

Los resultados para el análisis del material de referencia ERA 713 están resumidos en la tabla 20.

Tabla 20: Resultados del análisis del material de referencia certificada ERA 713 analizado al principio del desarrollo del procedimiento

Compuesto	Concentración (µg/L)					
	Certificada	Límites aceptados	(A)	(B)	Media	RDS
α-HCH	**7,38**	3,22 – 10,1	15,3	12,3	**13,8**	15 %
ß-HCH	**9,04**	4,28 – 12,2	9,2	7,7	**8,5**	12 %
γ-HCH	**5,76**	2,57 – 7,97	12,8	11,2	**12,0**	9 %
p,p'-DDE	**4,71**	2,02 – 6,41	1,2	0,9	**1,0**	16 %
p,p'-DDD	**6,40**	3,09 – 8,86	1,8	1,5	**1,7**	14 %
p,p'-DDT	**2,80**	1,11 – 4,14	0,6	0,6	**0,6**	3 %
Aldrín	**5,08**	1,79 – 6,84	2,5	2,1	**2,3**	11 %
Dieldrín	**7,10**	3,61 – 9,41	9,6	7,8	**8,7**	15 %
Endrín	**3,02**	1,32 – 4,37	5,4	4,7	**5,1**	10 %

Los resultados obtenidos para el Aldrín, Dieldrín, y β-HCH se encuentran dentro de los límites aceptados. En el caso de las concentraciones de α-HCH y γ-HCH, los valores medidos son superiores a los que certifica el material de referencia. Se debe a que estos análisis fueron realizados al principio del desarrollo de la metodología, y estos compuestos fueron cuantificados con el ion m/z 219, que según se explicará en el punto 4.1.6. de este procedimiento no era adecuado. En caso del p,p'-DDE, p,p'-DDD y p,p'-DDT, los valores medidos eran inferiores a los valores certificados, debido a que su análisis se realizó con el *liner* del sistema de inyección sucio, por lo que las señales analíticas eran más bajas. Según se ha establecido en el punto 3.8.6. de este informe es necesario cambiar el *liner* del sistema de inyección. Lamentablemente no se disponía de más material de referencia para realizar su análisis en las condiciones óptimas.

A diferencia del análisis del material de referencia ERA 713, en el caso del análisis del material de referencia ERA 709 si se realizó bajo unas condiciones de análisis cromatográfico óptimas. Los resultados se encuentran recogidos en la tabla 21.

Tabla 21: Resultados del análisis del material de referencia certificada ERA 709 analizado al final del desarrollo del procedimiento

Compuesto	Concentración (µg/L)					
	Certificada	Límites aceptados	(A)	(B)	Media	RDS
Simazina	**3,61**	1,99 – 5,23	2,35	2,26	**2,31**	3 %
Atrazina	**3,50**	1,92 – 5,08	2,95	2,76	**2,86**	5 %
γ-HCH	**2,14**	1,18 – 3,10	2,06	2,09	**2,07**	1 %
Hexaclorobenceno	**2,81**	1,41 – 3,50	1,65	1,79	**1,72**	6 %
Aldrín	**1,82**	0,82 – 2,32	1,15	1,20	**1,17**	3 %
Dieldrín	**1,57**	0,86 – 2,28	1,37	1,32	**1,34**	3 %
Endrín	**2,27**	1,59 – 2,95	2,88	3,05	**2,97**	4 %
Metacloro	**10,2**	5,61 – 14,8	7,59	7,23	**7,41**	3 %

Según los resultados obtenidos las concentraciones medidas son algo inferiores a las certificadas, aunque siempre dentro de los límites aceptados para todos los compuestos. Los resultados mostrados en la tabla 19 se han calculado sin considera la recuperación de cada compuesto evaluada en el apartado 4.1.2.2. Según estos valores las recuperaciones para estos compuestos están comprendidas entre el 80 – 100 %, por lo que si se tuviesen en cuenta las concentraciones se aproximarán más al valor certificado. Con el análisis de este material de referencia se ha demostrado la trazabilidad y exactitud del procedimiento de análisis de ciertos pesticidas en aguas continentales.

4.1.3.2. Muestras de sedimentos

El análisis del material de referencia CNS391 de sedimento de aguas naturales ha permitido validar y demostrar la trazabilidad y exactitud para ciertos pesticidas organoclorados y PCBs. Los resultados obtenidos a partir del análisis de 4 alícuotas de material de referencia analizado por duplicado, según el procedimiento descrito y en diferentes días se incluyen en la tabla 22.

Tabla 22: Trazabilidad y exactitud obtenida al analizar el material de referencia CNS391 según el procedimiento

Compuesto	Concentración (ng/g)						
	Certificada	(A)	(B)	(C)	(D)	Media	RDS (%)
α-HCH	**37,1**	27	23	26	30	**26**	10
ß-HCH	**21,1**	27	25	25	26	**25**	4
γ-HCH	**9,5**	12	11	10	12	**12**	8
Hexaclorobenceno	**34,5**	36	32	33	40	**35**	9
o,p'-DDE	**39,5**	37	34	30	24	**31**	19
p,p'-DDE	**18,8**	20	18	17	14	**17**	15
o,p'-DDD	**15,5**	17	15	14	11	**14**	16
p,p'-DDD	**13,9**	14	13	12	9	**12**	17
o,p'-DDT	**43**	30	26	24	17	**24**	21
p,p'-DDT	**10,2**	12	12	11	10	**11**	7
PCB 28	**44,9**	46	39	40	39	**41**	8
PCB 52	**64,6**	79	67	67	53	**67**	16
PCB 101	**45,7**	54	47	43	32	**44**	21
PCB 118	**24,0**	33	29	28	21	**28**	18
PCB 138	**34,6**	43	38	29	26	**34**	23
PCB 153	**50,1**	33	28	41	34	**34**	15
PCB 180	**54,7**	47	42	39	35	**41**	13

4.1.4. Precisión intermedia

4.1.4.1. Aguas continentales

Para estudiar la precisión intermedia se han estudiado las señales analíticas que se han obtenido al realizar por duplicado un conjunto de 3 – 9 muestras de aguas continentales enriquecidas con diferentes concentraciones de pesticidas organoclorados, durante un periodo de tres semanas, según ha quedado reflejado en el punto 4.1.2. del presente informe. Para el conjunto de datos se ha calculado la desviación típica relativa agrupada según la siguiente ecuación.

$$RSD_{pooled} = \sqrt{\frac{\sum RSD^2(n-1)}{\sum(n-1)}}$$

Donde el término RSD^2 corresponde al cuadrado del valor de la desviación típica relativa del duplicado de cada muestra (n=2) y el término $\sum$ (n-1) se corresponde con el número de muestras de aguas continentales analizadas. Los resultados están descritos en la tabla 23.

Tabla 23: Valores de precisión intermedia, expresados como RSDpool, calculados según la repetitividad de un conjunto de 3 -9 alícuotas de aguas continentales enriquecidas con pesticidas organoclorados y analizados por duplicado a lo largo de tres semanas

Compuesto	RSD (%) para n=2									
	Semana 1 (A)	Semana 2 (A)	Semana 3 (A)	Semana 1 (B)	Semana 2 (B)	Semana 3 (B)	Semana 1 (C)	Semana 1 (C)	Semana 1 (C)	RSD_{pool} (%)
o,p'-DDE	0,7	3	5,9	12,5	3,7	12,1	-	-	-	**8**
Dieldrín	0,7	2,3	8,3	11,2	6,7	15	17	17,8	8,4	**12**
p,p'-DDE	0,7	2,3	7,6	11,3	6,7	10,3	16,9	10,1	2,0	**10**
o,p'-DDD	0,7	4,9	14,0	12,7	9,3	14,9	-	-	-	**12**
Endrín	1,5	7	48,6	10,9	1,0	15,9	18,8	24,4	6,5	**22**
p,p'-DDD	1,7	5,7	18,9	22,2	12,0	9,7	27,2	26,6	15,0	**19**
o,p'-DDT	2,4	3,5	-	9,5	9,4	-	-	-	-	**8**
p,p'-DDT	4,1	12	-	8,7	14,1	-	34,3	21,0	-	**20**
α-HCH	10,5	25	1,2	39,3	10,1	3,7	24,3	10,6	8	**20**
β-HCH	7,2	9,1	31	17,8	17,9	1,4	10,7	28,5	1,8	**18**
γ-HCH	7,4	18,2	20,7	35,4	2,7	1,2	1,6	18,8	6,5	**18**
Simazina	8,5	7,5	19,3	0,2	15,2	1,4	-	-	-	**12**
Atrazina	5,7	7,4	13,6	3,8	15,5	3,3	-	-	-	**10**
Terbutilazina	2,4	3,6	8,9	13,9	12,5	2,6	-	-	-	**10**
Metacloro	0,1	0,6	8,6	11,6	8,1	3,4	-	-	-	**8**
Hexacloro.	-	-	-	-	-	-	11,3	2,6	5,4	**9**
Aldrín	-	-	-	-	-	-	4,0	9,9	4,4	**8**
Isodrín	-	-	-	-	-	-	7,1	15,6	0,5	**12**

Los valores de RSD_{pooled} para todos los pesticidas estudiados son inferiores al 20 %. Los compuestos con mayores valores son el p,p'-DDT y el Endrín, dos compuestos que sufren la degradación en el sistema de inyección del GC-MS [50]. Más detalles se describen en el punto 4.2.1.2.2. de este informe sobre la evaluación de la incertidumbre del calibrado.

4.1.4.2. Sedimentos

Para el cálculo de la precisión intermedia se han considerado los valores de RSD deducidos a partir del análisis por duplicado (n=2) de cada muestra de sedimento (33 muestras), agrupándolas y deduciendo el valor de desviación típica relativa agrupada, RSD_{pooled}. El análisis se ha realizado a lo largo de 9 meses. Los resultados de las desviaciones estándar están en la tabla recogidos en la tabla 24.

Tabla 24: Desviaciones estándar relativas deducidas a partir del análisis de dos alícuotas de cada muestra de sedimento. Las celdas vacías corresponden a valores de concentración por debajo del límite de detección

Sedim	PeClBn	α-HCH	β-HCH	γ-HCH	HxClBn	op-DDE	pp-DDE	op-DDD	pp-DDD	op-DDT	pp-DDT	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 153	PCB 138	PCB 180
1	0,366	0,019	0,222	0,003	0,006	0,012	0,037	0,009	0,076	-	-	0,003	0,010	0,125	0,015	0,002	-	-
2	0,698	0,025	0,002	0,009	0,061	0,099	0,005	0,007	-	-	-	-	0,002	0,003	-	0,017	-	-
3	0,055	0,035	-	0,022	0,020	0,031	0,021	0,016	0,027	-	-	0,019	0,028	0,029	-	0,025	-	-
4	-	1,037	0,155	-	0,995	0,080	0,002	0,038	0,039	-	-	0,242	0,160	0,130	0,130	0,278	-	-
5	0,015	0,004	-	0,008	0,250	0,002	-	0,003	0,014	-	-	-	0,002	0,031	0,068	0,010	-	-
6	0,007	0,005	-	0,001	-	0,008	-	0,002	0,073	-	-	-	0,001	0,001	0,016	0,004	-	-
7	0,014	0,030	0,003	0,004	-	0,003	0,004	0,038	0,010	-	-	0,001	0,001	0,003	0,002	0,004	-	-
8	0,255	0,048	0,015	0,022	0,082	0,099	0,031	0,028	0,278	-	-	0,129	0,056	0,060	-	0,037	-	-
9	0,038	0,005	0,324	0,023	0,005	0,012	0,028	0,162	0,718	-	-	0,008	0,054	0,120	0,281	0,116	-	-
10	1,115	0,173	0,017	0,007	0,102	0,004	-	0,045	0,332	-	-	0,001	0,001	0,001	-	0,001	-	-
11	0,044	0,005	0,016	0,002	0,024	0,022	0,062	0,198	1,414	-	-	0,241	0,371	0,494	-	-	-	-
12	-	0,056	0,019	0,044	0,209	0,020	0,002	0,080	0,047	-	-	0,056	0,132	0,112	0,051	0,082	0,146	0,048
13	-	0,009	0,074	0,004	0,001	0,115	0,112	0,082	0,052	0,082	0,002	0,019	0,060	0,086	0,080	0,128	0,092	0,120
14	0,038	-	0,039	-	0,055	0,137	0,181	0,001	-	0,500	-	0,097	0,001	0,052	0,199	0,308	0,175	0,728
15	0,316	0,004	0,002	0,012	-	0,139	0,074	0,047	0,119	-	-	0,010	0,007	0,011	-	0,010	-	-
16	-	0,009	0,199	-	0,062	0,250	0,874	0,135	0,058	-	-	-	0,036	-	-	-	-	-
17	0,182	0,165	0,915	-	0,107	-	0,006	0,018	0,023	-	0,033	0,005	-	0,002	0,017	0,422	0,513	0,012
18	0,029	0,008	0,024	0,036	0,087	0,032	0,020	0,214	0,129	0,017	0,355	0,076	0,095	0,064	0,011	0,024	0,022	0,031
19	0,008	0,013	0,087	0,018	0,002	0,001	0,002	0,004	0,030	0,167	0,488	0,002	0,001	0,112	0,001	0,005	-	-
20	0,005	0,009	0,006	0,031	0,018	0,007	0,002	-	0,045	0,641	1,143	0,005	0,003	0,001	0,019	0,320	0,490	-
21	1,010	0,014	0,015	-	0,476	0,080	0,017	0,036	0,008	0,041	-	0,407	0,287	-	-	-	-	-
22	0,387	0,022	0,01	0,028	-	0,017	0,001	0,031	0,039	0,056	-	0,004	0,006	0,008	0,003	0,002	0,003	0,005
23	0,043	0,032	0,005	0,037	-	0,065	0,016	0,045	0,133	0,188	-	0,056	0,013	0,019	-	0,031	-	-
24	0,009	0,038	-	0,017	0,144	0,183	0,080	0,062	0,018	-	-	0140	0,171	0,325	-	0,810	-	-
25	0,004	0,028	1,284	0,010	0,066	0,004	0,005	-	0,018	0,005	0,628	0,028	0,018	0,010	0,012	0,002	-	-
26	0,017	0,005	0,001	0,006	0,014	0,015	0,023	0,010	0,011	-	-	0,183	0,090	0,133	-	0,133	-	-
27	-	0,663	0,122	0,763	-	0,031	0,015	0,009	0,003	-	-	0,191	0,025	0,006	-	0,004	-	-
28	0,012	0,001	-	0,374	0,593	0,034	0,060	0,138	0,185	-	-	0,040	0,020	0,098	-	0,101	-	-
29	0,016	0,015	0,020	-	0,195	-	-	-	0,088	0,012	-	0,056	0,004	-	-	0,015	0,001	0,001
30	0,118	0,036	0,056	0,001	0,020	0,001	0,003	0,006	0,007	0,009	0,335	0,040	0,023	-	0,006	0,034	0,015	0,018
31	-	0,118	-	0,047	0,022	0,013	0,010	0,012	0,025	0,212	-	0,019	0,023	0,025	0,046	0,019	0,032	0,019
32	0,260	0,101	0,038	0,187	0,520	0,036	0,046	0,139	0,080	0,180	-	0,159	0,111	0,070	-	0,044	-	-
33	0,026	0,336	0,065	0,019	0,524	0,114	0,021	0,052	0,103	1,997	0,966	0,004	0,001	,0634	0,062	0,031	0,025	-

Los resultados finales de desviaciones típicas relativas agrupadas se detallan en la tabla 25. Esta estimación es más robusta y representativa de las características reales del sistema en diversas condiciones experimentales, combinando el efecto de repetitividad y el de componentes entre muestras y entre días.

Tabla 25: Parámetros de precisión intermedia calculados a partir de las desviaciones estándar relativas deducidas tras el análisis por duplicado de cada muestra de sedimento.

Compuesto	$\sum(P\Sigma\Delta)^2(\nu-1)$	$\sum(\nu-1)$	RSD_{pooled}(%)
PeClBcno	5,09	27	**43**
α-HCH	3,07	32	**31**
β-HCH	3,74	29	**36**
γ-HCH	1,73	27	**25**
HxClBcno	4,62	31	**39**
o,p'-DDE	1,66	32	**23**
p,p'-DDE	1,76	31	**24**
o,p'-DDD	1,67	32	**23**
p,p'-DDD	4,2	32	**36**
o,p'-DDT	4,1	14	**54**
p,p'-DDT	3,95	10	**63**
PCB 28	2,24	31	**27**
PCB 52	1,81	32	**24**
PCB 101	2,76	31	**30**
PCB 118	1,02	18	**24**
PCB 153	3,02	29	**32**
PCB 138	1,51	11	**37**
PCB 180	0,98	9	**33**

Según los resultados obtenidos, para la mayor parte de los compuestos los valores de desviaciones típicas relativas agrupadas estuvieron entre el 25 y 35%, valores muy coherentes con la dificultad analítica que presenta el análisis de este tipo de compuestos en matrices tan complejas y heterogéneas como las estudiadas a lo largo de nueve meses de estudio.

Cabe destacar los resultados del o,p'-DDT y p,p'-DDT, donde se obtuvieron valores de desviaciones relativas por encima del 50 %. En este sentido, cabe mencionar que el análisis de estos dos compuestos en las muestras de sedimentos correspondió en general con un número reducido de muestras que superaron los límites de cuantificación y cuando así fue, los valores de concentración fueron próximos a dichos límites de cuantificación. Además es conocida la problemática analítica que conlleva el

análisis de estos compuestos mediante cromatografía de gases, donde el DDT es degradado en el sistema de inyección produciendo DDE y DDD, como se explicará en detalle en el punto quedado reflejado en el apartado 4.2.1.2.2. de este informe.

También destacó el caso del Pentaclorobenceno, con imprecisiones que alcanzaron valores del 43%, posiblemente debido al carácter volátil de este compuesto.

4.1.5. Límites de detección y cuantificación

Para determinar los límites de cuantificación y determinación de los diferentes compuestos organoclorados, se inyectaron consecutivamente 4 disoluciones de calibrado con concentraciones de 10 ng/L a lo largo de los 9 meses de estudio.

El LOD fue calculado como tres veces la desviación estándar obtenida en la medida del área cromatográfica de cuatro disoluciones de calibrado de 10 ng/L inyectadas consecutivamente. El LOQ fue calculado como 10 veces la desviación estándar. Los LOD y LOQ han ido variando con el tiempo en función de las condiciones en las que se encontraba el sistema cromatográfico. En la tabla 26 se presentan como los LOD y LOQ para cada compuesto a lo largo del tiempo.

Tabla 26: Variación de los LOD y LOQ para los compuestos estudiados a lo largo de 9 meses

Compuesto organoclorado	LOD (ng/L)		LOQ (ng/L)	
	Rango	Promedio	Rango	Promedio
PeClBcno*	-	4	-	13
HxClbecno	0,3 – 2,2	1,4	0,4 – 4,2	2,3
o,p'-DDE*	-	4	-	18
p,p'-DDE	0,6 – 1,0	0,9	0,8 – 5,7	2,4
o,p'-DDD*	-	3		21
p,p'-DDD	0,1 – 6,8	3,5	3,4 – 16,4	7,3
o,p'-DDT	0,2 – 2,6	1,5	3,5 – 5,7	4,2
p,p'-DDT	0,2 – 4,9	2,3	3,8 – 7,3	4,9
Aldrín	0,1 – 3,4	1,7	2,8 – 8,4	5,3
Isodrín	1,1 – 4,0	2,2	0,4 – 8,0	3,4
Dieldrín	0,2 – 6,0	3,2	2,0 – 9,0	5,3
Endrín	0,7 – 5,0	1,8	1,5 – 6,0	4,0
Simazina	2,0 – 11,2	5,9	6,3 – 29,6	13,1
Atrazina	1,4 – 5,1	3,7	4,7 – 9,1	6,7
Terbutilazina	1,8 – 5,5	4,2	4,2 – 8,4	6,6
Metacloro	1,4 – 6,0	4,3	3,7 – 9,0	6,7
α-HCH	2,2 – 3,0	2,6	2,2 – 7,8	5,2
β-HCH	1,0 – 5,0	2,7	0,3 – 11,4	5,3
γ-HCH	1,5 – 3,8	2,4	2,1 – 9,2	5,1
PCB 28*	-	2	-	15
PCB 52*	-	2	-	9
PCB 101*	-	2	-	12
PCB 118*	-	3	-	22
PCB 153*	-	3	-	19
PCB 138*	-	3	-	19
PCB 180*	-	4	-	21

***Valores expresados en ng/g**

4.1.6. Sensibilidad y selectividad

La selectividad del procedimiento de análisis para los compuestos organoclorados está relacionada con las características del detector de espectrometría de masas. El detector empleado es un simple cuadrupolo con una fuente de ionización de iones por impacto electrónico. Estos detectores tienen una resolución de 1 uma.

Para cuantificar la selectividad, se han estudiado diferentes blancos de sedimentos y aguas continentales sin encontrar interferencias cromatográficas significativas. Sin embargo, se ha observado que en algunas muestras de sedimentos y

aguas continentales aparece un pico cromatográfico con un tiempo de retención de 17.3 minutos, coincidiendo con los tiempos de retención del β-HCH y γ-HCH. Este pico presenta una señal notable con el ion 219, al igual que los dos pesticidas que eluyen a este tiempo de retención. Para minimizar esta interferencia, se debe medir el ion 181, ya que la interferencia no presenta señal con este ion, pero sí el β-HCH y el γ-HCH. Al inyectar una muestra en modo *scan* esta interferencia ha sido identificada como el 3,5-di-tercbutil-4-hidroxibenzaldehido (CAS 1620-98-0). También se ha observado un interferencia a un tiempo de retención de 20,3 minutos. Este compuesto ha sido identificado con el eicosano. Esta interferencia co-eluye con el Metacloro y Aldrín. La interferencia presenta un ion 79 muy elevado, mientras que el Metacloro y Aldrín no lo tiene. Para minimizar esta interferencia el Aldrín debe ser cuantificado con los iones 263 y 66.

Cuando el detector de espectrometría de masas está registrando los iones formados en modo *scan*, los compuestos pueden ser identificados con muy pequeño margen de error, por lo que la selectividad del procedimiento es máxima. Los espectros de masas obtenidos en modo *scan* se obtienen haciendo un barrido completo en un rango de m/z (normalmente 50-550 uma), en pequeños intervalos de tiempo (décimas de segundo). La ventaja del espectro de masas obtenido en modo *scan* es que genera mucha información estructural de la molécula, pudiéndose lograr la identificación de ésta, ya que la fragmentación obtenida a 70 eV son muy predecibles y constantes. Esta característica permite la comparación de los espectros generados con aquellos espectros guardados en una base de datos de espectros de masas. La desventaja del análisis en modo *scan* es la baja sensibilidad que se obtiene. Cada fracción de segundo, se hace un barrido de todas las m/z, por lo que la cantidad de fragmentos que golpean el detector es muy baja, y por lo tanto la señal obtenida es muy pequeña.

La sensibilidad del método de análisis está relacionada con el modo de trabajo del espectrómetro de masas. Así, para aumentar la sensibilidad del detector de espectrometría de masas, el espectrómetro de masas puede trabajar en modo SIM. De este modo, solamente unos determinadas relaciones m/z pueden pasan a través del

filtro de masas. Así el número de iones que pueden pasar por segundo es mucho mayor, y así el número de iones que golpea el detector es mayor, por lo que se aumenta la sensibilidad. La desventaja de trabajar en modo SIM es que se pierde toda la información estructural de la molécula, por lo que no se puede identificar y baja la selectividad.

En función de los espectros de masas obtenidos en modo *scan*, se definen los iones que se deben monitorizar en modo SIM para cuantificar una especie. Para cuantificar una especie en modo SIM se suelen escoger tres iones: el ion cuantificador (normalmente el ion base) y dos iones calificadores. Se definen las ventanas de integración en función de los tiempos de retención de los pesticidas estudiados, para aumentar la sensibilidad del método de análisis. Además se deben monitorizar los iones del patrón interno y del patrón de *surrogate*. En la tabla 10 de este procedimiento se han recogido los iones escogidos para cada compuesto.

La sensibilidad del detector de espectrometría de masas se define como la pendiente de la recta de calibrado. En la tabla 27 se resume la sensibilidad obtenida para cada compuesto a lo largo del periodo de tiempo estudiado.

Tabla 27: Sensibilidad obtenida para los diferentes compuestos organoclorados medidos en diferentes calibrados durante un periodo de 9 meses.

Compuesto organoclorado	Número calibrados	Sensibilidad (L/ng)		
		Mínima	Máxima	Mediana
PeClBcno	8	$8{,}72\ 10^{-5}$	$1{,}42\ 10^{-3}$	$3{,}15\ 10^{-4}$
HxClbecno	7	$2{,}61\ 10^{-4}$	$5{,}42\ 10^{-4}$	$3{,}55\ 10^{-4}$
o,p'-DDE	9	$3{,}56\ 10^{-4}$	$7{,}38\ 10^{-4}$	$5{,}33\ 10^{-4}$
p,p'-DDE	13	$2{,}37\ 10^{-4}$	$8{,}26\ 10^{-4}$	$4{,}48\ 10^{-4}$
o,p'-DDD	9	$3{,}27\ 10^{-4}$	$8{,}75\ 10^{-4}$	$6{,}14\ 10^{-4}$
p,p'-DDD	13	$1{,}54\ 10^{-4}$	$1{,}33\ 10^{-3}$	$6{,}70\ 10^{-4}$
o,p'-DDT	9	$2{,}18\ 10^{-4}$	$8{,}72\ 10^{-4}$	$5{,}73\ 10^{-4}$
p,p'-DDT	13	$5{,}84\ 10^{-4}$	$1{,}23\ 10^{-4}$	$6{,}11\ 10^{-4}$
Aldrín	7	$1{,}14\ 10^{-4}$	$2{,}20\ 10^{-4}$	$1{,}33\ 10^{-4}$
Isodrín	7	$1{,}15\ 10^{-4}$	$2{,}99\ 10^{-4}$	$1{,}71\ 10^{-4}$
Dieldrín	15	$1{,}16\ 10^{-4}$	$5{,}47\ 10^{-4}$	$1{,}96\ 10^{-4}$
Endrín	15	$4{,}38\ 10^{-5}$	$5{,}85\ 10^{-4}$	$8{,}38\ 10^{-5}$
Simazina	9	$6{,}66\ 10^{-5}$	$2{,}19\ 10^{-4}$	$1{,}64\ 10^{-4}$
Atrazina	9	$9{,}73\ 10^{-5}$	$3{,}06\ 10^{-4}$	$2{,}62\ 10^{-4}$
Terbutilazina	9	$1{,}42\ 10^{-4}$	$4{,}84\ 10^{-4}$	$4{,}06\ 10^{-4}$
Metacloro	9	$2{,}44\ 10^{-4}$	$7{,}68\ 10^{-4}$	$6{,}14\ 10^{-4}$
α-HCH	16	$4{,}30\ 10^{-5}$	$2{,}52\ 10^{-4}$	$1{,}28\ 10^{-4}$
β-HCH	16	$8{,}06\ 10^{-5}$	$2{,}22\ 10^{-4}$	$1{,}25\ 10^{-4}$
γ-HCH	16	$9{,}08\ 10^{-5}$	$2{,}40\ 10^{-4}$	$1{,}31\ 10^{-4}$
PCB 28	8	$3{,}66\ 10^{-4}$	$8{,}35\ 10^{-4}$	$6{,}01\ 10^{-4}$
PCB 52	8	$3{,}07\ 10^{-4}$	$7{,}56\ 10^{-4}$	$4{,}77\ 10^{-4}$
PCB 101	8	$3{,}79\ 10^{-4}$	$9{,}73\ 10^{-4}$	$5{,}69\ 10^{-4}$
PCB 118	8	$3{,}84\ 10^{-4}$	$1{,}35\ 10^{-3}$	$7{,}99\ 10^{-4}$
PCB 153	8	$3{,}16\ 10^{-4}$	$1{,}12\ 10^{-3}$	$5{,}99\ 10^{-4}$
PCB 138	8	$2{,}24\ 10^{-4}$	$9{,}87\ 10^{-4}$	$5{,}15\ 10^{-4}$
PCB 180	8	$1{,}31\ 10^{-4}$	$8{,}67\ 10^{-4}$	$4{,}97\ 10^{-4}$

Para estudiar más detenidamente la sensibilidad de los compuestos a lo largo del tiempo, se ha representado los diagramas de cajas y bigotes con los valores de sensibilidad obtenidos para cada compuesto (Figura 6). La caja del diagrama define los tres cuartiles del conjunto de datos, la línea horizontal dentro de la caja define la mediana y la cruz marca el valor medio. La longitud de los segmentos marcan los valores máximos y mínimos.

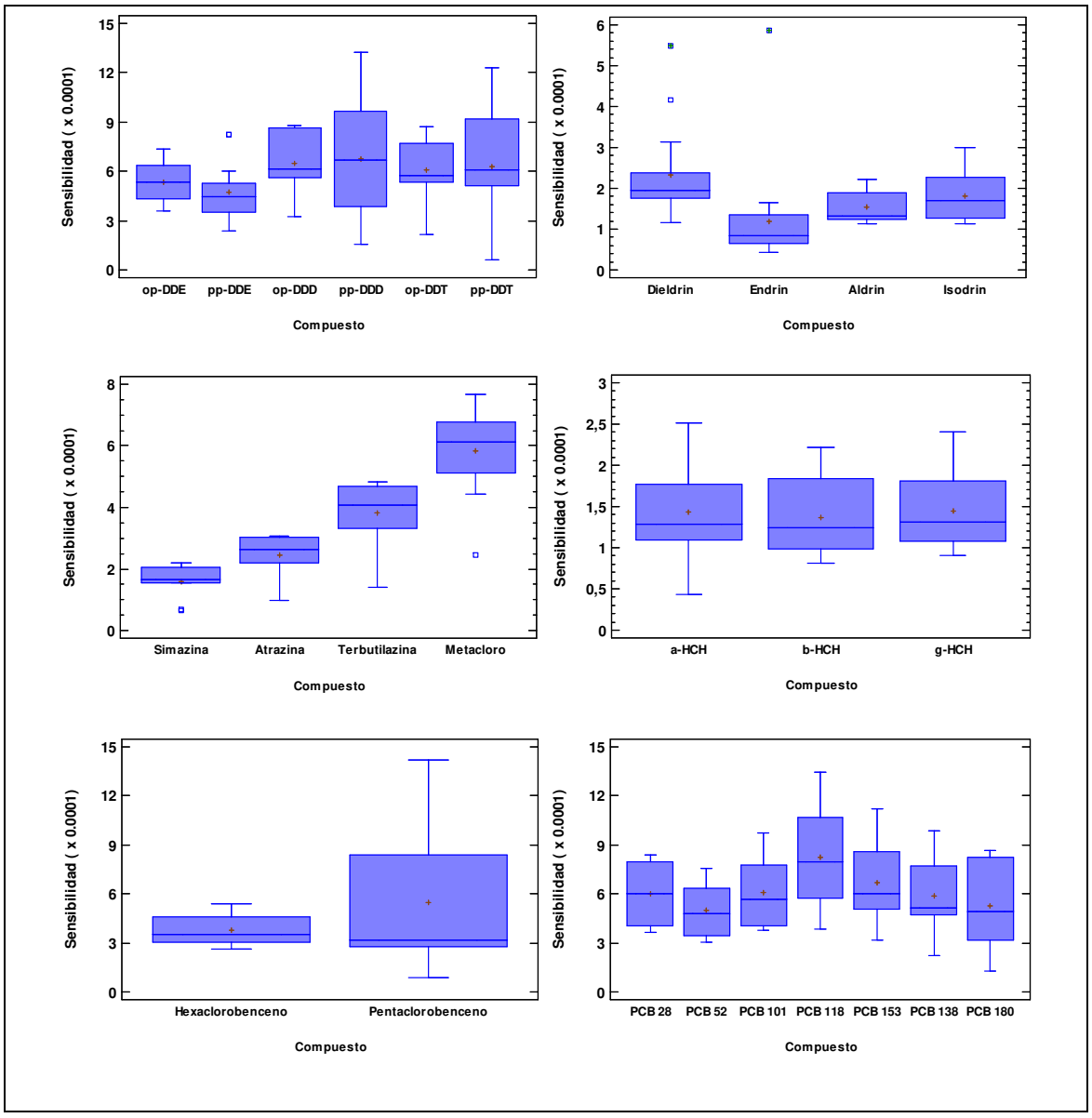


Figura 6: Diagramas de caja y bigotes donde se representa la sensibilidad para los compuestos organoclorados a lo largo de 9 meses de análisis. La caja define los tres cuartiles, la línea media marca la mediana, el punto marca el valor medio y los brazos marcan el valor máximo y mínimo.

De forma general para todos los compuestos, se observa que las distribuciones de datos, es decir los valores de sensibilidad obtenidos a lo largo del tiempo, es simétrica, ya que los percentiles son similares y la mediana está en la parte central junto con el valor medio. Únicamente el Pentaclorobenceno no ha presentado una distribución simétrica, ya que la sensibilidad entre el cuartil entre el 50 – 75 % está mucho más dispersa.

Se han obtenido valores de sensibilidad anómalos para el Dieldrín y Endrín. Hay casos en los que la sensibilidad de estos compuestos era mucho mayor que en el resto.

Estos valores de mayor sensibilidad coinciden con aquellos análisis en los que las condiciones de inyección eran más óptimas, liner y/o columna cromatográfica nuevos. En estos casos la degradación del Endrín y Dieldrín que se produce en el sistema de inyección era mínima y por lo tanto la sensibilidad de estos compuestos aumentaba. Sin embargo, en un sistema cromatográfico con un sistema de inyección que haya analizado muestras contaminadas, se generaban puntos activos que degradaban en parte estos compuestos, por lo que la sensibilidad disminuía considerablemente. Debido a que en este trabajo se ha evaluado el funcionamiento del sistema en condiciones reales de análisis, la degradación de estos compuestos se produce en cierto grado y por tanto su sensibilidad es más baja, por lo que los valores de sensibilidad óptimos para estos compuestos son tratados como valores anómalos.

4.2. Incertidumbre de medida

Se han identificado tres contribuciones principales a la incertidumbre asociada a la determinación de los compuestos organoclorados: Calibración del GC/MS, análisis del material de referencia y tratamiento de la muestra. A continuación se describirá detalladamente la evaluación de cada una de las contribuciones

4.2.1. Incertidumbre asociada a la calibración del GC/MS

La incertidumbre asociada a la calibración del GC/MS se estudió tras el análisis de diferentes calibraciones a largo del tiempo. En particular, se evaluaron 4 calibrados realizados a lo largo de un periodo de 9 meses. Cada calibración presentó 4 niveles de calibración (50, 100, 500 y 1000 ng/mL).

La incertidumbre asociada al cálculo de la concentración (u^2_x) tendrá como contribuciones:

- Aquellas debidas a la preparación de las disoluciones patrón utilizadas (u^2_{Cpat})
- Al propio proceso de calibración y ajuste de la recta de calibrado (u^2_{Cx}),

De acuerdo a la siguiente expresión:

$$u_x^2 = u_{Cpat}^2 + u_{Cx}^2$$

Y como desviaciones estándar relativas:

$$\frac{u_x^2}{x^2} = \frac{u_{Cpat}^2}{C_{pat}^2} + \frac{u_{Cx}^2}{C_x^2}$$

4.2.1.1. Contribución de las disoluciones de calibración.

Respecto a la contribución de incertidumbre procedente de la preparación de las disoluciones patrón para el estudio de la recta de calibrado (u^2_{Cpat}), la contribución más importante proviene de la preparación de la disolución patrón original. Tanto la cadena de dilución para la preparación de las disoluciones de calibrado, que incluye factores como la temperatura, límites de especificación de las jeringas utilizadas y repetitividad de las medidas efectuadas con las jeringas no presentan una influencia significativa en esta contribución [34, 44-48]. En consecuencia, teniendo en cuenta que la incertidumbre asociada a la preparación de la disolución patrón original (10 µg/mL) es de ±1% y es suministrada por la casa comercial responsable de su certificación, la correspondiente contribución ha sido estimada como

$$\frac{u_{Cpat}^2}{C_{pat}^2} = \left({}^{0,2}/_{10}\right)^2 = 0{,}0004$$

4.2.1.2. Contribución de la recta de calibrado

Respecto a las contribuciones asociadas al proceso de calibración y al ajuste de la recta de calibrado (u^2_{Cx}) consideramos que están incluidas en la incertidumbre del proceso de medida y, por tanto, están contempladas en el cálculo de las incertidumbres de la señal, ordenada y pendiente (u_y, u_b y u_m). Para la evaluación de esta contribución, partimos de la expresión de la concentración en función de los parámetros característicos de la recta de calibrado:

$$C_x = \frac{y' - b}{m}$$

Donde cada variable se define según:

- y’ es el área corregida en función del patrón interno

- x es la concentración de la disolución de interés
- m, b son los coeficientes de la pendiente y ordenada en el origen, respectivamente.

Aplicando la ley de propagación de incertidumbres, la incertidumbre vendrá dada por la siguiente expresión:

$$u_{Cx}^2 = \frac{u_{y'}^2}{m^2} + \frac{u_b^2}{m^2} + u_m^2 \frac{(y' - b)}{m^4}$$

$$\frac{u_{Cx}^2 m^2}{(y' - b)^2} = \frac{u_{y'}^2}{(y' - b)^2} + \frac{u_b^2}{(y' - b)^2} + \frac{u_m^2}{m^2}$$

$$\frac{u_{Cx}^2}{C_x^2} = \frac{u_{y'}^2}{(y' - b)^2} + \frac{u_b^2}{(y' - b)^2} + \frac{u_m^2}{m^2}$$

Donde cada variable se corresponde con:

- y' es el valor promedio de la respuesta analítica, calculado a partir del nivel de calibración más bajo, de cuatro calibraciones analizadas a lo largo del tiempo.
- $u_{y'}$ es la incertidumbre deducida como contribución de tipo A ($w \cdot s_y/\sqrt{n}$)
- C_x es la concentración de la disolución (50 ng/mL).
- b, m, son los coeficientes de ordenada en el origen y pendiente, respectivamente
- u_b, u_m son las incertidumbres deducidas como contribuciones tipo A calculadas a partir de las correspondientes desviaciones estándar de la ordenada y pendiente (s_b, s_m).

4.2.1.2.1. Incertidumbre de la señal analítica ($u^2_{y'}$)

Se ha seleccionado como nivel de concentración el valor de 50 ng/mL, debido a que es mayor que los límites de cuantificación establecidos, por encima de 10 ng/mL, y se corresponde con el nivel de calibración más bajo del conjunto de calibrados estudiados.

La etapa de calibración tiene contribuciones de incertidumbres procedentes de los coeficientes de regresión, por lo que han sido evaluadas a partir de la desviación estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen tras el análisis de una serie de cuatro niveles de concentración independientemente preparados y analizados a lo largo del tiempo (en total, cuatro puntos de cada nivel de concentración).

La incertidumbre asociada al tipo de señal ($u^2_{y'}$) se ha considerado como una contribución de tipo A, obtenida tras aplicar la ecuación:

$$u^2_{y'} = \left(w \frac{s_{y'}}{\sqrt{n}}\right)$$

Y aplicando los correspondientes factores de corrección (*w*) de la desviación estándar muestral recogidos en la tabla 28. Los resultados obtenidos correspondientes al proceso de medida cromatográfico se incluyen en la tabla 29.

Tabla 28: Valores del factor de corrección de la desviación estándar muestral

Nº medidas (n)	Factor corrección (w)
2	7,0
3	2,3
4	1,7
5	1,4
6	1,3
7	1,3
8	1,2
9	1,2

Tabla 29: Parámetros de incertidumbre y estadísticos asignados al proceso de medida cromatográfico.

Compuesto (*50 ng/mL*^{1})	y'	s_y	n	u^2_y
PeClBcno	0,017	0,004	13	2,8 10^{-05}
HxClbecno	0,02	0,0032	13	9,6 10^{-06}
o,p'-DDE	0,03	0,0029	21	4,8 10^{-06}
p,p'-DDE	0,022	0,0027	20	5,1 10^{-06}
o,p'-DDD	0,027	0,0035	13	1,2 10^{-05}
p,p'-DDD	0,027	0,0068	14	3,4 10^{-05}
o,p'-DDT	0,023	0,0032	11	9,9 10^{-06}
p,p'-DDT	0,024	0,0029	11	1,2 10^{-05}
Aldrín	0,006	0,001	11	8,9 10^{-07}
Isodrín	0,012	0,0028	11	1,2 10^{-05}
Dieldrín	0,012	0,0046	17	2,0 10^{-05}
Endrín	0,053	0,0253	12	6,2 10^{-04}
Simazina	0,008	0,0023	17	4,9 10^{-06}
Atrazina	0,011	0,0012	18	1,0 10^{-06}
Terbutilazina	0,018	0,0022	18	3,6 10^{-06}
Metacloro	0,024	0,004	14	1,6 10^{-05}
α-HCH	0,006	0,0009	15	8,1 10^{-07}
β-HCH	0,005	0,0005	15	2,2 10^{-07}
γ-HCH	0,005	0,0007	15	4,1 10^{-07}
PCB 28	0,02	0,0035	13	1,2 10^{-05}
PCB 52	0,018	0,0037	13	1,3 10^{-05}
PCB 101	0,04	0,0114	13	1,2 10^{-04}
PCB 118	0,053	0,0154	13	2,3 10^{-04}
PCB 153	0,045	0,0107	15	1,1 10^{-04}
PCB 138	0,044	0,0172	15	2,8 10^{-04}
PCB 180	0,032	0,0042	16	1,7 10^{-05}

4.2.1.2.2. Incertidumbre de la ordenada en el origen (u^2_b) y pendiente (u^2_m)

En cuanto a las componentes de incertidumbre asociadas a la ordenada en el origen (u^2_b) y la pendiente (u^2_m), éstas provienen de las diferencias obtenidas en la calibración del equipo. Fundamentalmente son producidas por variaciones en la preparación de patrones, en la respuesta de la señal y a ligeras desviaciones de la linealidad del equipo.

Se pueden obtener a partir de los valores de s_b y s_m deducidas en la recta de calibrado y considerando una contribución de tipo A, de donde u_b y u_m vienen dados por las siguientes expresiones:

$$u_b^2 = \left(w\frac{s_b}{\sqrt{n}}\right)^2 \qquad u_m^2 = \left(w\frac{s_m}{\sqrt{n}}\right)^2$$

Siendo la variable *n* el nº de puntos de la recta de calibrado.

Los parámetros estadísticos deducidos para cada recta de calibrado se dan en la tabla 30.

Tabla 30: Parámetros estadísticos de las rectas de regresión lineal utilizados para el cálculo de incertidumbres asociadas al proceso de calibrado.

Compuesto	b	m	s_b	s_m	u^2_b	u^2_m
PeClBcno	0,002	2,8 10^{-04}	0,0012	2,5 10^{-06}	1,5 10^{-07}	6,9 10^{-13}
HxClbecno	-0,0007	3,4 10^{-04}	0,0038	8,2 10^{-06}	1,6 10^{-06}	7,5 10^{-12}
o,p'-DDE	-0,0024	6,4 10^{-04}	0,0056	1,1 10^{-05}	2,2 10^{-06}	8,6 10^{-12}
p,p'-DDE	-0,0028	5,2 10^{-04}	0,0051	1,0 10^{-05}	1,8 10^{-06}	6,9 10^{-12}
o,p'-DDD	-0,0229	8,0 10^{-04}	0,0188	3,6 10^{-05}	3,4 10^{-05}	1,3 10^{-10}
p,p'-DDD	-0,0248	8,4 10^{-04}	0,0193	3,8 10^{-05}	3,6 10^{-05}	1,4 10^{-10}
o,p'-DDT	-0,0256	7,1 10^{-04}	0,0193	3,8 10^{-05}	4,9 10^{-05}	1,9 10^{-10}
p,p'-DDT	-0,025	7,2 10^{-04}	0,0167	3,3 10^{-05}	3,7 10^{-05}	1,5 10^{-10}
Aldrín	-0,003	1,2 10^{-04}	0,0038	8,3 10^{-06}	1,6 10^{-06}	7,7 10^{-12}
Isodrín	-0,0067	1,8 10^{-04}	0,0103	2,0 10^{-05}	9,5 10^{-06}	3,5 10^{-11}
Dieldrín	-0,0008	2,4 10^{-04}	0,012	2,3 10^{-05}	1,5 10^{-05}	5,5 10^{-11}
Endrín	0,0032	8,5 10^{-05}	0,0049	1,0 10^{-05}	2,9 10^{-06}	1,2 10^{-11}
Simazina	-0,0048	1,9 10^{-04}	0,0039	7,2 10^{-06}	1,3 10^{-06}	4,4 10^{-12}
Atrazina	-0,0051	2,7 10^{-04}	0,0057	1,1 10^{-05}	2,6 10^{-06}	9,3 10^{-12}
Terbutilazina	-0,0073	4,2 10^{-04}	0,0094	1,8 10^{-05}	7,1 10^{-06}	2,5 10^{-11}
Metacloro	-0,0207	6,6 10^{-04}	0,0121	2,1 10^{-05}	1,5 10^{-05}	4,4 10^{-11}
α-HCH	-0,0041	1,4 10^{-04}	0,0033	5,9 10^{-06}	9,8 10^{-07}	3,1 10^{-12}
β-HCH	-0,0049	1,3 10^{-04}	0,0037	6,5 10^{-06}	1,2 10^{-06}	3,9 10^{-12}
γ-HCH	-0,0046	1,3 10^{-04}	0,0045	7,9 10^{-06}	1,8 10^{-06}	5,7 10^{-12}
PCB 28	-0,003	4,0 10^{-04}	0,0047	1,0 10^{-05}	2,4 10^{-06}	1,1 10^{-11}
PCB 52	0,0004	3,2 10^{-04}	0,0044	9,6 10^{-06}	2,2 10^{-06}	1,0 10^{-11}
PCB 101	0,0026	4,1 10^{-04}	0,0067	1,4 10^{-05}	5,0 10^{-06}	2,3 10^{-11}
PCB 118	0,0018	5,7 10^{-04}	0,0097	2,1 10^{-05}	1,0 10^{-05}	4,8 10^{-11}
PCB 153	-0,0021	5,3 10^{-04}	0,0108	2,1 10^{-05}	8,9 10^{-06}	3,3 10^{-11}
PCB 138	0,001	4,8 10^{-04}	0,0111	2,1 10^{-05}	1,2 10^{-05}	4,4 10^{-11}
PCB 180	0,0007	4,9 10^{-04}	0,0117	2,5 10^{-05}	1,5 10^{-05}	7,1 10^{-11}

Para estimar (y'-b) se aplicaron las lecturas de las áreas registradas en la deducción de los parámetros de incertidumbre asignados al proceso de medida (tabla 29). Los resultados finales de las distintas contribuciones de incertidumbre en el proceso de calibrado se incluyen en la tabla 31.

Tabla 31: Parámetros de incertidumbre asociados al proceso de calibrado del equipo cromatográfico en la determinación de los compuestos

Compuesto	$u^2_y/(y-b)^2$	$u^2_b/(y-b)^2$	$u^2_m/(m)^2$	$(u_{Cx})^2/C_x^2$
PeClBcno	0,119	0,0006	$8,7\ 10^{-06}$	0,12
HxClbecno	0,023	0,0039	$6,5\ 10^{-05}$	0,027
o,p'-DDE	0,005	0,0021	$2,1\ 10^{-05}$	0,007
p,p'-DDE	0,008	0,0029	$2,6\ 10^{-05}$	0,011
o,p'-DDD	0,005	0,0137	$2,0\ 10^{-04}$	0,019
p,p'-DDD	0,013	0,0133	$2,0\ 10^{-04}$	0,026
o,p'-DDT	0,004	0,0206	$3,8\ 10^{-04}$	0,025
p,p'-DDT	0,005	0,0153	$2,8\ 10^{-04}$	0,021
Aldrín	0,011	0,0202	$4,9\ 10^{-04}$	0,032
Isodrín	0,033	0,0269	$1,1\ 10^{-03}$	0,061
Dieldrín	0,121	0,0894	$9,4\ 10^{-04}$	0,212
Endrín	0,248	0,0012	$1,7\ 10^{-03}$	0,251
Simazina	0,032	0,0085	$1,2\ 10^{-04}$	0,04
Atrazina	0,004	0,0099	$1,2\ 10^{-04}$	0,014
Terbutilazina	0,006	0,0115	$1,4\ 10^{-04}$	0,017
Metacloro	0,008	0,0076	$1,0\ 10^{-04}$	0,016
α-HCH	0,008	0,0098	$1,6\ 10^{-04}$	0,018
β-HCH	0,002	0,0129	$2,5\ 10^{-04}$	0,015
γ-HCH	0,004	0,018	$3,2\ 10^{-04}$	0,022
PCB 28	0,022	0,0045	$7,1\ 10^{-05}$	0,027
PCB 52	0,043	0,0071	$9,7\ 10^{-05}$	0,05
PCB 101	0,089	0,0036	$1,4\ 10^{-04}$	0,093
PCB 118	0,086	0,0039	$1,5\ 10^{-04}$	0,09
PCB 153	0,049	0,004	$1,2\ 10^{-04}$	0,053
PCB 138	0,152	0,0063	$1,9\ 10^{-04}$	0,158
PCB 180	0,017	0,0156	$2,9\ 10^{-04}$	0,033

Y la contribución global procedente de la calibración al proceso total de determinación de los compuestos organoclorados incluye por tanto la contribución con origen en la preparación de las correspondientes disoluciones de calibrado (tabla 32).

Tabla 32: Componentes de incertidumbre del proceso de calibrado en las medidas cromatográficas de los compuestos de interés.

Compuesto	$(u_{Cpat})^2/C^2_{pat}$	$(u_{Cx})^2/C^2_x$	u^2_x/x^2	u_x/x (%)
Pentaclorobenceno	0,0004	0,12	0,12	35
Hexaclorobenceno	0,0004	0,027	0,027	17
o,p'-DDE	0,0004	0,007	0,007	8
p,p'-DDE	0,0004	0,011	0,012	11
o,p'-DDD	0,0004	0,019	0,019	14
p,p'-DDD	0,0004	0,026	0,026	16
o,p'-DDT	0,0004	0,025	0,026	16
p,p'-DDT	0,0004	0,021	0,021	15
Aldrín	0,0004	0,032	0,032	18
Isodrín	0,0004	0,061	0,061	25
Dieldrín	0,0004	0,212	0,212	46
Endrín	0,0004	0,251	0,252	50
Simazina	0,0004	0,04	0,041	20
Atrazina	0,0004	0,014	0,014	12
Terbutilazina	0,0004	0,017	0,018	13
Metacloro	0,0004	0,016	0,016	13
α-HCH	0,0004	0,018	0,018	14
β-HCH	0,0004	0,015	0,016	13
γ-HCH	0,0004	0,022	0,023	15
PCB 28	0,0004	0,027	0,027	17
PCB 52	0,0004	0,05	0,05	22
PCB 101	0,0004	0,093	0,093	31
PCB 118	0,0004	0,09	0,091	30
PCB 153	0,0004	0,053	0,053	23
PCB 138	0,0004	0,158	0,159	40
PCB 180	0,0004	0,033	0,034	18

Los valores de incertidumbre asociados a la calibración del GC/MS para el análisis de los compuestos organoclorados recogidos en la tabla 31, establecen valores que oscilan entre el 10 – 20 %.

Hay que resaltar que el cálculo de esta contribución se ha realizado bajo condiciones reales de trabajo y no con disoluciones patrón. Se ha estudiado la variabilidad de diferentes calibrados a lo largo de 9 meses, en los cuales se han analizado por triplicado más de 70 muestras de lodos y más de 350 muestras de aguas

continentales contaminadas por compuestos organoclorados. De este modo, se pone claramente de manifiesto la robustez de la metodología analítica desarrollada.

Como se citó anteriormente, la incertidumbre asociada a la calibración del GC/MS presenta como principales contribuciones la incertidumbre de los patrones empleados para la calibración del equipo y la incertidumbre de la recta de calibrado: señal analítica, pendiente y ordenada. De todas ellas, la contribución asociada a la medida de la señal analítica es la que presentaba mayor incertidumbre y es la responsable de los valores de incertidumbre anómalos que han presentado algunos compuestos.

El Pentaclorobenceno ha presentado una incertidumbre del 35 %, principalmente debido a la contribución a la incertidumbre de la señal analítica. Se ha producido un incremento en la dispersión asociada a la medida analítica. Esta mayor dispersión se ha asociado a la volatilidad de este compuesto, ya que era el más volátil del conjunto de compuestos analizados.

El Dieldrín y el Endrín, dos compuestos estereoisómeros, han presentado incertidumbres próximas al 50 %. De igual modo, la contribución responsable de este aumento de la incertidumbre ha sido la mayor dispersión que se ha producido en la medida de analítica. Esta variabilidad está estrechamente ligada con la degradación que se produce en el sistema de inyección con estos compuestos [50]. El Endrín al ser calentado en sistema de inyección de un cromatógrafo de gases tiene mucha facilidad para degradarse y formar Endrín cetona y Endrín aldehído, por lo que se produce una variación en la cantidad de compuesto que entra en el sistema cromatográfico, y por consiguiente hay una variabilidad intrínseca en su análisis. La intensidad de la degradación de estos compuestos está relacionada con la presencia de puntos activos en el *liner* y en la cabeza de la columna. La presencia de estos puntos activos está estrechamente ligada con el número de análisis realizados y a los efectos de la matriz que puedan alterar el sistema de inyección. Esta variabilidad no puede eliminarse totalmente y debe ser controlada mediante el empleo de compuestos protectores de la columna cromatográfica y reemplazando los *liner* del sistema de inyección periódicamente. Se ha establecido que la variabilidad del Endrín debe mantenerse

inferior al 20 %. En caso de superarse se debe proceder al cambio del *liner* del sistema de inyección.

Algunos PCBs han presentado valores de incertidumbre superiores al 20 %, debido a la mayor dispersión que ha presentado la medida analítica de algunos compuestos. Los PCBs son los compuestos con mayor peso molecular y menos volatilidad de los compuestos estudiados, por lo que la volatilización e inyección de estos compuestos es más compleja. De forma general, la cantidad de compuesto que entra en el sistema cromatográfico está relacionada con la eficacia de la volatilización, que se ve afectada por las condiciones en las que se encuentre el sistema de inyección. Para los PCBs, cuya volatilización es más crítica, se ven más influenciados por las condiciones del sistema que el resto de compuestos. Así, la mayor variabilidad de estos compuestos se ha producido en aquellos casos en los que el sistema de inyección no estaba en las condiciones óptimas, bien por el número de muestras analizadas o por las interferencias que producen las matrices.

4.2.2. Incertidumbre asociada al análisis del material de referencia

4.2.2.1. Muestras de sedimentos

Se empleó como material de referencia un sedimento de aguas naturales procedente de CRM, CNS391. Las condiciones de tratamiento y análisis fueron las mismas que las aplicadas durante el análisis de las muestras de sedimentos.

El cálculo de incertidumbres asociadas (u^2_{mr}) se realizó considerando una contribución de tipo A, a partir de la desviación típica relativa obtenida tras el análisis de 4 alícuotas del material de referencia. Asimismo, debe tenerse en cuenta que este valor así deducido tendrá contribuciones del propio proceso de extracción del material de referencia, del proceso de concentración y del proceso de medida cromatográfica:

$$u^2_{mr} = u^2_{extmr} + u^2_{cc} + u^2_{cal}$$

Los análisis de materiales de referencia sólo pudieron llevarse a cabo para validar los datos de ciertos organoclorados. La tabla 33 recopila los cálculos y

correspondientes incertidumbres asociadas a la determinación de ciertos compuestos organoclorados en el material de referencia del sedimento de aguas naturales CNS391.

Tabla 33: Incertidumbre asociada a los análisis del material de referencia CNS391. Los valores de concentración están expresados en ng/g

Compuesto	(A)	(B)	(C)	(D)	Media	RSD	u_{mr}(%)
α-HCH	0,73	0,63	0,69	0,80	0,71	0,099	**6,9**
ß-HCH	1,26	1,17	1,16	1,22	1,20	0,039	**2,7**
γ-HCH	1,30	1,16	1,10	1,31	1,22	0,084	**5,9**
Hexaclorobenceno	0,37	0,30	0,33	0,43	0,36	0,152	**11**
o,p'-DDE	0,94	0,85	0,77	0,60	0,79	0,187	**13**
p,p'-DDE	1,07	0,96	0,88	0,75	0,91	0,146	**10**
o,p'-DDD	1,07	0,96	0,87	0,72	0,91	0,165	**12**
p,p'-DDD	1,02	0,92			0,97	0,067	**4,7**
o,p'-DDT	0,69	0,61	0,55	0,41	0,56	0,214	**15**
p,p'-DDT	1,18	1,14	1,10	1,00	1,10	0,071	**5,0**
PCB 28	1,02	0,87	0,89	0,88	0,92	0,076	**5,3**
PCB 52	1,22	1,04	1,04	0,82	1,03	0,159	**11**
PCB 101	1,18	1,02	0,95	0,69	0,96	0,211	**15**
PCB 118	1,39	1,22	1,15	0,88	1,16	0,184	**13**
PCB 138	1,25	1,11	0,85	0,76	0,99	0,226	**16**
PCB 153	0,65	0,56	0,81	0,68	0,68	0,152	**11**
PCB 180	0,86	0,76	0,71	0,64	0,74	0,127	**8,9**

4.2.2.2. Muestras de aguas continentales

Se ha empleado el material de referencia ERA 709. Este material de referencia se ha analizado por duplicado según las condiciones descritas en este procedimiento. El cálculo de la incertidumbre asociada (u^2_{mr}) se ha realizado del mismo modo que para el material de referencia de sedimentos.

La tabla 34 recoge el cálculo de las incertidumbres asociadas a la determinación de ciertos compuestos organoclorados en el material de referencia de aguas continentales.

Tabla 34: Incertidumbre asociada a los análisis del material de referencia ERA 709. Los valores de concentración están expresados en µg/L

Compuesto	Concentración (µg/L)				
	(A)	(B)	Media	RDS	u_{mr}(%)
ERA 709					
Simazina	2,35	2,26	2,31	3 %	**13**
Atrazina	2,95	2,76	2,86	5 %	**22**
γ-HCH	2,06	2,09	2,07	1 %	**4**
Hexaclorobenceno	1,65	1,79	1,72	6 %	**29**
Aldrín	1,15	1,20	1,17	3 %	**16**
Dieldrín	1,37	1,32	1,34	3 %	**12**
Endrín	2,88	3,05	2,97	4 %	**20**
Metacloro	7,59	7,23	7,41	3 %	**17**

Los resultados de la incertidumbre calculada son superiores a la de los sedimentos, debido a que se han podido realizar únicamente un duplicado, en lugar de cuatro réplicas. Así el factor *w* se ha tenido que considerar 7 en lugar de 1.7 que se ha considerado en los sedimentos.

4.2.3. Incertidumbre asociada al tratamiento de las muestras

4.2.3.1. Muestras de sedimentos

El cálculo de incertidumbres asociadas (u^2_{ms}) se realizó considerando la contribución de la precisión intermedia de acuerdo a la variabilidad experimental debida a los errores aleatorios y a las condiciones en las que se realizan los análisis, como día, calibrado, etc.

Para su cálculo se han considerado los valores de RSD deducidos a partir del análisis por duplicado de cada muestra de sedimento, agrupándolas y deduciendo el valor correspondiente de desviación típica relativa agrupada (RSD_{pooled}).

$$RSD_{pooled} = \sqrt{\frac{\sum RSD^2(n-1)}{\sum(n-1)}}$$

Análogamente al análisis del material de referencia, el valor así deducido incluye la componente del proceso de extracción de la muestra, la etapa de concentración y medida cromatográfica:

$$u^2_{trat\ muestra} = u^2_{ext\ muestra} + u^2_{cc} + u^2_{cal}$$

Como se ha indicado en la introducción del presente informe, el término se ha calculado como la precisión del método evaluada en condiciones intermedias. En particular, se han deducido los valores de RSD a partir de los resultados analíticos de dos alícuotas de un total de 33 muestras de sedimento de aguas naturales, recogidos en la tabla 23 del punto 4.1.4. del cálculo de la precisión intermedia del presente informe.

Los resultados finales de desviaciones típicas relativas agrupadas se han detallado en la tabla 24 de este informe.

4.2.3.2. Muestras de aguas continentales

El cálculo de la incertidumbre asociada al tratamiento de muestra se ha realizado considerando los valores de RDS obtenidos en el estudio de precisión intermedia recogido en el apartado 4.1.4. de este informe, concretamente los valores recogidos en la tabla 22.

Al igual que ocurría con el análisis de las muestras de sedimentos, el valor deducido está sobreestimado ya que esta componente incluye la etapa de extracción, concentración y el análisis cromatográfico, que ya ha sido estimado anteriormente.

4.2.4. Incertidumbre combinada

Una vez se han calculado las tres contribuciones identificadas como principales para el análisis de compuestos organoclorados en muestras de aguas continentales y sedimentos, se debe de calcular la incertidumbre combinada para cada compuesto en las dos matrices.

Hay que resaltar que las tres contribuciones evaluadas están sobreestimadas, ya que las contribuciones asociadas al análisis de los materiales de referencia y a la precisión intermedia incluyen la incertidumbre asociada al análisis cromatográfico. Además en el análisis de la incertidumbre asociada a la calibración del GC/MS se han sobreestimado algunos cálculos, según ha quedado recogido en el último informe de

EURACHEM [41]. La incertidumbre combinada, expresada como incertidumbre relativa, se calcula según la siguiente expresión:

$$u_c(analito) = \sqrt[2]{u_{cal}^2 + u_{mr}^2 + u_{pre}^2}$$

En la tabla 35 se recoge las tres contribuciones asociadas al análisis de varios pesticidas organoclorados en aguas continentales, así como la incertidumbre combinada.

Tabla 35: Resumen de las principales contribuciones de incertidumbre asociadas al análisis de pesticidas en aguas continentales y el valor deducido como incertidumbre combinada

	U_{cal} (%)	U_{mr} (%)	U_{pre} (%)	U_c (%)
o,p'-DDE	8	-	8	**11**
p,p'-DDE	11	-	10	**15**
o,p'-DDD	14	-	12	**18**
p,p'-DDD	16	-	19	**25**
o,p'-DDT	16	-	8	**18**
p,p'-DDT	15	-	20	**25**
Dieldrín	46	12	12	**49**
Endrín	50	20	22	**58**
Aldrín	18	16	8	**25**
Isodrín	25	-	12	**28**
Simazina	20	13	12	**27**
Atrazina	12	22	10	**27**
Terbutilazina	13	-	10	**16**
Metacloro	13	17	8	**23**
Hexaclorobenceno	17	29	9	**35**
α-HCH	14	7	20	**25**
β-HCH	13	-	18	**22**
γ-HCH	15	4	18	**24**

La incertidumbre asociada al análisis de los derivados del DDT en aguas continentales es inferior al 25 % para todos los compuestos. De todos los isómeros, el p,p'-DDT es el que ha presentado mayor incertidumbre en su medida, en parte debido a los problemas que tiene el análisis de este compuesto mediante cromatografía de gases. Como se comentó anteriormente este compuesto puede ser degradado en el sistema de inyección y formar p,p'-DDD. Se ha comprobado que el p,p'-DDD ha presentado la mayor contribución a la incertidumbre en el término de la precisión

intermedia, posiblemente debido a que parte del p,p'-DDT se ha degradado y ha formado p,p'-DDD.

En el caso de los derivados del Lindano, la incertidumbre asociada a su análisis está en torno al 20 %, mientras que para el Hexaclorobenceno alcanza un valor del 35 %, en parte debido a la incertidumbre asociada al análisis del material de referencia. No obstante, esta incertidumbre está sobre estimada ya que se han analizado únicamente un duplicado y el término de incertidumbre tuvo que ser multiplicado por un factor de corrector w=7, de acuerdo a la desviación estándar muestral resumido en la tabla 27.

La incertidumbre de los derivados de la Atrazina están en torno al 20 %, siendo mayor en el caso de la Simazina, debido a que este compuesto presentó una mayor dificultad en su análisis cromatográfico, como quedó demostrado en el apartado 4.1.6 de este procedimiento, donde este compuesto presentó la menor sensibilidad.

La incertidumbre combinada del Dieldrín y Endrín son muy elevadas, debido principalmente al error que se comete en su análisis cromatográfico, como se comentó en el apartado 4.2.1.2.2. El motivo de que estos compuestos presentasen una contribución tan elevada se debe a que en algunos de sus calibrados, existieron datos anómalos, como se puede observar en la figura 6. La existencia de estos datos anómalos son los causantes de que su incertidumbre sea mucho más elevada que para el resto de compuestos. Un valor más real sería la incertidumbre asociada a la precisión intermedia, donde estos compuestos han presentado una contribución en torno al 20 %.

En la tabla 36 se resumen las principales contribuciones de incertidumbre identificadas en el análisis de compuestos organoclorados en muestras de sedimentos. En este caso, no tiene sentido calcular la incertidumbre combinada de las tres principales contribuciones consideradas, ya que la incertidumbre asociada a la precisión en condiciones intermedias se ha estimado en base al análisis de muestras reales de sedimentos contaminados con compuestos organoclorados en muy diferentes concentraciones y a lo largo del tiempo. Este valor calculado tiene por tanto

en consideración la contribución asociada al análisis de estos compuestos a lo largo del tiempo, así como la incertidumbre asociada a la propia matriz en la que están adsorbidos los analitos de interés en diferentes niveles de concentración.

De este modo la incertidumbre asociada al análisis del material de referencia y al calibrado pueden considerase tan solo como una aproximación de la considerada tras el análisis de estos compuestos en matrices limpias. En contraste, el estudio de variabilidad de los resultados obtenidos del análisis de estos compuestos en matrices altamente contaminadas y heterogéneas puede considerase como una aproximación de la influencia que tiene los significativos efectos de la matriz, como ha quedado demostrado durante el estudio de sesgos asociados a la matriz (apartado 4.1.2.2.).

Tabla 36: Principales incertidumbres asociadas al análisis de compuestos organoclorados en sedimentos

	U_{cal} (%)	U_{mr} (%)	U_{pre} (%)
o,p'-DDE	8	13	23
p,p'-DDE	11	10	24
o,p'-DDD	14	12	23
p,p'-DDD	16	5	36
o,p'-DDT	16	15	54
p,p'-DDT	15	5	63
PCB 28	17	5	27
PCB 52	22	11	24
PCB 101	31	15	30
PCB 118	30	13	24
PCB 153	23	16	32
PCB 138	40	11	37
PCB 180	18	9	33
Pentaclorobenceno	35	-	43
Hexaclorobenceno	17	11	39
α-HCH	14	7	31
β-HCH	13	3	36
γ-HCH	15	6	25

5. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método de análisis para determinar el nivel de ciertos compuestos organoclorados de interés medioambiental en muestras de aguas continentales y en sedimentos. El tratamiento de muestra se ha optimizado en función de la matriz analizada. Así el análisis de pesticidas organoclorados en aguas continentales se basa en una extracción en fase sólida seguida del análisis cromatográfico, mientras que el análisis de compuestos organoclorados en sedimentos se basa en la extracción con disolventes orgánicos mediante la aplicación conjunta y repetida de agitación mecánica y ultrasonidos, seguida del análisis cromatográfico.

El método desarrollado permite cuantificar el contenido de o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT, Hexaclorobenceno, Dieldrín, Endrín, Isodrín, Aldrín, Simazina, Atrazina, Terbutilazina, Metacloro, α-HCH, β-HCH y γ-HCH presente en aguas continentales a nivel de ng/L. Además se cuantifica el contenido de o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT, Hexaclorobenceno, Pentaclorobenceno, PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-118, PCB-153, PCB-138, PCB-180, α-HCH, β-HCH y γ-HCH en sedimentos a nivel de ng/g.

Se han validado los dos procedimientos desarrollados. Para ello se han determinado y demostrado la linealidad, la recuperación, trazabilidad, exactitud, precisión intermedia, reproducibilidad, robustez y se han establecido los límites de detección y cuantificación. Estos parámetros se han determinado a lo largo de un periodo de nueve meses, en los que el procedimiento ha sido empleado para el estudio del nivel de compuestos organoclorados en muestras reales.

Se ha comprobado la existencia de la degradación de ciertos compuestos organoclorados en el sistema de inyección. La inyección continua de muestras con diferentes niveles de estos compuestos genera puntos activos en el *liner* del sistema de inyección que produce la degradación de algunos compuestos como el Endrín, o,p'-DDT y el p,p'-DDT, además de disminuir la sensibilidad de los compuestos más pesados, principalmente los PCBs. Se ha establecido que cada 2-3 semanas o 50 inyecciones, el *liner* del sistema de inyección debe ser reemplazado.

Debido a que las matrices sólidas pueden presentar un mayor efecto matriz, se ha evaluado la presencia de sesgos que pudieran interferir en la aplicación del procedimiento desarrollado. Se ha demostrado que en el caso de muestras muy heterogéneas y con altas concentraciones de compuestos organoclorados, el procedimiento debe ser modificado levemente. La principal conclusión de este estudio fue la necesidad de utilizar alícuotas por encima de 1,5 gramos para evitar o reducir la presencia de sesgo constante en el resultado final de concentración.

Cabe mencionar que la muestra de lodo que fue seleccionada para este estudio tenía elevados niveles y alto potencial de heterogeneidad en su matriz, con el objetivo estudiar el alcance de dicho protocolo analítico. Las diferencias encontradas en el niveles encontrados pueden justificarse en base a la significativa heterogeneidad que presenta esta muestra, lo que implicaría la necesidad de utilizar alícuotas suficientemente grandes o un tratamiento previo de homogeneización de las misma. Si bien el análisis de esta muestra altamente contaminada puede considerarse como excepcional, sí deja constancia de la importante influencia que tiene la selección del tamaño de alícuota en los resultados finales y, en consecuencia, la presencia de un significativo sesgo en los mismos cuando los niveles de concentración son elevados. En esta situación debe revisarse cuidadosamente el protocolo analítico para minimizar la existencia de dicho sesgo, estableciendo necesariamente los niveles de concentración y la contribución de incertidumbre asociada.

Se ha procedido a evaluar y cuantificar la incertidumbre asociada a la medida de los compuestos organoclorados presentes en las matrices de interés. Debido a las características de las matrices el tratamiento de las incertidumbres ha sido diferente en función de la matriz en la que estaban los compuestos analizados.

Para la determinación de la incertidumbre asociada al análisis de pesticidas organoclorados en muestras de aguas continentales se han identificado tres contribuciones principales: Incertidumbre asociada al proceso de calibración y análisis cromatográfico con detector de espectrometría de masas, la incertidumbre asociada al análisis del material de referencia y la incertidumbre asociada a la recuperación establecida mediante un estudio de precisión intermedia. El resto de contribuciones de

incertidumbre han sido descartadas en base a la experiencia de los autores en otros estudios donde ha quedado demostrada que esas incertidumbres no eran significativas.

Se ha calculado la incertidumbre combinada para varios pesticidas organoclorados y ha quedado establecida entre el 10 – 30 %, lo que demuestra la calidad de las medidas realizadas para determinar estos compuestos en muestras de aguas continentales contaminadas con pesticidas a nivel de ng/L mediante el procedimiento desarrollado.

El estudio de estas incertidumbres ha sido sobreestimada en algunos casos lo que explica los valores de incertidumbre combinada asociada al Endrín, Dieldrín y Hexaclorobenceno. La incertidumbre asociada al Hexaclorobenceno se debe a la contribución del análisis del material de referencia. El valor obtenido es superior debido al factor de corrección empleado en su cálculo (w=7), que según las últimas directrices de dadas por EURACHEM puede ser omitido ya que genera una sobreestimación de la medida. En el caso de los valores del Endrín y Dieldrín, su mayor incertidumbre se debe al análisis cromatográfico. Como se explicó a lo largo de este documento, estos compuestos tienen menor sensibilidad y se pueden producir alteraciones en el sistema de inyección. En el cálculo de la incertidumbre se han incluido todos los valores obtenidos, incluyendo aquellos en los que el sistema de inyección no estaba en condiciones óptimas y producía valores anómalos que obligaban a cambiar el *liner* del sistema de inyección.

La evaluación de la incertidumbre asociada al análisis de compuestos organoclorados en muestras de sedimentos se ha centrado en determinarla de dos formas complementarias, debido a la dificultad analítica que potencialmente presentan las matrices sólidas.

Por un lado se ha identificado y calculado las contribuciones a la incertidumbre asociadas al calibrado y análisis cromatográfico con detección de espectrometría de masas y la contribución del análisis del material de referencia. Esta incertidumbre calculada puede asociarse con el análisis de estos compuestos en matrices de

sedimentos homogéneos y con bajos niveles de concentración. Según este cálculo, las incertidumbres están en torno al 20 – 30 %, lo que está en concordancia con la dificultad analítica que conlleva estos análisis a nivel de ng/g.

Por otro lado se ha evaluado la incertidumbre asociada al análisis de un conjunto de muestras de sedimentos de diferente naturaleza y concentración de compuestos organoclorados analizados repetidamente a lo largo de 9 meses, de acuerdo a un estudio de repetitividad. Esta contribución a la incertidumbre pone de manifiesto la dificultad añadida que conlleva el análisis de muestras más heterogéneas y cuantifica el efecto de la matriz en el análisis de estos compuestos mediante el procedimiento desarrollado. Los valores obtenidos mediante esta aproximación son superiores a los calculados mediante la anterior evaluación de la incertidumbre. Gracias a este estudio ha quedado demostrada la variabilidad que existe en el análisis de compuestos orgánicos como pesticidas y PCBs en matrices complejas y heterogéneas, que normalmente en otros estudios no ha sido contemplado.

6. ANEXOS

Anexo A: Patrones comerciales.

Pesticide Mix-5 (10 mL Ciclohexano)	Número CAS	Concentración (ng/µL)
o,p'-DDE	3424-82-6	10
p,p'-DDE	72-55-9	10
o,p'-DDD	53-19-0	10
p,p'-DDD	72-54-8	10
o,p'-DDT	789-02-6	10
p,p'-DDT	50-29-3	10
Dieldrín	60-57-1	10
Endrín	72-20-8	10

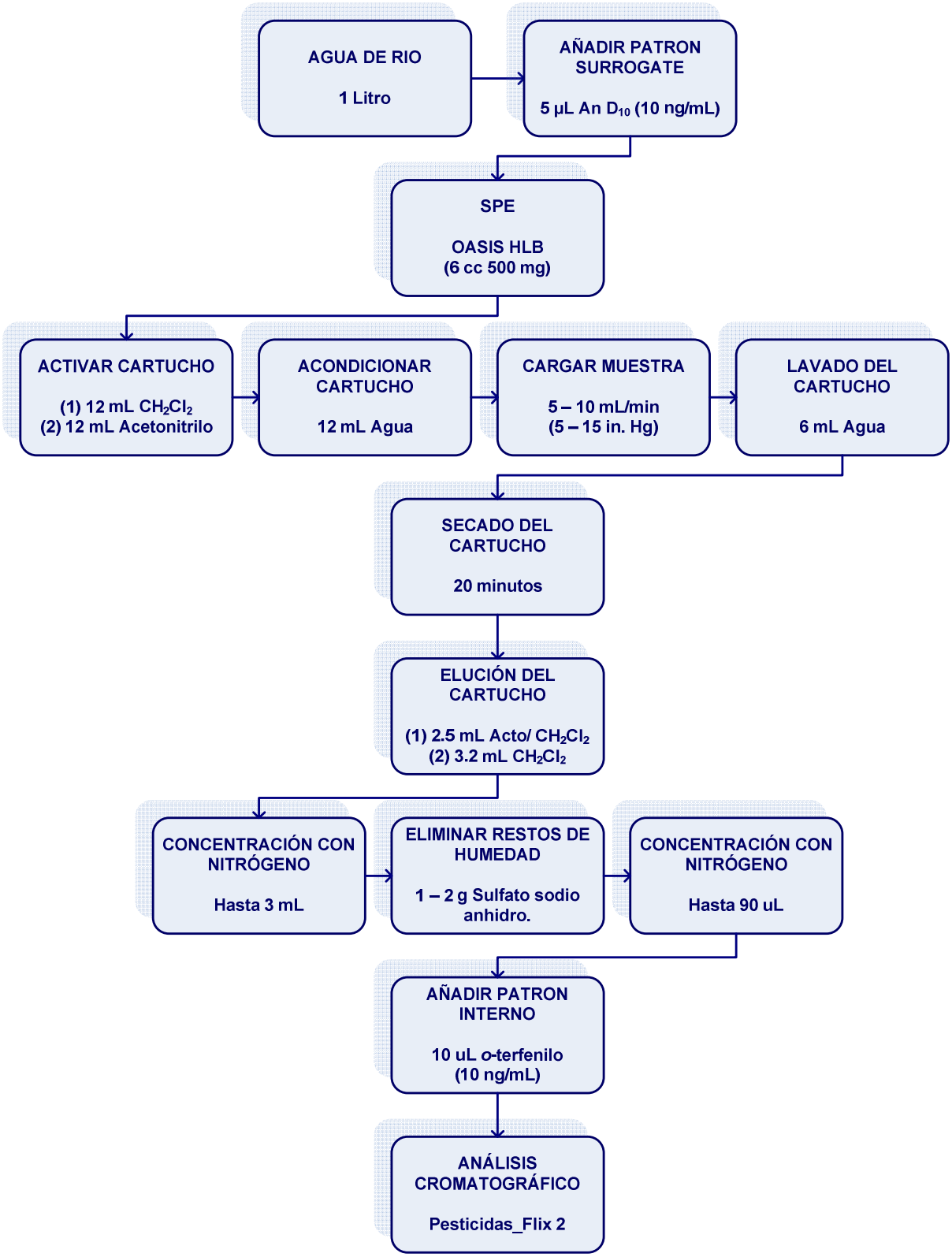
Pesticide Mix-7 (10 mL Ciclohexano)	Número CAS	Concentración (ng/µL)
α-HCH	319-84-6	10
β-HCH	319-85-7	10
δ-HCH	319-86-8	10
γ-HCH	58-89-9	10

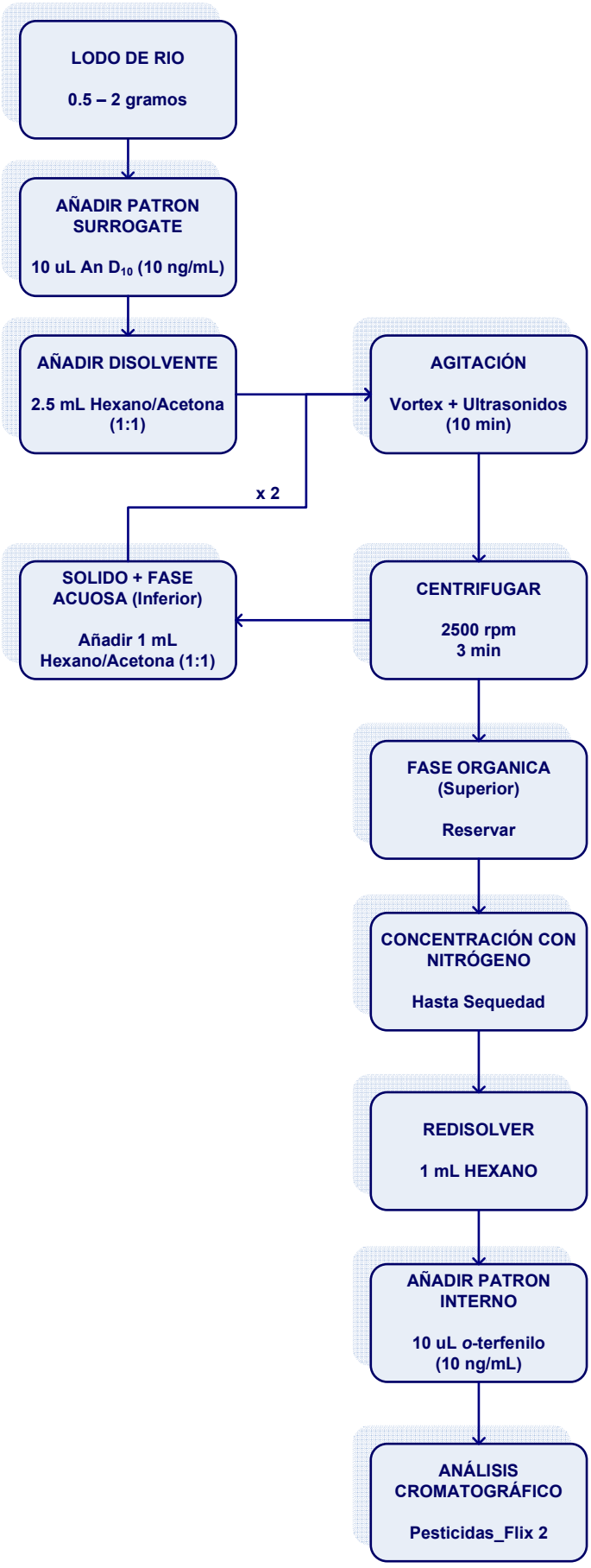
Pesticide Mix-31 (10 mL acetona)	Número CAS	Concentración (ng/µL)
Atrazina	1912-24-9	10
Atrazina desetil	6190-65-4	10
Metazacloro	67129-08-2	10
Metacloro	51218-45-2	10
Simazina	122-34-9	10
Terbutilazina	5915-41-3	10

Pesticide Mix-33 (1 mL iso-octano)	Número CAS	Concentración (ng/µL)
Aldrín	309-00-2	10
p,p'-DDD	72-54-8	10
p,p'-DDE	72-55-9	10
p,p'-DDT	50-29-3	10
Diclorobenil	1194-65-6	10
Dieldrín	60-57-1	10
α-endosulfan	959-98-8	10
Endrín	72-20-8	10
α-HCH	319-84-6	10
β-HCH	319-85-7	10
γ-HCH	58-89-9	10
Heptacloro	76-44-8	10
Heptacloro-exo-epoxido	1024-57-3	10
Heptacloro-endo-epoxido	28044-83-9	10
Hexaclorobenceno	118-74-1	10
Hexacloro-1,3-butadieno	87-68-3	10
Isobenzan	297-78-9	10
Isodrín	465-73-6	10
Quintozeno	82-68-8	10
PCB 28	7012-37-5	10
PCB 52	35693-99-3	10
PCB 101	37680-73-2	10
PCB 118	31508-00-6	10
PCB 138	35065-28-2	10
PCB 153	35065-27-1	10
PCB 180	35065-29-3	10

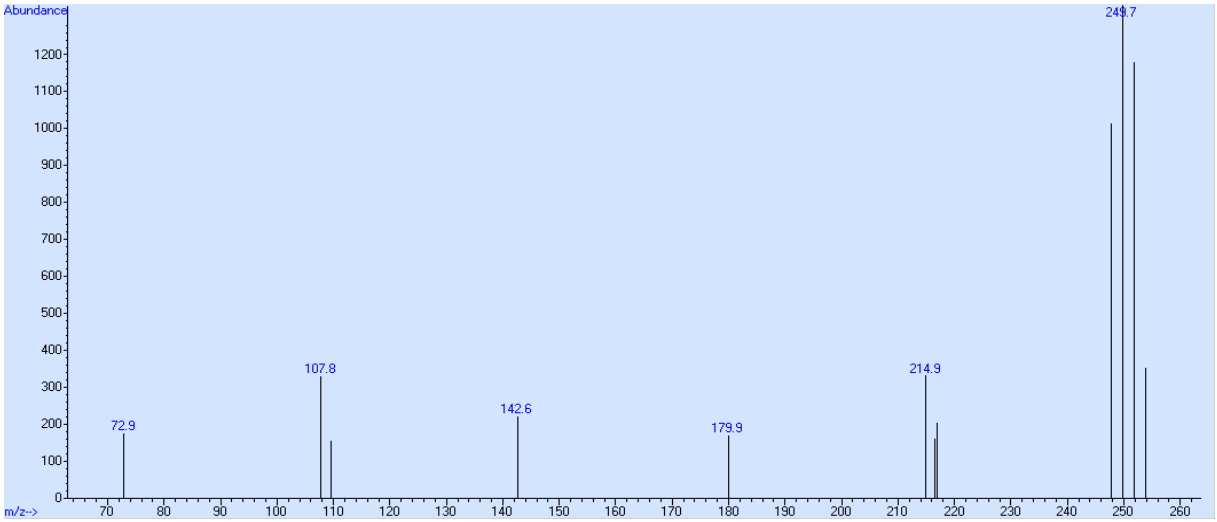
Pesticide (10 mL Ciclohexano)	Número CAS	Concentración (ng/µL)
Pentaclorobenceno	608-93-5	10
Pentaclorofenol	87-86-5	10

Anexo B: Esquema de los métodos de análisis.

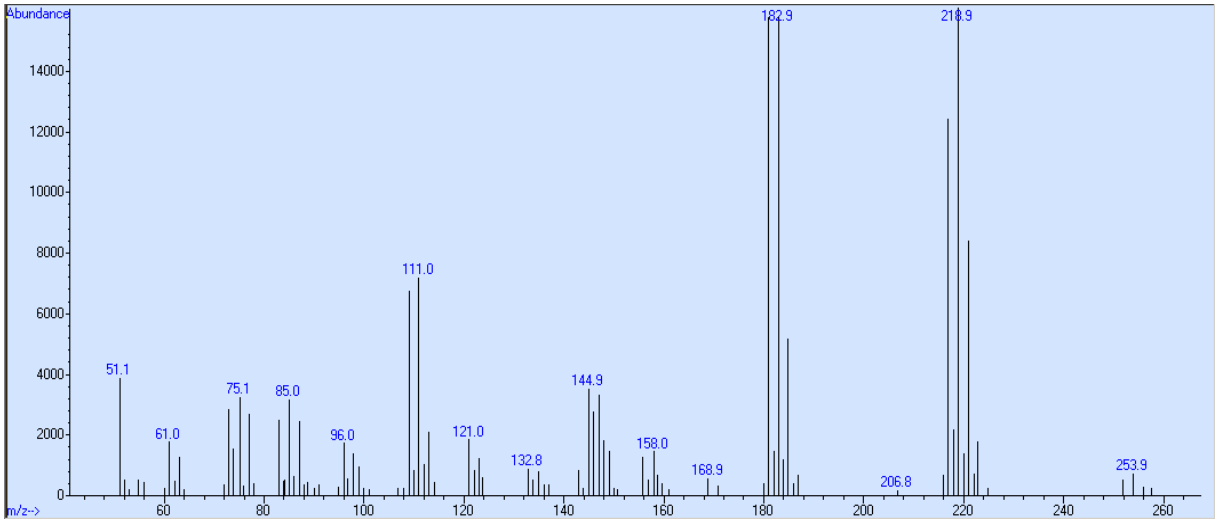



LODO DE RIO
0.5 – 2 gramos
AÑADIR PATRON SURROGATE
10 uL An D_{10} (10 ng/mL)
AÑADIR DISOLVENTE
2.5 mL Hexano/Acetona (1:1)
AGITACIÓN
Vortex + Ultrasonidos (10 min)
x 2
SOLIDO + FASE ACUOSA (Inferior)
Añadir 1 mL Hexano/Acetona (1:1)
CENTRIFUGAR
2500 rpm
3 min
FASE ORGANICA (Superior)
Reservar
CONCENTRACIÓN CON NITRÓGENO
Hasta Sequedad
REDISOLVER
1 mL HEXANO
AÑADIR PATRON INTERNO
10 uL o-terfenilo (10 ng/mL)
ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO
Pesticidas_Flix 2

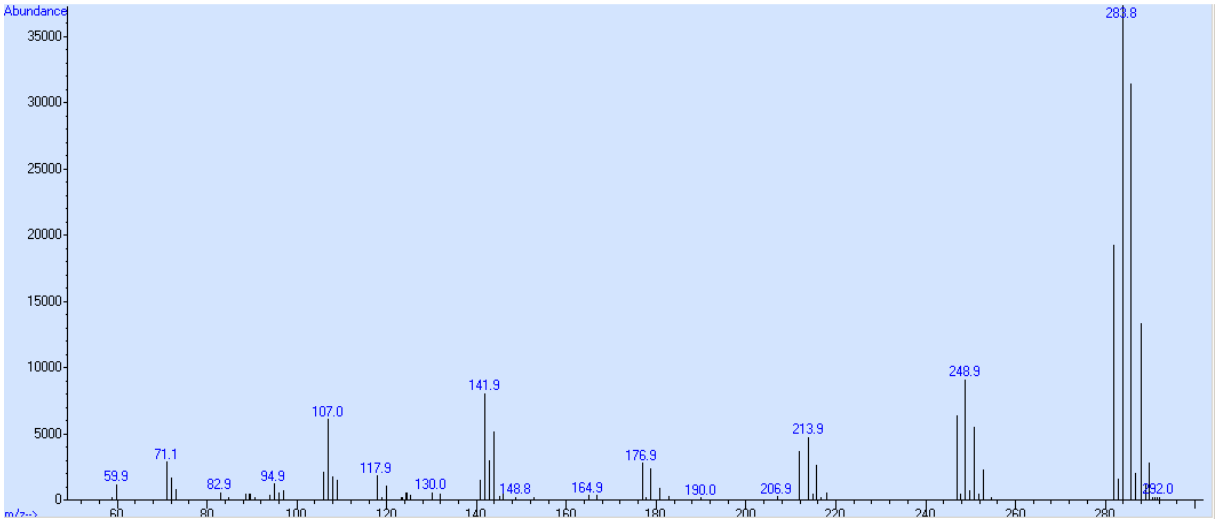
Anexo C: Espectros de masas.



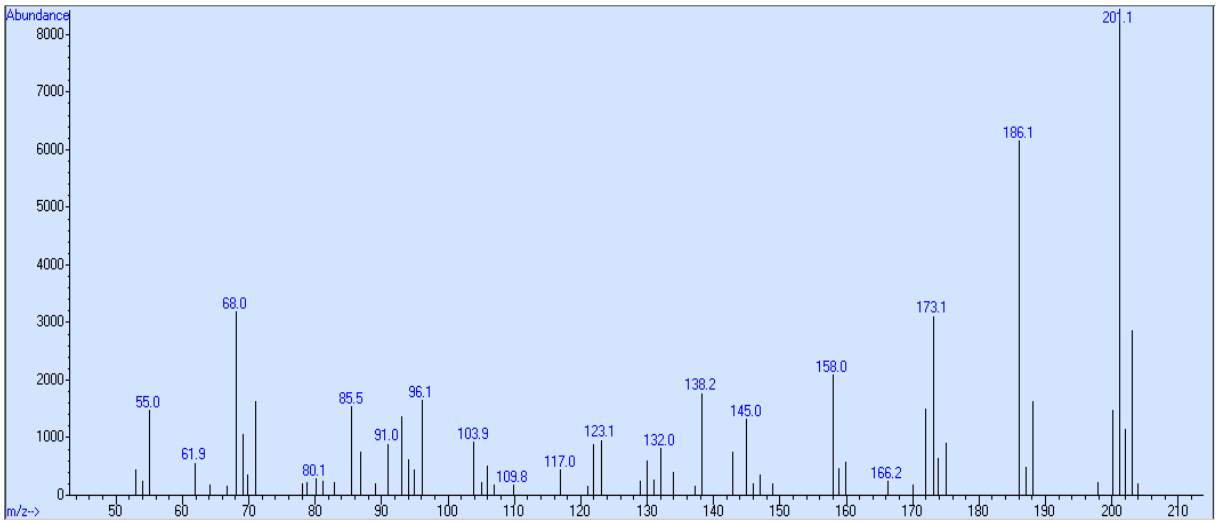
Espectro de masas del Pentaclorobenceno.



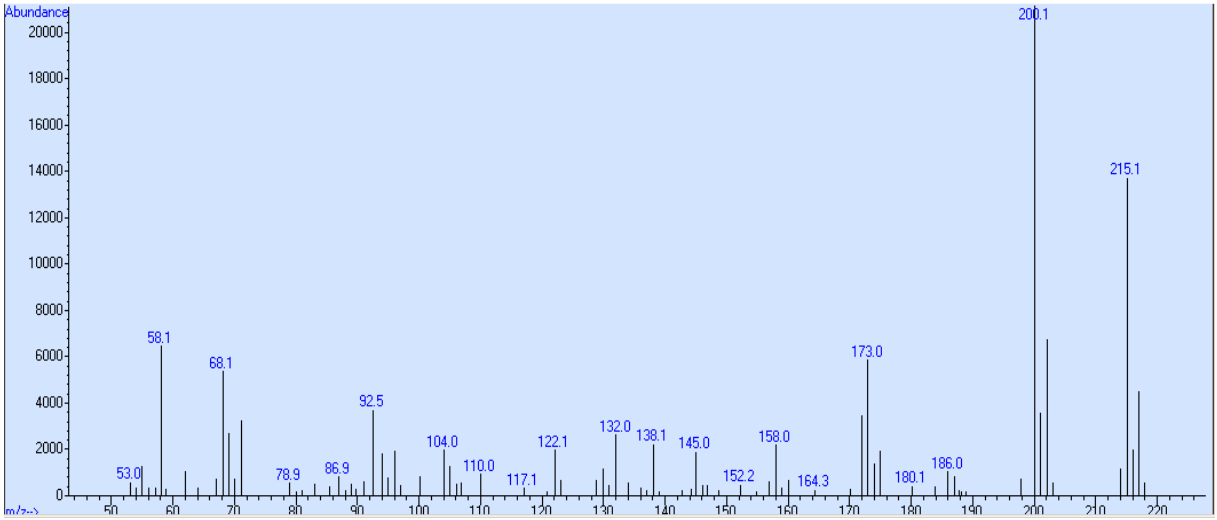
Espectro de masas del α-HCH.



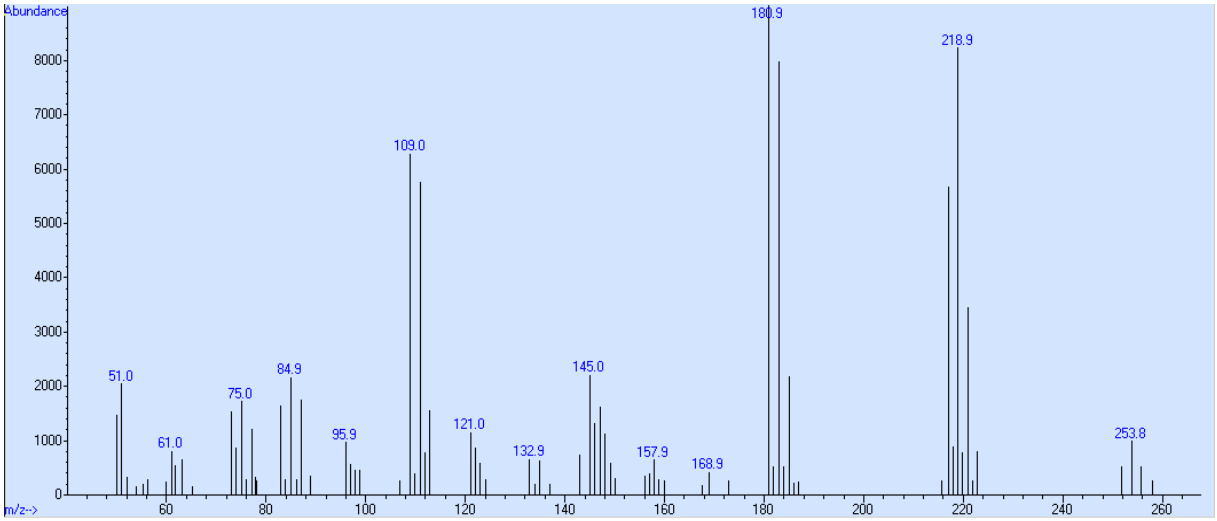
Espectro de masas del Hexaclorobenceno.



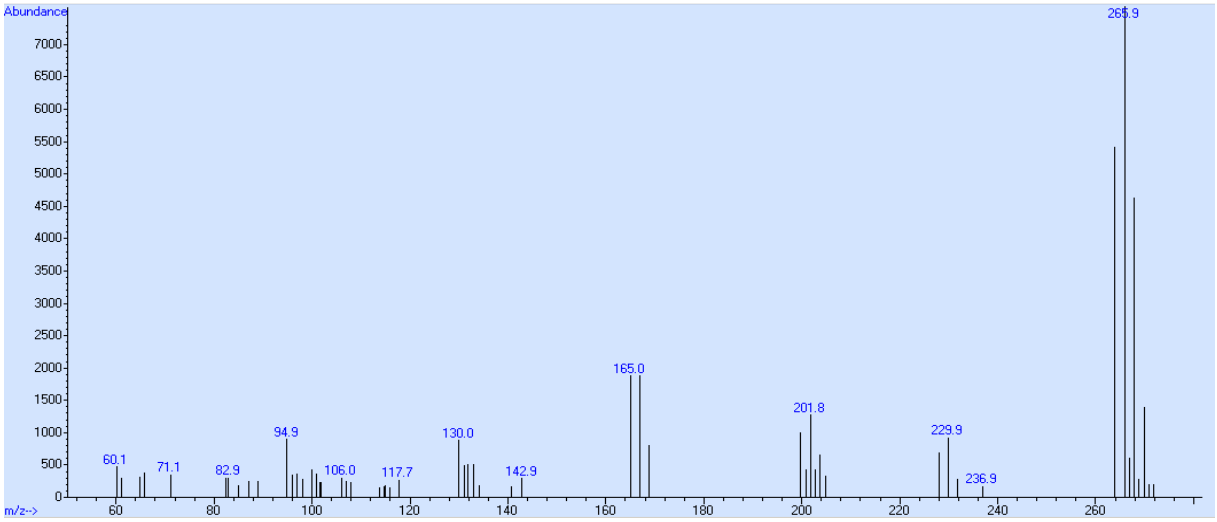
Espectro de masas de la Simazina.



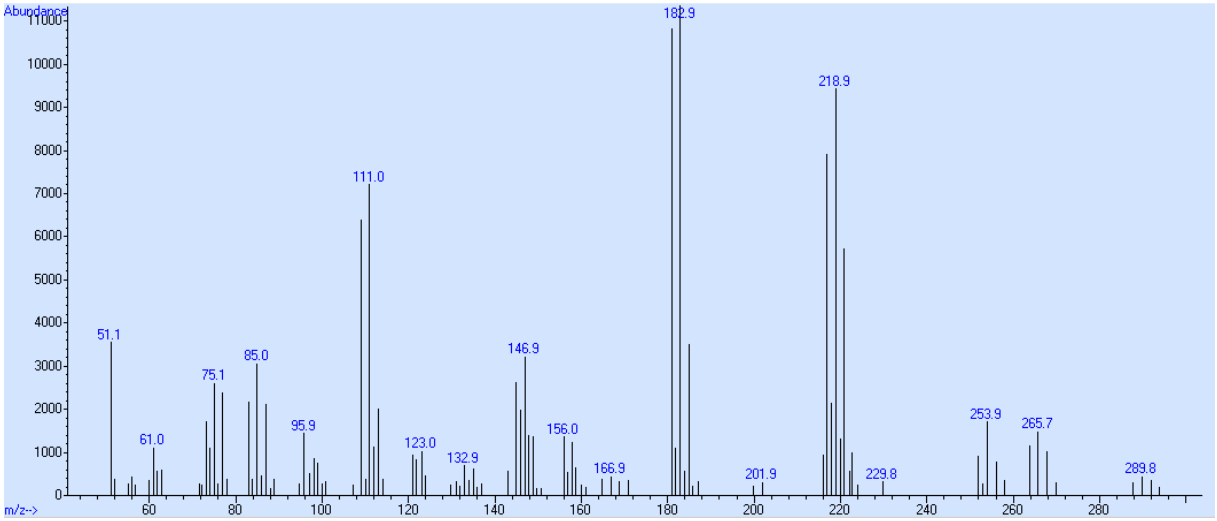
Espectro de masas de la Atrazina.



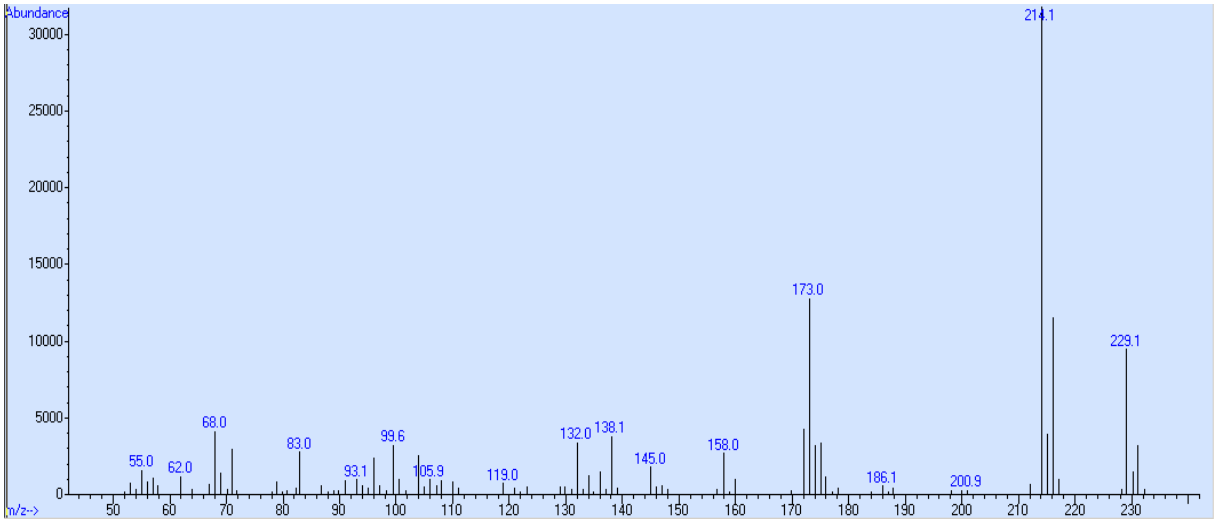
Espectro de masas del β-HCH.



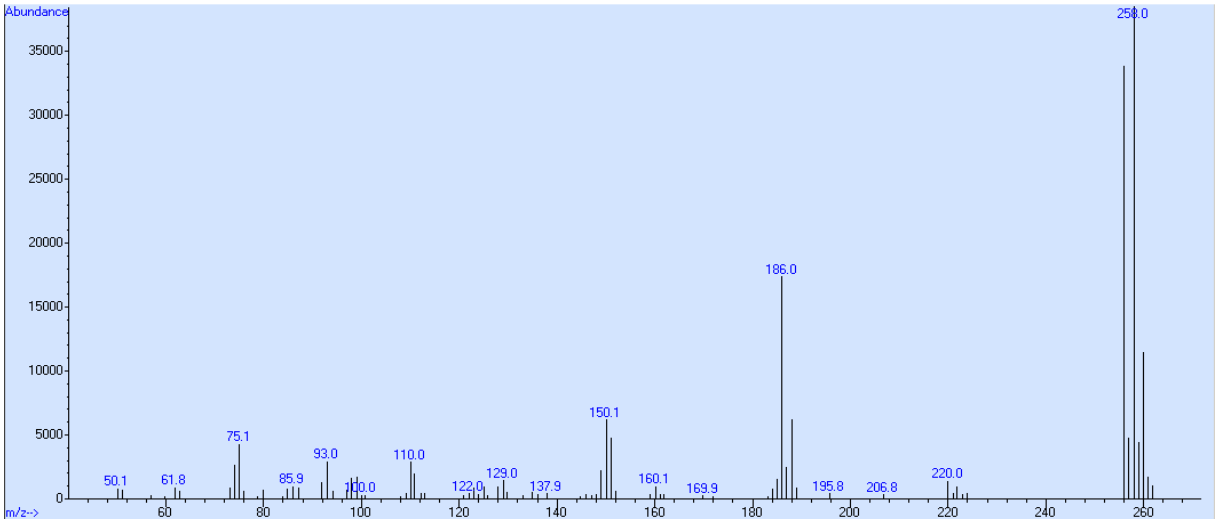
Espectro de masas del Pentaclorofenol.



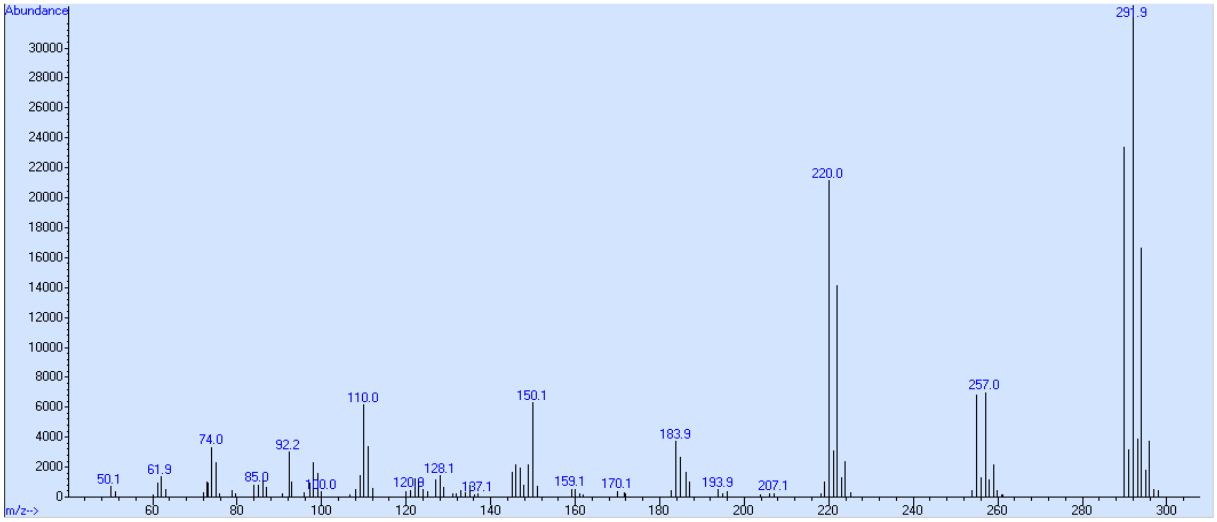
Espectro de masas del γ-HCH.



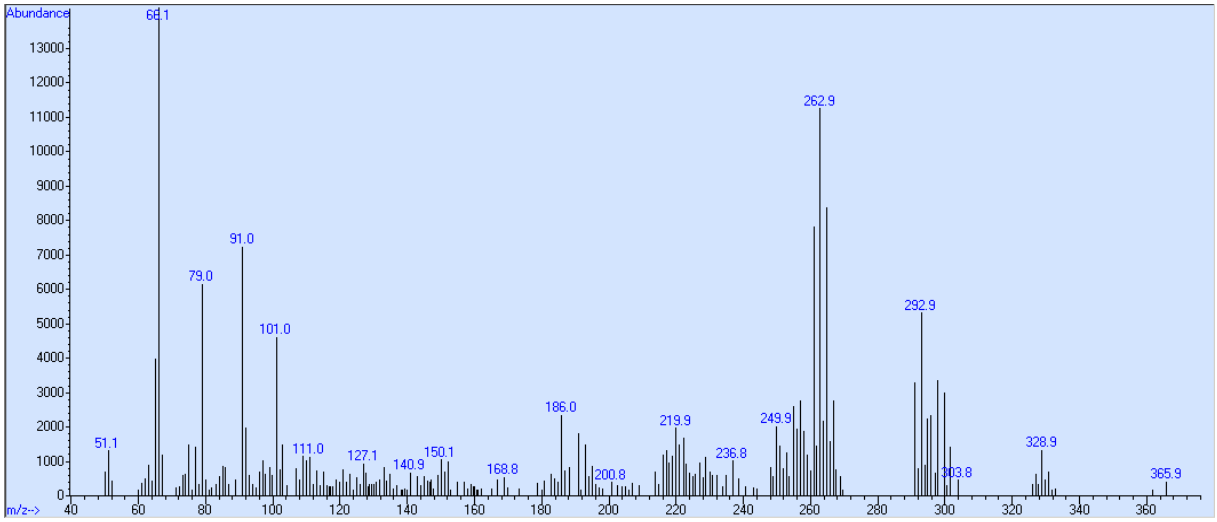
Espectro de masas de la Terbutilzaina



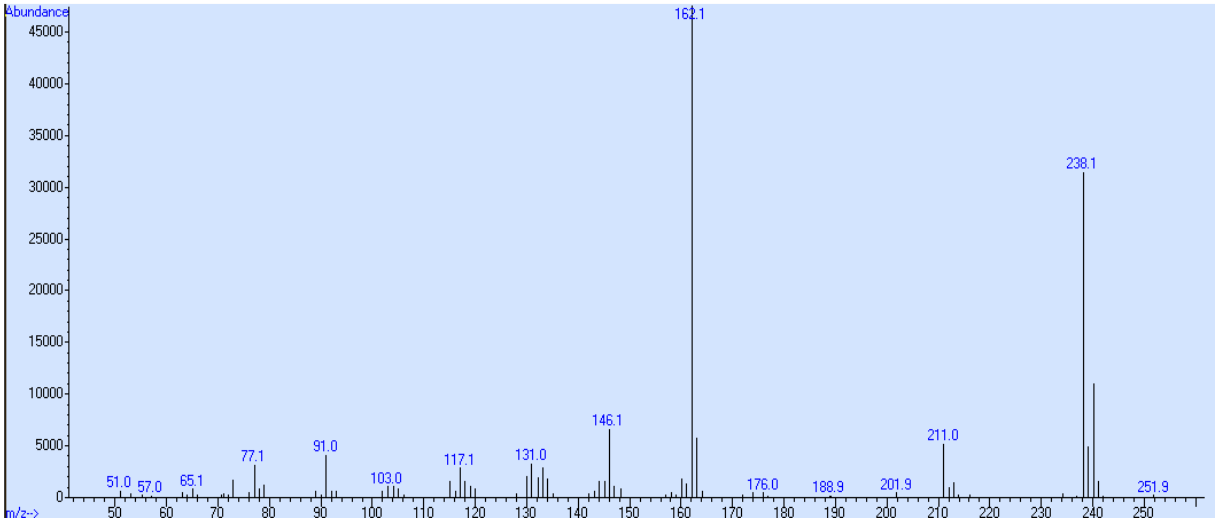
Espectro de masas del PCB-28.



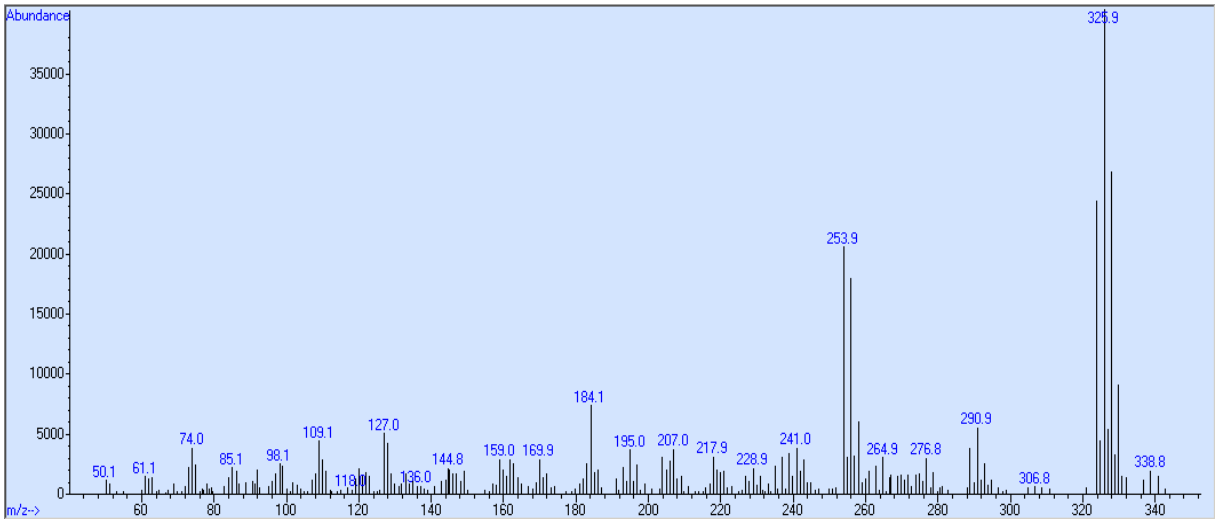
Espectro de masas del PCB-52.



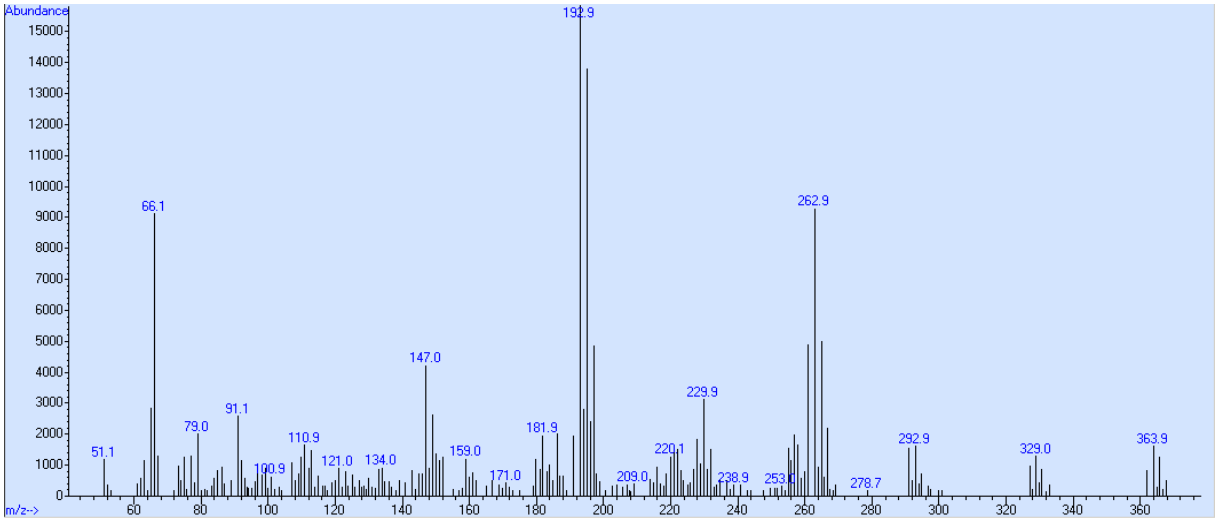
Espectro de masas del Aldrin.



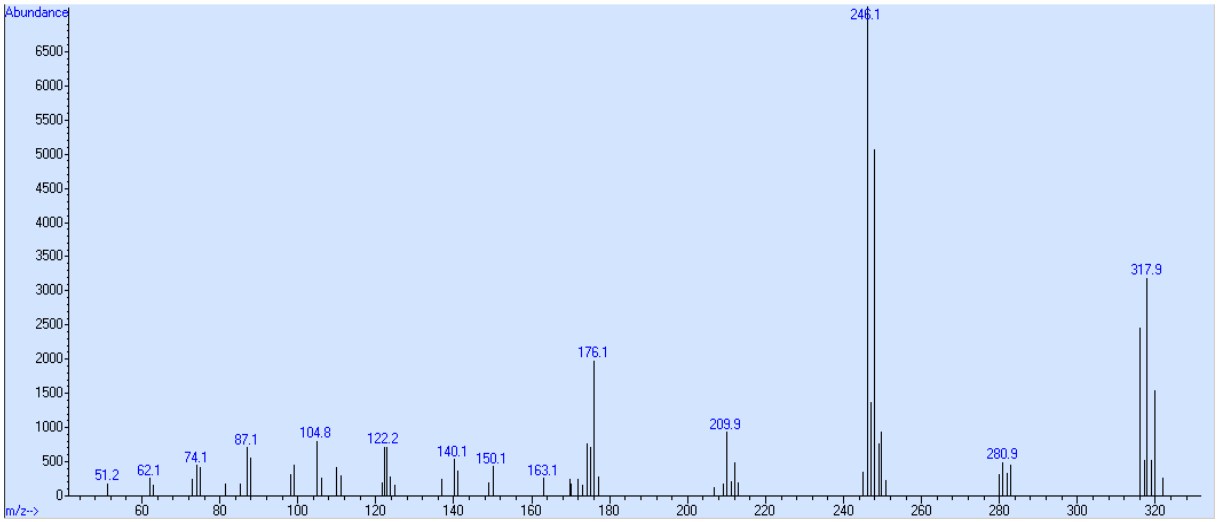
Espectro de masas del Metacloro.



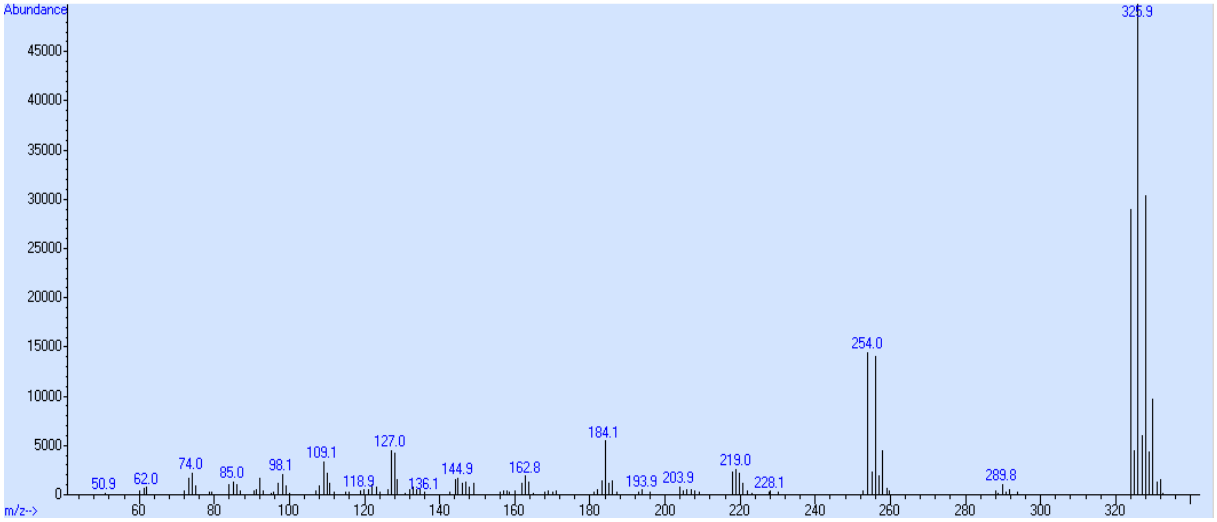
Espectro de masas del PCB-101.



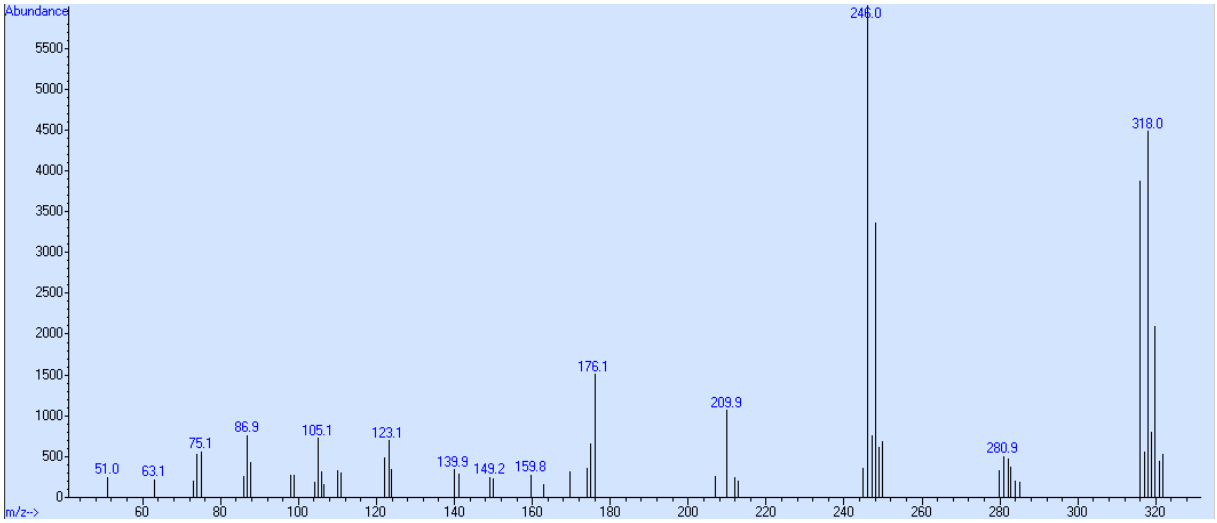
Espectro de masas del Isodrin.



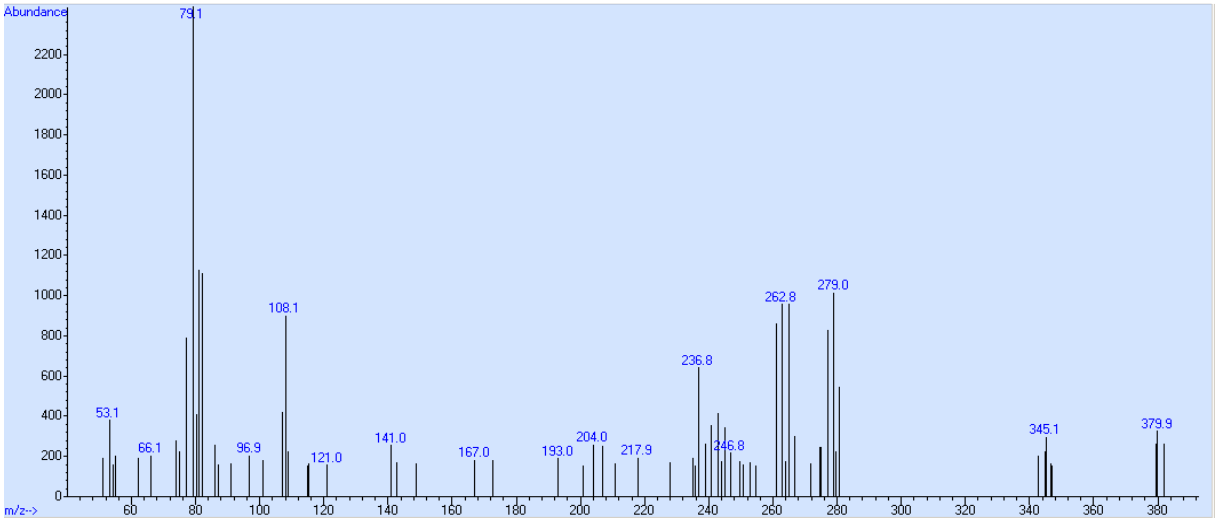
Espectro de masas del o,p'-DDE.



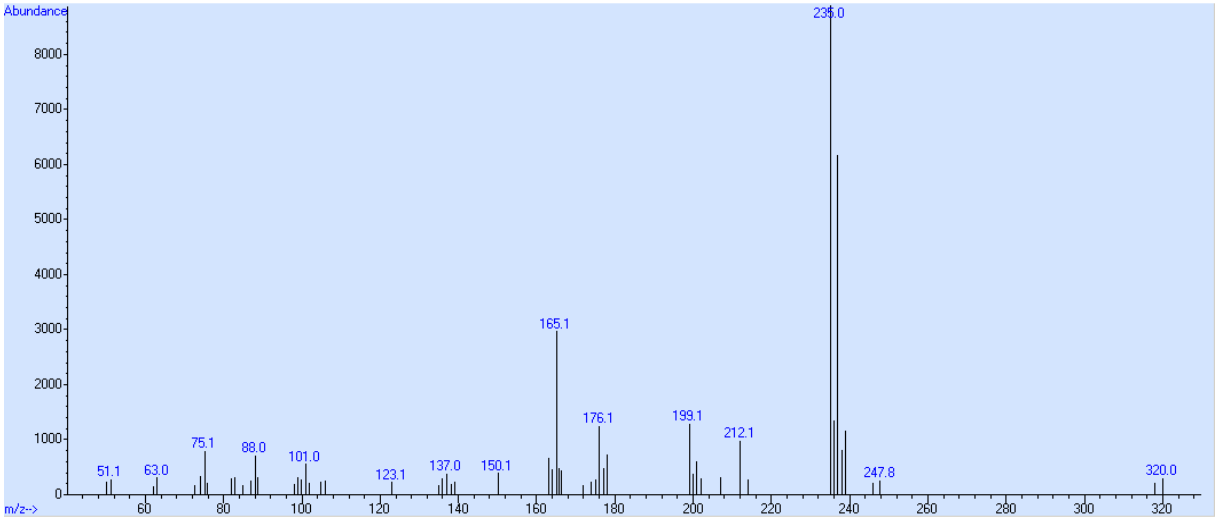
Espectro de masas del PCB-118.



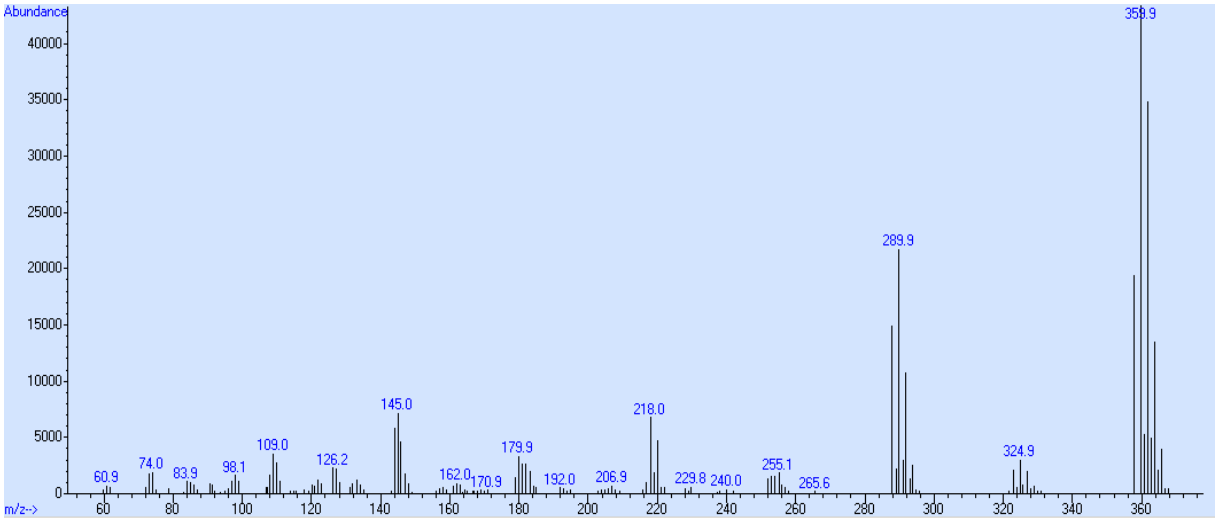
Espectro de masas del p,p'-DDE.



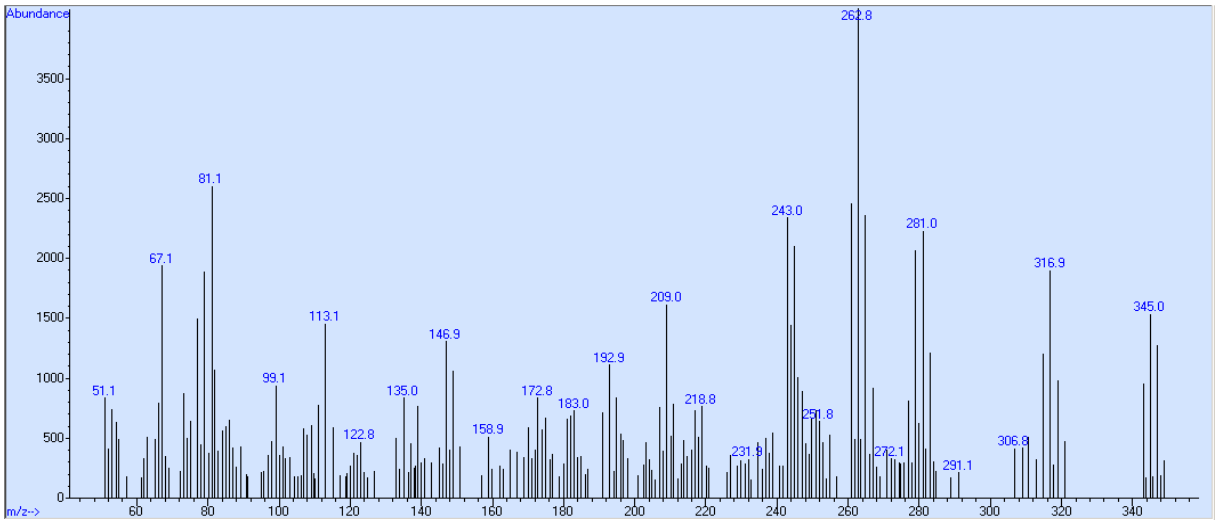
Espectro de masas del Dieldrin.



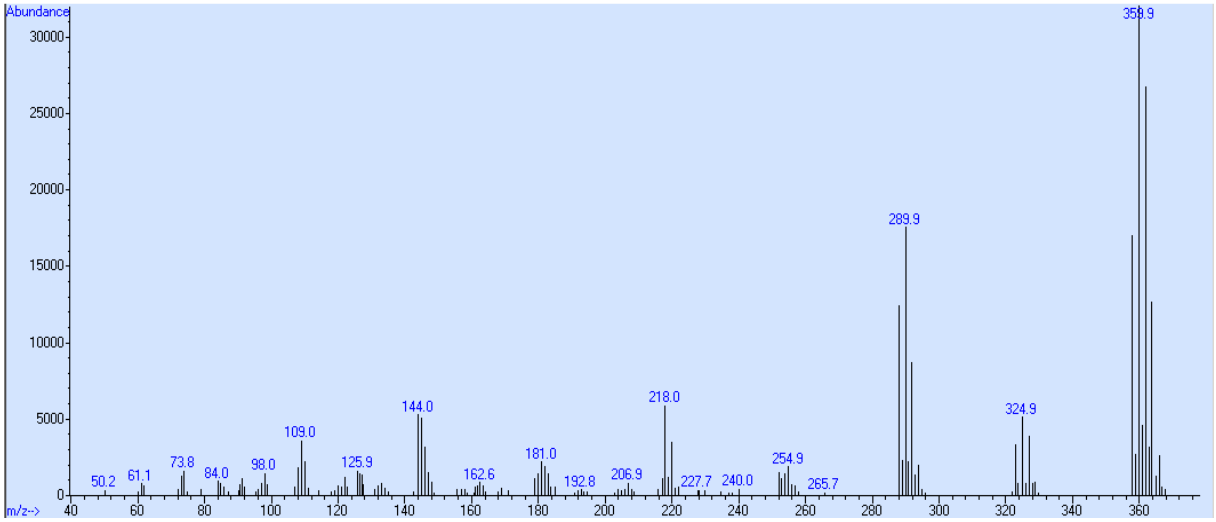
Espectro de masas del o,p'-DDD.



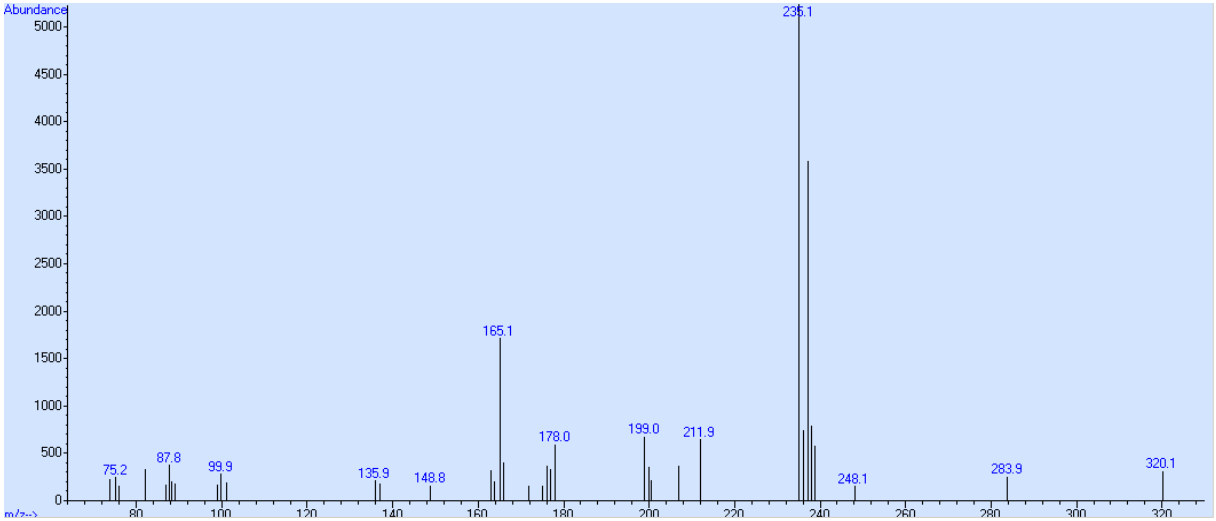
Espectro de masas del PCB-153.



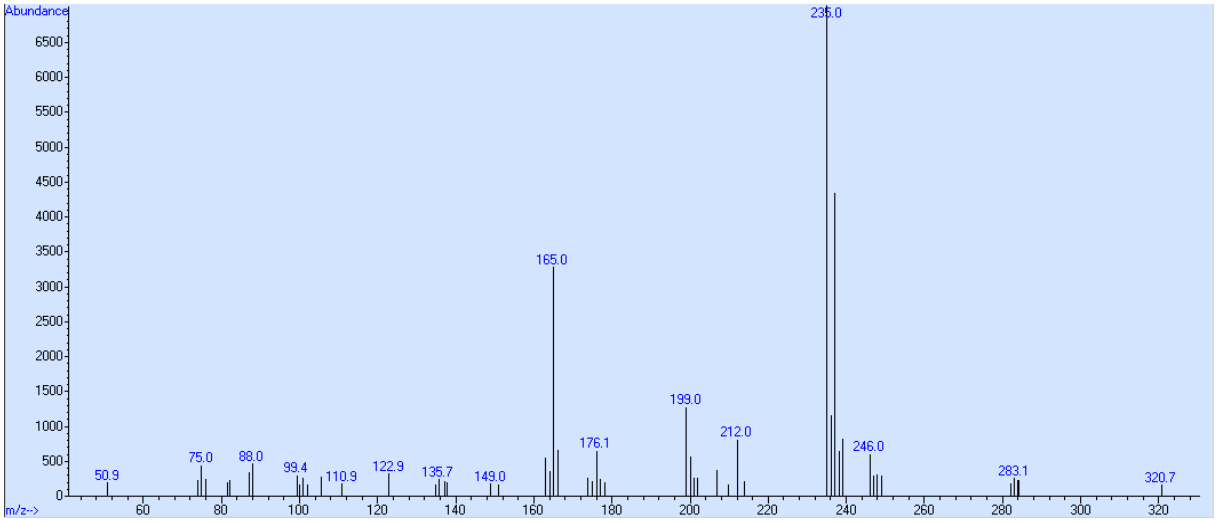
Espectro de masas del Endrin.



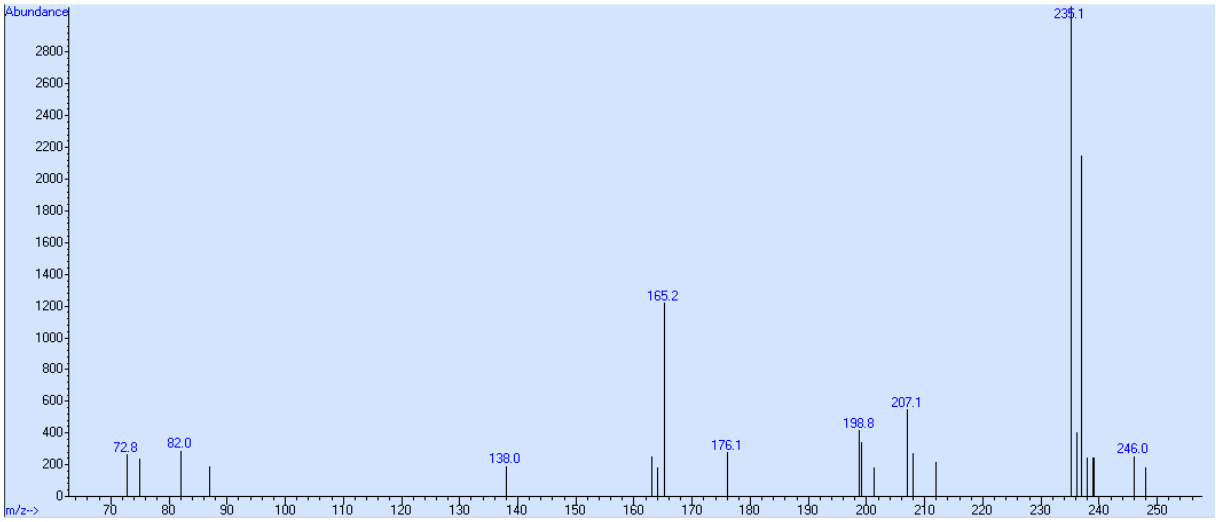
Espectro de masas del PCB-138.



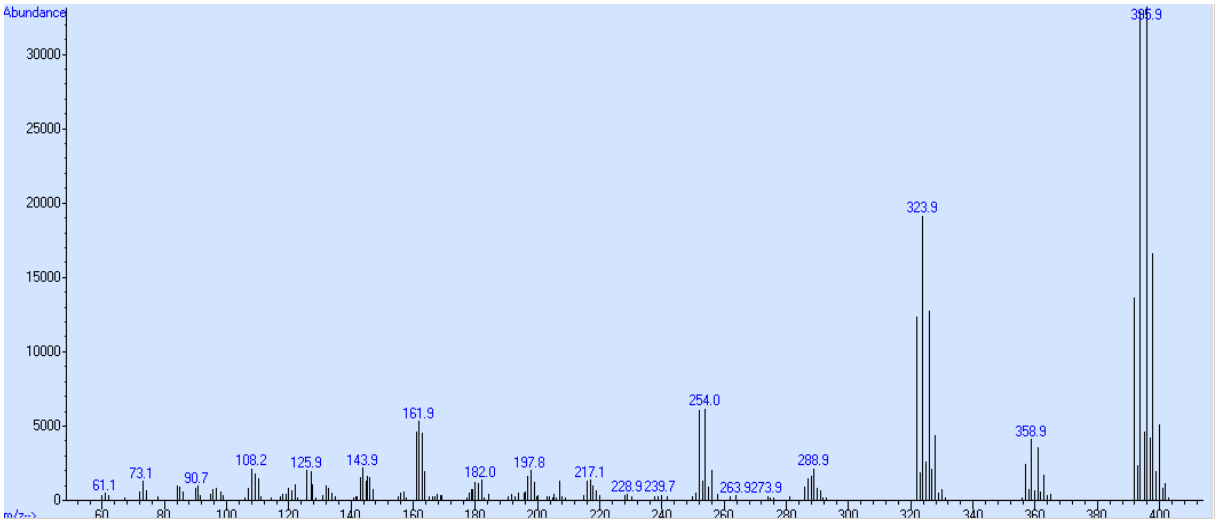
Espectro de masas del p,p'-DDD.



Espectro de masas del o,p'-DDT.



Espectro de masas del p,p'-DDT.



Espectro de masas del PCB-180.

7. REFERENCIAS

1. Ratola, N., et al., *Uncertainty associated to the analsis of organochlorine pesticides in water by solid-phase microextrction/gas chromatography-electron capture detection-Evaluation using two different approaches.* Analytica Chimica Acta, 2006. 573-574: p. 202-208.

2. Guan, Y.-F., et al., *Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in riverine runoff of the Pearl River Delta, China: Assessment of mass loading, input source and environmental fate.* Environmental Pollution, 2009. 157(2): p. 618-624.

3. Hong, S., et al., *Persistent organochlorine residues in estuarine and marine sediments from Ha Long Bay, Hai Phong Bay, and Ba Lat Estuary, Vietnam.* Chemosphere, 2008. 72(8): p. 1193-1202.

4. Vallack, H.W., et al., *Controlling persistent organic pollutants–what next?1.* Environmental Toxicology and Pharmacology, 1998. 6(3): p. 143-175.

5. S., P., et al., *The environmental contamination DDE fails to influence the outcome of sexual differentation in the marine turtle chelonia mydas.* Environmental Health Perspectives, 1998. 106(4): p. 185-188.

6. Lacorte, S., et al., *Ultra-trace determination of Persistent Organic Pollutants in Arctic ice using stir bar sorptive extraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 2009. 1216(49): p. 8581-8589.

7. Bustnes, J.O., et al., *Relationships between ecological variables and four organochlorine pollutants in an artic glaucous gull (Larus hyperboreus) population.* Environmental Pollution, 2005. 136(1): p. 175-185.

8. Ballschmiter, K., et al., *Man-made chemicals found in remote areas of the world: The experimental definition for POPS.* Environmental Science and Pollution Research, 2002. 9(4): p. 274-288.

9. Oehme, M., et al., *DETERMINATION OF LEVELS OF POLYCHLORINATED DIBENZO-P-DIOXINS, DIBENZOFURANS, BIPHENYLS AND PESTICIDES IN HARP SEALS FROM THE GREENLAND SEA.* Science of the Total Environment, 1995. 162(2-3): p. 75-91.

10. Castells, P., et al., *Occurrence of polychlorinated naphthalenes, polychlorinated biphenyls and short-chain chlorinated paraffins in marine sediments from Barcelona (Spain).* Chemosphere, 2008. 70(9): p. 1552-1562.

11. Belmonte Vega, A., A. Garrido Frenich, and J.L. Martínez Vidal, *Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry.* Analytica Chimica Acta, 2005. 538(1-2): p. 117-127.

12. Navarro, A., et al., *Occurrence and transport of pesticides and alkylphenols in water samples along the Ebro River Basin.* Journal of Hydrology, 2010. 383(1–2): p. 18-29.

13. Zhang, Z., et al., *Occurrence of PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the Tonghui River of Beijing, China.* Environmental Pollution, 2004. 130(2): p. 249-261.

14. Claver, A., et al., *Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain).* Chemosphere, 2006. 64(9): p. 1437-1443.

15. Carvalho, P.N., et al., *Organochlorine pesticides levels in Portuguese coastal areas.* Chemosphere, 2009. 75(5): p. 595-600.

16. POPs, C.d.E.s. *Convenio de Estocolmo sobre POPs*. 2001; Available from: www.chm.pops.int.

17. Villaverde, J., et al., *Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal.* Science of The Total Environment, 2008. 390(2-3): p. 507-513.

18. Hildebrandt, A., et al., *Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain).* Water Research, 2008. 42(13): p. 3315-3326.

19. Hung, C.-C., et al., *Relationships between pesticides and organic carbon fractions in sediments of the Danshui River estuary and adjacent coastal areas of Taiwan.* Environmental Pollution, 2007. 148(2): p. 546-554.

20. Gómez-Gutiérrez, A.I., et al., *Organic contaminant loads into the Western Mediterranean Sea: Estimate of Ebro River inputs.* Chemosphere, 2006. 65(2): p. 224-236.

21. Concha-Graña, E., et al., *Evaluation of HCH isomers and metabolites in soils, leachates, river water and sediments of a highly contaminated area.* Chemosphere, 2006. 64(4): p. 588-595.

22. Nagaraju, D. and S.-D. Huang, *Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid–liquid microextraction with gas chromatography–ion trap mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 2007. 1161(1–2): p. 89-97.

23. Zitko, V., *Chlorinated Pesticides: Aldrin, DDT, Endrin, Dieldrin, Mirex*, in *Persistent Organic Pollutants*, H. Fiedler, Editor. 2003, Springer Berlin Heidelberg. p. 47-90.

24. Hussen, A., et al., *Optimisation of pressurised liquid extraction for the determination of p,p' -DDT and p,p' -DDE in aged contaminated Ethiopian soils.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. 386(5): p. 1525-1533.

25. García, S., *Estudio sobre la determinación de bifenilos policlorados (PCBs) en aire ambiente mediante cromatogrfía de gases y caracterización anual en una zona semiurbana del area de Madrid*, in *Departamento de Química analítica*. 2000, Universidad Complutense Madrid: Madrid.

26. Wang, W., et al., *Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques.* Analytica Chimica Acta, 2007. 602(2): p. 211-222.

27. Anastassiades, M., K. Matovska, and S.J. Lehotay, *Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides.* Journal of Chromatography A, 2003. 1015(1-2): p. 163-184.

28. Tao, S., et al., *Use of sequential ASE extraction to evaluate the bioavailability of DDT and its metabolites to wheat roots in soils with various organic carbon contents.* Science of The Total Environment, 2004. 320(1): p. 1-9.

29. Mastovská, K. and S.J. Lehotay, *Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues.* Journal of Chromatography A, 2004. 1040(2): p. 259-272.

30. De Gaetano, Y., et al., *Removal of pesticides from wastewater by ion pair Centrifugal Partition Extraction using betaine-derived ionic liquids as extractants.* Chemical Engineering Journal, 2016. 285: p. 596-604.

31. Liu, Y., et al., *Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in water samples.* Journal of Chromatography A, 2009. 1216(6): p. 885-891.

32. Zhou, Q., et al., *Trace determination of organophosphorus pesticides in environmental samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction.* Journal of chromatography. A, 2008. 1188(2): p. 148-53.

33. EPA 3550B. http://www.trincoll.edu/~henderso/textfi~1/416%20notes/3550b.pdf.

34. Pindado Jiménez, Ó. and R.M. Pérez Pastor, *Estimation of measurement uncertainty of pesticides, polychlorinated biphenyls and polyaromatic hydrocarbons in sediments by using gas chromatographyâ€“mass spectrometry.* Analytica Chimica Acta, 2012. 724(0): p. 20-29.

35. Lacorte, S., et al., *Broad spectrum analysis of 109 priority compounds listed in the 76/464/CEE council directive using solid-phase extraction and GC/EI/MS* Anal. Chem., 2000. 72: p. 1430-1440.

36. WATERS. *OASIS HLB*. Available from: www.waters.com/oasis.

37. Heiden, A.C., B. Kolahgar, and E. Pfannkoch, *Benefits of Using Programmed Tempeature Vaporizers (PTVs) instead of hot split/splitless inlets for measurements of volatiles by liquid, headspace, and solid phase microextraction (SPME) techniques.* AppNote 7/2001, 2001.

38. Thompson, M., S.L.R. Ellison, and R. Wood, *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of method of analysis.* Pure and Applied Chemistry, 2002. 74(5): p. 835-855.

39. EURACHEM, *The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.* 1996.

40. 5725, I., *Accuracy (trueness and precision) of measurements methohds and results, Parts 1-6*, in *ISO 5725*. 1994: Geneva.

41. EURACHEM, *CITAC Guide CG 4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. 2nd Edition ed. 2000.

42. *International Vocabulary of Metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM)*. 2008: Joint Committee for guides in Metrology.

43. *Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in mesurement*. 2008: Joint Committe for Guides in Metrology.

44. Pindado Jiménez, O., R.M. Pérez Pastor, and S. García Alonso, *Assessment uncertainty associated to the analysis of organic compounds linked to particulate matter of atmospheric aerosols.* Talanta, 2010. 80(3): p. 1121-1128.

45. García Alonso, S., R. Perez Pastor, and A.J. Quejido Cabezas, *Optimised chromatographic method for the measurement of selected polychlorinated biphenyls in ambient air.* Analytica Chimica Acta, 2001. 440: p. 223-230.

46. García Alonso, S., R.M. Pérez Pastor, and F.J. García Frutos, *An evaluation of analytical quality for selected polyaromatic hydrocarbons measurements in a fuel contaminated soil.* Accred Qual Assur, 2011. 16: p. 369-377.

47. García Alonso, S., et al., *Influence of particle size on the quality of PAH concentration measurement in a contimined soil.* Polycyclic Aromatic Compounds, 2008. 28: p. 67-83.

48. Barrado Olmedo, A.I., R.M. Pérez Pastor, and S. García Alonso, *An evaluation of uncertainty associated to analytical measurements of selected polycyclic aromatic compounds in ambient air.* Talanta, 2012. 101: p. 428-434.

49. CEA-ENAC.LC/02, *Expresión de la incertidumbre de medida en las calibraciones*. Enero 1998.

50. Eichelberger, J.W., T.D. Behymer, and W.L. Budde, *Determination of organic compounds compounds in drinking water by liquid-solid extraction and capillary column gas chromatografy/mass spectrometry*, in *Method 525*, EPA, Editor. 1995.

51. Maroto, A., et al., *Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays.* Analytica Chimica Acta, 2001. 440(2): p. 171-184.

52. EURACHEM, *CITAC Guide CG 4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. Third Edition ed. 2012.

1135-9420