

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA

“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



**DETERMINACIÓN DE DIOXINAS Y FURANOS EN HARINA DE
PESCADO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS TRIPLE CUADRUPOLO**

**TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL
TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN QUÍMICA**

AUTOR:

MIGUEL ANGEL CAHUAYA MAMANI

ASESOR(A):

MSC. GRACIELA UNTIVEROS BERMÚDEZ

Lima-Perú

2021

REVISORES:

Ph.D. Guillermo A. Santillán Zea

MSc. Alberto Barrenechea Pastor

**Este trabajo lo dedico a mi papá que en paz descansa y
a mi madre que en vida me da fuerzas para seguir adelante.**

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo de suficiencia profesional fue posible gracias a las personas que me ayudaron, confiaron y apostaron por mí, razón por la cual les dedico estas líneas en forma de gratitud.

- A mi papá Rigoberto Cahuaya (Q.E.P.D.) y mamá Rufina Mamani, por confiar en mí y sobre todo por darme su infinito amor.
- A MSc. Graciela Untiveros Bermúdez por su ayuda incondicional, consejos, disponibilidad, ser mi asesora y una amiga en quien se puede confiar.
- A mi gran amigo Hanns Gómez, por brindarme su apoyo para que este trabajo se desarrolle.
- A Isabel Andamayo, mi compañera, por estar siempre apoyándome en las buenas y malas, por sus consejos y ser una excelente compañía.
- A mis hermanos.
- Finalmente, a Kevin, Juñior, Isa y Tefy, mis amigos y compañeros, que me acompañaron durante los estudios pregrado.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	2
2.1.	DIOXINAS Y FURANOS	2
2.1.1.	Definición y estructura química	2
2.1.2.	Propiedades físico-químicas.....	4
2.1.3.	Fuentes de generación	4
2.1.4.	Fuentes de contaminación por dioxinas	5
2.1.5.	Impacto en la salud.....	6
2.1.6.	Factor de Equivalencia Tóxica.....	6
2.2.	HARINA DE PESCADO	7
2.3.	CROMATOGRAFÍA DE GASES	8
2.3.1.	Fuente de gas (fase móvil)	9
2.3.2.	Sistema de inyección.....	9
2.3.3.	Horno y columna (fase estacionaria).....	10
2.3.4.	Sistema de detección	11
2.3.5.	Sistema de registro	11
III.	OBJETIVOS	12
3.1.	GENERALES	12
3.2.	ESPECÍFICOS	12

IV. METODOLOGÍA	13
4.1. MUESTRA	13
4.2. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.....	13
4.2.1. Equipos.....	13
4.2.2. Materiales.....	13
4.2.3. Reactivos.....	14
4.2.3.1. Soluciones estándar:	14
4.2.3.2. Reactivos para análisis	14
4.3. CONDICIONES DEL CROMATÓGRAFO DE GASES Y EL DETECTOR MASAS	15
4.3.1. Condiciones del GC	15
4.3.2. Condiciones del MS	15
4.4. MODOS DE ADQUISICIÓN.....	16
4.4.1. Adquisición completa de escaneo (SCAN).....	16
4.4.2. Monitoreo de iones seleccionados (SIM).....	16
4.4.3. Monitoreo de reacción múltiple (MRM).....	17
4.5. PROCEDIMIENTO.....	17
4.5.1. Dilución del estándar interno y patrón de trabajo de PCDD/F	17
4.5.2. Preparación para la determinación del límite de detección y cuantificación de las dioxinas y los furanos.....	18
4.5.3. Preparación de la curva de calibración de PCDD/F	19
4.5.4. Procedimiento de análisis para la muestra de harina de pescado.....	20
4.5.4.1. Pesaje.....	20

4.5.4.2.	Adición del estándar interno y del patrón trabajo de PCDD/F.....	20
4.5.4.3.	Extracción por soxhlet del BM, LCS, M y DM	20
4.5.4.4.	Purificación con columna de sílica mixta.....	22
4.5.4.5.	Purificación con columna de carbón (carbón AX-21).....	24
4.5.4.6.	Lectura.....	25
4.6.	CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.....	25
4.6.1.	Cálculo de concentración en Equivalentes Toxicológico:	25
4.6.2.	Cálculo de los valores de Equivalentes Toxicológicos (TEQ):	26
V.	RESULTADOS	27
VI.	DISCUSIÓN	39
VII.	CONCLUSIÓN.....	44
VIII.	RECOMENDACIONES	45
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	46
X.	ANEXOS	50

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

BM	Blanco de Método
LCS	Muestra de Control de Laboratorio
M	Muestra
DM	Duplicado de Muestra
GC	Cromatografía de Gases
MS	Espectrometría de Masas
TQ	Triple Cuadrupolo
HRMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
PCDD	Policlorodibenzo-para-dioxinas
PCDF	Policlorodibenzofuranos
TEF	Factores Toxicológicos
TEQ	Equivalentes Toxicológicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
RBF	Matraces de Fondo Redondo

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfico 1. Curva de linealidad 2,3,7,8-TCDD.....	28
Gráfico 2. Curva de linealidad 1,2,3,7,8-PeCDD.....	28
Gráfico 3. Curva de linealidad 1,2,3,4,7,8-HxCDD.....	29
Gráfico 4. Curva de linealidad 1,2,3,6,7,8-HxCDD.....	29
Gráfico 5. Curva de linealidad 1,2,3,7,8,9-HxCDD.....	30
Gráfico 6. Curva de linealidad 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD.....	30
Gráfico 7. Curva de linealidad OCDD.....	31
Gráfico 8. Curva de linealidad 2,3,7,8-TCDF.....	31
Gráfico 9. Curva de linealidad 1,2,3,7,8-PeCDF.....	32
Gráfico 10. Curva de linealidad 2,3,4,7,8-PeCDF.....	32
Gráfico 11. Curva de linealidad 1,2,3,4,7,8-HxCDF.....	33
Gráfico 12. Curva de linealidad 1,2,3,6,7,8-HxCDF.....	33
Gráfico 13. Curva de linealidad 2,3,4,6,7,8-HxCDF.....	34
Gráfico 14. Curva de linealidad 1,2,3,7,8,9-HxCDF.....	34
Gráfico 15. Curva de linealidad 1,2,3,4,6,7,8-pCDF.....	35
Gráfico 16. Curva de linealidad 1,2,3,4,7,8,9-pCDF.....	35
Gráfico 17. Curva de linealidad OCDF.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Policlorodibenzo-p-dioxinas.....	3
Figura 2. Policlorodibenzofuranos.....	3
Figura 3. Columna de sílica mixta.....	22
Figura 4. Productos formados de la hidrólisis del triglicérido.	23
Figura 5. Columna de carbón activado AX-21.....	24
Figura 6. Cromatograma de dioxinas y furanos.....	27

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Preparación para la determinación del límite de detección y cuantificación de las dioxinas y los furanos.....	18
Tabla 2. Preparación de la curva de calibración de dioxinas y furanos.....	19
Tabla 3. Resultados del límite de detección de dioxinas y furanos.....	27
Tabla 4. Concentración de BM, LCS, Muestra y Duplicado de muestra obtenido por el GCMS-TQ.....	37
Tabla 5. Valor reportable de Dioxinas [suma de policlorodibenzo-para-dioxinas (PCDD) y Policlorodibenzofuranos (PCDF)], de la muestra analizada, expresada en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (TEQ- OMS), utilizando los factores de equivalencia de toxicidad de la misma organización (TEF-OMS,2005)	38

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Abreviatura de Dioxinas.....	50
Anexo 2. Abreviatura de Furanos.....	50
Anexo 3. Vías de contaminación de dioxinas.....	51
Anexo 4. Valores de TEF para compuestos individuales.	52
Anexo 5. Límite máximo permisible de dioxinas en harina de pescado.....	53
Anexo 6. Diagrama de flujo de la técnica cromatografía gaseoso.....	54
Anexo 7. Dioxinas, furanos y sus análogos marcados isotópicamente.....	54
Anexo 8. Masas del ion precursor y ion producto de las dioxinas y furanos.....	55
Anexo 9. Tiempo de retención de dioxinas y furanos.....	56
Anexo 10. Aseguramiento de calidad del método de ensayo.....	56

RESUMEN

Las dioxinas y furanos son compuestos orgánicos muy tóxicos, se forman como sub productos de procesos industriales; son liposolubles, bioacumulables, estables e inertes a reacciones químicas y biológicas. Debido a su alta toxicidad su análisis en harina de pescado es indispensable para la exportación o para la venta en el mercado nacional; su límite permisible según la OMS es 1.25 ng/kg. La mayoría de laboratorios de servicios no cuentan con un método para este tipo de análisis, por lo que se terceriza con laboratorios del extranjero y demora el tiempo de respuesta, razón por la cual se plantea implementar un método para este análisis usando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (GC/MS-TQ), equipo con el que se cuenta.

Para desarrollar el método del análisis de dioxinas y furanos se determina el límite de detección, la curva de calibración y posterior a eso se analiza una muestra de harina de pescado usando sus controles de calidad.

Los límites de detección obtenidos para las dioxinas son: 0.25ug/L para 2,3,7,8-TCDD y 1,2,3,7,8-PeCDD; 0.5ug/L para 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD y 1,2,3,7,8,9-HxCDD; 1ug/L para 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD y OCDD; para los 10 furanos es 0.5 ug/L. Las curvas de linealidad tienen R^2 mayor a 95 %. El valor reportable de suma de dioxinas y furanos de la muestra analizada es 0.0669 ng/kg, la cual es menor al límite máximo permisible.

Palabras Claves: Dioxinas, Furanos, Harina de Pescado, Cromatografía.

ABSTRACT

Dioxins and furans are very toxic organic compounds, they are formed as by-products of industrial processes; they are fat soluble, bioaccumulative, stable and inert to chemical and biological reactions. Due to its high toxicity, its analysis in fishmeal is essential for exportation or for sale in the national market; its permissible limit according to WHO is 1.25 ng / kg. Most service laboratories do not have a method for this type of analysis, so it is outsourced to foreign laboratories and delays the response time, which is why it is proposed to implement a method for this analysis using a gas chromatograph coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (GC / MS-TQ), equipment available. To develop the method for the analysis of dioxins and furans, the detection limit is determined, the calibration curve and after that a sample of fishmeal is analyzed using its quality controls. The detection limits obtained for dioxins are: 0.25ug / L for 2,3,7,8-TCDD and 1,2,3,7,8-PeCDD; 0.5ug / L for 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD and 1,2,3,7,8,9-HxCDD; 1ug / L for 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD and OCDD; for the 10 furans it is 0.5 ug / L. The linearity curves have R^2 greater than 95%. The reportable value of sum of dioxins and furans of the analyzed sample 0.0669 ng / kg, which is less than the maximum permissible limit.

Key Words: Dioxins, Furans, Fishmeal, Chromatography.

I. INTRODUCCIÓN

Las dioxinas y furanos son una familia de compuestos orgánicos muy tóxicos, estos se forman como sub productos de procesos industriales; son liposolubles, bioacumulables, estables hasta los 750 °C e inertes a reacciones químicas y biológicas, lo que hace que sean casi indestructibles (1). El análisis de Dioxinas y Furanos es un requisito indispensable para la exportación de la harina de pescado o para la venta en el mercado nacional; debido a su alta toxicidad para la salud humana, su límite permisible en harina de pescado es 1.25 ng/kg (2). un límite considerablemente bajo; por lo cual, para su análisis se usa un cromatógrafo de alta resolución GC/HRMS; la gran desventaja es que en Perú no hay un laboratorio que cuente con este equipo, debido a su elevado costo. Hasta la actualidad el requerimiento de este tipo de análisis se terceriza con otros laboratorios del extranjero, lo que conlleva a que demore el tiempo de respuesta y la ganancia sea mínima para la empresa, razón por la cual se planteó implementar un método para analizar las dioxinas y los furanos en harina de pescado usando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (GC/MS-TQ), equipo con el que se cuenta.

Se acondicionará el GC y el detector MS con parámetros adecuados, para obtener un cromatograma gaseoso adecuado, de esta manera cuantificar las dioxinas y furanos.

Se realizará la determinación del límite de detección (LD), las curvas de linealidad y el análisis de una muestra de harina de pescado (con sus respectivos controles)

para obtener su concentración de dioxinas en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (TEQ-OMS) (2).

Con este trabajo se demostrará que los conocimientos adquiridos en la Facultad de Ciencias y Filosofías de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, contribuye como base para seguir ampliando nuestros conocimientos y sea posible realizar análisis desafiantes.

Cabe resaltar que la implementación de este análisis en un laboratorio generaría elevadas ganancias al laboratorio, debido a la alta demanda de este tipo de análisis en harina de pescado.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Dioxinas y Furanos

2.1.1. Definición y estructura química

Las dioxinas y furanos son moléculas orgánicas que presentan cloro en su estructura, son muy tóxicas y se caracterizan por ser planas, la cual se presenta por la unión de dos bencenos a través de dos átomos de oxígeno (3), en el caso de las dioxinas (Figura 1), o de un átomo de oxígeno, en el caso de los furanos (Figura 2). Para los valores reportables según la OMS, el término "dioxinas" abarca a los policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDDs) y los policlorodibenzofuranos (PCDFs) (2).

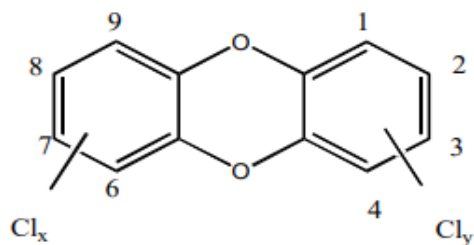


Figura 1. Policlorodibenzo-p-dioxinas

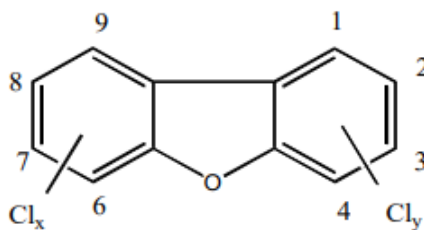


Figura 2. Policlorodibenzofuranos

Las moléculas de dioxinas y furanos pueden presentar átomos de cloro en diferentes posiciones, a cada uno de estos isómeros se les denominan congéneres; a las que presentan el mismo grado de cloración, se les denominan homólogos (3). Entre dioxinas y furanos, en total hay 210 compuestos, de las cuales 17 son tóxicos y son aquellos que se encuentran sustituidos con cloro en la posición 2, 3, 7, 8. De los 17 compuestos tóxicos, 10 son congéneres de furanos (anexo 1) y 7 son congéneres de dioxinas (anexo 2); debido a su alta toxicidad, son estas 17 de vital importancia para el análisis. El congénere más tóxico es la 2, 3, 7, 8 – tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (4).

2.1.2. Propiedades físico-químicas

Las PCDDs y los PCDFs son sólidos cristalinos e incoloros a 25 °C y presentan una elevada estabilidad térmica y química, baja presión de vapor, baja solubilidad en agua, elevada solubilidad en disolventes orgánicos, con puntos ebullición y fusión relativamente elevados, estables en medio oxidante, ácido y básico (5).

La estabilidad de estas moléculas se debe a la resonancia que presentan en todas sus estructuras; tanto en las dioxinas y furanos los oxígenos y carbonos tienen una hibridación sp^2 , sus electrones π participan en la resonancia y la deslocalización de la carga electrónica se da en toda la estructura, razón por la cual estas moléculas son muy estables (6).

Tienen afinidad a los lípidos, se acumulan en el tejido adiposo de los animales y presentan resistencia a la degradación biológica. Estas propiedades hacen que estas moléculas sean contaminantes muy persistentes (5) (7).

2.1.3. Fuentes de generación

Estas moléculas se generan, en diferentes procesos industriales principalmente, como subproductos no deseados (8). Se forman en procesos industriales relacionados con el cloro o fabricación de productos clorados, por ejemplo: el blanqueo de la pulpa y pasta de papel con cloro y la producción de compuestos organoclorados [clorofenoles, fenilos policlorados (PCBs), clorobencenos, etc.]. Los

procesos térmicos en la actualidad constituyen la fuente de emisión principal de PCDDs/PCDFs en muchos países, entre los cuales se encuentran: los incendios accidentales (de edificios, forestales, de equipos donde hay PCBs, etc.), la incineración de residuos (ejemplo: sólidos urbanos, sólidos clínicos, sólidos peligrosos y lodos de depuradora), los hornos de cementeras, la producción de energía (calefacción con combustión de petróleo, carbón o madera, la generación de electricidad en centrales eléctricas, etc.), la fabricación del acero, entre otros (9).

2.1.4. Fuentes de contaminación por dioxinas

La distribución ambiental de las dioxinas es a nivel mundial y las concentraciones altas se encuentran especialmente en los productos lácteos, carnes, pescados y mariscos, como también en algunos suelos, sedimentos y alimentos (anexo 3). En las plantas, el agua y el aire, sus concentraciones son bajísimas (10). Las dioxinas pueden entrar de la alimentación animal a la cadena alimentaria humana a través del aire a planta/suelo, de planta/suelo a animal y de agua/sedimento a pescado (9).

2.1.5. Impacto en la salud

La presentación de efectos tóxicos causado por dioxinas en el ser humano se relaciona con exposición ocupacional, accidental o por consumo de alimentos con residuos. Los primeros reportes se dieron durante la Guerra de Vietnam donde personas expuestas desarrollaron una lesión que desfigura la piel, identificada como “cloroacné” (11). La misma alteración fue identificada en muchos trabajadores de una fábrica donde se fabricaba compuestos químicos a base de cloro. Otro efecto producido por las dioxinas, reportado en humanos, es la presencia de pequeñas manchas oscuras en la piel (12).

2.1.6. Factor de Equivalencia Tóxica

De todas las dioxinas y furanos, 17 tienen importancia toxicológica (anexo 1 y 2) y la más tóxica es el 2,3,7,8-TCDD (4). Para realizar la comparación de datos analíticos de los 17 congéneres, se hace uso del grado de toxicidad de cada compuesto y se convierten los resultados para expresarlos como “Equivalentes Tóxicos” (TEQ). La conversión asume que todos las dioxinas y furanos muestran similares efectos cualitativos, pero con intensidades diferentes. El Factor de Equivalencia Tóxica (TEF) indica el grado de toxicidad de cada congénere y se determina mediante la relación entre la toxicidad del congénere implicado frente a la del compuesto más tóxico, el 2,3,7,8-

TCDD, a la que se ha asignado el valor de 1 (2). En 1997 la OMS establece los valores únicos de OMS-TEF para humanos (anexo 4).

2.2. Harina de Pescado

La harina de pescado es una de los productos más exportados en nuestro país (13), se exporta principalmente a china ya que es un ingrediente importante en la formulación de dietas para la nutrición animal en la industria de alimentos balanceados para acuicultura, porcicultura, avicultura y alimento para mascotas, debido a su alto contenido de proteínas y alta digestibilidad. Cerca del 98% de la pesca industrial de anchoveta se destina para la elaboración de la harina de pescado (13).

El proceso de producción de la harina de pescado a escala industrial consta de cuatro operaciones principales como cocción, prensado, secado y molienda, todo esto con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de agua y aceite del pescado. En el Perú La única especie permitida en el país para la elaboración de este producto es la anchoveta (*Engraulis Rigens*) (14).

En el proceso de producción industrial de harina de pescado las temperaturas llegan a 100°C como máximo, haciéndose imposible la destrucción de algunos compuestos tóxicos como las dioxinas en caso estén presentes en el pescado (15). Uno de los compuestos orgánicos más tóxicos y resistente a altas temperaturas son las dioxinas, debido a su propiedad lipofílica y su baja solubilidad en agua, hacen que sean especialmente afines por los tejidos grasos de los peces. “Estas propiedades, además de

conferirles resistencia a la degradación, favorecen su acumulación dentro de los organismos, pudiendo llegar a concentrarse en varios órdenes de magnitud con respecto al medio que los rodea” (3). Las dioxinas son muy tóxicas para la salud, su límite permisible en harina de pescado es 1.25 ng/kg (2, p3) (anexo 5), razón por la cual el análisis de Dioxinas y Furanos es un requisito indispensable al momento de la exportación de la harina a cualquier país o para colocarlo en el mercado nacional (16).

2.3. Cromatografía de gases

La cromatografía gaseosa es una técnica de separación donde se usa como gas portador un gas inerte, es una técnica de amplia utilización que ofrece una buena separación y sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles. Con esta técnica las mezclas son separadas en fase gaseosa, de acuerdo a esto se establece los límites de su utilización, las cuales están marcados fundamentalmente por la estabilidad térmica de los compuestos a separar (17).

La separación mediante GC se realiza mediante inyección de una pequeña cantidad de la muestra a separar en una corriente de un gas inerte, por lo general helio, a elevada temperatura; esta corriente de gas, atraviesa una columna cromatográfica que separará los analitos de la mezcla por medio de partición (cromatografía gas líquido), de adsorción (cromatografía gas sólido). Estos analitos separados, emergerán de la columna a intervalos discretos y pasarán al detector

adecuado (ver anexo 6), en este caso a un MS-TQ (17). Partes fundamentales de un cromatógrafo gaseoso:

- Fuente de gas (fase móvil)
- Sistema de inyección.
- Horno y columna (fase estacionaria)
- Sistema de detección.
- Sistema de registro.

2.3.1. Fuente de gas (fase móvil)

Para elegir el gas portador se toma en cuenta el tipo de detector y deben ser puros, secos e inertes. Los gases que más se usan en cromatografía de gas son el helio e hidrogeno, los cuales no son determinantes en la separación de los compuestos, ya que son compuestos inertes; es el flujo del gas portador la que influye en los tiempos de retención, a medida que se incrementa el flujo del gas se tiene menor tiempo de retención (18). Para este trabajo se usará el gas Helio, debido a su baja inflamabilidad comparada al gas hidrogeno.

2.3.2. Sistema de inyección

Este sistema sirve para introducir la muestra que se va a analizar en la columna. Se tiene que elegir un sistema que química y físicamente sean inertes a la muestra y a la fase móvil, además tiene que ser capaz de

resistir presiones elevadas (18). De acuerdo a lo descrito, se usará el sistema Agilent 7693A (19), el cual es un inyector automático de líquidos que facilita inyecciones precisas, rápidas y fiables para los sistemas GC y GC/MS Agilent.

2.3.3. Horno y columna (fase estacionaria)

El horno tiene la función de conservar la temperatura de la columna uniforme y constante, para asegurar que los tiempos de retención presenten una buena repetibilidad (18). El cromatógrafo de gases Agilent 8970B que se usará incorpora un horno que garantiza conservar la temperatura de la columna estable.

La columna es fundamental para la separación de los analitos de una muestra. El tubo de la columna es de acero inoxidable, de diámetro interno entre 2 y 5 mm y una longitud entre 5 y 30 cm. Para la separación de dioxinas y furanos se usará la columna Agilent DB-5ms Ultra Inerte (20), la cual está compuesta por fenilo al 5% y por polidimetilsiloxano al 95%, ofrece un rendimiento analítico para una variedad de aplicaciones. Además, es de bajo sangrado¹; presenta excelentes formas de picos, una buena relación señal-ruido, lo que proporciona un alto rendimiento para analitos desafiantes como las dioxinas y furanos.

¹ Pérdida de fase estacionaria que sale de la columna y que normalmente genera una señal de fondo.

2.3.4. Sistema de detección

Tras la separación en la columna de los analitos de la mezcla, la identificación y cuantificación de los analitos se realiza usando un detector adecuado. Para la detección de dioxinas y furanos se requiere un detector de alta sensibilidad y selectividad, razón por el cual se usará el detector espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 7010B (MS-TQ Agilent 7010B) (21); este detector nos proporciona límites de detección muy bajos llegando sin problemas a nivel de pg en modo de ionización electrónica (EI). Este sistema presenta una fuente de EI de alta eficiencia que genera más iones comparado al modelo anterior de Agilent 7010A, lo que lo convierte en el detector MS-TQ Agilent más sensible (21) (22). Cuenta con los modos de adquisición SCAN, SIM y MRM dinámico (dMRM); el MRM dinámico es lo distintivo de este sistema, la cual proporciona facilidad de uso y eficiencia.

2.3.5. Sistema de registro

Para la identificación, cuantificación y posterior registro de datos, en este trabajo se usará el sistema MassHunter Agilent (23) (24), el cual es un software que permite organizar en lotes las muestras y los analitos para una revisión y análisis rápidos.

III. OBJETIVOS

3.1. Generales

Determinación con un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo acondicionado para la lectura específica de dioxinas y furanos, en matriz de harina de pescado.

3.2. Específicos

- Extracción de los analitos con tolueno utilizando soxhlet.
- Eliminación de los compuestos interferentes de las dioxinas y furanos.
- Concentración del extracto libre de interferentes hasta 20 uL.
- Acondicionamiento, del cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo, con una fuente y cuadrupolo exclusivo para el análisis de dioxinas y furanos.
- Lectura del extracto final en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo.
- Determinar el límite de detección de las dioxinas y furanos.
- Realizar las curvas de linealidad de las dioxinas y furanos.
- Verificar el resultado de la muestra usando los controles: blanco de método, muestra control de laboratorio y duplicado de la muestra.
- Obtener el valor reportable de dioxinas [suma de policlorodibenzo-para-dioxinas (PCDD) y policlorodibenzofuranos (PCDF)], de la muestra, expresada en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (EQT- OMS).

IV. METODOLOGÍA

4.1. Muestra

Harina de pescado de anchoveta proveniente de una industria pesquera del litoral de Chimbote.

4.2. Equipos, materiales y reactivos

4.2.1. Equipos

- Cromatógrafo Gaseoso Agilent 7890 B con Detector de Masa Agilent 7010B.
- Inyector Automático de Líquidos Agilent 7693A.
- Columna Agilent DB-5ms Ultra Inerte.
- Balanza analítica Mettler Toledo.
- Evaporador Caliper, adecuado para volúmenes de hasta 200 mL y entrada para gas nitrógeno.
- Rota Vapor Buchi.
- Sonicador Branson.
- Bomba de vacío.

4.2.2. Materiales

- Tubos del evaporador, punto final aproximadamente 0,5 mL.
- Pipetas Pasteur de vidrios de borosilicato de 150 mm.
- Fiolas de 5, 10, 25, 100, 250 mL.
- Probetas de 25 mL.
- Insertos de 150 uL y viales de 2mL.
- Dedales de extracción

- Recirculación del enfriador.
- Planchas de calentamiento.
- Perlas de ebullición.
- Matraz de fondo redondo (RBF), vidrio de borosilicato, 500 mL.
- Matraz de fondo plano, 250 mL.
- Embudo, estándar, 150 mm, 80 mm de diámetro, vidrio de borosilicato.
- Micropipeta de 0.5-5, 10-100, 100-1000 μ L y puntas desechables.
- Tubos de centrifuga de Polipropileno desechables de 50 mL y 15 mL.
- Vasos de 100 mL.
- Frascos de vidrio de 1L.
- Columnas de vidrio de separación cromatografías.
- Extractores Soxhlet.
- Embudo Büchner.
- Matraz Kitasato.

4.2.3. Reactivos

4.2.3.1. Soluciones estándar:

- Soluciones de calibración de PCDD/F (anexo 1 y 2)
- ^{13}C -Solucion de adición para PCDD/F (Estándar Interno) (anexo 7)

4.2.3.2. Reactivos para análisis

- Diclorometano, grado cromatográfico.
- Tolueno, grado para análisis.
- Etanol, grado para análisis.

- n-hexano, grado cromatográfico.
- Sulfato de sodio anhidro, grado para análisis.
- Harina de pescado patrón.
- Columna de sílica gel mixta.
- Columna de carbón activado.
- Lana de vidrio.

4.3. Condiciones del cromatógrafo de gases y el detector masas

4.3.1. Condiciones del GC

Columna	Agilent DB-5 MS UI 60m x 250um x 0.25um (p/n 122-5562UI)
Volumen de inyección	5 ul
Gas portador	Helio
Modo de gas portador	Flujo constante
Flujo	0.96 mL/min
Programa de Horno	120 °C (5 minutos) 25 °C/min a 250 °C (5 minutos) 2.6 °C/min a 300 °C (17.5 minutos)
Tiempo total de corrida	29.5 minutos

4.3.2. Condiciones del MS

Modo de operación	Ionización de electrones (EI), reacción múltiple (MRM)
Temperatura de la línea de transferencia	300 °C
Temperatura de fuente	300 °C
Temperatura de cuadrupolo	150 °C

4.4. Modos de Adquisición

El espectrómetro de masas triple cuadrupolo permite adquirir datos mediante diferentes modos de adquisición.

4.4.1. Adquisición completa de escaneo (SCAN)

En el modo SCAN los 2 cuadrupolos dejan pasar todos los iones de un rango de masas en un momento determinado y logran hacer un barrido, donde cambian todas las radios frecuencias muy rápidamente para poder asignar las masas características, de esta manera obtiene los diferentes espectros. De esta manera con el modo SCAN se tiene un cromatograma con todos los componentes de un rango de masa. Este modo se usa principalmente en el análisis cualitativo para la identificación de compuestos por búsqueda en biblioteca de espectros.

Para este análisis se conoce las masas del ion precursor y sus respectivos iones productos de todas las dioxinas y los furanos (**ver Anexo 8**), pero no sabemos cuál es sus tiempos de retención en el sistema GC/MS-TQ que contamos.

Para determinar el tiempo de retención de cada dioxina y furano use el modo SCAN en un rango de masas de 300 y 550 Da, use una solución de estándar de dioxinas y furanos (PCDD / F) de una concentración de 10 ug/l en Tolueno.

4.4.2. Monitoreo de iones seleccionados (SIM)

En el modo SIM el primer cuadrupolo deja pasar todos los iones y el segundo cuadrupolo solamente deja pasar un ion molecular de interés. Mediante este modo, se tiene una señal del ion de interés y se tiene un cromatograma más limpio, pero a niveles de concentración muy bajo el modo SIM no es tan efectivo, razón por el cual en este trabajo se usa el MRM.

4.4.3. Monitoreo de reacción múltiple (MRM)

En el modo MRM el primer cuadrupolo deja pasar un ion molecular (ion precursor o ion padre) de interés, en la celda de colisión este ion molecular se fragmenta y en el segundo cuadrupolo se escoge un fragmento específico que solo este presente en el ion precursor (ion producto o ion hijo) y no en los interferentes. De esta manera se obtiene un cromatograma con una señal del ion de interés libre de interferentes, razón por el cual es más selectivo y sensible que el SIM. A cada combinación ion padre / ion hijo se llama transición; el sistema GC/MS-TQ nos permite en el modo MRM monitorizar varias transiciones y determinar de entre 30 a 50 compuestos al mismo tiempo con una alta especificidad, se usa principalmente para el análisis cuantitativo de compuestos conocidos.

Una vez determinada los tiempos de retención mediante el modo SCAN, realice los análisis cuantitativos de las 7 dioxinas y los 10 furanos usando el modo MRM; asignando las masas del ion precursor y ion productos conocidas (**ver Anexo 8**).

4.5. Procedimiento

4.5.1. Preparación por dilución del estándar interno y patrón de trabajo de PCDD/F

- Diluir la solución de estándar interno (^{13}C PCDD / F) a 100 ug/l en Tolueno.
- Diluir el patrón de trabajo de PCDD / F a 100 ug/l en Tolueno.

4.5.2. Preparación para la determinación del límite de detección y cuantificación de las dioxinas y los furanos.

- Añadir 100 ul de Solución de estándar interno de 100 ug/l en los tubos ámbar de 2 mL rotulados 1, 2, 3,4 ,5 ,6 y 7
- Añadir 5 uL de la solución Stock de 100 ug/l, en los tubos.
- Diluir el contenido de los tubos con 895 ul de diclorometano.
- Llevar los tubos preparados al Autosampler Agilent 7693 para su respectiva lectura, en el Cromatógrafo Gaseoso Agilent 7890 B equipado con Detector de Masa Agilent 7010.

Tabla 1. Preparación para la determinación del límite de detección y cuantificación de las dioxinas y los furanos.

Tubo	V de estándar interno 100 ug/l (uL)	V de solución stock 100 ug/l (uL)	V de diclorometano (uL)
1	100	5	895
2	100	5	895
3	100	5	895
4	100	5	895
5	100	5	895
6	100	5	895
7	100	5	895

4.5.3. Preparación de la curva de calibración de PCDD/F

- Añadir 100 μ l de Solución de estándar interno de 100 μ g/l en los tubos ámbar de 2 mL rotulados 1, 2, 3,4 ,5 ,6.
- Añadir 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ L de la solución Stock de 100 μ g/l, en los tubos 1, 2, 3,4 ,5 ,6 respectivamente.
- Diluir el contenido de los tubos hasta 1 mL con diclorometano.
- Llevar los tubos preparados al Autosampler Agilent 7693 para su respectiva lectura, en el Cromatógrafo Gaseoso Agilent 7890 B equipado con Detector de Masa Agilent 7010.

Tabla 2. Preparación de la curva de calibración de dioxinas y furanos.

Tubo	Alícuota de estándar interno 100 μg/l (uL)	Alícuota de solución stock 100 μg/l (uL)	Volumen de diclorometano (uL)
1	100	10	890
2	100	20	880
3	100	40	860
4	100	60	840
5	100	80	820
6	100	100	800

4.5.4. Procedimiento de análisis para la muestra de harina de pescado.

4.5.4.1. Pesaje

- Blanco de muestra (**BM**): Pesar 40 g de harina de pescado libre del analito en el dedal de extracción.
- Muestra de control de laboratorio (**LCS**): Pesar 40 g de harina de pescado libre del analito en el dedal de extracción.
- Muestra (**M**): Pesar 40 g de muestra en el dedal de extracción.
- Duplicado de muestra (**DM**): Pesar 40 g de muestra en el dedal de extracción.

4.5.4.2. Adición del estándar interno y adición del patrón trabajo de PCDD / F

- Fortificar con 100 µL de estándar interno en el dedal de extracción, al blanco de muestra, LCS, muestra y duplicado de muestra.
- Añadir con 40 µL de Solución Stock de PCDD / F en el dedal de extracción al LCS.

4.5.4.3. Extracción por soxhlet del BM, LCS, M y DM

- Lave el extractor Soxhlet incluyendo los matraces de fondo redondo (RBF) con tolueno y diclorometano. Encienda el recirculador refrigerante y deje enfriar.
- Coloque el dedal tapado con lana de vidrio en el extractor Soxhlet.
- Agregue 200 mL de tolueno y perlas de ebullición al RBF y colóquelo en la plancha de calentamiento.
- Conecte el extractor Soxhlet, incluido el condensador y verifique que

todo este sellado.

- Configure el Soxhlet a una velocidad de 5 a 7 ciclos por hora, deje extrayendo por 4 h.
- Apague la plancha de calentamiento y permita que se enfríe, retire el RBF que contiene tolueno.
- Agregue 200 mL de tolueno/etanol (1:1) y perlas de ebullición a un nuevo RBF y colóquelo en la plancha de calentamiento.
- Conecte el Soxhlet, incluido el condensador y verifique que todo este sellado.
- Configure el Soxhlet a una velocidad de 5 a 7 ciclos por hora. Deje extrayendo por 16 h.
- Apague la plancha de calentamiento y permita que se enfríe.
- Retire el RBF y combine ambos extractos (el extracto de tolueno y el extracto de tolueno / etanol). Añadir 5 g de sulfato de sodio anhidro, agitar y dejar decantar.
- Filtre el extracto al vacío y concentre el filtrado utilizando un rota vapor aproximadamente 0,5 mL.
- Tome el concentrado del evaporador y colóquelo en una fiola de 25 mL. Lave el balón del evaporador con tolueno, enrase la fiola de 25 mL con tolueno, homogenizar.

4.5.4.4. Purificación con columna de sílica mixta

La columna de sílica mixta utiliza sílica gel de alta pureza (tamaño de malla de 100-200); está compuesta con 3 g de sílica gel impregnada con $AgNO_3$ al 10 %, 5 g de sílica gel impregnada con H_2SO_4 al 10 %, 4 g de sílica gel impregnada con H_2SO_4 al 44 %, 3 g de sílica gel impregnada con KOH al 2% y 3 g de Na_2SO_4 anhidro, como se observa en la figura 3.

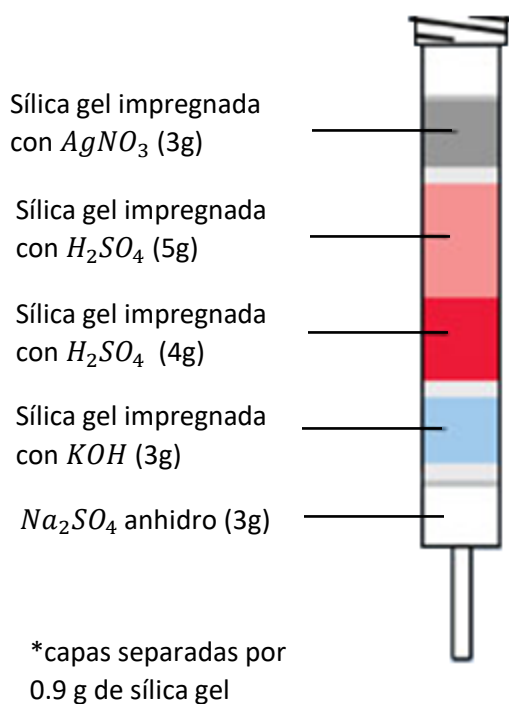


Figura 3. Columna de sílica mixta.

La sílica gel impregnada con $AgNO_3$ nos permite eliminar compuestos de azufre (si estuviera presente), donde la plata reacciona con el azufre formando sulfuro de plata, un compuesto de color negro; esto se puede observar durante la purificación, pues la capa de sílica gel impregnada con

$AgNO_3$ se va ennegreciendo a medida que se le va añadiendo el extracto de la muestra.

La sílica gel impregnada con H_2SO_4 de baja concentración nos permite eliminar compuestos básicos y en parte hidrolizar grasas. La sílica gel impregnada con H_2SO_4 de mayor concentración permite hidrolizar de manera segura toda la grasa presente en el extracto de la muestra. Cuando se dice grasa, generalmente se refiere a los acilglicéridos, ésteres compuesto por una molécula de glicerina a la cual se le unen uno, dos o tres ácidos grasos. La hidrolisis del triglicérido con ácido sulfúrico da como productos a la glicerina y ácidos grasos, como se observa en la figura 4.

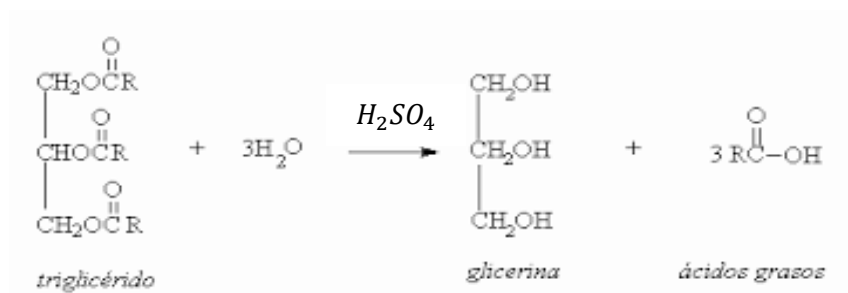


Figura 4. Productos formados de la hidrolisis del triglicérido.

La sílica gel impregnada con KOH nos permite eliminar los componentes ácidos, como los ácidos grasos formados en la capa anterior. El Na_2SO_4 anhidro retiene la glicerina y el agua.

De esta manera la columna de sílica mixta, usando como solvente el tolueno, nos permite obtener solo compuestos de naturaleza apolar, como son las dioxinas y furanos.

- Transfiera los 25 mL de la fiola a la columna de sílice mixta, lavando la fiola con 10 mL de tolueno.
- Permita que la muestra drene a través de la columna y recíbala en un matraz de 125 mL.

4.5.4.5. Purificación con columna de carbón (carbón AX-21)

Consiste en cromatografía de adsorción en columna utilizando carbón activado AX-21, la cual es recomendada por la normalización española UNE-EN 16215:2020 para la separación de PCDD / PCDF planas y eliminar PCBs no planas y otras moléculas no planas interferentes (25).

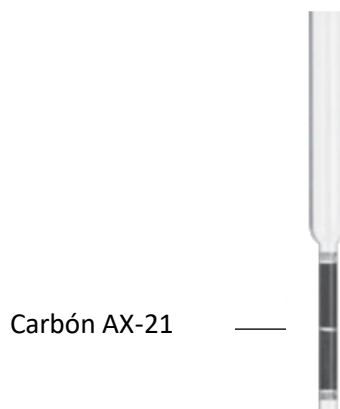


Figura 5. Columna de carbón activado AX-21

- Transferir el extracto contenido en el matraz a la columna de carbón, lavando el matraz con 10 mL de tolueno. Recibir el solvente en un balón de 125 mL.
- Concentrar el extracto a sequedad en el rota vapor.
- Reconstituir el extracto a un volumen de 80 uL con tolueno y transferir

al inserto de 150 uL, lavar 2 veces el balón con 30 uL de tolueno para recuperar todo el extracto.

- Colocar el inserto dentro del tubo de evaporación, a una temperatura de 40°C y ajuste la presión del aire a 0.7 bar.
- Llevar a sequedad y reconstituir a un volumen final de 20 uL con tolueno, esta fracción contiene PCDD / Fs.

4.5.4.6. Lectura

- Coloque el inserto (que contiene los 20 uL) en un vial de 2mL y llevar los tubos preparados al Autosampler Agilent 7693 para su respectiva lectura, en el Cromatógrafo Gaseoso Agilent 7890 B equipado con Detector de Masa Agilent 7010.

***Repita el procedimiento 4.5.4 para todas las muestras.**

4.6. Cálculo y expresión de resultados.

4.6.1. Cálculo de concentración en Equivalentes Toxicológico:

$$C_{\text{PCDD/F}} \left(\frac{\text{ng}}{\text{kg}} \right) = \frac{(\text{Lectura}) \times (\text{Volumen final}) \times (\text{Dilucion})}{\text{Peso de muestra}} \quad (1)$$

Lectura = Concentración de lectura de PCDD/F (ug/L)

Dilución = Factor de dilución (sin unidades).

Volumen final = microlitros (uL)

Peso de la muestra: gramos (g)

4.6.2. Cálculo de los valores de Equivalentes Toxicológicos (TEQ):

Para realizar este cálculo se necesita los valores de los Factores Toxicológicos Equivalentes (TEF) que se muestran en el anexo, estos valores se multiplican con los valores de concentración de los congéneres respectivos.

$$TEQ_{\left(\frac{ng}{kg}\right)} = \sum_{i=1}^n (TEF)_i \times \left(C_{\frac{PCDD}{F}}\left(\frac{ng}{kg}\right) \right)_i \quad (2)$$

Donde:

$TEQ_{\left(\frac{ng}{kg}\right)}$ es el Equivalente Toxicológico

$(TEF)_i$ es el valor de TEF de compuesto i (anexo 4)

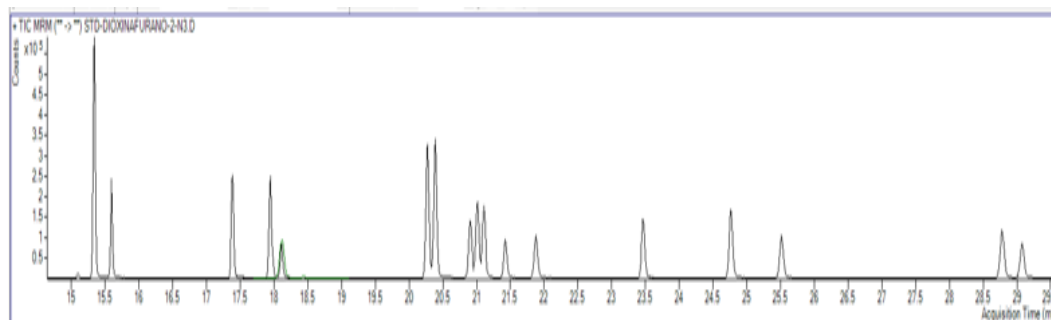
V. RESULTADOS

Tabla 3. Resultados del límite de detección de dioxinas y furanos.

Cantidad adicionado (pg/ul)*	Analito	Prueba de Limite de detección (pg/ul)							% R (50 %-150 %)						
		Muestras de harina de pescado patron													
		1	2	3	4	5	6	7							
0.25	2,3,7,8-TCDD	0.24	0.24	0.25	0.24	0.22	0.23	0.24	95	96	99	95	89	91	97
0.25	1,2,3,7,8-PeCDD	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.23	0.22	95	94	95	95	98	94	90
0.5	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.45	0.45	0.47	0.47	0.48	0.48	0.46	90	91	95	93	95	95	93
0.5	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.50	0.51	0.51	0.51	0.50	0.50	0.50	100	101	101	101	101	101	100
0.5	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.49	0.51	0.51	0.46	0.47	0.51	0.54	98	103	102	93	94	102	107
1	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.96	0.99	0.99	0.98	0.95	0.95	0.97	96	99	99	98	95	95	97
1	OCDD	0.92	0.96	0.96	0.90	0.98	0.92	0.99	92	96	96	90	98	92	99
0.5	2,3,7,8-TCDF	0.47	0.47	0.49	0.49	0.48	0.50	0.50	94	95	98	98	96	100	100
0.5	1,2,3,7,8-PeCDF	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.48	98	97	98	97	99	99	96
0.5	2,3,4,7,8-PeCDF	0.50	0.51	0.51	0.48	0.50	0.49	0.56	100	102	101	97	100	99	112
0.5	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.51	0.51	0.51	0.51	0.50	0.51	0.54	103	102	102	102	101	101	108
0.5	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.53	0.45	0.44	0.47	0.51	0.52	0.44	107	90	88	95	103	105	88
0.5	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.50	0.50	0.50	0.50	0.48	0.50	0.55	99	100	100	99	96	101	111
0.5	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.48	0.48	0.47	0.47	0.41	0.47	0.48	96	95	95	94	82	95	97
0.5	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.48	0.47	0.48	0.43	0.42	0.47	0.51	96	95	96	86	85	94	103
0.5	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.48	0.49	0.46	0.47	0.50	0.50	0.47	96	97	93	95	99	100	94
0.5	OCDF	0.44	0.45	0.43	0.43	0.45	0.43	0.45	87	90	86	87	89	85	90

**La cantidad adicionada en ug/l es igual a pg/ul.*

Figura 6. Cromatograma de dioxinas y furanos



**Tiempo de retención de cada analito (anexo 9)*

Curvas de las dioxinas

Gráfico 1. Curva de linealidad 2,3,7,8-TCDD

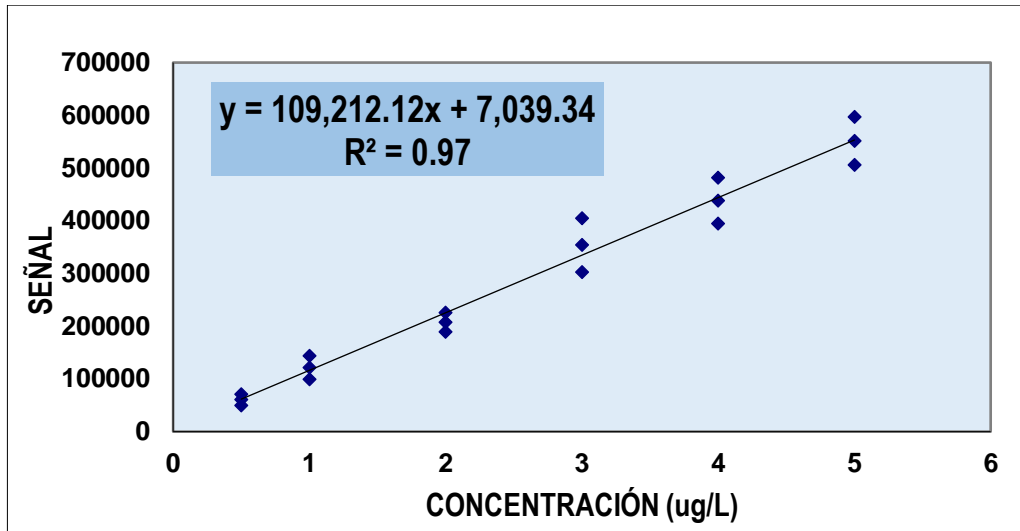


Gráfico 2. Curva de linealidad 1,2,3,7,8-PeCDD

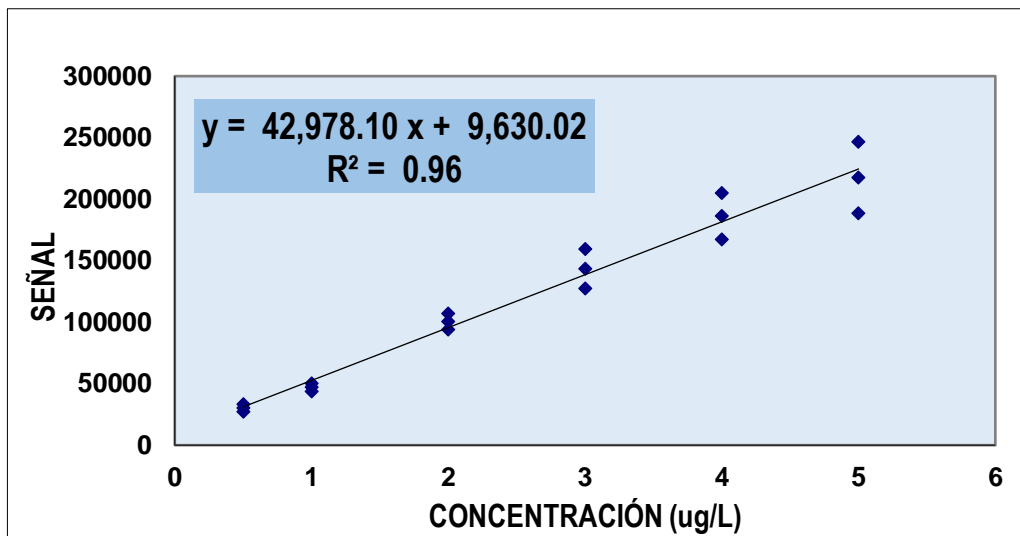


Gráfico 3. Curva de linealidad 1,2,3,4,7,8-HxCDD

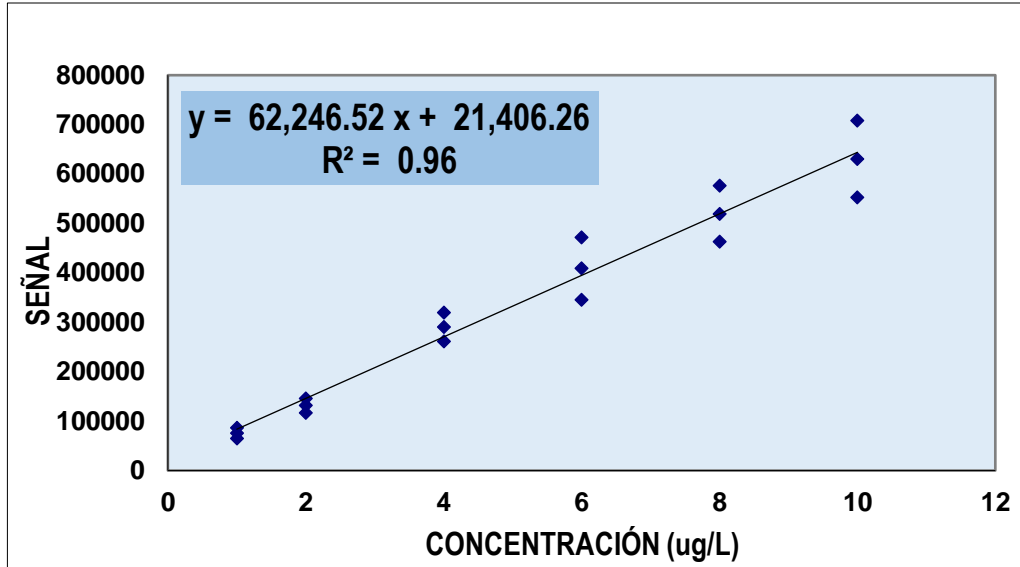


Gráfico 4. Curva de linealidad 1,2,3,6,7,8-HxCDD

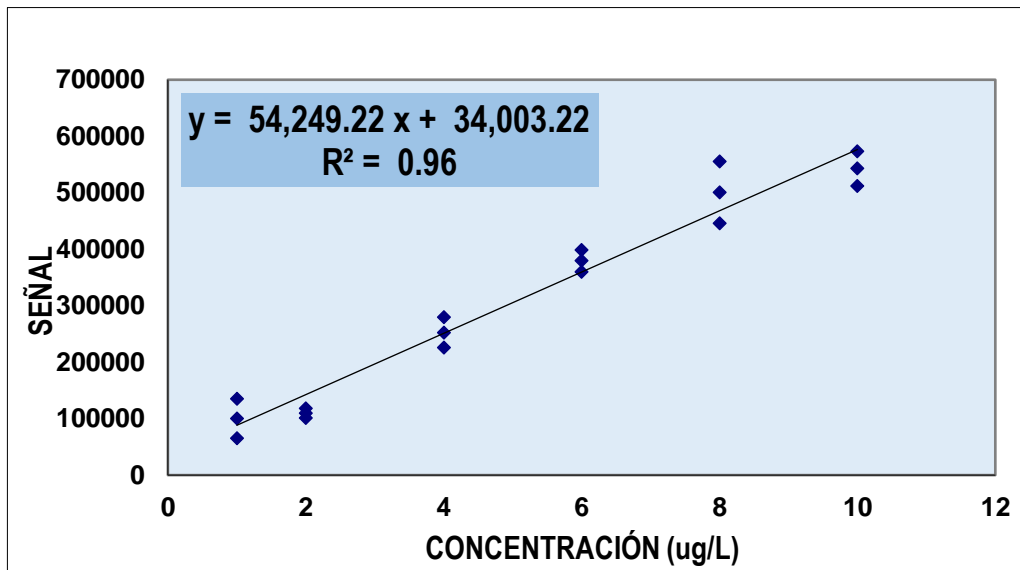


Gráfico 5. Curva de linealidad 1,2,3,7,8,9-HxCDD

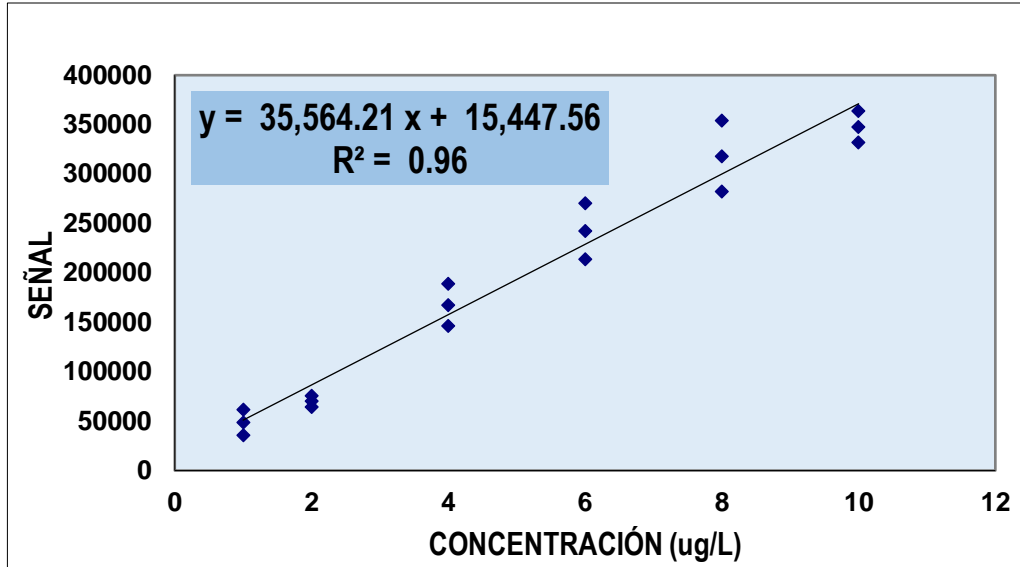


Gráfico 6. Curva de linealidad 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD

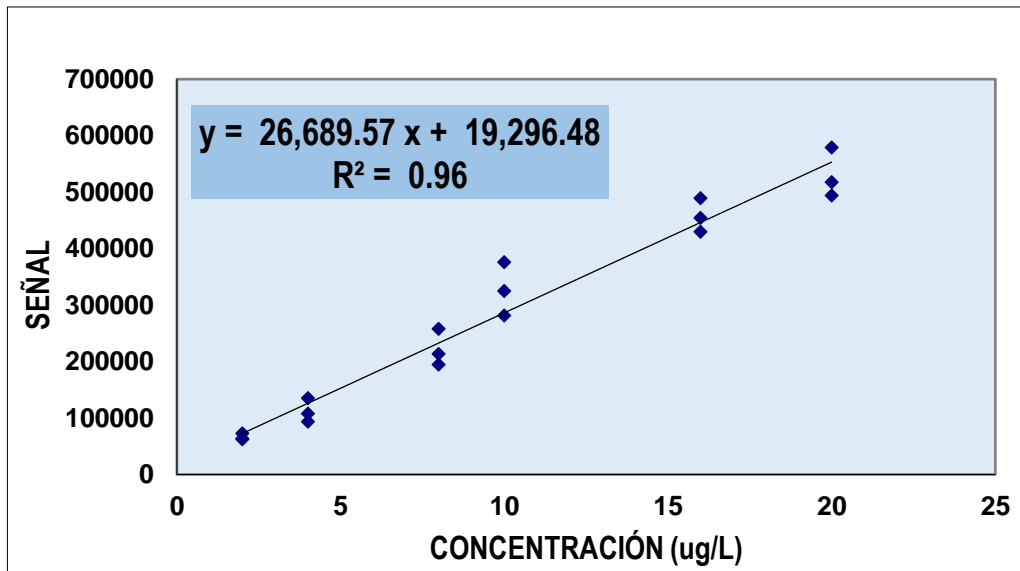
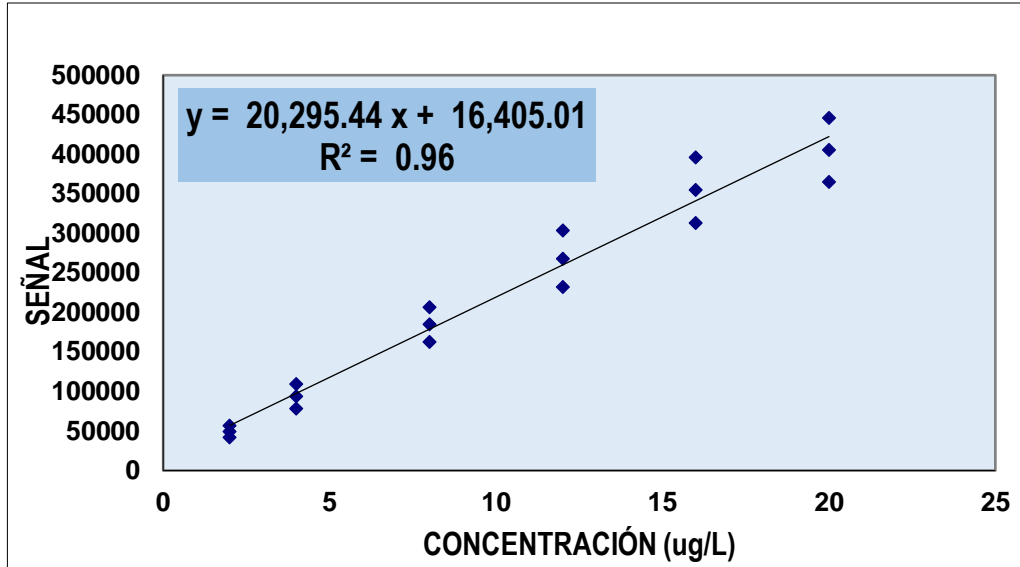


Gráfico 7. Curva de linealidad OCDD



Curvas de los furanos

Gráfico 8. Curva de linealidad 2,3,7,8-TCDF

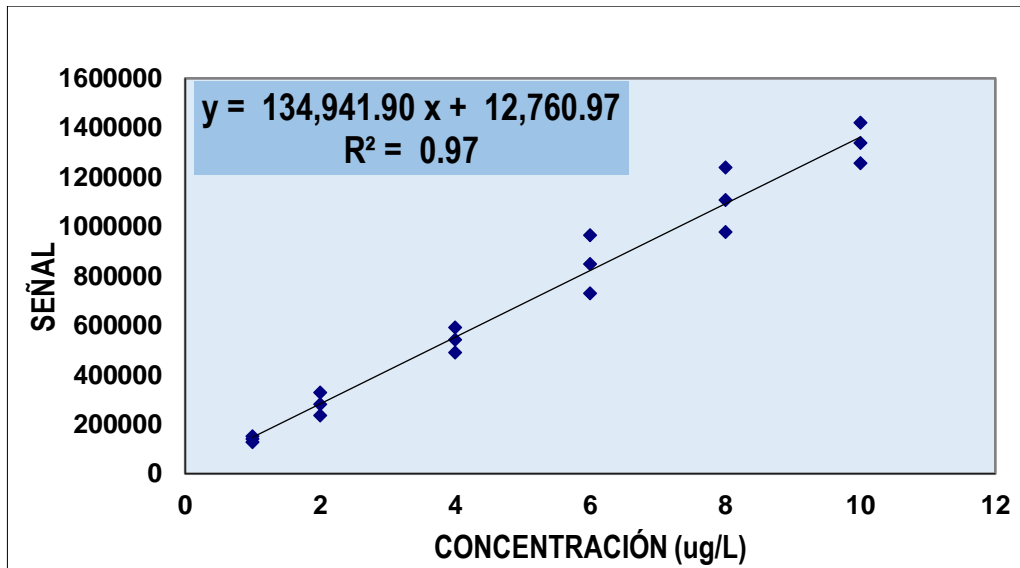


Gráfico 9. Curva de linealidad 1,2,3,7,8-PeCDF

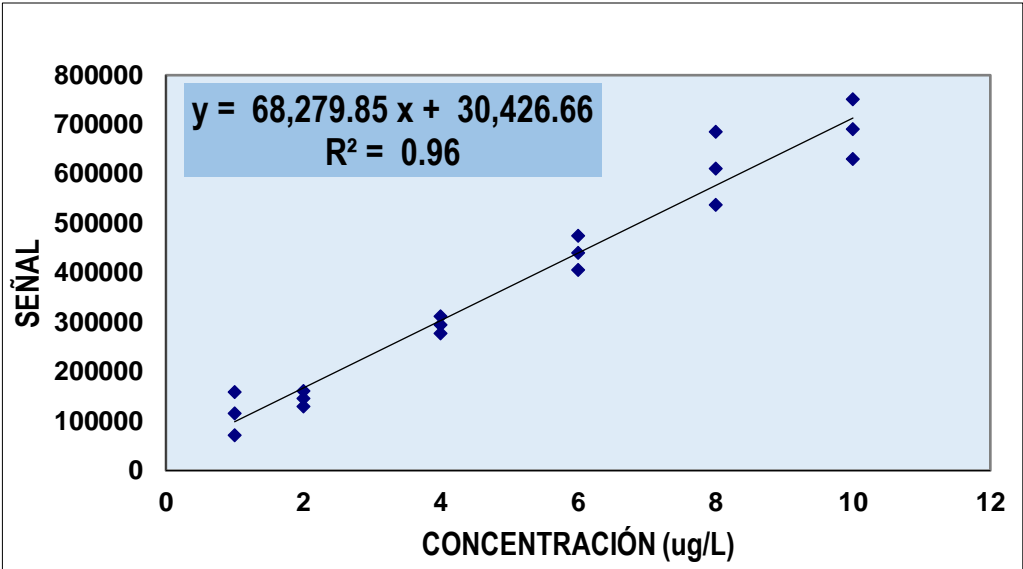


Gráfico 10. Curva de linealidad 2,3,4,7,8-PeCDF

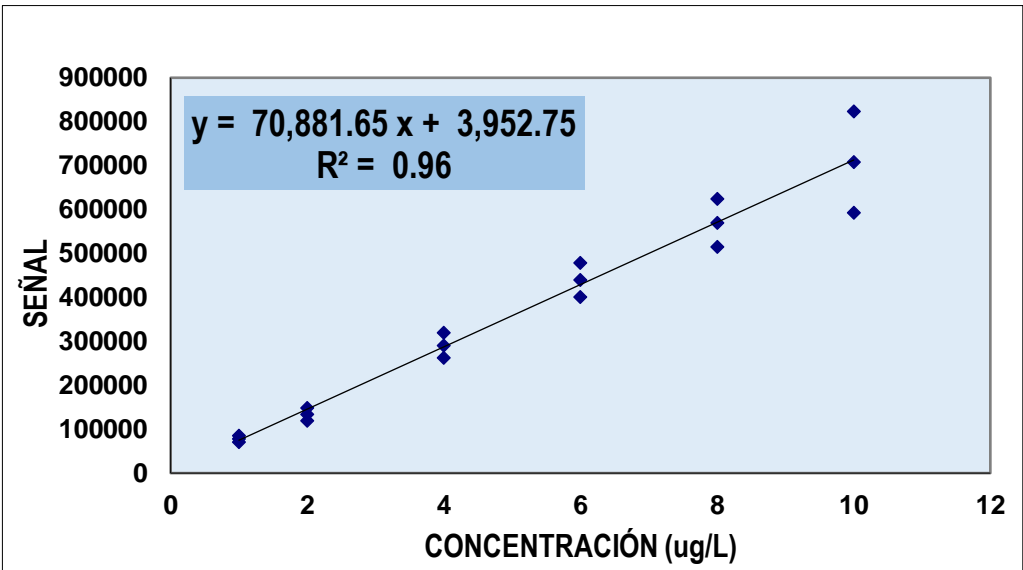


Gráfico 11. Curva de linealidad 1,2,3,4,7,8-HxCDF

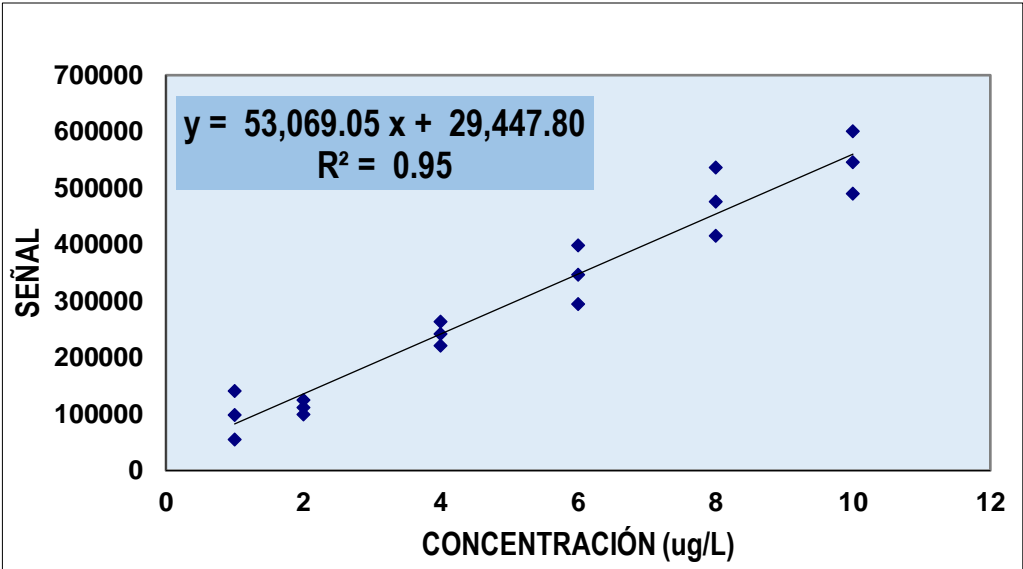


Gráfico 12. Curva de linealidad 1,2,3,6,7,8-HxCDF

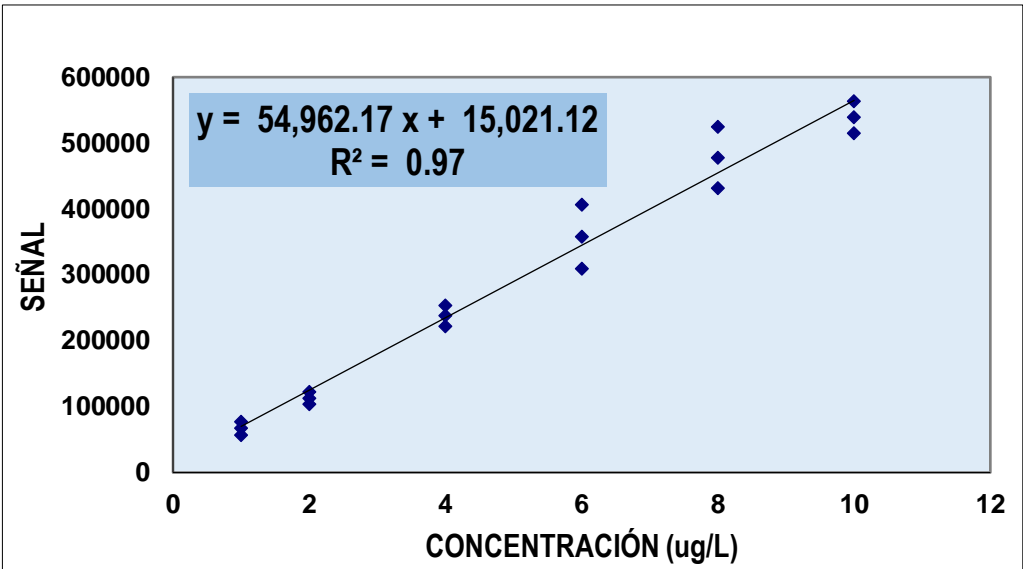


Gráfico 13. Curva de linealidad 2,3,4,6,7,8-HxCDF

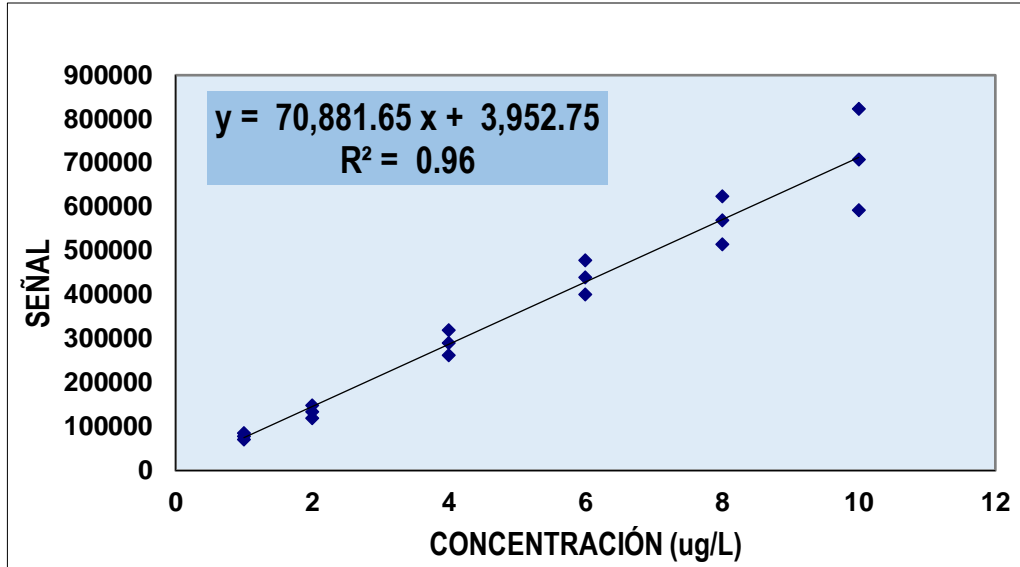


Gráfico 14. Curva de linealidad 1,2,3,7,8,9-HxCDF

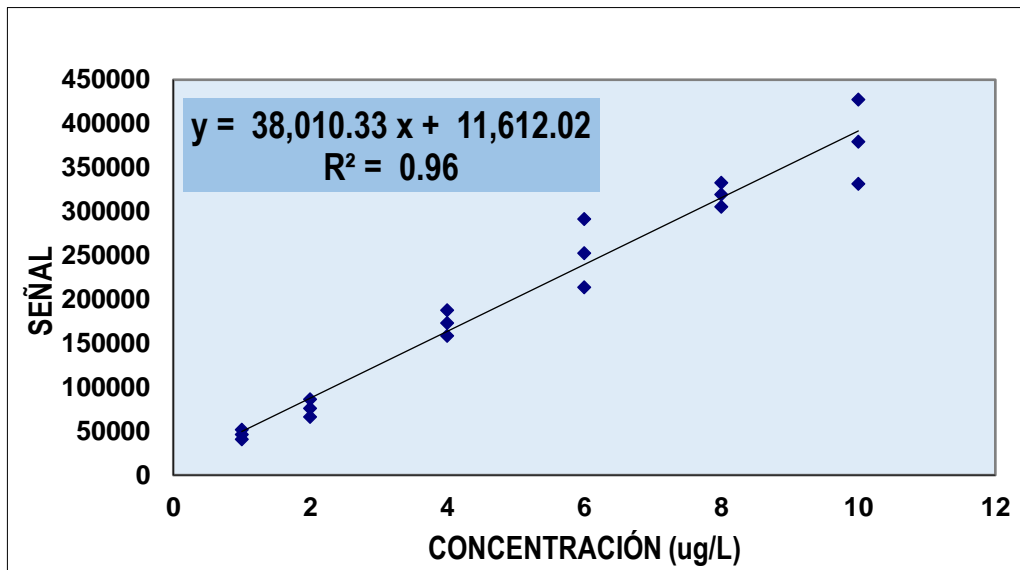


Gráfico 15. Curva de linealidad 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF

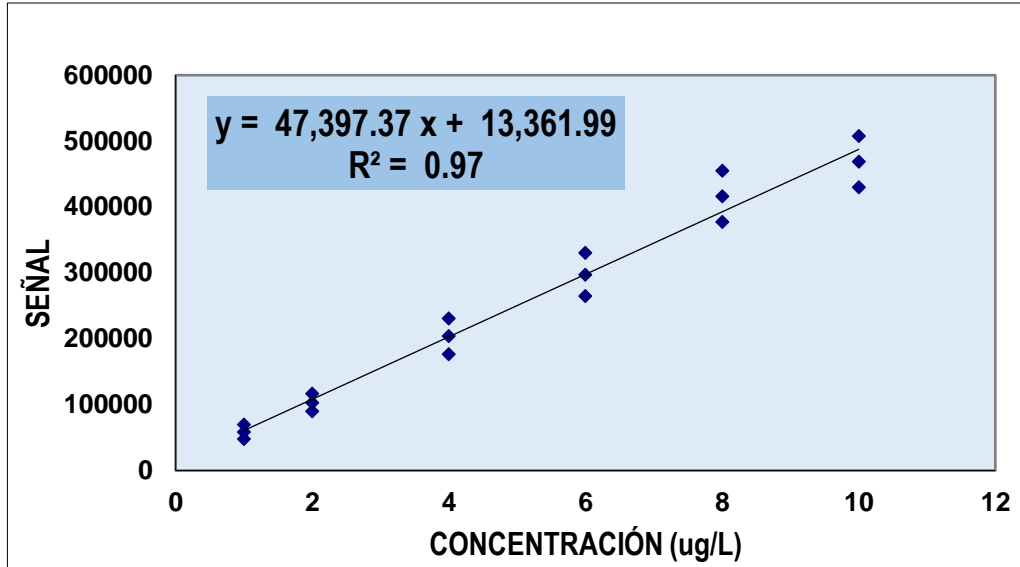


Gráfico 16. Curva de linealidad 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF

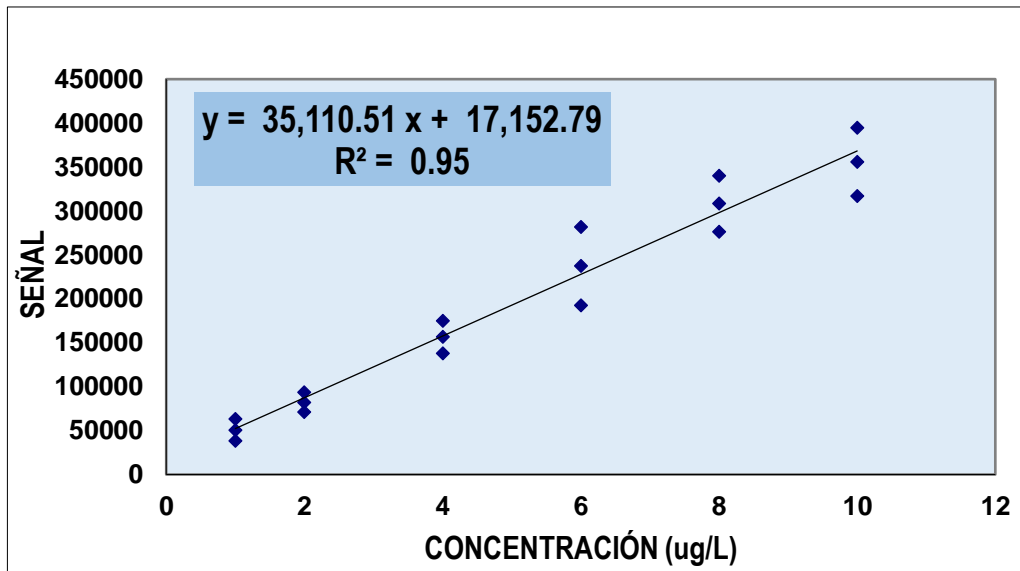


Gráfico 17. Curva de linealidad OCDF

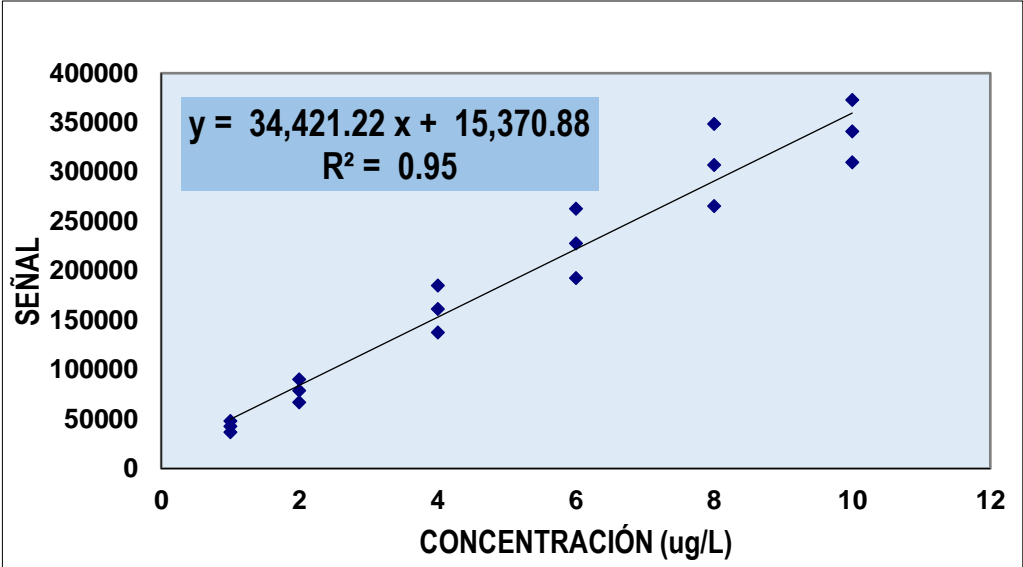


Tabla 4. Concentración de BM, LCS, Muestra y Duplicado de muestra obtenido por el GCMS-TQ

Analitos	BM ug/L	LCS ug/L	Muestra ug/L	Duplicado muestra ug/L
2,3,7,8-TCDD	0.0024	2.8540	0.0048	0.0018
1,2,3,7,8-PeCDD	0.0023	2.9352	0.0095	0.0069
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.0825	5.8751	0.0929	0.0380
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.0378	5.5063	0.0776	0.0570
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.0582	5.8953	0.0358	0.0266
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.0768	11.4812	0.0967	0.0957
OCDD	0.0938	11.6626	0.0709	0.0792
2,3,7,8-TCDF	0.0947	5.8485	0.0065	0.0871
1,2,3,7,8-PeCDF	0.0298	5.8205	0.0603	0.0691
2,3,4,7,8-PeCDF	0.0659	5.3812	0.0181	0.0360
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.0651	5.6585	0.0437	0.0022
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.0249	5.5723	0.0044	0.0571
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.0471	5.4952	0.0885	0.0106
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.0969	5.7006	0.0619	0.0153
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.0244	5.3783	0.0293	0.0063
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.0941	5.6228	0.0558	0.0030
OCDF	0.0536	5.8638	0.0452	0.0815

Tabla 5. Valor reportable de Dioxinas [suma de policlorodibenzo-para-dioxinas (PCDD) y policlorodibenzofuranos (PCDF)], de la muestra analizada, expresada en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (TEQ- OMS), utilizando los factores de equivalencia de toxicidad de la misma organización (TEF-OMS, 2005).

Compuestos	Concentración * (ng/kg)	TEF OMS 2005	TEQ ** OMS (ng/kg)
2,3,7,8-TCDD	0.0024	1	0.0024
1,2,3,7,8-PeCDD	0.0398	1	0.0398
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.0465	0.1	0.0046
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.0388	0.1	0.0039
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.0179	0.1	0.0018
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.0084	0.01	0.0001
OCDD	0.0355	0.0003	0.0000
2,3,7,8-TCDF	0.0033	0.1	0.0003
1,2,3,7,8-PeCDF	0.0302	0.03	0.0009
2,3,4,7,8-PeCDF	0.0091	0.3	0.0027
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.0219	0.1	0.0022
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.0022	0.1	0.0002
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.0443	0.1	0.0044
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.0310	0.1	0.0031
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.0147	0.01	0.0001
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.0279	0.01	0.0003
OCDF	0.0226	0.0003	0.0000
Valor Reportable			0.0669

**calculado de acuerdo a la ecuación 1.*

***calculado de acuerdo a la ecuación 2.*

VI. DISCUSIÓN

Para la determinación de dioxinas y furanos se usó el sistema cromatógrafo gaseoso Agilent 7890 B equipado con detector de masa Agilent 7010B, debido a que este sistema adapta la capacidad de separación que tiene la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas triple cuadrupolo. Esta adaptabilidad permite analizar y cuantificar compuestos a nivel de trazas en mezclas complejas, como la harina de pescado, con una elevada de efectividad. Se usa una columna Agilent DB-5ms Ultra Inerte, compuesta por fenilo al 5% y por polidimetilsiloxano al 95%, una columna apolar que tendrá mayor afinidad a compuestos apolares. Juan Luengo L. dice: “La solubilidad de las dioxinas en agua decrece cuando aumenta el número de átomos de cloro” (26); por tanto, mientras más átomos de cloro presenten la dioxinas o furanos, más se retendrán en la fase estacionaria; esto se ve reflejado en el cromatograma (figura 6), donde el tiempo de retención está relacionado en gran medida con la cantidad de cloros presentes en las dioxinas y furanos; razón por el cual en la figura 6 se pueden distinguir 5 secciones muy bien remarcados, entre el minuto 15 al 16 se observan al tetraclorodibenzo-p-dioxina y el tetraclorodibenzofurano, entre el minuto 17 al 19 se observan al pentaclorodibenzo-p-dioxina y a los 2 pentaclorodibenzofuranos, entre el minuto 20 al 22 se observan a las 3 hexaclorodibenzo-p-dioxinas y a los 4 hexalorodibenzofuranos, entre el minuto 23 al 26 se observan al pentaclorodibenzo-p-dioxina y a los 2 pentaclorodibenzofuranos y entre el minuto 28 al 29 se observan al octaclorodibenzo-p-dioxina y el octaclorodibenzofurano.

En la tabla 3 se observa los límites de detección de las dioxinas y los furanos, estos varían entre 0.25 ug/L a 1 ug/L. Estos límites se determinaron mediante experimentos de diferentes diluciones en los estándar de dioxinas y furanos, haciendo corridas en el GC/MS-TQ e interpretando los cromatogramas (figura 6; en el caso del 2,3,7,8-TCDD y 1,2,3,7,8-PeCDD se obtuvo un límite más bajo (0.25 ug/L) comparado a los demás analitos, debido a que son las dioxinas más tóxicas según la organización mundial de la salud (10) y que a esas concentraciones son detectables; en el caso de 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD y OCDD, se obtuvo un límite de detección mayor debido a que su resolución en el cromatograma a menos de 1 ug/L no es detectable. Los demás dioxinas y furanos tienen un límite de detección de 0.5 ug/L, en los cuales sus picos en el cromatograma son detectables (figura 6). Una vez determinada la concentración mínima para la detección de los picos de cada analito en el cromatograma, se realizó el método cromatográfico y se hicieron 7 corridas. Se determinó que los valores son reproducibles, que la desviación estándar no varía considerablemente y además el porcentaje de recuperación es mayor al 85%.

Con el límite de detección, se puede determinar el límite de cuantificación de cada analito, que es el doble del límite de detección.

En la figura 6 se observa los picos de las 7 dioxinas y los 10 furanos; el 2,3,7,8-TCDD presenta un pico con mayor resolución, los 3 picos juntos en el tiempo de retención TR (21 min) son las 3 HxCDD, las cuales son isómeros, porque presentan la misma cantidad de cloros en sus estructuras. Se observa también el pico con

menos resolución en el tiempo de retención TR (29,2 min), la cual corresponde al OCDD.

Para la separación y detección de todos los picos de los analitos se requiere por lo menos 29.5 minutos en el tiempo de corrida, esto para que se diferencien los picos. En las curvas de linealidad, la concentración más bajo cuantificable (límite de cuantificación) para 2,3,7,8-TCDD y 1,2,3,7,8-PeCDD es 0,5 ug/L, para 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD y OCDD es 2 ug/L y para los demás analitos es 1ug/L. La concentración máxima de cada estándar se calcula a partir del límite de cuantificación multiplicado por el factor 10. La concentración para 2,3,7,8-TCDD y 1,2,3,7,8-PeCDD es 5 ug/L, para 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD y OCDD es 20 ug/L y para los demás analitos es 10 ug/L.

En las curvas de linealidad de las dioxinas (gráficos 1 - 7) y los furanos (gráficos 8 - 17) el coeficiente de determinación es mayor al 95 %, lo cual nos indica que la relación entre las concentraciones de los analitos y las señales (áreas) son lineales; por lo tanto, se puede cuantificar las concentraciones de dioxinas y furanos.

En la tabla 4 se observa las concentraciones obtenidas de las dioxinas y los furanos de la muestra de harina de pescado, además se tiene las concentraciones de sus controles, como el blanco de método, la muestra control de laboratorio y el duplicado de la muestra, las cuales verifican que el resultado obtenido de la muestra sea confiable. Cabe resaltar que las concentraciones de cada dioxina y furano en la muestra de harina de pescado son menores a sus límites de cuantificación, lo que nos indica su “ausencia”.

El duplicado de muestra presenta concentraciones por debajo al límite de cuantificación, igual a la muestra, esto demuestra la confianza en que la prueba dio resultados confiables. La concentración del blanco de método BM para cada analito es prácticamente cero, esto nos indica que el método establecido está correcto, que no presenta interferencias; por lo tanto, no presentan falsos positivos. La muestra control de laboratorio LCS para todos los analitos de dioxinas y furanos presentan una recuperación cercana a su valor adicionado, se tiene por tanto un buen porcentaje de recuperación. Además de la muestra control de laboratorio LCS, se usan los estándares internos marcados isotópicamente para determinar el porcentaje de recuperación, según las normas I.S. EN-16215:2020 (25) y EPA METHOD 8290 (27) . Se profundiza estos controles para asegurar la calidad del método de ensayo realizado y los controles establecidos (anexo 10).

En la tabla 5 se obtiene, de la muestra de harina de pescado, la concentración de dioxinas [suma de policlorodibenzo-para-dioxinas (PCDD) y policlorodibenzofuranos (PCDF)] expresada en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (TEQ- OMS). Para la obtención del valor reportable tenemos la ecuación 1 y 2, en los cuales se usan las concentraciones de lectura, volumen final concentrado (20 ul), peso inicial (40g) y los factores de equivalencia de toxicidad de la misma organización (anexo 4). En la tabla también se puede observar que el 2,3,7,8-TCDD y 1,2,3,7,8-PeCDD presentan un factor toxicológico de 1, lo cual nos indica su alta toxicidad y debido a eso su aporte elevado en el cálculo final para el valor reportable; los compuestos menos tóxicos

de las dioxinas y furanos analizados, son los OCDD y OCDF, las cuales presentan un factor toxicológico de 0.0003 y su aporte para el cálculo es muy bajo.

La toxicidad de las dioxinas y furanos aumenta a medida que disminuye la cantidad de cloro en sus estructuras, cabe resaltar que la dioxina más tóxica es la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (4)

El valor reportable de dioxinas expresada en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (TEQ- OMS), obtenido de la muestra de harina de pescado, es 0.0669 ng/kg, este valor es menor al límite máximo permisible en harina de pescado 1.25 ng/kg (2); lo cual indica que la muestra de harina de pescado no presenta dioxinas en un nivel que pueda causar daños en la salud.

VII. CONCLUSIÓN

- Los límites de detección para las dioxinas son: 0.25ug/L para 2,3,7,8-TCDD y 1,2,3,7,8-PeCDD; 0.5ug/L para 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD y 1,2,3,7,8,9-HxCDD; 1ug/L 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD y OCDD.
- El límite de detección para los 10 furanos es 0.5 ug/L.
- El límite de cuantificación para las dioxinas y furanos es el doble del límite de detección.
- Las curvas de linealidad de las dioxinas y furanos tienen un coeficiente de determinación (R^2) mayor a 95 %.
- El blanco de método, la muestra control de laboratorio y el duplicado de la muestra verifican que el resultado obtenido de la muestra de harina de pescado sea confiable.
- El valor reportable de dioxinas [suma de policlorodibenzo-para-dioxinas (PCDD) y policlorodibenzofuranos (PCDF)], de la muestra analizada, expresada en equivalentes tóxicos es 0.0669ng/kg, la cual es menor al límite máximo permisible (1.25 ng/kg).
- La determinación de dioxinas y furanos en matriz de harina de pescado es viable usando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo.

VIII. RECOMENDACIONES

- Para la realización del análisis de dioxinas usar equipos de protección adecuados debido a su alta toxicidad.
- Debido a alta toxicidad de dioxinas se recomienda trabajar en un laboratorio exclusivo.
- Este trabajo puede servir como base para la implementación metodológica en un laboratorio de análisis, y debido a la alta demanda del análisis de dioxinas, generaría elevadas ganancias.
- Los conocimientos adquiridos durante los estudios de la carrera de química constituyen una base sólida para seguir ampliando nuestros conocimientos y que sea posible cumplir metas desafiantes.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Karchner SI, Franks DG, Keneddy SWyHME. “The molecular basis for differential dioxin sensitivity in birds: Role of the aryl hydrocarbon receptor”. Proc Natl Acad Sci. 2006 April; 103(16).
2. Reglamento (UE) n° 277/2012. Modificación de los anexos I y II de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los contenidos máximos y los límites de intervención respecto a las dioxinas y furanos. 2012..
3. Fernández Bremauntz A. Las Sustancias Tóxicas Persistentes. Segunda ed. Ecología INd, editor. México; 2004.
4. Ortuño Sánchez M. La Cara Oculta de Alimentos y Cosméticos. Primera ed. Aiyana , editor. Málaga: Asociacion Aiyana; 2005.
5. Baird C. Química ambiental. segunda ed. Barcelona: Reverté S.A.; 2001.
6. Bodie Eugene Douglas JJA. Conceptos y modelos de Química inorgánica. Segunda ed. Barcelona: Reverté; 1994.
7. Pilar Saura PSP. La gestión y la comunicación de crisis en el sector de alimentación y bebidas: El análisis del caso español. La referencia a Europa y a EE.UU. Primera ed. Univ Pontifica Comillas , editor. Madrid; 2005.

8. Vitoria IFd. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Revista española de derecho internacional. 2002 Agosto; 54(9).
9. GC/LRMS CdDpCd. Cuantificación de Dioxinas por Cromatografía de GC/LRMS en Carnes y Leches. Tesis Doctoral. Nuevo León: Universidad Autonoma de Nuevo León, Química Analítica de la Facultad de Medicina; 2010.
- 10 OMS. Las dioxinas y sus efectos en la salud humana. [Online].; 2018 [cited 2020 Octubre 13]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dioxins-and-their-effects-on-human-health>.
- 11 Carrillo A. Toxicología de las dioxinas y su impacto en la salud humana. [Online].; 2010 [cited 2020 Octubre 23]. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n19/n19a07.pdf>.
- 12 OMS. Informe sobre la salud en el mundo-Protección de la salud pública mundial en el siglo XXI. [Online].; 2007 [cited 2020 Octubre 18]. Available from: https://www.who.int/whr/2007/07_report_es.pdf?ua=1.
- 13 FAO. Información y Análisis sobre el Comercio Mundial de Pescado. [Online].; 2019 [cited 2020 Noviembre 3]. Available from: <http://www.fao.org/in-action/globefish/marketreports/resource-detail/es/c/1242187/>.

- 14 Mar del Perú. Pesca de Anchoveta y Samasa. [Online].; 2017 [cited 2020
·
Noviembre 5]. Available from: <https://www.mardelperu.pe/pesca/10/pesqueria-anchoveta>.
- 15 PAHO. Inocuidad de Alimentos, Control Sanitario, HACCP. [Online].; 2016
·
[cited 2020 Noviembre 4]. Available from: <https://www.paho.org>.
- 16 DIGESA. Requisitos Sanitarios Para la exportación de Alimentos. [Online].; 2012
·
[cited 2020 Octubre 8]. Available from:
<http://www.prompex.gob.pe/Miercoles/Portal/MME/descargar.aspx?archivo=143F4CF9-6DFA-4DCF-ADB1-13C6F7778F4A.PDF>.
- 17 Quirós MB. Principios Y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases. Decimo ed.
·
Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 2006.
- 18 Arderiu XF. Bioquímica clínica y patología molecular. Segunda ed. Barcelona:
·
Reverté, S.A.; 1997.
- 19 Agilent Technologies, Inc. Agilent 7693A, Inyector Automático de Líquidos.
·
Quinta ed. Agilent Technologies I, editor. Wilmington, EE.UU.; 2010.
- 20 Agilent Technologies, Inc. Guía de selección de columnas Agilent J&W para GC.
·
Segunda ed. Technologies A, editor. EE.UU.; 2010.
- 21 Agilent Technologies, Inc. GC/MS de triple cuadrupolo Agilent 7000/7010.
·
Segunda ed. Technologies A, editor. EE.UU.; 2017.

- 22 Agilent Technologies, Inc. GC/MS Triple Quadrupolo 7010B. [Online].; 2020
· [cited 2020 Diciembre 22]. Available from: <https://www.agilent.com>.
- 23 Agilent Technologies, Inc. Analisis Cuantitativo MassHunter. [Online].; 2020
· [cited 2020 Diciembre 22]. Available from: <https://www.agilent.com>.
- 24 Agilent Technologies, Inc. Agilent MassHunter Workstation Software,
· Quantitative Analysis. 4th ed. Agilent , editor. EE.UU.; 2010.
- 25 Normalización Española UNE-EN 16215. Animal feeding stuffs: Methods of
· sampling and analysis - Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by
GC/HRMS and of indicator PCBs by GC/HRMS. [Online].; 2020 [cited 2020
Noviembre 2]. Available from: <https://www.une.org>.
- 26 MV. JLL. Dioxinas: una amenaza desde el medio ambiente. [Online].; 2008 [cited
· 2020 Diciembre 23]. Available from:
<https://revistas.uchile.cl/index.php/RT/article/view/15919/16405>.
- 27 METHOD 8290. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and
· polychlorinated dibenzofurans (pcdfs) by high-resolution gas
chromatography/highresolution mass spectrometry (hrgc/hrms). [Online].; 2007
[cited 2020 Noviembre 3]. Available from: <https://www.o2si.com/docs/epa-method-8290.pdf>.
- 28 UNE-EN 16215. Methods of sampling and analysis - Determination of dioxins
· and dioxin-like PCBs and of indicator PCBs by GC/HRMS. [Online].; 2020 [cited
2020 Diciembre 3]. Available from: <https://www.une.org>.

X. ANEXOS

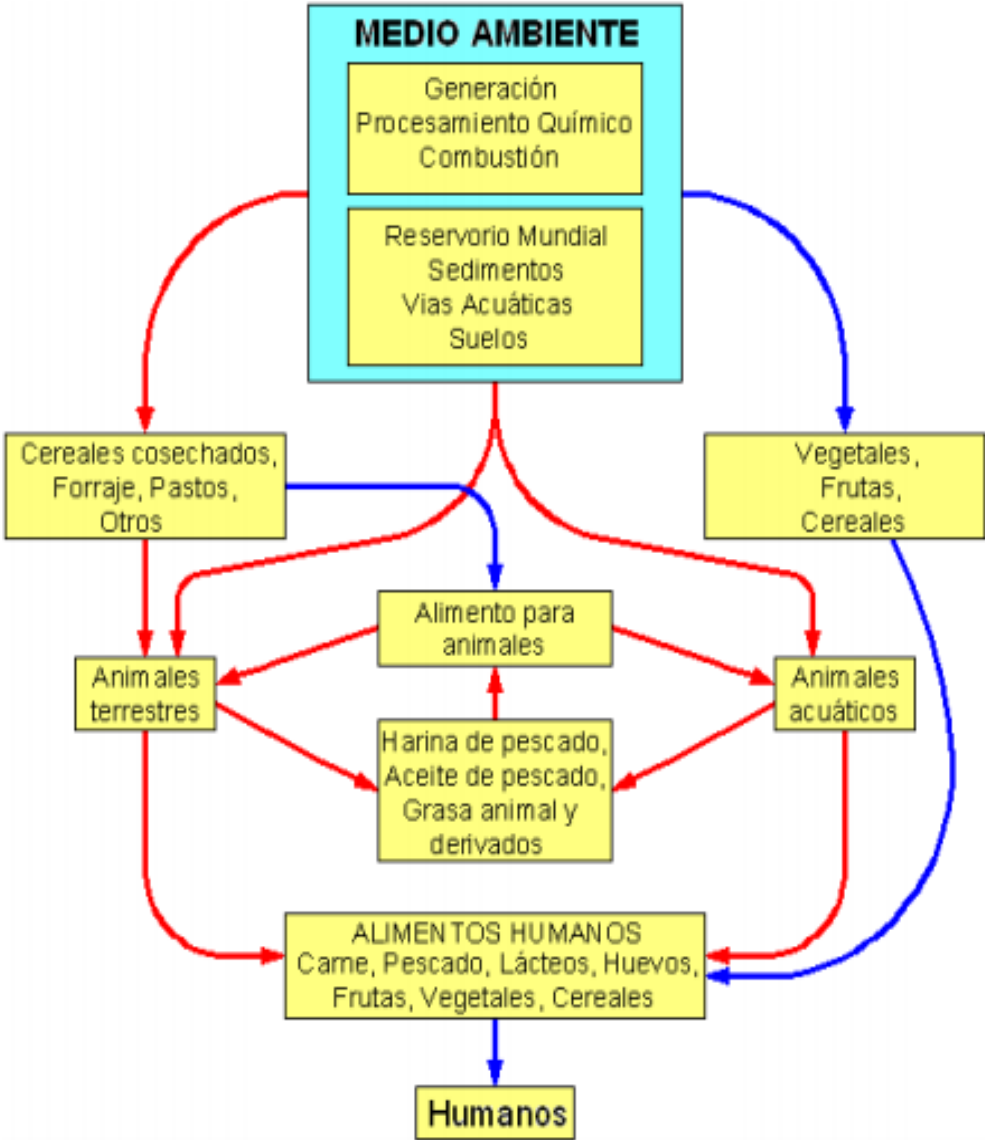
Anexo 1. Abreviatura de Dioxinas

Dioxinas	
Abreviatura	Nombre
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina
1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzo-p-dioxina
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina
1,2,3,6,7,8-HxCDD	1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina
1,2,3,7,8,9-HxCDD	1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzo-p-dioxina
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzo-p-dioxina
OCDD	Octaclorodibenzo-p-dioxina

Anexo 2. Abreviatura de Furanos

Furanos	
Abreviatura	Nombre
2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano
1,2,3,7,8-PeCDF	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano
2,3,4,7,8-PeCDF	2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano
1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzofurano
1,2,3,6,7,8-HxCDF	1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzofurano
1,2,3,7,8,9-HxCDF	2,3,4,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1,2,3,4,6,8,9-Heptaclorodibenzofurano
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1,2,3,4,7,8,9-Heptaclorodibenzofurano
OCDF	Octaclorodibenzofurano

Anexo 3. Vías de contaminación de dioxinas



Anexo 4. Valores de TEF para compuestos individuales.

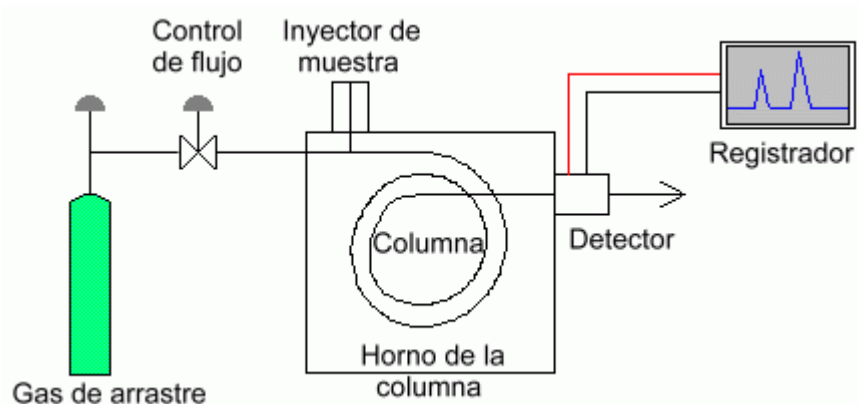
Compuestos	WHO 2005 TEF *
Policlorodibenzo-para-dioxinas	
2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01
OCDD	0,0003
Policlorodibenzofuranos	
2,3,7,8-TCDF	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01
OCDF	0,000 3

* Reglamento UE 2017/644. Métodos de muestreo y análisis para el control de los niveles de dioxinas, PCB similares a las dioxinas y PCB no similares a las dioxinas en determinados productos alimenticios

Anexo 5. Límite Máximo permisible de dioxinas en harina de pescado.

Sustancias indeseables	Productos destinados a la alimentación animal	Contenido máximo en ng EQT PCDD/F OMS/kg (ppm) ⁽¹⁾ en piensos calculado sobre la base de un contenido de humedad del 12 %
1. Dioxinas [suma de policlorodibenzo- <i>para</i> -dioxinas (PCDD) y policlorodibenzofuranos (PCDF) expresada en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (EQT-OMS), utilizando los factores de equivalencia tóxica de la misma organización (FET-OMS, 2005) ⁽²⁾]	Materias primas para piensos de origen vegetal, excepto:	0,75
	— aceites vegetales y sus subproductos.	0,75
	Materias primas para piensos de origen mineral.	0,75
	Materias primas para piensos de origen animal:	
	— grasa animal, incluida la grasa de leche y la grasa de huevo,	1,50
	— otros productos de animales terrestres, incluidos la leche y los productos lácteos y los huevos y los ovoproductos,	0,75
	— aceite de pescado,	5,0
	— pescados, otros animales acuáticos y sus productos derivados, excepto el aceite de pescado y las proteínas de pescado, hidrolizadas, que contengan más de un 20 % de grasa ⁽³⁾ ,	1,25
— proteínas de pescado, hidrolizadas, que contengan más de un 20 % de grasa,	1,75	

Anexo 6. Diagrama de flujo de la técnica cromatográfica gaseoso.



Anexo 7. Dioxinas, furanos y sus análogos marcados isotópicamente

Dioxinas	Dioxinas marcadas isotópicamente	Furanos	Furanos marcados isotópicamente
2,3,7,8-TCDD	^{13}C -2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-TCDF	^{13}C -2,3,7,8-TCDF
1,2,3,7,8-PeCDD	^{13}C -1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,7,8-PeCDF	^{13}C -1,2,3,7,8-PeCDF
1,2,3,4,7,8-HxCDD	^{13}C -1,2,3,4,7,8-HxCDD	2,3,4,7,8-PeCDF	^{13}C -2,3,4,7,8-PeCDF
1,2,3,6,7,8-HxCDD	^{13}C -1,2,3,6,7,8-HxCDD	1,2,3,4,7,8-HxCDF	^{13}C -1,2,3,4,7,8-HxCDF
1,2,3,7,8,9-HxCDD	^{13}C -1,2,3,7,8,9-HxCDD	1,2,3,6,7,8-HxCDF	^{13}C -1,2,3,6,7,8-HxCDF
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	^{13}C -1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	2,3,4,6,7,8-HxCDF	^{13}C -2,3,4,6,7,8-HxCDF
OCDD	^{13}C -OCDD	1,2,3,7,8,9-HxCDF	^{13}C -1,2,3,7,8,9-HxCDF
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	^{13}C -1,2,3,4,6,7,8-HpCDF
		1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	^{13}C -1,2,3,4,7,8,9-HpCDF
		OCDF	^{13}C -OCDF

Anexo 8. Masas del ion precursor y ion producto de las dioxinas y furanos.

Name	Type	RT*	Quantifier			Qualifier		
			Precursor ion	Product ion	CE [†] (V)	Precursor ion	Product ion	CE [†] (V)
¹³ C-2378-TCDF	PCDF	20.32	315.9	251.9	33	317.9	253.9	33
2378-TCDF	PCDF	20.34	303.9	240.9	33	305.9	242.9	33
¹³ C6-1234-TCDD	PCDD	20.44	325.9	262.9	28	327.9	264.9	28
¹³ C-2378-TCDD	PCDD	20.74	331.9	267.9	24	333.9	269.9	24
2378-TCDD	PCDD	20.75	319.9	256.9	24	321.9	258.9	24
¹³ C-12378-PeCDF	PCDF	23.29	351.9	287.9	35	349.9	285.9	35
12378-PeCDF	PCDF	23.29	339.9	276.9	35	337.9	274.9	35
¹³ C-23478-PeCDF	PCDF	24.08	351.9	287.9	35	349.9	285.9	35
23478-PeCDF	PCDF	24.10	339.9	276.9	35	337.9	274.9	35
¹³ C-PCB 169	non-Ortho PCB	24.19	371.9	301.9	28	369.9	299.9	28
PCB 169	non-Ortho PCB	24.20	359.9	289.9	28	357.8	287.9	28
¹³ C-12378-PeCDD	PCDD	24.34	365.9	301.9	25	367.9	303.9	25
12378-PeCDD	PCDD	24.36	355.9	292.9	25	353.9	290.9	25
¹³ C-123478-HxCDF	PCDF	27.04	385.8	321.9	35	387.8	323.9	35
123478-HxCDF	PCDF	27.05	373.8	310.9	35	375.8	312.9	35
¹³ C-123678-HxCDF	PCDF	27.18	385.8	321.9	35	387.8	323.9	35
123678-HxCDF	PCDF	27.19	373.8	310.9	35	375.8	312.9	35
¹³ C-234678-HxCDF	PCDF	27.83	385.8	321.9	35	387.8	323.9	35
234678-HxCDF	PCDF	27.85	373.8	310.9	35	375.8	312.9	35
¹³ C-123478-HxCDD	PCDD	28.00	403.8	339.8	25	401.8	337.9	25
123478-HxCDD	PCDD	28.02	389.8	326.9	25	391.8	328.8	25
¹³ C-123678-HxCDD	PCDD	28.12	403.8	339.8	25	401.8	337.9	25
123678-HxCDD	PCDD	28.14	389.8	326.9	25	391.8	328.8	25
¹³ C-123789-HxCDD	PCDD	28.49	403.8	339.8	25	401.8	337.9	25
123789-HxCDD	PCDD	28.50	389.8	326.9	25	391.8	328.8	25
¹³ C-123789-HxCDF	PCDF	28.98	385.8	321.9	35	387.8	323.9	35
123789-HxCDF	PCDF	29.00	373.8	310.9	35	375.8	312.9	35
¹³ C-1234678-HpCDF	PCDF	31.13	419.8	355.8	36	421.8	357.8	36
1234678-HpCDF	PCDF	31.14	407.8	344.8	36	409.8	346.8	36
¹³ C-1234678-HpCDD	PCDD	32.97	437.8	373.8	25	435.8	371.8	25
1234678-HpCDD	PCDD	33.01	423.8	360.8	25	425.8	362.8	25
¹³ C-1234789-HpCDF	PCDF	33.97	419.8	355.8	36	421.8	357.8	36
1234789-HpCDF	PCDF	34.00	407.8	344.8	36	409.8	346.8	36
¹³ C-OCDD	PCDD	39.38	469.7	405.8	26	471.7	407.8	26
OCDD	PCDD	39.41	457.7	394.8	26	459.7	396.8	26
¹³ C-OCDF	PCDF	39.83	453.7	389.8	35	455.7	391.8	35
OCDF	PCDF	39.84	441.7	378.8	35	443.7	380.8	35

Anexo 9. Tiempo de retención (TR) de dioxinas y furanos

Analito	TR
2378 TCDF	15.43
2378 TCDD	15.56
12378 PeCDF	17.44
23478 PeCDF	17.89
12378 PeCDD	18.21
123478 HxCDF	20.35
123678 HxCDF	20.43
234678 HxCDF	20.89
123478 HxCDD	21.01
123678 HxCDD	21.18
123789 HxCDD	21.42
123789 HxCDF	21.89
1234678 HpCDF	23.49
1234678 HpCDD	24.74
1234789 HpCDF	25.51
OCDD	28.72
OCDF	29.13

Anexo 10. Aseguramiento de calidad del método de ensayo.

En la siguiente tabla, se indican los controles establecidos para el ensayo.

Controles aplicados	Criterio	Referencia
Blanco	< LDM	EPA 8290 - Reglamento UE 2017/644 Comisión Europea
Patrón de trabajo LCS	%R: 60-120%	EPA 8290 - Reglamento UE 2017/644 Comisión Europea
Duplicado de muestra	%RPD ≤ 25%	EPA 8290 - Reglamento UE 2017/644 Comisión Europea
Patrón interno deuterado	%R: 60-120%	Reglamento UE 2017/644 Comisión Europea