

Validación y aplicación de la extracción rápida de plaguicidas polares (QuPPE) y cromatografía líquida de ultra rendimiento-espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) para analizar perclorato en vegetales de México

Validation and application of quick polar pesticide (QuPPE) extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to analyze perchlorate in vegetables from Mexico

Leyva-Morales J.B.^{1*}, Calderón R.^{2,3}, García-Hernández, J.⁴, Palma P.⁵, Bastidas-Bastidas, P.J.⁶, Zambrano-Soria, M.⁷, Olmeda-Rubio, C.⁶, Romo-Gómez, C.¹, Acevedo-Sandoval, O.A.¹, Camacho-López, C.¹

¹ Área Académica de Química, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Mineral de la Reforma 42184, Hidalgo, México. ² Núcleo de Investigación en Sustentabilidad Agroambiental, Facultad de Medicina Veterinaria y Agronomía, Universidad de Las Américas, Manuel Montt 948, 7500975 Providencia, Región Metropolitana, Santiago, Chile. ³ Centro de Investigación y Desarrollo de Ecosistemas Hídricos, Facultad de Ingeniería, Ciencia y Tecnología, Universidad Bernardo O'Higgins, Av. Viel 1497, 8370993 Santiago, Región Metropolitana, Chile. ⁴ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Carretera al Varadero Nacional, Km. 6.6, Col. Las Playitas, Guaymas 85480, Sonora, México. ⁵ Laboratorio de Salud Pública, Ambiental y Laboral, Servicio Regional Ministerial, Ministerio de Salud, P. Bulnes 194, 8330339 Santiago, Región Metropolitana, Chile. ⁶ Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (Residuos de Plaguicidas), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Unidad Culiacán, Carretera a Eldorado Km. 5.5, Campo el Diez 80393, Culiacán, Sinaloa, México. ⁷ Laboratorio Nacional de Investigación para la Inocuidad Alimentaria (LANIIA)-Unidad Nayarit, Universidad Autónoma de Nayarit, Calle Tres S/N. Colonia. Cd. Industrial, Tepic 63173, Nayarit, México.



Please cite this article as/Como citar este artículo:

Leyva-Morales J.B., Calderón R., García-Hernández, J., Palma P., Bastidas-Bastidas, P.J., Zambrano-Soria, M., Olmeda-Rubio, C., Romo-Gómez, C., Acevedo-Sandoval, O.A., Camacho-López, C. (2024). Validation and application of quick polar pesticide (QuPPE) extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to analyze perchlorate in vegetables from Mexico. *Revista Bio Ciencias*, 11, e1766. <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1766>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: September 18th 2024.

Accepted/Aceptado: October 22th 2024.

Available on line/Publicado: October 24th 2024.

RESUMEN

El perclorato es considerado un contaminante que puede generar alteración endocrina en las personas expuestas a través de diversos alimentos, incluidos los vegetales. Para abordar la falta de información sobre este problema de salud en México, desarrollamos un método analítico para cuantificar el perclorato en vegetales de consumo común basado en la extracción rápida de plaguicidas polares (QuPPE) y cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplado a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS). El método fue validado mediante los parámetros de selectividad, exactitud, precisión, linealidad, efecto matriz, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) según las pautas de SANTE. El método desarrollado exhibió un rango lineal de 0.005 a 0.100 mg/kg con valores LOD y LOQ de 0.001 y 0.003 mg/kg, respectivamente. La recuperación en la matriz de tomate fortificada fue de 96.85 ± 12.90 % con un coeficiente de variación (CV) de 11.55 ± 0.84 %. El método se aplicó para analizar 31 muestras de vegetales recolectadas de diferentes regiones de México. Las concentraciones de perclorato variaron desde no detectado (ND) hasta 0.016 mg/kg de peso fresco. Este método genera evidencia científica robusta para implementar y fortalecer programas de monitoreo de perclorato en matrices alimentarias, apoyando los esfuerzos para regular este analito en México.

PALABRAS CLAVE: UPLC-MS/MS, Perclorato, Vegetales, Validación, México.

ABSTRACT

Perchlorate is considered a contaminant that can cause endocrine disruption in people exposed through various foods, including vegetables. To address the lack of information on this health problem in Mexico, we developed an analytical method to quantify perchlorate in commonly consumed vegetables based on quick polar pesticide (QuPPE) extraction and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). According to SANTE guidelines, the method was validated through selectivity, accuracy, precision, linearity, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ). The developed method exhibited a linear range of 0.005–0.100 mg/kg with LOD and LOQ values of 0.001 and 0.003 mg/kg, matrix effect, respectively. Recovery in a fortified tomato matrix was 96.85 ± 12.90 % with a coefficient of variation (CV) of 11.55 ± 0.84 %. The method was applied to analyze 31 vegetable samples collected from different regions in Mexico. Perchlorate concentrations ranged from not detected (ND) to 0.016 mg/kg, fresh weight. This method generates robust scientific evidence to implement and strengthen perchlorate monitoring programs for food matrices, supporting efforts to regulate this analyte in Mexico.

KEY WORDS: UPLC-MS/MS, Perchlorate, Vegetables, Validation, Mexico.

Introducción

Perclorato (ClO_4^-) es un anión compuesto por un átomo de cloro en el centro unido a cuatro átomos de oxígeno (Motzer, 2001; Kumarathilaka *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2019). Es una sustancia fuertemente oxidante que ha sido principalmente utilizada en la industria aeroespacial y como un aditivo en fuegos artificiales, explosivos y combustible de cohetes (Seyfferth and Parker, 2006; Hepperle *et al.*, 2013; Leoterio *et al.*, 2017; Bauer, 2018; Constantinou *et al.*, 2019; Savini *et al.*, 2019; Calderón *et al.*, 2020a; Liao *et al.*, 2020; Panseri *et al.*, 2020; Huertas-Pérez *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022). La combinación de su uso excesivo y la falta de procesos de disposición final han generado que el perclorato se encuentre extensamente diseminado en el ambiente permitiendo su entrada a la cadena alimentaria. De hecho, se ha informado que el perclorato se encuentra en múltiples fuentes de agua (agua potable, agua de riego, agua superficial y agua subterránea), suelo, alimentos de origen vegetal y productos animales. Además, en la última década, los fertilizantes han sido identificados como una de las principales fuentes de insumo de perclorato en los sistemas agroalimentarios. Las vías de exposición más relevantes al perclorato

en humanos son el consumo de alimentos y agua (Sánchez *et al.*, 2005; Seyfferth & Parker, 2006; Yang *et al.*, 2011; Hepperle *et al.*, 2013; Calderón *et al.*, 2017; Bauer *et al.*, 2018; Chamkasem, 2018; Rajski *et al.*, 2018; Constantinou *et al.*, 2019; Dong *et al.*, 2019; Herrera-López *et al.*, 2019; Melton *et al.*, 2019; Savini *et al.*, 2019; Calderón *et al.*, 2020a,b,c; Garrido *et al.*, 2020; Liao *et al.*, 2020; Panseri *et al.*, 2020; Cutillas & Fernández-Alba, 2021; Calderón *et al.*, 2022a,b; Huertas-Pérez *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022; Muñoz-Arango *et al.*, 2023).

La exposición constante al perclorato a través del consumo de agua y alimentos representa una grave amenaza para la salud pública. El perclorato es un potente inhibidor que compite con el simportador de yoduro de sodio (NIS), que reduce el transporte activo de yodo a la tiroides y disminuye la producción de hormonas tiroideas T_3 y T_4 y afecta la homeostasis celular en el cuerpo (Leung *et al.*, 2010).

Las personas que padecen algún trastorno tiroideo, mujeres embarazadas o bebés son particularmente vulnerables a la exposición al perclorato (Calderón *et al.*, 2017; Leoterio *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2019; Huertas-Pérez *et al.*, 2022). Aproximadamente entre el 4 y el 10 % de la población mundial presenta hipotiroidismo (Flores-Rebollar *et al.*, 2015). En México, entre el 1.2 y el 7.2 % de los adultos tienen hipotiroidismo manifiesto y entre el 5.6 y el 15.4 % de los adultos tienen hipotiroidismo subclínico (Flores-Rebollar *et al.*, 2015; Juárez-Cedillo *et al.*, 2017). Las mujeres embarazadas son el grupo más vulnerable al hipotiroidismo (12.8 % de hipotiroidismo manifiesto y 21.1 % de hipotiroidismo subclínico) (Cruz-Cruz *et al.*, 2014).

Así, se necesitan con urgencia métodos analíticos robustos para evaluar el perclorato en alimentos de origen vegetal en México debido a la falta de información disponible, la ausencia de regulaciones para su uso en el país y dada la frecuencia con la que este compuesto se detecta en diferentes matrices ambientales en otros países del mundo (Calderón *et al.*, 2017; Bauer *et al.*, 2018; Chamkasem 2018; Rajski *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2020; Cutillas *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022).

Actualmente, se encuentran disponibles diversos métodos analíticos, que tienen baja sensibilidad, para analizar el perclorato en vegetales: la fluorescencia de rayos X (Hatzistavros & Kallithrakas-Kontos, 2011); la electroforesis (Kiplagat *et al.*, 2011); la dispersión Raman mejorada en superficie (SERS) (Hu *et al.*, 2021); la cromatografía iónica (IC) acoplada a conductividad (USEPA, 2000), espectrometría de masas (IC-MS) (Mathew *et al.*, 2005) y a espectrometría de masas en tándem (IC-MS/MS) (Bauer *et al.*, 2018; Panseri *et al.*, 2020) y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP/MS) (Voogt & Jackson, 2010); potenciometría con electrodos selectivos de iones (Leoterio *et al.*, 2017); y la cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) (Lee *et al.*, 2012; Chamkasem, 2018; Herrera-López *et al.*, 2019; Huerta-Pérez *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022). De acuerdo con Dong *et al.* (2019), de los métodos anteriormente mencionados el análisis de fluorescencia de rayos X, la potenciometría con electrodos selectivos de iones, así como aquel que emplea electroforesis presentan una sensibilidad reducida. En tanto, la IC acoplada a detector de conductividad no posee selectividad dando lugar al reporte frecuente de falsos positivos. Además, la IC-MS es susceptible a la presencia de interferencias. En este escenario, la

UPLC-MS/MS ha demostrado ser eficaz en la determinación de analitos polares, incluido el perclorato en matrices complejas, al tiempo que muestra una selectividad y sensibilidad adecuadas (Dong *et al.*, 2019; Zang *et al.*, 2022).

Dada la alta tasa de consumo de vegetales en México (Pérez-Lizaur *et al.*, 2014) y que la ingesta de vegetales es la principal vía de exposición a este compuesto, la población corre un riesgo potencialmente alto de exposición al perclorato, su límite máximo de residuos en vegetales es de 0.05 mg/kg (Calderón *et al.*, 2017, Calderón *et al.*, 2020a,b; European Commission, 2020; Calderón *et al.*, 2022a,b). Por lo anterior, este estudio tuvo como objetivo validar y aplicar el método de extracción rápida de plaguicidas polares (QuPPE) (Anastassiades *et al.*, 2023) y su posterior cuantificación mediante UPLC-MS/MS para la determinación de perclorato en vegetales de gran consumo en México (tomate, pimiento verde, espinacas y lechuga) (Pérez-Lizaur *et al.*, 2014; Calderón *et al.*, 2022b; Calderón *et al.*, 2023).

Material y Métodos

Reactivos y químicos

El estándar analítico de perclorato (IC-PER-10X-1) (pureza 99 %) fue suministrado por Accustandard Inc. (New Haven, USA). Los solventes acetonitrilo y metanol (grado MS, JT Baker), acetonitrilo y agua (grado HPLC, JT Baker) fueron proporcionados por Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V. (Nuevo León, México). El formiato de amonio y el ácido fórmico, grado ACS, se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

Equipos

Los equipos utilizados fueron: Licuadora industrial JR de 12 L, Centrífuga (Hettich GmbH & Co., Kirchlengern, Germany), Baño ultrasónico CPX8800H (Branson Ultrasonics, Danbury, USA), Vórtex M16715 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), Balanza granataria Practum 2102-1S (Sartorius AG, Göttingen, Germany), Balanza analítica AX224 (Sartorius), Rota evaporador digital R215 (Büchi, Flawil, Switzerland) y Bomba de vacío (Welch-Ilmvac, Seattle, USA).

Soluciones madre y preparaciones de muestras fortificadas

A partir del estándar de perclorato adquirido, se preparó una solución (concentración de 1.0 ng/ μ L) que se utilizó para la fortificación de las muestras blanco y para preparar las soluciones de trabajo (prueba de linealidad del sistema). Tanto la solución madre como las de trabajo se almacenaron en viales de color ámbar no silanizados a 4 °C en la oscuridad. Antes de cada uso, las soluciones estándar se equilibraron a temperatura ambiente (Leyva-Morales *et al.*, 2015; Leyva-Morales *et al.*, 2023; Bastidas-Bastidas *et al.*, 2024).

Al no disponer de un material de referencia o matriz blanco, muestras control de fruto fresco de tomate (1.5 kg) se tomaron como matriz representativa para la validación. Las muestras

fueron colectadas de una finca orgánica, en Culiacán, Sinaloa, México, certificada como productora orgánica por Agricert México. Primero, las muestras fueron analizadas por triplicado para demostrar que se encontraban libres de perclorato y también que no hubiera co-extracciones (compuestos interferentes) que pudieran interferir con el análisis posterior. Una vez confirmado esto, las muestras se utilizaron para las pruebas de validación.

Los niveles de concentración se establecieron de modo que el más bajo estuviera cerca del límite de detección (LOD), un segundo nivel fuera igual a 0.05 mg/kg, el límite máximo de residuos permitido (MRL) según la normativa europea (ya que actualmente no hay regulación disponible para México), y el resto de los niveles fueran superiores al MRL. Se pesó y fortificó una muestra de tomate blanco (10 g) añadiendo (por quintuplicado) la solución estándar a los cinco niveles de concentración directamente a la muestra de fruta preparada. Para fortificar las muestras, se agregaron 50, 100, 250, 500 y 1000 μL de la solución a las muestras de tomate de control a una concentración de 1.0 ng/mL para el nivel 1 (0.005 mg/kg), nivel 2 (0.010 mg/kg), nivel 3 (0.025 mg/kg), y nivel 4 (0.0500 mg/kg) y nivel 5 (0.100 mg/kg), respectivamente. Posteriormente, fueron analizados mediante el método propuesto.

Preparación y extracción de muestras

La parte comestible de la muestra total de la matriz escogida como representativa de matrices vegetales con alta humedad (frutos frescos de tomate) fue triturada y homogeneizada en una licuadora industrial de acuerdo con lo reportado en el Manual Analítico de Plaguicidas (PAM), específicamente en el apartado 102-A, referente a la preparación de muestras (Bastidas-Bastidas *et al.*, 2019). Una porción fue tomada como muestra representativa para el análisis.

Se colocaron submuestras del material de control (10 g \pm 0.05 g) en tubos de polipropileno para centrifuga de 50 mL y se agregó el estándar de fortificación a los niveles de concentración mencionados en la sección de soluciones madre y preparaciones de muestras fortificadas. Posteriormente, las muestras fortificadas fueron agitadas en vórtex por 30 segundos aproximadamente y se mantuvieron en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego, se adicionaron 10 mL de metanol acidificado al 1 % con ácido fórmico y fueron agitados por 15 minutos en baño ultrasónico, se dejaron reposar a -18 °C por 90 minutos y luego se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos. Después de esto, 1.0 mL del sobrenadante resultante fue filtrado a través de membrana de nylon de 0.22 μm en un vial de polipropileno de 1.5 mL para el análisis mediante UPLC-MS/MS (Anastassiades *et al.*, 2023).

Análisis instrumental

El sistema cromatográfico consistió en un equipo de cromatografía líquida de ultra desempeño (UPLC Acquity serie H) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo TQD equipado con una columna Torus DEA (1.7 x 100 x 3.0 mm y tamaño de poro de 130 Å) (Waters Corporation, Milford, USA). El sistema empleó un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura del horno de 50 °C. Cada muestra se inyectó automáticamente a través de un administrador de muestras Acquity con un sistema de muestreo automático de aguja de flujo continuo (Corporación

Waters) a un volumen de 10 μ L. Las fases móviles empleadas fueron: fase móvil A (formiato de amonio 50 mM, pH 2.9) y fase móvil B (acetonitrilo + 0.9 % ácido fórmico), con un gradiente establecido de la siguiente manera: (1) 0 min, 10 % A; (2) 0-4.5 min, 60 % A; (3) 4.5-8.5 min, 60 % A; y (4) 8.5-16 min, 10 % A. Después de alcanzar las condiciones iniciales, la columna fue reequilibrada durante 4 minutos antes de la siguiente inyección. El tiempo total de corrida fue de 16 minutos.

La ionización por electropulverización se empleó en modo de ionización negativa con un voltaje capilar de 2500 V. Se utilizó nitrógeno como nebulizador (caudal de 300 L/h) y gas de desolvatación (caudal de 2500 L/h). La temperatura de desolvatación fue de 600 ° C y la temperatura de la fuente fue de 150 ° C. La adquisición y análisis de los datos se realizó con la estación de trabajo MassLynx4.1 (Corporación Waters) utilizando el monitoreo de reacciones múltiples (MRM) durante al menos dos transiciones, que se utilizaron como pares de transición cuantitativos y de confirmación empleando las condiciones de masa en tándem que se muestran en la Tabla 1 y la Figura 1.

Tabla 1. Condiciones de masa en tándem para el análisis de perclorato.

Analito	Ion padre (m/z)	Ion hijo (m/z)	Tiempo de retardo (s)	Cono (V)	Colisión (V)
Perclorato	99.00	67.00	0.085	20	18
		83.00	0.085	20	45

Fuente: Elaboración propia.

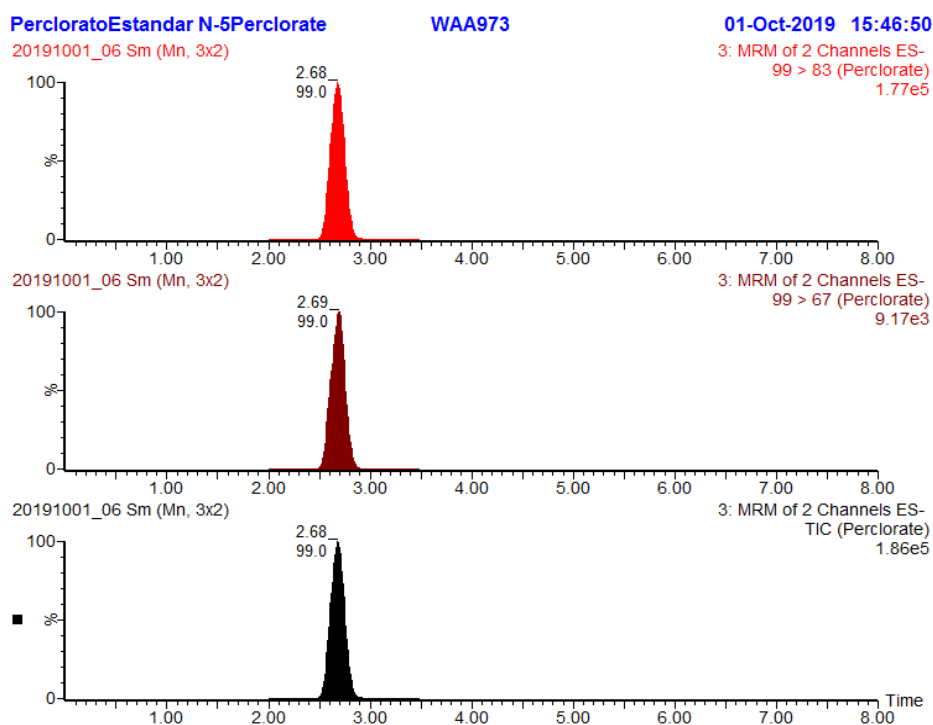


Figura 1. Transiciones monitoreadas para análisis de perclorato.

Fuente: Elaboración propia.

Cuantificación

Para calcular la concentración del perclorato en las muestras, se utilizó el método de estándar externo reportado por Bastidas-Bastidas *et al.* (2019) usando la siguiente ecuación:

$$\text{ppm or mg/kg} = \frac{(\text{respuesta del pico de la muestra})(\text{estándar inyectado [ng]})}{(\text{respuesta del pico del estándar})(\text{equivalentes de muestra inyectada [mg]})} \quad \text{Ec. (1)}$$

Control de Calidad del método

Se realizó un control de calidad interno con cada lote analítico para verificar que el cumplimiento de las especificaciones de idoneidad del sistema continuo establecidas se mantuvieran, así como para demostrar la exactitud y precisión u otros parámetros determinados para el método utilizado en la determinación. Una muestra blanco-fortificada a 0.025 mg/kg (nivel 3) fue analizada junto con cada lote de análisis. En el caso de los blancos fortificados, la recuperación del perclorato debe estar entre 70 y 120 % para garantizar un buen control de calidad. En este sentido, las muestras blanco-fortificadas mostraron recuperaciones entre 93 y 111 %. Además, el blanco de muestra no mostró interferencias, demostrando un buen desempeño (Pihlstrom *et al.*, 2021).

Validación del método

La validación del método propuesto se realizó de acuerdo con los lineamientos establecidos por la Comunidad Europea en la guía SANTE 11312/2021: control de calidad analítico y procedimientos de validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos (Pihlstrom *et al.*, 2021). El desempeño del método fue evaluado a través de los parámetros límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), selectividad, linealidad, exactitud, precisión y efecto matriz. Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado y los criterios de calidad descritos en este documento se utilizaron para juzgar si la validación fue exitosa. La selectividad se evaluó mediante la comparación cualitativa del tiempo de retención de los picos obtenidos en muestra blanco con los de los picos de un estándar analítico de perclorato. El LOD y el LOQ se determinaron en función de la desviación estándar de la respuesta de la muestra en blanco y la pendiente de la curva de calibración del estándar. La linealidad se estudió a través de una regresión lineal mediante el análisis de curvas de calibración de los niveles de concentración previamente. Mientras que, la precisión y la exactitud se reflejaron en función del porcentaje de recuperación. La precisión se obtuvo por el porcentaje del coeficiente de variación (% CV) de la recuperación global observada y la exactitud se calculó con base en el porcentaje del promedio global de la recuperación de las 25 réplicas para el analito de interés dividido entre la concentración esperada (nivel de fortificación). Finalmente, el efecto matriz (ME) fue evaluado como la relación entre la sensibilidad analítica de la curva preparada en matriz en relación con la sensibilidad de la curva de calibración preparada en solvente.

Colecta de muestras vegetales y aplicación del método

Después de validar el método, se tomaron muestras de tomate y otros tres vegetales (pimiento verde, espinacas y lechuga) recolectadas en mercados y supermercados de ocho estados de México (Baja California, Estado de México, Nayarit, Nuevo León, Sinaloa, Sonora, Tlaxcala,

y Yucatán) los cuales fueron sometidos a análisis de perclorato para evaluar la aplicabilidad del método. Los vegetales muestreados fueron productos agrícolas convencionales (n = 31; pimiento verde [8], tomate [8], lechuga [7] y espinacas [8]) (Calderón *et al.*, 2022b; Calderón *et al.*, 2023).

Resultados y discusión

Validación del método

El método desarrollado mostró claramente una alta sensibilidad basada en los valores obtenidos de LOD de 0.001 mg/kg y de LOQ de 0.003 mg/kg. La selectividad fue adecuada, ya que no se detectaron interferencias que pudieran afectar la determinación del analito (Tabla 2, Figura 2). La sensibilidad y selectividad mejoradas del método UPLC-MS/MS hacen que esta técnica sea apropiada para determinar niveles de residuos de compuestos polares y/o iónicos en diversas matrices (Leyva-Morales *et al.*, 2023; Bastidas-Bastidas *et al.*, 2024).

Además, el método desarrollado exhibió linealidad del analito en el rango de concentración de 0.005 a 0.100 mg/kg, lo que se confirmó mediante el análisis de regresión lineal (concentraciones de perclorato agregadas versus recuperadas; $R^2 > 0,99$) (Figura 3). Además, el método fue exacto y preciso, con recuperaciones del 94.08 al 103.31 % y CVs del 5.40 al 6.70 % (Tabla 2). En todos estos casos, se cumplieron los criterios de aceptación establecidos en la guía SANTE (70-130 %) y CV (≤ 20 %) (Pihlstrom *et al.*, 2021).

Varios métodos validados para determinar el perclorato en vegetales emplean un espectrómetro de masas en tándem como detector, incluido el propuesto en el presente estudio. Por ejemplo, Bauer *et al.* (2018) optimizaron un método analítico para determinar perclorato en tomates utilizando IC-MS/MS, analizando los niveles de concentración de 0.010 y 0.100 mg/kg. Los porcentajes de recuperación para el primer y segundo nivel de concentración fueron del 117 % y 102 %, respectivamente. En ambos casos el CV fue del 1% (Tabla 3). El método, así como el aquí propuesto, fue exacto y preciso según los criterios de SANTE (Pihlstrom *et al.*, 2021), demostrando que la espectrometría de masas en tándem es suficientemente sensible para evaluar compuestos altamente polares a niveles de concentración de trazas (Leyva-Morales *et al.*, 2023; Bastidas-Bastidas *et al.*, 2024).

Tabla 2. Parámetros de validación para la determinación de perclorato en vegetales.

Analito	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Exactitud (porcentaje de recobro)	Precisión (CV %)
Perclorato	0.001	0.003	95.79 ± 14.61	15.25

Límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), exactitud (criterio: porcentaje de recuperación de 70-120 %) y precisión (criterio: coeficiente de variación [CV] ≤ 20 %)

Fuente: Elaboración propia.

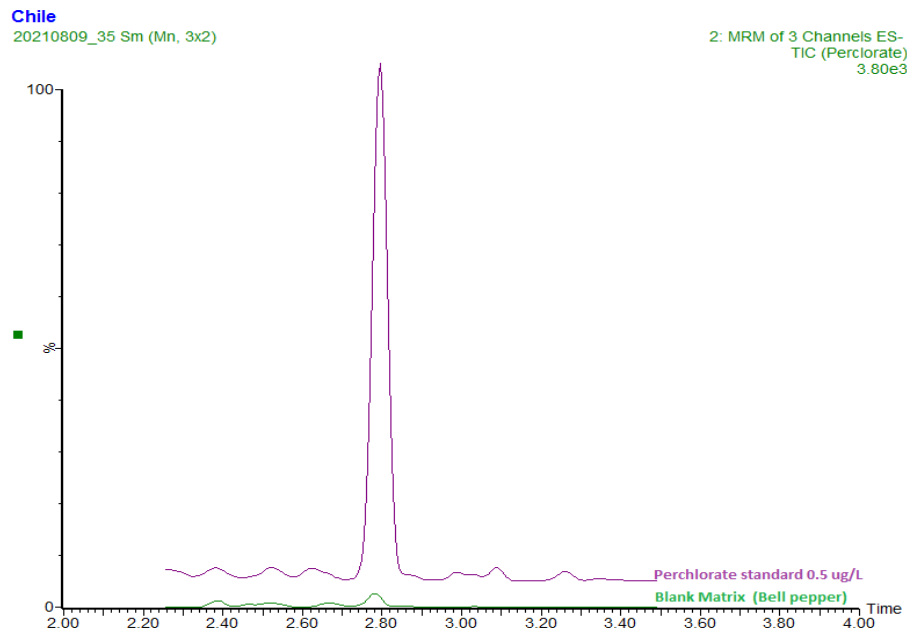


Figura 2. Cromatograma de adquisición de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) para perclorato (reactivos en blanco frente a muestras fortificadas a un nivel máximo de 0.01 mg/kg).

Fuente: Elaboración propia.

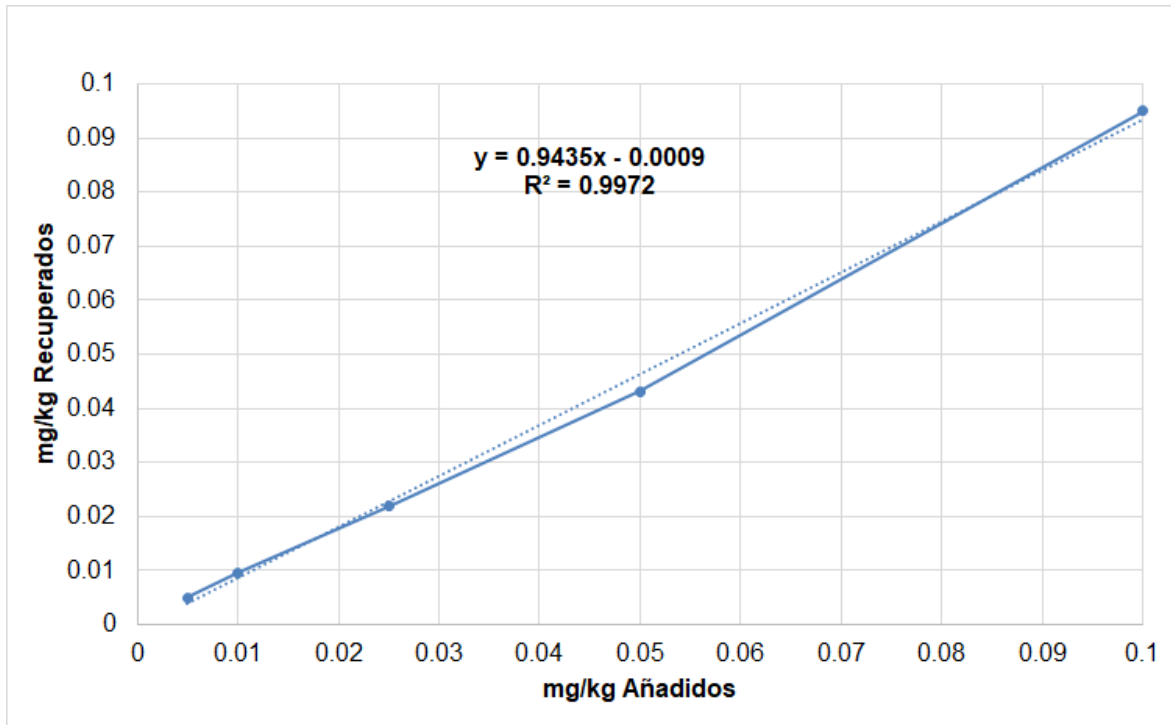


Figura 3. Linealidad del método desarrollado para analizar perclorato en vegetales.

Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, el método desarrollado es más exacto y preciso que el método analítico propuesto por Chamkasem (2018) para la determinación de perclorato en zanahoria, manzana y judía verde mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Tabla 3).

Constantinou *et al.* (2019) también evaluaron el perclorato en alimentos vegetales (fresa, uva, manzana, centeno, naranja y arroz) y emplearon el mismo método propuesto en este estudio (Tabla 3). A diferencia del método propuesto aquí, el reportado no evaluó el tomate como matriz, y el LOD (0.02 mg/kg) y LOQ (0.05 mg/kg) fueron menos sensibles. Además, el estándar interno marcado isotópicamente empleado en ese estudio aumentó el costo del análisis sin afectar notablemente el proceso (Leoterio *et al.*, 2017).

Hepperle *et al.* (2013) validaron un método analítico para determinar el perclorato en manzanas y cebada mediante extracción QuPPE y cuantificación UPLC-MS/MS (Tabla 3). El LOQ informado por estos autores (0.002 mg/kg) fue ligeramente superior al LOQ del presente estudio. Herrera-López *et al.* (2019) validaron un método analítico para determinar perclorato en cinco matrices: uva, lechuga, naranja, avena y soja. Los valores de LOQ fueron 0.02 mg/kg para uva,

lechuga, avena y soja, mientras que el LOQ para naranja fue de 0.05 mg/kg (Tabla 3). Por lo tanto, los valores LOQ informados en ese estudio indicaron que el método era menos sensible que el método propuesto en el presente estudio (0.003 mg/kg).

Huertas-Pérez *et al.* (2022) validaron el método analítico QuPPE-UPLC-MS/MS para determinar el perclorato en una amplia gama de productos alimenticios (puré de mango, puré de manzana, brócoli, alimentos para bebés a base de frutas alimentos para bebés a base de vegetales, ciruelas pasas, remolacha y jugo de manzana) (Tabla 3). Su método puede manejar una mayor diversidad de matrices que el método desarrollado en el presente estudio, y el rango de trabajo evaluados es más amplio. Sin embargo, sus valores de LOQ fueron similares o menos sensibles que los nuestros (0.010 mg/kg para todas las matrices evaluadas).

Finalmente, en cuanto al efecto matriz (ME), se evaluó como la relación entre la sensibilidad analítica de la curva preparada en matriz con relación a la sensibilidad de la curva de calibración preparada en solvente ($ME (\%) = [(pendiente \text{ en matriz} / pendiente \text{ en solvente}) - 1] \times 100$). De acuerdo con la guía SANTE, valores $< \pm 20 \%$ se interpretan como un efecto bajo, valores $> \pm 20$ y $< \pm 50 \%$ se consideran un efecto moderado, mientras que valores $> \pm 50 \%$ se consideran un efecto alto (Pihlstrom *et al.*, 2021). En este sentido, los valores negativos de los efectos de matriz significan una supresión de la señal, mientras que los valores positivos representan una mejora. Una vez conocido el efecto matriz, se realiza la corrección pertinente en los cálculos de los analitos evaluados. Según Leyva Morales *et al.* (2023) un aspecto importante del ME es que, para cada tipo de matriz, se debe estudiar de forma independiente el efecto producido. En este sentido, se observó un efecto matriz de negativo en todos los vegetales evaluados; en el caso del tomate, fue de $-57,45 \%$; mientras que, en el caso de espinaca, lechuga y pimiento verde fue de $-42,98 \%$, $-26,44$ y $-11,56$, respectivamente (Figura 4).

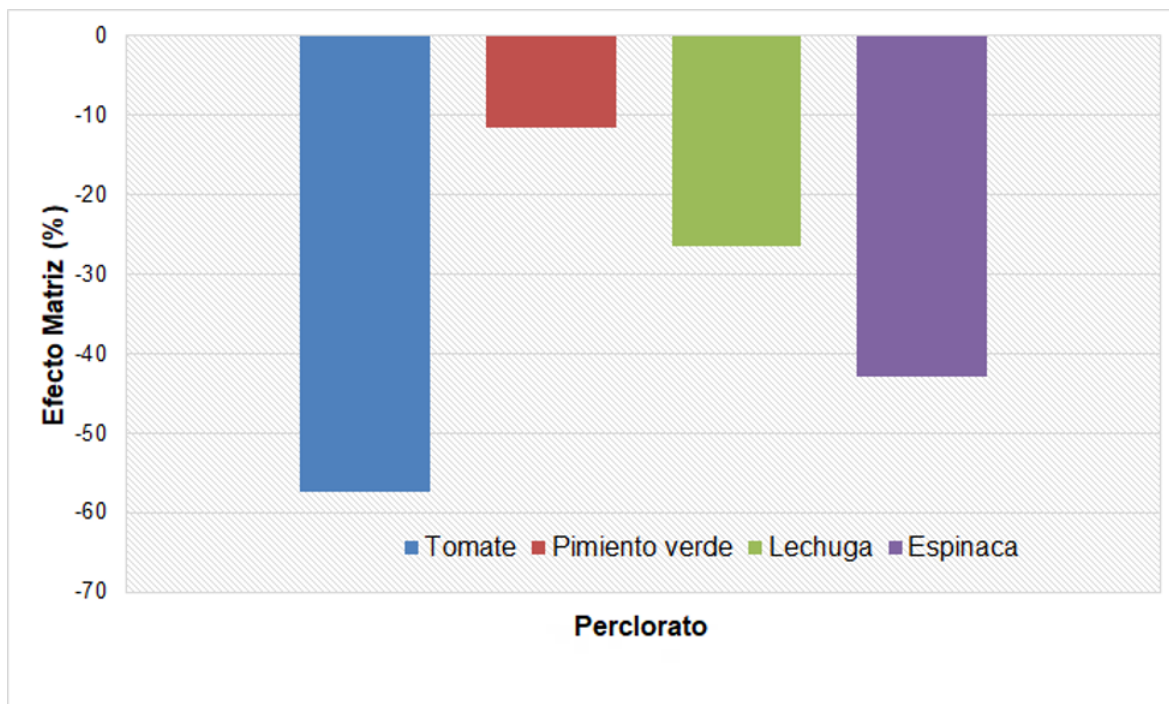


Figura 4. Efecto matriz (EM %) para perclorato en los vegetales evaluados.

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados de ME observados en el presente trabajo coincidieron con otros reportados previamente donde se indica que los componentes presentes en varias matrices pueden reducir la respuesta de la señal de los analitos en el detector debido a la supresión iónica (Pizzutti *et al.*, 2016). Este comportamiento se ha sido reportado como muy común en LC-MS/MS, debido a la competencia que se genera en la fuente de iones durante el proceso de ionización, entre los componentes coeluidos de la matriz con los analitos de interés, provocando así la supresión de iones y, por lo tanto, una señal de respuesta reducida. Este problema, al momento de la determinación de los analitos, se puede omitir mediante la preparación de estándares en matriz añadida, tal como se presentó en este trabajo (Pizzutti *et al.*, 2016; Pano-Farias *et al.*, 2017; Fei *et al.*, 2024).

Aplicación del método para el análisis de vegetales

El análisis de vegetales de diferentes regiones de México reveló la presencia de perclorato en el 71 % (22/31) de las muestras analizadas. Sin embargo, sólo 13 muestras contenían concentraciones de perclorato por encima del LOQ, nueve mostraron concentraciones entre el LOD y el LOQ, y siete contenían trazas (es decir, por debajo del LOD). La concentración

máxima (0.016 mg/kg) se detectó en espinacas de un mercado local de Tlaxcala. La frecuencia de detección de perclorato en productos agrícolas presentó el siguiente comportamiento: lechuga > espinaca > tomate > pimiento verde (Tabla 4). Algunos autores han informado que las hortalizas de hoja tienden a ser más susceptibles a la acumulación de perclorato (Sánchez *et al.*, 2005; USDA, 2005; Seyfferth & Parker, 2006; Garrido *et al.*, 2020; Calderón *et al.*, 2022a; Zhang *et al.*, 2022), lo que concuerda con los resultados de este estudio. La Figura 5 muestra la presencia de perclorato en una muestra de tomate de Culiacán, Sinaloa, México. Ninguna de las muestras superó el LMR establecido por la normativa europea (0,05 mg/kg).

Aunque en México no existen reportes de la presencia de perclorato en alimentos, cuando se exportan productos agrícolas a otros países estos pasan por una estricta revisión para garantizar que estos sean inocuos. En este sentido, durante 2004-2005, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) supervisó la presencia de percloratos en 27 tipos de alimentos, entre ellos vegetales producidos tanto a nivel nacional como algunos importados de México. El monitoreo realizado indicó la presencia de perclorato en todos los vegetales tanto los producidos en diversas partes de Estados Unidos como en los importados, siendo la lechuga la que presentó una mayor frecuencia de detección y las espinacas las que bioacumularon los niveles más altos de percloratos (0.927 mg/kg). Interesantemente, la concentración máxima de perclorato en las espinacas importadas de México (0.252 mg/kg) fue en general superior a las concentraciones presentes en las espinacas producidas en los Estados Unidos (0.006–0.154 mg/kg), excepto para las espinacas producidas en California, particularmente en Brawley (0.927 mg/kg), Long Beach (0.266 mg/kg), Moorpark (0.259 mg/kg) y Riverside (0.680 mg/kg). En el caso del tomate, se observó el mismo comportamiento. La concentración máxima observada en la producción nacional correspondió al producido de Somis, California (0.039 mg/kg), mientras que los tomates importados de México exhibieron aproximadamente siete veces más perclorato (0.286 mg/kg). Sin embargo, la concentración máxima en lechuga se detectó en productos de Yuma, Arizona (0.129 mg/kg), sin informes de la presencia de perclorato para la lechuga de origen mexicano (USDA, 2005). Las concentraciones reportadas por el USDA para vegetales importados de México (lechuga y tomate) fueron superiores a las detectadas en vegetales de supermercados de diferentes regiones de México analizados en este estudio.

Finalmente, si bien en México no existen regulaciones que establezcan los límites máximos permitidos para perclorato en vegetales, el método desarrollado en este estudio proporciona un método de determinación alternativo ya que resultó en valores de LOD y LOQ que fueron inferiores a los establecidos en las regulaciones de la Comisión Europea (0.05 mg/kg) (European Commission, 2020).

Tabla 3. Comparación del método desarrollado con métodos informados anteriormente para determinar el perclorato en diversas matrices alimentarias.

Método de extracción/determinación	Matriz	Nivel de fortificación (mg/kg)	Porcentaje de recobro (%)	Coefficiente de variación (%)	Límite de detección (mg/kg)	Límite de cuantificación (mg/kg)	Referencia
QuPPE/ cromatografía iónica- espectrometría de masas en tándem (IC-MS/MS)	Tomate	0.01	117	1	No Reportado (NR)	No Reportado (NR)	Bauer et al. (2018)
		0.1	102	1			
	Manzana	0.01	97	1			
		0.1	97	1			
	Limón	0.01	106	2			
		0.1	94	1			
	Pasa	0.01	119	4			
		0.1	97	1			
	Aguacate	0.01	93	2			
		0.1	95	1			
	Trigo	0.01	109	1			
		0.1	99	1			
	Zanahoria	0.02	70	29			
		0.04	95	9			
0.25		90	22				
Extracción y centrifugación con disolventes/ Cromatografía líquida- espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)	Manzana	0.02	74	4	No Reportado (NR)	0.001	Chamkasem (2018)
		0.04	94	8			
		0.25	85	2			
	Judía verde	0.02	92	7			
		0.04	113	2			
		0.25	88	2			

Continuación

Tabla 3. Comparación del método desarrollado con métodos informados anteriormente para determinar el perclorato en diversas matrices alimentarias.

Método de extracción/ determinación	Matriz	Nivel de fortificación (mg/kg)	Porcentaje de recobro (%)	Coefficiente de variación (%)	Límite de detección (mg/kg)	Límite de cuantificación (mg/kg)	Referencia			
QuPPE/cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem de ionización por electropulverización (LC/ESI-MS/MS)	Fresa	0.05	96	14.9	0.02	0.05	Constantinou <i>et al.</i> (2019)			
		0.2	104.6	5.5						
		0.05	87.2	12						
	Uva	0.2	97.5	4.5						
		Manzana	0.05	87.5				6.6		
			0.2	97.4				2.8		
	Centeno	0.05	89.1	2.2						
		0.2	87.4	3.5						
	Naranja	0.05	110.5	9.8				No Reportado (NR)	0.002	Hepperle <i>et al.</i> (2013)
		0.2	100.7	12.6						
0.05		104.1	6.1							
Arroz	0.2	110.5	9.8							
	Manzana	0.01	108	2.6						
		0.1	98	2.2						
QuPPE/UPLC-MS/MS	Cebada	0.01	106	2.3						
		0.1	93	5						

Continuación

Tabla 3. Comparación del método desarrollado con métodos informados anteriormente para determinar el perclorato en diversas matrices alimentarias.

Método de extracción/ determinación	Matriz	Nivel de fortificación (mg/kg)	Porcentaje de recobro (%)	Coefficiente de variación (%)	Límite de detección (mg/kg)	Límite de cuantificación (mg/kg)	Referencia
Método de extracción a base de metanol con limpieza sencilla/ cromatografía líquida/ ionización por electropulverización- espectrometría de masas QTrap (LC/ ESI-Qtrap MS)	Uva	0.02	93	4	0.01	0.02	Herrera-López <i>et al.</i> (2019)
		0.05	97	11			
		0.10	97	5			
		0.50	97	1			
	Lechuga	0.02	113	3	0.01	0.02	
		0.05	107	5			
		0.10	105	2			
		0.50	105	2			
	Naranja	0.02	NR	NR	0.01	0.05	
		0.05	108	7			
		0.10	103	11			
		0.50	102	6			
	Avena	0.02	101	8	0.01	0.02	
		0.05	102	3			
		0.10	102	7			
		0.50	101	2			
Soya	0.02	NR	NR	0.01	0.05		
	0.05	114	19				
	0.10	116	5				
	0.50	110	6				

Continuación

Tabla 3. Comparación del método desarrollado con métodos informados anteriormente para determinar el perclorato en diversas matrices alimentarias.

Método de extracción/ determinación	Matriz	Nivel de fortificación (mg/kg)	Porcentaje de recobro (%)	Coefficiente de variación (%)	Límite de detección (mg/kg)	Límite de cuantificación (mg/kg)	Referencia
QuPpe/ UPLC-MS/MS	Puré de Mango	0.002	103.6	2	No Reportado (NR)	0.01	Huertas-Pérez <i>et al.</i> (2022)
		0.020	99.7	0.4			
	Puré de manzana	0.002	93.3	5.4			
		0.500	99	1			
	Alimentos para bebés a base de frutas	0.002	107.3	2.8			
		0.500	99.3	1			
		0.002	102.1	5.9			
	Alimentos para bebés a base de vegetales	0.500	97.5	1			
		0.002	100.6	5			
	Brócoli	0.500	98.8	1			
0.010		98.7	5.1				
Ciruela pasa	0.010	98.7	5.1				
	1.250	105.2	2.9				
Remolacha seca	0.010	110.1	3.6				
	1.250	105.6	2.8				
Jugo de manzana concentrado	0.002	95.5	5.3				
	1.250	106.9	3.7				
QuPpe/ UPLC-MS/MS	Tomate	0.005	111.7	10.6	0.001	0.003	Este estudio
		0.010	88.4	11.9			
		0.050	90.5	12.12			

Fuente: Elaboración propia.

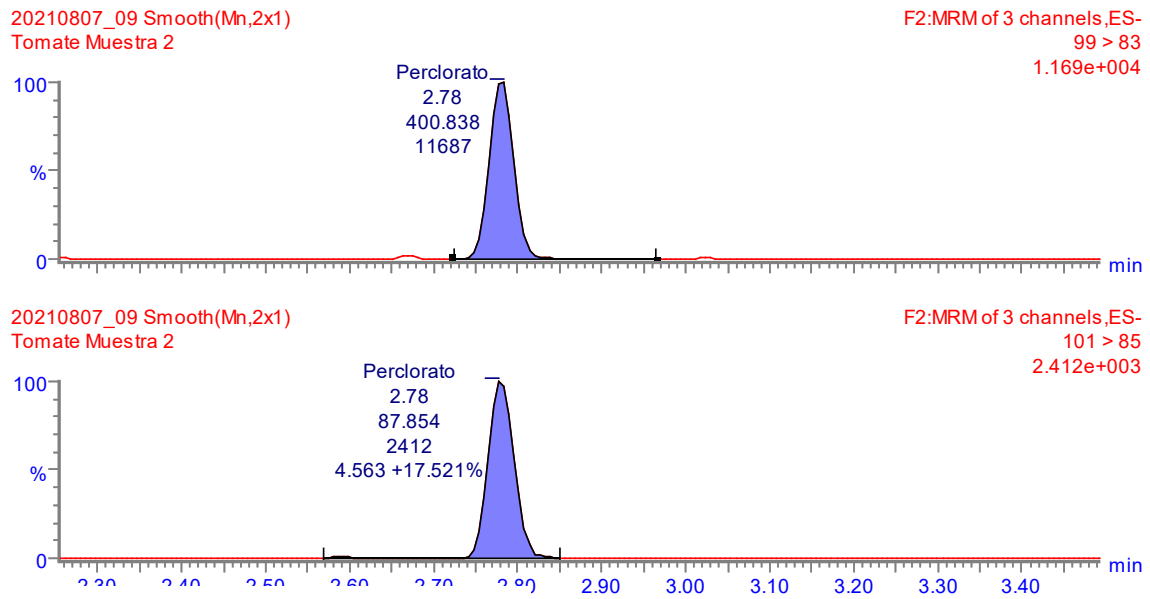


Figura 5. Presencia de perclorato en una muestra de tomate (0.010 mg/kg) de un supermercado local en Culiacán, Sinaloa, México.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Concentraciones de perclorato en muestras vegetales de ocho estados de la República Mexicana.

Número de muestra	Muestra	Origen	Localización	Concentración de perclorato (mg/kg)	MRL de la Comisión Europea
					(mg/kg)*
1	Pimiento verde	Supermercado local	Culiacán, Sinaloa	0.004	
2	Tomate	Supermercado local	Culiacán, Sinaloa	0.010	
3	Lechuga	Supermercado local	Culiacán, Sinaloa	0.006	
4	Espinaca	Supermercado local	Culiacán, Sinaloa	<LOQ	
5	Pimiento verde	Supermercado local	Tepic, Nayarit	<LOQ	
6	Tomate	Supermercado local	Tepic, Nayarit	<LOQ	
7	Lechuga	Supermercado local	Tepic, Nayarit	0.005	0.05
8	Espinaca	Supermercado local	Tepic, Nayarit	<LOQ	
9	Pimiento verde	Supermercado local	Guaymas, Sonora	0.006	
10	Tomate	Supermercado local	Guaymas, Sonora	0.004	

Continuación

Tabla 4. Concentraciones de perclorato en muestras vegetales de ocho estados de la República Mexicana.

Número de muestra	Muestra	Origen	Localización	Concentración de perclorato (mg/kg)	MRL de la Comisión Europea (mg/kg)*
11	Lechuga	Supermercado local	Guaymas, Sonora	<LOQ	
12	Espinaca	Supermercado local	Guaymas, Sonora	0.033	
13	Tomate	Supermercado local	Mexicali, Baja California	<LOD	
14	Lechuga	Supermercado local	Mexicali, Baja California	<LOD	
15	Espinaca	Supermercado local	Mexicali, Baja California	0.004	
16	Pimiento verde	Supermercado local	Mexicali, Baja California	<LOQ	
17	Tomate	Mercado de alimentos	Monterrey, Nuevo León	0.006	
18	Espinaca	Mercado de alimentos	Monterrey, Nuevo León	<LOD	
19	Pimiento verde	Mercado de alimentos	Monterrey, Nuevo León	0.005	
20	Lechuga	Producción en Chinampera	Xochimilco, Estado de México	0.007	
21	Tomate	Mercado Local	Xochimilco, Estado de México	ND	0.05
22	Espinaca	Producción en Chinampera	Xochimilco, Estado de México	0.006	
23	Tomate	Mercado Local	Tlaxcala, Tlaxacala	<LOD	
24	Pimiento verde	Mercado Local	Tlaxcala, Tlaxacala	<LOD	
25	Lechuga	Mercado Local	Tlaxcala, Tlaxacala	0.001	
26	Espinaca	Mercado Local	Tlaxcala, Tlaxacala	0.016	
27	Tomate	Mercado Local	Mérida, Yucatán	<LOD	
28	Pimiento verde	Mercado Local	Mérida, Yucatán	ND	
29	Lechuga	Mercado Central	Mérida, Yucatán	<LOQ	
30	Espinaca	Mercado Central	Mérida, Yucatán	<LOQ	
31	Pimiento verde	Mercado Central	Mérida, Yucatán	<LOD	

Límite de detección (LOD) = 0.001 mg/kg; Límite de cuantificación (LOQ) = 0.003 mg/kg; ND = No detectado:
 *Regulación de la Comisión Europea 2020/685 (European Commission, 2020); límite máximo de residuo permitido (MRL); los valores resaltados en negrita son mayores que el LOQ.

Fuente: Elaboración propia

Conclusiones

Se desarrolló un método económico, sencillo y rápido para la cuantificación de perclorato en vegetales mediante el método de extracción QuPPE y cuantificación empleando UPLC-MS/MS. El método mostró buena linealidad ($R^2 > 0.99$), selectividad, precisión y exactitud con límites de detección y cuantificación inferiores a lo normado en la regulación europea. Esto garantiza que el método propuesto es adecuado para el propósito propuesto ya que los parámetros evaluados están dentro de los valores recomendados en la guía SANTE para el desarrollo de métodos analíticos.

Además, este estudio es el primero en reportar la presencia de percloratos en México. Finalmente, el método se aplicó con éxito a tomate, lechuga, pimiento verde y espinaca recolectados en diferentes regiones de México, demostrando que su sensibilidad es superior o equivalente a otros métodos reportados en la literatura para evaluar el perclorato en vegetales.

En términos de perspectivas futuras, el método desarrollado se puede aplicar a otros alimentos, y su alcance se puede ampliar a otros analitos con propiedades similares. El método desarrollado se puede utilizar para monitorear este contaminante en productos agrícolas, marcando la pauta para la creación de políticas públicas para la regulación de las concentraciones de perclorato en los alimentos.

Contribución de los autores

Conceptualización, JBLM, RC, PJBB, MZS; Desarrollo metodológico, JBLM, RC, PJBB, MZS, COR; manejo de software, PP, PJBB, OAAS, CCL; validación experimental, JBLM, RC, PP, PJBB, COR, CCL, OAAS; análisis de resultados, JBLM, RC, PP, CRG, OAAS, CCL; manejo de datos, JBLM, RC, JGH, PP, PJBB, CRG, OAAS, CCL; escritura y preparación del manuscrito, JBLM, RC, JGH, PP, PJBB, CRG; redacción, revisión y edición, CCL, OAAS, CRG, MZS, JBLM; administradores del proyecto, JGH, RC, JBLM; adquisición de fondos, JGH, RC.

Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Este Proyecto (Fondo Conjunto de Cooperación Chile-México) fue apoyado por la Agencia Chilena de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AGCID) de Chile y la Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXCID) de México.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Anastassiades, M., Kolberg, D. I., Benkenstein, A., Eichhorn, E., Zechmann, S., Mack, D., ... & Barth, A. (2023). Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via LC-MS/MS involving simultaneous extraction with methanol (QuPPE-method). EU reference laboratory for pesticides requiring single residue methods (EURL-SRM). CVUA, Stuttgart, Germany. https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=887&LabID=200&Lang=EN
- Bastidas-Bastidas, P. D. J., Leyva-Morales, J. B., Olmeda-Rubio, C., Pineda-Landeros, J. M., & Martínez-Rodríguez, I. E. (2019). Comparación de dos métodos para el análisis multiresiduo de plaguicidas organofosforados en productos de origen agrícola con alto y bajo contenido de humedad. *Revista Bio Ciencias*, 6, e654. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.nesp.e654>
- Bastidas-Bastidas, P., Cabrera, R., Valenzuela-Quintanar, A. I., Olmeda-Rubio, C., González-Mendoza, V. M., Perea-Domínguez, X. P., ... & Leyva-Morales, J. B. (2024). Validation and Application of UPLC-MS/MS Method to Analysis of Glyphosate and its Metabolites in Water. *Journal of Chromatographic Science*, 62(4), 364-371. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmad045>
- Bauer, A., Luetjohann, J., Rohn, S., Kuballa, J., & Jantzen, E. (2018). Ion chromatography tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) multimethod for the determination of highly polar pesticides in plant-derived commodities. *Food Control*, 86, 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.007>
- Calderón, R., Godoy, F., Escudey, M., & Palma, P. (2017). A review of perchlorate (ClO_4^-) occurrence in fruits and vegetables. *Environmental monitoring and assessment*, 189 (82), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5793-x>
- Calderon, R., Rajendiran, K., Kim, U. J., Palma, P., Arancibia-Miranda, N., Silva-Moreno, E., & Corradini, F. (2020a). Sources and fates of perchlorate in soils in Chile: A case study of perchlorate dynamics in soil-crop systems using lettuce (*Lactuca sativa*) fields. *Environmental Pollution*, 264, 114682. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114682>
- Calderón, R., Palma, P., Eltit, K., Arancibia-Miranda, N., Silva-Moreno, E., & Yu, W. (2020b). Field study on the uptake, accumulation and risk assessment of perchlorate in a soil-chard/spinach system: Impact of agronomic practices and fertilization. *Science of The Total Environment*, 719, 137411. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137411>
- Calderón, R., Palma, P., Arancibia-Miranda, N., Kim, U. J., Silva-Moreno, E., & Kannan, K. (2020c). Occurrence, distribution and dynamics of perchlorate in soil, water, fertilizers, vegetables and fruits and associated human exposure in Chile. *Environmental Geochemistry and Health*, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00680-6>
- Calderón, R., Jara, C., Albornoz, F., Palma, P., Arancibia-Miranda, N., Karthikraj, R., & Zhu, H. (2022a). Accumulation and distribution of perchlorate in spinach and chard growing under greenhouse: Implications for food safety in baby foods commodities. *Food Chemistry*, 370, 131101. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131101>
- Calderón, R., García-Hernández, J., Palma, P., Leyva-Morales, J. B., Zambrano-Soria, M., Bastidas-Bastidas, P. J., & Godoy, M. (2022b). Assessment of pesticide residues in vegetables commonly consumed in Chile and Mexico: Potential impacts for public health. *Journal of*

- Food Composition and Analysis*, 108, 104420. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104420>
- Calderón, R., García-Hernández, J., Palma, P., Leyva-Morales, J. B., Godoy, M., Zambrano-Soria, M., ... & Valenzuela, G. (2023). Heavy metals and metalloids in organic and conventional vegetables from Chile and Mexico: Implications for human health. *Journal of Food Composition and Analysis*, 123, 105527. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105527>
- Chamkasem, N. (2018). Rapid determination of polar pesticides and plant growth regulators in fruits and vegetables by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 53(9), 622-631. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1473977>
- Constantinou, P., Louca-Christodoulou, D., & Agapiou, A. (2019). LC-ESI-MS/MS determination of oxyhalides (chlorate, perchlorate and bromate) in food and water samples, and chlorate on household water treatment devices along with perchlorate in plants. *Chemosphere*, 235, 757-766. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.180>
- Cruz-Cruz, E. A., Ramírez-Torres, A., Pimentel-Nieto, D., & Sánchez, A. M. R. (2014). Prevalence of clinical and subclinical hypothyroidism during pregnancy in a pregnant women population. *Ginecología y Obstetricia de México*, 82(11), 717-724.
- Cutillas, V., & Fernández-Alba, A. R. (2021). Analysis by LC-MS/MS of polar pesticides in fruits and vegetables using new hybrid stationary phase. *MethodsX*, 8, 101306 <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101306>
- Dong, H., Xiao, K., Xian, Y., Wu, Y., & Zhu, L. (2019). A novel approach for simultaneous analysis of perchlorate (ClO₄⁻) and bromate (BrO₃⁻) in fruits and vegetables using modified QuEChERS combined with ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 270, 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.091>
- European Commission. (2020). Commission Regulation (EU) 2020/685 of 20 May 2020 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of perchlorate in certain foods. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020R0685&rid=3>
- Fei, Z., Sun, M., Song, Q., Li, C., & Liu, Y. (2024). Freezing-assisted sugaring-out liquid-liquid extraction coupled with LC-MS/MS for quantitative determination of perchlorate in honey. *Food Chemistry*, 435, 137604. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137604>
- Flores-Rebollar, A., Moreno-Castañeda, L., Vega-Servín, N. S., López-Carrasco, G., & Ruiz-Juvera, A. (2015). Prevalence of autoimmune thyroiditis and thyroid dysfunction in healthy adult Mexicans with a slightly excessive iodine intake. *Nutrición Hospitalaria*, 32(2), 918-924. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.2.9246>
- Garrido, Y., Marín, A., Tudela, J. A., Truchado, P., Allende, A., & Gil, M. I. (2020). Chlorate accumulation in commercial lettuce cultivated in open field and irrigated with reclaimed water. *Food Control*, 114, 107283. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107283>
- Hatzistavros, V. S., & Kallithrakas-Kontos, N. G. (2011). Determination of trace perchlorate concentrations by anion-selective membranes and total reflection X-ray fluorescence analysis. *Analytical chemistry*, 83(9), 3386-3391. <https://doi.org/10.1021/ac103295a>
- Hepperle, J., Wolheim, A., Kolberg, D., Wildgrube, C., Kaufmann-Horlacher, I., Anastasiades, M., & Scherbaum, E. (2013). Analysis of perchlorate in food samples of plant origin applying the QuPPE-method and LC-MS/MS. *Aspects of Food Control and Animal Health*, 2, 2–16. https://ejournal.cvuas.de/docs/cvuas_ejournal_201302.pdf

- Herrera- López, S. H., Scholten, J., Kiedrowska, B., & de Kok, A. (2019). Method validation and application of a selective multiresidue analysis of highly polar pesticides in food matrices using hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1594, 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.024>
- Hu, J., Xian, Y., Wu, Y., Chen, R., Dong, H., Hou, X., ... & Wang, L. (2021). Perchlorate occurrence in foodstuffs and water: Analytical methods and techniques for removal from water—A review. *Food Chemistry*, 360, 130146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130146>
- Huertas-Perez, J. F., Mottier, P., Baslé, Q., Tan, S. Y., Kopeć-Durska, M., Zawada, P., ... & Sánchez-Calderón, M. G. (2022). Chlorate and perchlorate—LC-MS/MS analytical method validation in a broad range of food commodities. *Microchemical Journal*, 177, 107281. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107281>
- Juárez-Cedillo, T., Basurto-Acevedo, L., Vega-García, S., Sánchez-Rodríguez Martha, A., Retana-Ugalde, R., Juárez-Cedillo, E., ... & Escobedo-de-la-Peña, J. (2017). Prevalence of thyroid dysfunction and its impact on cognition in older mexican adults:(SADEM study). *Journal of endocrinological investigation*, 40 (9), 945-952. <https://doi.org/10.1007/s40618-017-0654-6>
- Kiplagat, I. K., Doan, T. K. O., Kubáň, P., & Boček, P. (2011). Trace determination of perchlorate using electromembrane extraction and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, 32(21), 3008-3015. <https://doi.org/10.1002/elps.201100279>
- Kumarathilaka, P., Oze, C., Indraratne, S. P., & Vithanage, M. (2016). Perchlorate as an emerging contaminant in soil, water and food. *Chemosphere*, 150, 667-677. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.109>
- Lee, J. W., Oh, S. H., & Oh, J. E. (2012). Monitoring of perchlorate in diverse foods and its estimated dietary exposure for Korea populations. *Journal of hazardous materials*, 243, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.09.037>
- Leoterio, D. M., Paim, A. P. S., Belian, M. F., Galembeck, A., Lavorante, A. F., Pinto, E., ... & Montenegro, M. C. (2017). Potentiometric perchlorate determination at nanomolar concentrations in vegetables. *Food chemistry*, 227, 166-172. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.088>
- Leung, A. M., Pearce, E. N., & Braverman, L. E. (2010). Perchlorate, iodine and the thyroid. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 24(1), 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2009.08.009>
- Leyva-Morales, J. B., Valdez-Torres, J. B., Bastidas-Bastidas, P. J., & Betancourt-Lozano, M. (2015). Validation and application of a multi-residue method, using accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, for pesticides quantification in soil. *Journal of Chromatographic Science*, 53(10), 1623-1630. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv063>
- Leyva-Morales, J. B., Cabrera, R., Bastidas-Bastidas, P. D. J., Valenzuela-Quintanar, A. I., Pérez-Camarillo, J. P., González-Mendoza, V. M., ... & Cruz-Acevedo, E. (2023). Validation and application of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for the analysis of glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA), and glufosinate in soil. *Agriculture*, 13(6), 1131. <https://doi.org/10.3390/agriculture13061131>
- Liao, Z., Cao, D., Gao, Z., & Zhang, S. (2020). Occurrence of perchlorate in processed foods manufactured in China. *Food Control*, 107, 106813. <https://doi.org/10.1016/j.>

[foodcont.2019.106813](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125028)

- Mathew, J., Gandhi, J., & Hedrick, J. (2005). Trace level perchlorate analysis by ion chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1085(1), 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.015>
- Melton, L. M., Taylor, M. J., & Flynn, E. E. (2019). The utilisation of ion chromatography and tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) for the multi-residue simultaneous determination of highly polar anionic pesticides in fruit and vegetables. *Food chemistry*, 298, 125028. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125028>
- Motzer, W. E. (2001). Perchlorate: problems, detection, and solutions. *Environmental Forensics*, 2(4), 301-311. <https://doi.org/10.1006/enfo.2001.0059>
- Muñoz-Arango, D., Torres-Rojas, F., Tapia, N., Vega, M., Alvear, C., Pizarro, G., ... & Vargas, I. T. (2023). Perchlorate and chlorate assessment in drinking water in northern Chilean cities. *Environmental Research*, 233, 116450. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116450>
- Pano-Farias, N. S., Ceballos-Magaña, S. G., Muniz-Valencia, R., & González, J. (2017). Validation and assessment of matrix effect and uncertainty of a gas chromatography coupled to mass spectrometry method for pesticides in papaya and avocado samples. *Journal of food and drug analysis*, 25(3), 501-509. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.09.005>
- Panseri, S., Nobile, M., Arioli, F., Biolatti, C., Pavlovic, R., & Chiesa, L. M. (2020). Occurrence of perchlorate, chlorate and polar herbicides in different baby food commodities. *Food chemistry*, 330, 127205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127205>
- Pérez-Lizaur, A.B., Palacios-González, B., Castro-Becerra, A.L., & Flores-Galicia, I. (2014) Sistema mexicano de alimentos equivalentes. 3ra ed., *Fomento de Nutrición y Salud*, A.C. México, 63 pp.
- Pihlstrom, T., Fernandez-Alba, A.R., Ferrer Amate, C., Erecius Poulsen, M., Lippold, R., Carrasco Cabrera, L., Pelosi, P., Valverde, A., Mol, H., Jezussek, M., Malato, O., & Stepan, R. (2021). Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis. *in Food and Feed SANTE*, 11312, 2.
- Pizzutti, I. R., Vela, G. M.E., de Kok, A., Scholten, J. M., Dias, J. V., Cardoso, C. D., ... & Vivian, R. (2016). Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation. *Food chemistry*, 209, 248-255. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.069>
- Rajski, Ł., Díaz Galiano, F. J., Cutillas, V., & Fernández-Alba, A. R. (2018). Coupling ion chromatography to Q-orbitrap for the fast and robust analysis of anionic pesticides in fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*, 101(2), 352-359. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0410>
- Sanchez, C. A., Crump, K. S., Krieger, R. I., Khandaker, N. R., & Gibbs, J. P. (2005). Perchlorate and nitrate in leafy vegetables of North America. *Environmental science & technology*, 39(24), 9391-9397. <https://doi.org/10.1021/es050804k>
- Savini, S., Bandini, M., & Sannino, A. (2019). An improved, rapid, and sensitive ultra-high-performance liquid chromatography-high-resolution orbitrap mass spectrometry analysis for the determination of highly polar pesticides and contaminants in processed fruits and vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(9), 2716-2722. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06483>
- Seyfferth, A. L., & Parker, D. R. (2006). Determination of low levels of perchlorate in lettuce and spinach using ion chromatography– electrospray ionization mass spectrometry (IC-ESI-

- MS). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(6), 2012-2017. <https://doi.org/10.1021/jf052897v>
- United States Food and Drug Administration [USDA]. (2005). Exploratory Survey Data on Perchlorate in Food 2004-2005. <http://www.fda.gov/Food/FoodbornellnessContaminants/ChemicalContaminants/ucm077685.htm>
- US-EPA. (2000). US-EPA Method 9058. Determination of perchlorate using ion chromatography with chemical suppression conductivity detection. <https://hwbdocs.env.nm.gov/Waste%20Isolation%20Pilot%20Plant/200318.2/U.S.%20EPA.%201996.%20SW-846.pdf>
- Voogt, W., & Jackson, W. A. (2010). Perchlorate, nitrate, and iodine uptake and distribution in lettuce (*Lactuca sativa* L.) and potential impact on background levels in humans. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(23), 12192-12198. <https://doi.org/10.1021/jf101227d>
- Yang, M. J., Kim, J. S., Han, J. H., & Her, N. G. (2011). Development of Enhanced Analytical Method for Perchlorate in Food by IC-MS/MS with an Internal Standard. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 43(5), 532-536. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2011.43.5.532>
- Zhang, W., Lu, Q., Zheng, R., Qiu, W., Hua, Y., & Li, Y. (2022). Simultaneous determination of chlorate and perchlorate in drinking water and foods using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Research square*, 1-11. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2201547/v1>