

DETERMINACIÓ DE CONTAMINANTS EMERGENTS EN PEIXOS PER CROMATOGRÀFIA DE GASOS

Eva Martínez Fernández

TREBALL DE FI DE GRAU

Dirigit per la Dra. Eva Pocurull Aixalà

Grau de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2016

M'agradaria començar el treball donant les gràcies a aquelles persones que han estat al meu costat durant la realització d'aquest projecte. Primerament, agrair a tots els companys del grup: Alba, Alejandro, Daniela, Julio, Laura V., Mireia i Sameer, els quals han resolt els meus dubtes des del primer dia i m'han acollit al grup fent-me sentir una més. En especial, vull donar les gràcies a la Laura T. que m'ha guiat, explicat les noves tècniques i m'ha ajudat a solucionar qualsevol problema que m'ha sorgit; per tot això i més, li agraeixo tant el seu temps com dedicació, el seu recolzament ha estat molt important en tot moment. També, donar les gràcies a la meva directora de Treball de Fi de Grau, la Dra. Eva Pocurull; la seva ajuda i els seus consells han estat essencials per portar-lo a terme.

*“Les ciències aplicades no existeixen;
només les aplicacions de la ciència.”*

- Louis Pasteur -

ÍNDEX

1. ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓ	2
3. OBJECTIU	8
4. FONAMENTS	9
4.1. Extracció de líquids pressuritzats (PLE)	9
4.2. Extracció en fase sòlida (SPE)	10
5. PART EXPERIMENTAL	11
5.1. Compostos a determinar	11
5.2.1. Solvents, patrons i sorbents.....	12
5.2.2. Toxicitat i manipulació	12
5.2.3. Estudi econòmic.....	14
5.3. Preparació de la mostra	16
5.3.1. Extracció per líquids pressuritzats (PLE)	16
5.3.2. Extracció en fase sòlida (SPE).....	17
5.4. Determinació per GC-MS	18
5.5. Resultats i discussió	19
5.5.1. Preparació patrons.....	19
5.5.2. Optimització condicions GC-MS	19
5.5.3. Optimització condicions PLE	23
5.5.4. Optimització <i>Clean-Up</i>	29

6. CONCLUSIONS 34

7. REFERÈNCIES..... 35

1. ABSTRACT

A novel and sensitive method for the determination of benzotriazole, benzothiazole and benzenesulfonamide compounds in fish has been developed in this project. Pressurized liquid extraction (PLE) and solid phase extraction (SPE) were used as sample preparation techniques and gas chromatography followed by mass spectrometry (GC–MS) was used to determine the analytes. A clean-up and evaporation step were needed in order to minimise matrix effect and concentrate the analytes, respectively.

This project is focused on the optimisation of the GC-MS, PLE and clean-up conditions. First of all, the gradient of temperature was optimised in order to achieve a good separation between the peaks of the compounds. After that, hot Milli-Q water was chosen as the extraction solvent in PLE because of the recoveries and matrix effect. Finally, Florisil and silica gel were tested as clean-up sorbents, both of them acidified with sulfuric acid. Florisil was used in in-cell PLE and SPE clean-up steps, while silica gel was employed only in the SPE. Due to the results, silica gel was considered a better clean-up sorbent than Florisil.

2. INTRODUCCIÓ

El treball experimental s'ha dut a terme al grup de recerca de Cromatografia i Aplicacions Mediambientals (CROMA) del departament de Química Analítica i Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili.

Els contaminants d'interès emergents són compostos presents al medi ambient procedents de diferents orígens i amb diferents naturaleses químiques que fins al moment han passat inadvertits. La seva presència es deu a les contínues emissions d'aquests en grans quantitats arribant així, a ser perjudicials pels ecosistemes i, en conseqüència, per l'home. Segons la xarxa NORMAN, almenys 700 substàncies es classifiquen en 20 classes i s'han identificat en el medi aquàtic europeu [1]. Pel fet d'haver passat desapercebuts, solen ser compostos sense regulació i dels quals no es coneix gairebé res d'informació sobre el seu tractament, impacte i comportament ambientals. La seva futura regulació dependrà dels estudis que es duguin a terme sobre els efectes que tinguin en la salut.

Alguns contaminants d'interès emergent són els retardants de flama, pesticides, fàrmacs, drogues d'abús, productes d'higiene personal, cloroalcans i, els tractats en aquest treball, les famílies de benzotriazols, benzotiazols i benzosulfonamides.

Els factors més urgents són tractar els seus orígens, les seves aplicacions, característiques fisicoquímiques, nivells detectats i desenvolupament de mètodes per a la seva identificació i quantificació [2].

Cal tenir en compte que, malgrat que encara hi ha un cert desconeixement sobre els efectes i la implicació ambiental de molts dels contaminants d'interès emergent, es coneix que alguns d'ells, com els fàrmacs o els desinfectants, tenen propietats bioactives, mentre que d'altres presenten propietats de disrupció endocrina o són significativament ecotòxics [3].

Pel que fa a la toxicitat de les famílies estudiades en aquest treball, cal destacar que els benzotriazols són fitotòxics, mutagènics per bacteris, tòxics per microorganismes i tenen efectes estrogènics en els peixos i el 1-H-benzotriazol es creu que és un carcinogen humà. Els benzotiazols són sensibilizadors dèrmics i també mutagènics pels microorganismes i carcinogen humà. En el cas de les benzosulfonamides, només s'ha estudiat la p-toluensulfonamida que s'ha vist que és moderadament tòxica [4].

Principalment, els contaminants d'interès emergent s'han detectat en medis aquàtics: rius, llacs, aigües subterrànies, aigua potable i fonts d'abastiment d'aigua [5].

Avui en dia, són moltes les indústries i zones d'agricultura que utilitzen aigua en els processos alliberant-la amb molts compostos contaminants. Aquests contaminants

generats han suposat un canvi en el cicle de l'aigua causant una gran preocupació d'organitzacions mundials.

El sosteniment del medi ambient ha patit un alarmant deteriorament com a conseqüència de l'impacte humà essent l'aigua un recurs natural indispensable per a la vida humana. Al problema de la contaminació cal afegir el problema de la seva escassetat causada, principalment, pel canvi climàtic. Les mesures legislatives que s'han anat adoptant progressivament per evitar la contaminació química de l'aigua i els riscos que se'n deriven han contribuït a pal·liar parcialment aquesta situació. L'aparició d'elements no desitjables i tòxics, i la seva variació en les concentracions té el seu origen en l'anomenat "cicle de l'aigua" (fig. 2.1.). D'acord amb aquest cicle, les principals vies d'entrada de contaminants en el medi ambient aquàtic són les aigües residuals, entre les quals s'inclouen les urbanes, industrials, i les d'origen agrícola o ramader [2]. S'ha observat en estudis anteriors que els contaminants presents en les aigües residuals no són eliminats completament en el seu tractament en les estacions depuradores d'aigües residuals, dispersant-se així al medi ambient arribant de nou a les aigües superficials.

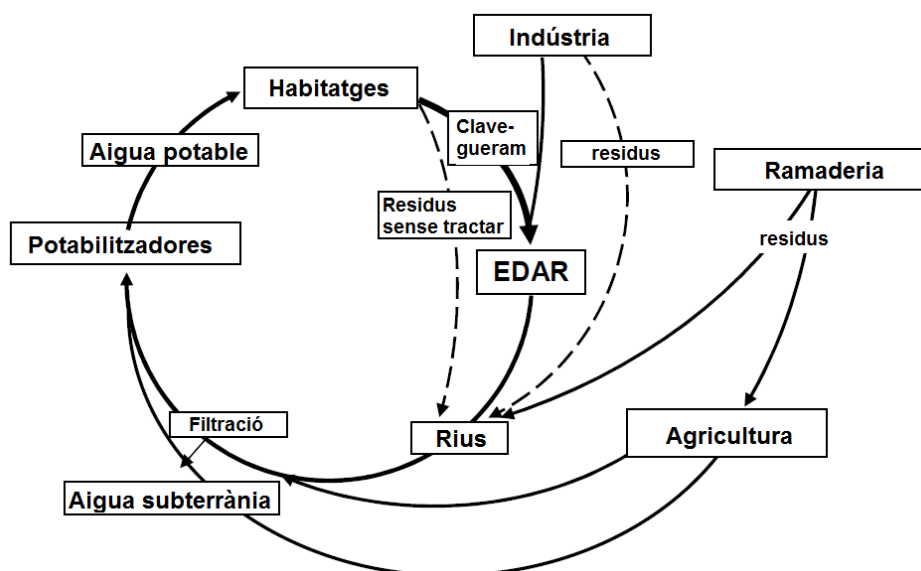


Fig. 2.1. El cicle de l'aigua

La necessitat de la determinació dels contaminants d'interès emergent és la seva àmplia producció i els efectes que això comporta. Molts d'ells són considerats químics d'alt volum de producció (HPV), que són els produïts o importats en quantitats majors a 1000 tones per any. Molts derivats dels benzotriazols (BTR), els benzotiazols (BTH) i les benzosulfonamides (BSA) són considerats uns d'aquests químics [6], produïts per a usos tant industrials com de la llar. La seva gran producció comporta una sèrie d'efectes nocius pel medi i els animals que cal estudiar per a la seva regulació. Per aquesta raó, el treball es basa en l'estudi d'aquestes tres famílies.

Els benzotriazols són compostos heterocíclics formats d'un anell benzènic fusionat amb un anell de triazol (Fig. 2.2.). Aquesta estructura base presenta aromaticitat i li confereix certa acidesa als compostos de benzotriazol, així mateix poden actuar tant com a base de Brønsted acceptant un protó gràcies al parell d'electrons deslocalitzat dels àtoms de nitrogen.

Una de les seves aplicacions més importants és com a inhibidor de la corrosió. El benzotriazol forma una pel·lícula quimisorbida fortament unida de dues dimensions de menys de 50 Å de gruix. Aquesta pel·lícula insoluble, que pot ser una capa monomolecular, protegeix el coure i els seus aliatges en medis aquosos, en diferents atmosferes, lubricants i fluids hidràulics. També forma precipitats insolubles amb els ions de coure en solució, és a dir, forma complexos quelats amb aquests ions, evitant així la corrosió d'alumini i acer en altres parts d'un sistema d'aigua. El compost també pot evitar la reacció entre les superfícies de coure o d'aliatge de coure i entorns típics. És un additiu útil a l'anticongelant i altres sistemes de circulació d'aigua; que pot ser incorporat en laques, papers d'embolicar, lubricants, fluids hidràulics i detergents alcalins [7], per a materials de la construcció, a més d'utilitzar-se en productes de la llar com en detergents i rentavaixelles.

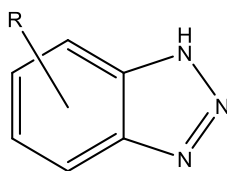


Fig. 2.2. Estructura de la família dels benzotriazols

Els benzotiazols també són compostos heterocíclics que consten d'un anell benzènic unit a un anell de tiazol (Fig. 2.3.). Els nou àtoms dels cicles i els seus substituents són coplanars. L'anell de tiazol és aromàtic, per tant, presenten una deslocalització d'electrons. La seva aromaticitat li dóna una estabilitat relativa, no obstant això, com a heterocicle, té posicions reactives que permeten la funcionalització.

En la dècada dels 50, el 2-aminobenzotiazol va ser estudiat intensament com a relaxant muscular central. Des de llavors, els químics no van tenir massa interès en aquesta família des del punt de vista medicinal. Va ser quan es va descobrir el perfil farmacològic de riluzol que va cridar l'atenció dels biòlegs per a aquesta sèrie. El riluzol (6-trifluorometil-2-benzotiazolona) es va trobar pel fet d'interferir amb la neurotransmissió del glutamat en experiments bioquímics, electrofisiològics i de comportament. Després d'aquest fet, els derivats del benzotiazol s'han estudiat àmpliament i s'ha trobat gran varietat de reactivitat química i ampli espectre d'activitat biològica. S'ha vist que el nucli del benzotiazol posseeix un nombre d'activitats biològiques, com ara anticancerígena, antimicrobià, anti-diabètic, anti-inflamatori i antiviral [8]. Un dels derivats del benzotiazol és un component que emet llum anomenat luciferina, trobat en les cuques de llum.

Els benzotiazols també s'utilitzen en inhibidors de la corrosió però, a més, són utilitzats en la indústria de la goma com a acceleradors de la vulcanització d'aquesta i, també en biocides [9].

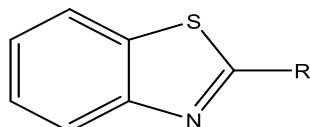


Fig. 2.3. Estructura de la família dels benzotiazols

Les benzosulfonamides (BSA) estan formades per un cicle benzènic amb una sulfonamida de substituent, els derivats es formen per l'addició de diferents grups tant a l'anell aromàtic com a l'amina com mostra la figura 2.4. A causa de tenir el substituent de sulfonamida, aquest li dóna al compost certa acidesa, cedint el protó de l'amina. Els seus derivats presenten diverses aplicacions en síntesi. L'o-toluensulfonamida és la matèria primera per a la síntesi de la sacarina. Una gran quantitat de tipus de toluensulfonamida incloent les mescles de N-etil-o/p-toluensulfonamides, N-metil-o/p-toluensulfonamides i o/p-toluensulfonamides s'utilitzen com a agents de promoció de flux per pintures, adhesius, materials de recobriment de nitrocel·lulosa, i com plastificants per poliamides i altres resines.

Promouen la resistència als olis, greixos i dissolvents. S'utilitzen com potenciadors de brillantor en les preparacions de pel·lícula de plàstic. S'utilitzen com a materials de base de les solucions de galvanoplàstia. Les toluensulfonamides i els seus derivats s'utilitzen com intermedis per a un nombre de la síntesi orgànica per al camp dels productes farmacèutics, pesticides, colorants, pigments, abrillantadors fluorescents, resines, i altres compostos orgànics [10].

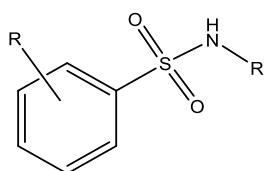


Fig. 2.4. Estructura de la família de les benzosulfonamides

Avui en dia, encara es necessita de més investigació per tal de saber amb certesa quin és el comportament d'aquestes espècies en el medi. No obstant això, ja s'han classificat els BTRs com a tòxics per als organismes aquàtics i s'ha prohibit la producció de N-butylbenzosulfonamida per la seva neurotoxicitat. Per aquests i altres efectes, han estat considerats contaminants emergents. A la taula 2.1. apareixen les concentracions detectades en aigües residuals, rius i llots en països d'Europa.

Taula 2.1. Presència de BTRs, BTs i BSAs en aigües residuals, rius i llots. [11]

COMPOST	AIGÜES RESIDUALS D'ENTRADA (µg/L)	AIGÜES RESIDUALS DE SORTIDA (µg/L)	RIU (µg/L)	LLOTS (ng/g)
1H-benzotriazol	0,5-210	0,01-100	0,05-7	1-412
4-metil-1H-benzotriazol	0,06-11	0,04-8	0,03-1670	1-82
5-metil-1H-benzotriazol	0,06-8	0,02-17	0,04-2160	1-104
5-cloro-1H-benzotriazol	0,01-14	0,005-3	0,002-002	0,5-114
5,6-dimetil-1H- benzotriazol	0,01-27	0,01-30	0,002	1-205
benzotiazol	0,2-1	0,05-12	0,02-0,2	26-265
2-benzotiazolamina	0,02-9	0,02-0,4	0004-0,02	34-174
2-(metiltio)-benzotiazol	0,1-13	0,04-13	0,01-13	23-157
2(3H)-benzotiazolona	0,1-11	0,05-512	0,006-0,3	0,5-307
benzosulfonamida	0,01-1	0,04-0,6	0,006-0,5	-
2-metil- benzosulfonamida	0,04-4	0,05-3	0,008-0,8	-
4-metil- benzosulfonamida	0,05-50	0,05-11	0,03-1	-
N,4-dimetil- benzosulfonamida	<0,01	0,001-0,005	-	-
N-etil-4-metil- benzosulfonamida	0,04-0,8	0,002-0,1	0,002-0,1	-

Aquest treball està focalitzat a l'anàlisi en mostres de peix ja que és la manera més directa de què un contaminant del medi aquós arribi a les persones i sigui ingerit, causant efectes nocius. A la taula 2.2. es citen diverses tècniques utilitzades segons la matriu on hi són presents els anàlits. Segons la bibliografia, encara no s'han determinat aquestes famílies en peixos.

Com s'observa a la taula, per extreure els anàlits de les mostres sòlides s'utilitzen tècniques com el PLE o el LSE mentre que amb mostres líquides es fa ús de SPE. Com a anàlisi instrumental predomina l'ús de LC encara que en algun cas s'ha utilitzat GC. El detector més utilitzat és el MS o el MS/MS per la seva sensibilitat i selectivitat.

Taula 2.2. Tècniques utilitzades en la determinació de BTRs, BTHs i BSAs segons la matriu. [11]

MATRIU	TÈCNICA D'EXTRACCIÓ	ANÀLISI INSTRUMENTAL
Aigua de riu	SPE ¹ , C ₁₈	GC x GC-MS
Aigua residual	SPE, Oasis HLB	LC-MS/MS

(Continuació) Taula 2.2. Tècniques utilitzades en la determinació de BTRs, BTHs i BSAs segons la matriu.

Llots	PLE ² i SPE; MeOH/H ₂ O	LC-MS
Sediments	LSE ³ i SPE; MeOH i Oasis HLB	LC-MS/MS
Sòl	LSE, ACN/H ₂ O	LC-MS/MS

¹ Extracció en fase sòlida.
² Extracció de líquids pressuritzats.
³ Extracció líquida-sòlida.

Quan els animals ingereixen els contaminants, aquests queden fixats en el seu cos (les dioxines i PCBs en el seu greix). Els organismes de la cadena tròfica que només mengen plàncton ingereixen els tòxics que hi ha a l'aigua, els que es mengen a aquests peixos o crustacis, ingereixen els de l'aigua més els acumulats en les seves preses, i així successivament fins a arribar fins al nostre organisme a través de l'alimentació.

La determinació de compostos de benzotriazols i benzotiazols en països d'Estats Units i de l'est d'Àsia per Wang *et al.* [12] és un exemple d'estudis previs d'aquetes espècies pel seu efecte nociu. La determinació es va dur a terme en mostres de pols d'interiors mitjançant l'extracció de líquids pressuritzats seguit d'extracció en fase sòlida; l'anàlisi químic es va fer amb LC. En aquest estudi es va veure com les concentracions dels compostos eren molt més grans en interiors de zones urbanes que no pas rurals. El cas més significatiu és la presència de benzotiazol-2-ol (2-OH-BTH) detectat en concentracions de 600 a 2000 ng/g, utilitzat en la vulcanització dels neumàtics dels vehicles.

Com a exemple de determinació de les espècies en mostres líquides, cal destacar l'estudi portat a terme per Carpinteiro *et al.* [13] basat en la determinació de derivats de benzotriazols en mostres d'aigua per microextracció en fase sòlida per espai de cap seguit de cromatografia de gasos en tàndem amb espectrometria de masses. Realitzat l'any 2010, va ser el primer estudi que va combinar GC-MS/MS i SPME per a la determinació sensible i selectiva de derivats de benzotriazols (estabilitzadors de UV) en mostres d'aigua.

3. OBJECTIU

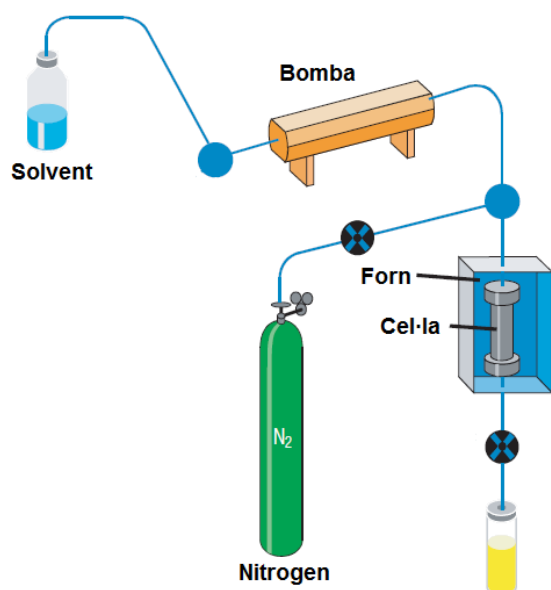
L'objectiu d'aquest treball és el desenvolupament i optimització d'un mètode analític per tal de determinar cinc compostos de les famílies de benzotriazols (1H-benzotriazol, 4-metil-1H-benzotriazol, 5-metil-1H-benzotriazol, 5-cloro-1H-benzotriazol, 5,6-dimetil-1H-benzotriazol), cinc de benzotiazols (benzotiazol, 2-clorobenzotiazol, 2-benzotiazolamina, 2-(metiltio)-benzotiazol, 2(3H)-benzotiazolona) i sis de benzosulfonamides (benzosulfonamida, 2-metil-benzosulfonamida, 4-metil-benzosulfonamida, N,4-dimetil-benzosulfonamida, N-etil-4-metil-benzosulfonamida, 4-bromobenzosulfonamida) en mostres de peix mitjançant extracció de líquids pressuritzats (PLE) i cromatografia de gasos amb detector d'espectrometria de masses.

4. FONAMENTS

De les diferents tècniques utilitzades en el treball, es descriuran a continuació els fonaments de l'extracció de líquids pressuritzats (PLE) i de l'extracció en fase sòlida (SPE). No es descriurà el fonament del GC-MS per ser tècniques molt conegudes.

4.1. Extracció de líquids pressuritzats (PLE)

L'extracció de líquids pressuritzats (PLE) és una tècnica d'extracció de mostra que utilitza solvents líquids a temperatures i pressions elevades per extreure de manera ràpida i eficaç anàlits de mostres sòlides. L'elevada temperatura augmenta la solubilitat dels anàlits en el solvent d'extracció i s'aconsegueix una velocitat de difusió més alta en la mostra, disminueix la viscositat, millora la penetració en la mostra i elimina les interaccions entre anàlits i matriu. L'elevada pressió permet que el solvent es mantingui sense bullir per les altes temperatures i, els solvents poden penetrar mostres sòlides de manera més eficient, reduint l'ús de grans quantitats de solvent. A més d'aquests avantatges, cal destacar que els extractes es filtren automàticament i que, en tractar-se d'una tècnica automatitzada, la manipulació de la mostra és mínima. També es porta a terme l'extracció en una atmosfera lliure d'oxigen amb el que s'evita la degradació dels compostos per oxidació. Els paràmetres principals a optimitzar són el tipus i volum utilitzats de solvent d'extracció, la temperatura, la pressió, el nombre de cicles d'extracció i el temps d'extracció.



L'equip consta d'una bomba que impulsa el solvent cap al forn on es troba la cel·la amb la mostra sòlida en forma de pols, principalment, amb un material dispersant inert com és la terra de diatomees. El material inert a la cel·la té la funció de millorar la difusió del solvent d'extracció a través de la mostra i augmentar la superfície de contacte. És necessari un gas inert per tal d'aportar la pressió necessària per dur a terme l'extracció, normalment, nitrogen. (Fig. 4.1.1.)

Fig. 4.1.1. Diagrama esquemàtic de l'equip de PLE.

4.2. Extracció en fase sòlida (SPE)

L'extracció en fase sòlida és una tècnica d'extracció de la mostra que concentra i purifica anàlits d'una solució per la seva retenció selectiva en un sorbent adient, seguit d'una elució dels anàlits mitjançant un solvent apropiat per a l'anàlisi instrumental. Com a mecanismes de retenció s'inclouen la fase invertida, la fase normal i l'intercanvi iònic. També és anomenada extracció líquid-sòlid. Els objectius principals d'aquesta tècnica d'extracció és l'enriquiment de traces, la neteja de la mostra, el fraccionament de la mostra i l'emmagatzematge d'anàlits.

El cartutx que s'utilitza consta d'un adsorbent immobilitzat. Es poden trobar gran varietat de sorbents comercials amb diferents característiques per tal de triar el més apropiat per als anàlits a retenir.

Els paràmetres a optimitzar d'aquesta tècnica són el tipus i característiques del sorbent, el pH i la força iònica de la mostra, el volum de mostra, el solvent d'elució, el volum del solvent d'elució i el flux.

A la figura 4.2.1. es mostren les etapes de l'extracció en fase sòlida. Inicialment, es necessita una etapa de condicionament del cartutx amb el solvent en què es troba la mostra. Aquest condicionament permet l'activació del sorbent i dels seus grups funcionals. Per activar els sorbents hidrofòbics s'utilitza, generalment, metanol o acetonitril. Seguidament, es passa la mostra i els anàlits es retenen en el sorbent mentre els interferents de la matriu, idealment, poden passar sense ser retinguts. Una vegada retinguts els anàlits, es passa el mateix solvent en el que es trobava l'extracte per tal de netejar el cartutx de qualsevol interferència. Finalment, els anàlits s'elueixen amb un solvent adient per a l'anàlisi instrumental. El solvent elimina la interacció anàlit-sorbent, per aquesta raó, el solvent ha de tenir la màxima interacció amb l'anàlit i una interacció mínima amb la resta de les impureses que hagin pogut quedar retingudes, deixant-les en el sorbent. Per tal d'obtenir una alta concentració, el volum d'elució ha de ser el mínim possible.

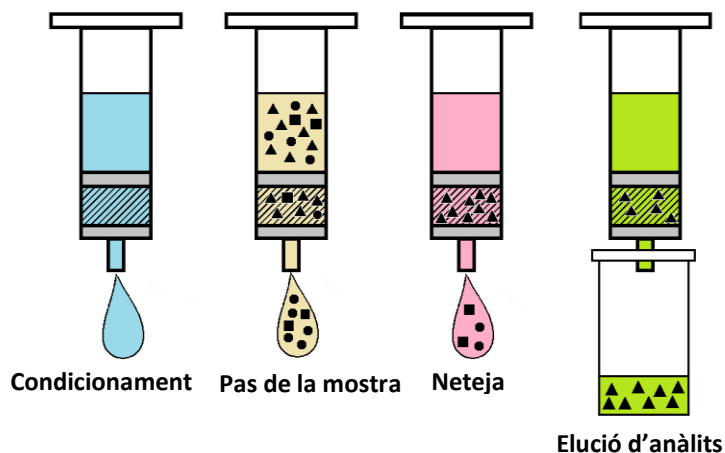


Fig. 4.2.1. Etapes de SPE.

5. PART EXPERIMENTAL

5.1. Compostos a determinar

Els compostos a determinar són els següents:

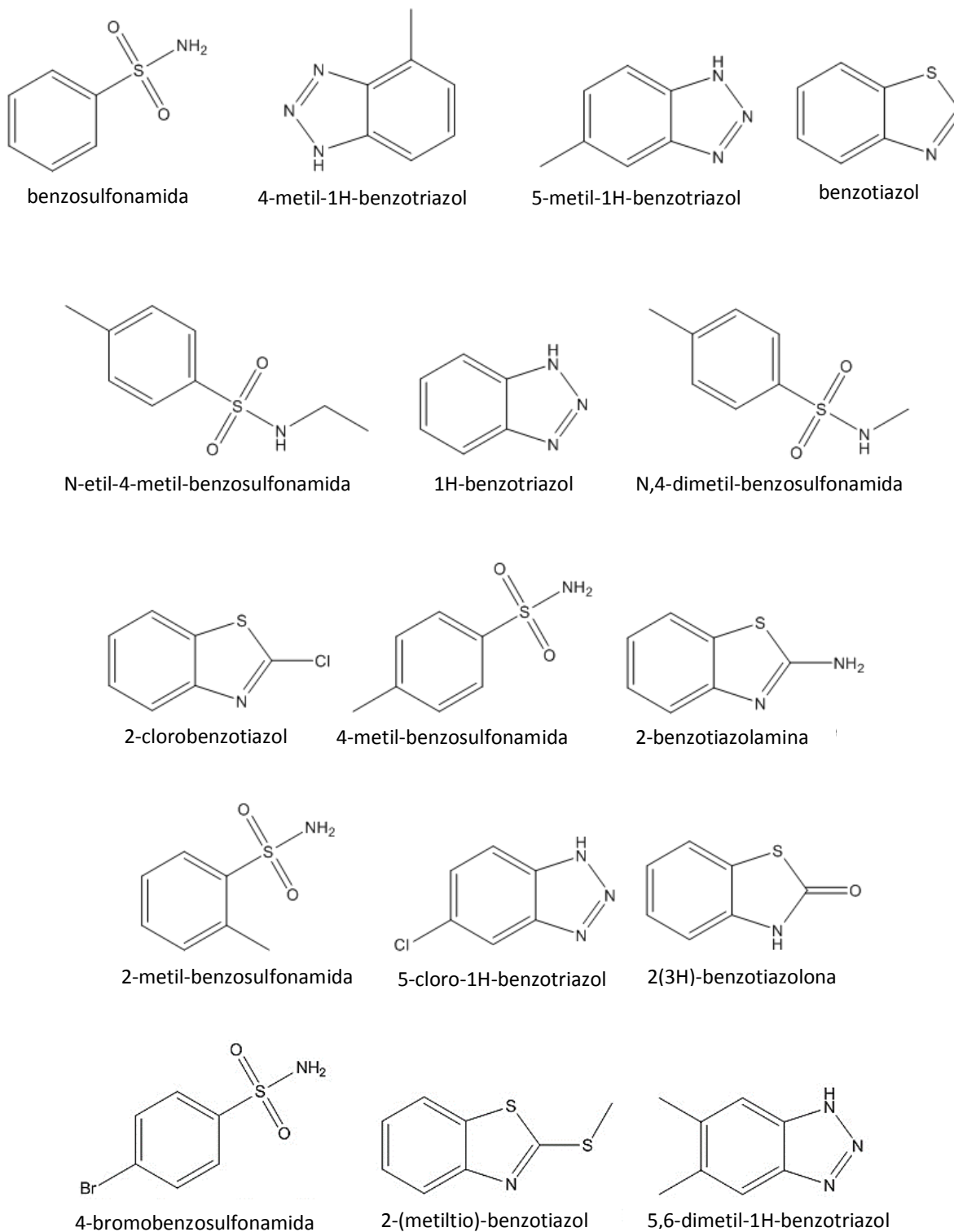


Fig. 5.1.1. Compostos a determinar.

5.2. Materials

5.2.1. Solvents, patrons i sorbents

Els patrons d'alta puresa (indicat en percentatge entre parèntesi) utilitzats són 5 benzotriazols: 1H-benzotriazol (BTR, $\geq 98\%$), 4-metil-1H-benzotriazol (4TTR, $\geq 98\%$), 5-metil-1H-benzotriazol (5TTR, $\geq 98\%$), 5-cloro-1H-benzotriazol (ClBTR, $\geq 99\%$), 5,6-dimetil-1H-benzotriazol (XTR, $\geq 99\%$); 5 benzotiazols: benzotiazol (BT, 96%), 2-clorobenzotiazol (ClBT, $\geq 99\%$), 2-benzotiazolamina (NH₂BT, 97%), 2-(metiltio)-benzotiazol (MeSBT, 97%), 2(3H)-benzotiazolona (OHBT, 98%); 6 benzosulfonamides: benzosulfonamida (BSA, $\geq 98\%$), 2-metil-benzosulfonamida (o-TSA, $\geq 99\%$), 4-metil-benzosulfonamida (p-TSA, $\geq 99\%$), N,4-dimetil-benzosulfonamida (Me-p-TSA, $\geq 98\%$), N-etil-4-metil-benzosulfonamida (Et-p-TSA, $\geq 98\%$), 4-bromobenzosulfonamida (BrBSA, $\geq 99\%$); i 1 patró intern: d4-benzotiazol (BT-d4, 98%). Els compostos van ser adquirits a Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Les solucions patrons individuals de 1000 mg/L van ser preparades en metanol, adquirit a ServiQuímia (Constantí, Tarragona), i emmagatzemades a -20 °C. Aquets patrons es van fer servir per fer-ne de menys concentrats i dopar les mostres de peix. Per dopar la mostra a l'inici, es fa servir acetona per a formar la suspensió i, àcid sulfúric per optimitzar el *clean-up*, adquirits a ServiQuímia (Constantí, Tarragona). L'aigua ultrapura es va obtenir utilitzant el sistema de purificació d'aigua, d'aigües Veolia (Sant Cugat del Vallés, Espanya).

El Florisil utilitzat com a sorbent als cartutxos de SPE així com el gel de sílice van ser adquirits a Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), els cartutxos de OASIS HLB (150 mg, 6 cm³) a Waters (Wexford, Irlanda) i la terra de diatomees utilitzada en l'etapa de PLE a Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemanya).

Els gasos utilitzats van ser l'heli per l'etapa de GC-MS i el nitrogen per la de PLE adquirits a Carbueros Metálicos (Tarragona, Espanya).

5.2.2. Toxicitat i manipulació

A la Taula 5.2.2.1. s'observa que la majoria dels compostos a determinar presenten efectes irritants. En algun cas com és el del o-TSA i p-TSA també són combustibles i en el cas dels solvents utilitzats són altament inflamables i combustibles.

Taula 5.2.2.1. Toxicitat i manipulació dels compostos.

COMPOST	TOXICITAT	MANIPULACIÓ
BT [14]	Nociu en cas d'ingestió, contacte amb la pell o inhalació.	
CIBT [15]	Tòxic en cas d'ingestió, nociu en cas d'inhalació, irritant.	
BTR [16]	Inflamable, nociu en cas d'ingestió o inhalació, irritant, nociu pels organismes aquàtics.	
4TTR [15]	Nociu en cas d'ingestió, irritant (de la pell, vies respiratòries i ulls).	
BSA [17]	Irritant, nociu en contacte amb la pell o per inhalació i nociu en cas d'ingestió.	
5TTR [17]	Nociu en cas d'ingestió, irritant (de la pell, vies respiratòries i ulls).	
NH2BT [18]	Irritant per la pell, ulls i vies respiratòries, tòxic en cas d'ingestió o inhalació.	
MeSBT [19]	Irritant per contacte amb la pell, ulls o vies respiratòries.	
o-TSA [20]	Combustible, irritant en contacte amb els ulls.	
CIBTR [19]	Tòxic en cas d'ingestió.	
OHBT [19]	Nociu en cas d'ingestió i irritant en contacte amb la pell i en cas d'inhalació.	Utilització de guants, ulleres de protecció i bata de laboratori.
p-TSA [20]	Combustible, irritació en contacte amb els ulls.	
Me-p-TSA [21]	Irritant en contacte amb els ulls i la pell així com amb les vies respiratòries.	
XTR [15]	Irritant en contacte amb la pell, els ulls i les vies respiratòries.	
Et-p-TSA [15]	Irritant en contacte amb la pell, els ulls i les vies respiratòries.	
BrBSA [15]	Nociu en cas d'ingestió i irritant en contacte amb la pell, els ulls i les vies respiratòries.	
MeOH [20]	Altament inflamable, mescles vapor/aire explosives, nociu en cas d'inhalació i en contacte amb ulls i pell.	
H ₂ SO ₄ [20]	Corrosiu, risc d'incendi i explosió en contacte amb bases, substàncies oxidants, aigua, combustibles i agents reductors.	
AcOEt [20]	Altament inflamable, mescles vapor/aire explosives. Nociu en cas d'inhalació i contacte amb la pell.	
MeCN [20]	Altament inflamable, mescles vapor/aire explosives, risc d'incendi i explosió en contacte amb oxidants forts. Nociu en cas d'inhalació.	

5.2.3. Estudi econòmic

Per a realitzar l'estudi econòmic, s'ha tingut en compte els materials (Taula 5.2.3.1.), els solvents (Taula 5.2.3.2.) i els reactius (Taula 5.2.3.3.) utilitzats durant l'optimització del mètode. A més, es mostren els preus dels aparells i instruments (Taula 5.2.3.4.) utilitzats al llarg de la realització del treball.

Taula 5.2.3.1. Estudi econòmic dels materials utilitzats al mètode.

MATERIAL	PREU DE COMPRA	QUANTITAT COMPRA	UTILITZAT PER EXTRACCIÓ	PREU PER EXTRACCIÓ	% RESPECTE EL TOTAL
ETAPA DE PLE					
Filtres cel·les	246,69 €	100 unitats	1	2,47 €	11,54 %
Terra de diatomees	110,97 €	1000 g	3 g	0,33 €	1,56 %
Nitrogen	65,21 €				
Cos cel·la	275,88 €				
ETAPA DE SPE					
Cartutxos	106,48 €	100 unitats	1	1,06 €	4,98 %
Oasis HLB	227,48 €	30 unitats	1	7,58 €	35,47 %
Fritats	107,69 €	100 unitats	2	2,15 €	10,07 %
Florisil	151,00 €	500 g	0,5 g	0,18 €	0,85 %
ETAPA DE FILTRAT					
Xeringues 1mL	15,61 €	100 unitats	1	0,16 €	0,73 %
Filtres de PTFE	371,95 €	50 unitats	1	7,44 €	34,80 %
TOTAL	21,37 €				

Taula 5.2.3.2. Estudi econòmic dels solvents utilitzats al mètode.

SOLVENT	PREU DE COMPRA	QUANTITAT COMPRA	UTILITZAT PER EXTRACCIÓ	PREU PER EXTRACCIÓ	% RESPECTE EL TOTAL
Metanol GC	30,44 €	2500 mL	20 mL	0,24 €	31,32 %
Metanol LC	9,38 €	2500 mL	24 mL	0,09 €	11,58 %
Acetonitril	21,78 €	2500 mL	18 mL	0,16 €	20,17 %
Acetat d'etil	39,88 €	2500 mL	18 mL	0,29 €	36,93 %
TOTAL.....	0,78 €				

Taula 5.2.3.3. Estudi econòmic dels reactius.

REACTIU	PREU DE COMPRA	QUANTITAT COMPRA	UTILITZAT	PREU TOTAL
BTR	40,40 €	50 mg	10 mg	8,08 €
4-TTR	40,10 €	50 mg	10 mg	8,02 €
5-TTR	33,50 €	50 mg	10 mg	6,70 €
CIBTR	72,10 €	25 g	10 mg	0,03 €
XTR	72,60 €	5 g	10 mg	0,15 €
BT	17,80 €	5 g	10 mg	0,04 €
BT-d4	180,00 €	2,5 mg	2,5 mg	180,00 €
CIBT	38,40 €	5 g	10 mg	0,08 €
NH2BT	19,50 €	5 g	10 mg	0,04 €
MeSBT	78,20 €	50 g	10 mg	0,02 €
OHBT	34,30 €	5 g	10 mg	0,07 €
BSA	15,40 €	5 g	10 mg	0,03 €
o-TSA	68,50 €	25 g	10 mg	0,03 €
p-TSA	43,20 €	10 g	10 mg	0,04 €
Me-p-TSA	93,90 €	100 g	10 mg	0,01 €
Et-p-TSA	41,20 €	100 g	10 mg	0,01 €
BrBSA	61,50 €	5 g	10 mg	0,12 €
H ₂ SO ₄	9,42 €	2500 mL	10,90 mL	0,04 €
TOTAL.....				203,51 €

Taula 5.2.3.4. Estudi econòmic dels aparells i instruments.

APARELL/INSTRUMENT	PREU DE COMPRA
Dionex ASE 350	40.000 €
Mivac	15.000 €
GC-MS	90.000 €

Segons el Servei de Recursos Científics i Tècnics de la Universitat Rovira i Virgili, els preus sobre pesos bruts de residus, envasos i palets són:

Solvents halogenats	1010 €/T
Solvents no halogenats	101 €/T
Soluciones aquoses	292,90 €/T
Olis	50,50 €/T
Sòlids, absorbents...	303 €/T
Invasos contaminats	606 €/T

Reactius laboratoris 2020 €/T

Els costos de transport i documentació són a part i cal sumar 2,37 €/T per repercussió d'abocadors.

Tenint en compte només el preu del material gastat per extracció i el dels solvents i, que s'han fet un total de 68 extraccions totals durant la realització del treball, el preu final del projecte és de 1506,20 €.

5.3. Preparació de la mostra

El peix utilitzat en l'estudi va ser comprat en tres establiments diferents: un mercat, una peixateria i un supermercat per tal de poder tenir una diversitat de la mostra i tenir en compte diverses fonts de compra dels consumidors.

Les mostres es van tallar a trossos petits i es van congelar. Més endavant, van ser liofilitzades mitjançant el Mi-Vac de SP Scientific (Warminster, Pensilvania). Una vegada la mostra estava lliure d'aigua, es va moldre i tamisar fins a obtenir una mostra en pols fina, aquesta es va guardar en un lloc sec i fresc per a ser analitzada.

Per a dopar la mostra sòlida amb els anàlits a determinar, es pesa una quantitat d'aquesta i se li afegeix acetona per tal de formar una suspensió. És important que el recipient utilitzat tingui una gran superfície per afavorir l'evaporació, per exemple, un cristal·litzador. Seguidament, s'afegeixen els anàlits d'un patró amb concentració coneguda i es mescla la suspensió per assegurar la homogeneïtat d'aquesta. El cristal·litzador el tapa amb para-Film fent-li obertures i es deixa evaporar del solvent.

5.3.1. Extracció per líquids pressuritzats (PLE)

Sota les condicions optimitzades, els anàlits van ser extrets amb aigua Milli-Q. Les extraccions es van dur a terme amb un extractor de líquids pressuritzats, ASE 350 Dionex, mitjançant cel·les de 10 ml de capacitat. Cada cel·la es va omplir amb un filtre de cel·lulosa al fons, d'1 g de terra de diatomees seguit d'una mescla d'1 g de mostra de peix amb 1 g de terra de diatomees preparada en un morter. Finalment, es van omplir les cel·les amb 1 g de terra de diatomees (Fig. 5.3.1.1.).

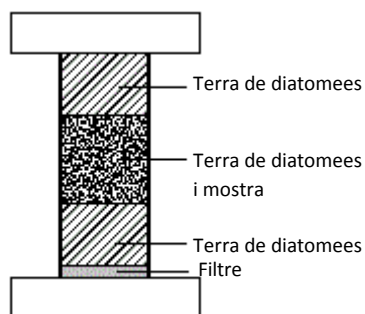


Fig. 5.3.1.1. Cel·la de PLE.

L'extracció es va portar a terme a 80 °C, amb cel·les pressuritzades a 1500 psi utilitzant un cicle estàtic de 5 min. El volum d'esbandir i el temps de purga (usant nitrogen) van ser 6,6 mL (equivalent al 60% de la capacitat de la cel·la) i 120 segons, respectivament.

5.3.2. Extracció en fase sòlida (SPE)

El procés d'extracció en fase sòlida està basat en estudis previs realitzats per Herrero *et al.* [4]. Es va fer ús de cartutxos de Oasis HLB i Florisil. El primer d'ells consta d'un sorbent de co-polímer de N-vinilpirrolidona (hidrofilica) i divinilbenzè (lipofílic) amb capacitat de retenir anàlits polars [22]; el segon es tracta de silicat de magnesi sintètic que actua com a adsorbent dels lípids de la mostra. Els cartutxos de Florisil van ser preparats amb 0.5 g d'aquest. Els cartutxos Oasis HLB van ser condicionats amb 5 ml de metanol seguits de 5 ml d'aigua Milli-Q; els de Florisil, amb 5 ml de metanol.

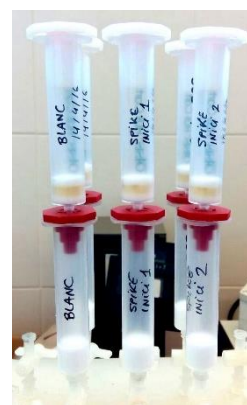


Fig. 5.3.2.1. Eluïó anàlits en SPE.

Primer, es va fer passar l'extracte aquós del PLE (10 mL, aproximadament) a través del cartutx de Oasis HLB per tal que els anàlits quedessin retinguts en aquest, es van fer passar 5 ml d'aigua Milli-Q i es va fer el buit per tal d'assecar el cartutx. Seguidament, es va posar el cartutx de Oasis HLB seguit del de Florisil (Fig. 5.3.2.1.) i es van eluir els compostos amb 6 ml de metanol recollint-los en vials. Seguidament, es va evaporar el solvent fins a 1 mL, aproximadament, per tal de concentrar l'extracte.

Una vegada s'havia evaporat l'extracte fins a, aproximadament, 1 mL, amb l'ajuda d'una xeringa d'1 mL i un filtre de PTFE de 0,2 µm de porus (hidròfob) aquest es va filtrar per acabar d'eliminar qualsevol interferència que quedés en suspensió i es va enrasar en un matràs d'1 mL en metanol per a la posterior injecció al cromatògraf intentant netejar el màxim d'extracte de l'evaporació per evitar la pèrdua d'anàlits.

5.4. Determinació per GC-MS

L'equip de GC-MS consisteix en un instrument Hewlett Packard HP 6980 Series GC System connectat a un detector d'espectrometria de masses Hewlett Packard 5973 Mass Selective Detector adquirits a Agilent Technologies (Palo Alto, USA). Les separacions es van dur a terme amb una columna ZB-5 de Micron Phenomenex (Torrance, California, USA) de dimensions (30m x 0.25mm d.i. x 0.25µm) operant a flux constant d'1 ml/min d'heli. L'enregistrament de les dades cromatogràfiques es va dur a terme amb un G1701DA MSD ChemStation, el qual era controlat per Windows (Microsoft). El GC va ser programat com a continuació: 85 °C (mantinguts 2 min), el primer pendent de temperatura a 25 °C/min fins a 200 °C, el segon pendent a 5 °C/min fins 250 °C i el tercer pendent a 10 °C/min fins 280 °C (mantinguts 2 min). La temperatura de l'injector (PTV) es va mantenir a 250 °C. Els patrons i les mostres es van injectar en volums d'1µl en mode *splitless* (2 min). El detector de masses enregistrava en el mode SIM a una energia d'impacte electrònic de 70 eV.

A la taula 5.4.1. es mostra informació sobre els compostos a analitzar com el nom, el pes molecular, els temps de retenció i els ions seleccionats per a cadascun d'ells en el mode SIM.

Taula 5.4.1. Abreviatura, pes molecular, temps de retenció i ions seleccionats a mode SIM.

ABREVIATURA	NOM	PM (g/mol)	IONS	TEMPS DE RETENCIÓ (min)
BT	Benzotiazol	135	135*, 108	6.9
BT-d4	Benzotiazol-d4	139	111*, 112, 95	6.9
CIBT	2-clorobenzotiazol	169	169*, 108, 134	7.6
BTR	1H-benzotriazol	119	119*	8.4
4TTR	4-metil-1H-benzotriazol	133	104*, 133	8.7
BSA	Benzosulfonamida	157	157*, 141	8.8
5TTR	5-metil-1H-benzotriazol	133	104*, 133	8.9
NH2BT	2-benzotiazolamina	150	150*, 123	9.2
MeSBT	2-(metiltio)-benzotiazol	181	181*, 148, 108	9.2
o-TSA	2-metil-benzosulfonamida	171	106*, 171, 137	9.3
CIBTR	5-cloro-1H-benzotriazol	153	153*, 125, 133	9.5

(Continuació) Taula 5.4.1. Abreviatura, pes molecular, temps de retenció i ions seleccionats a mode SIM.

p-TSA	4-metil-benzosulfonamida	171	171*, 155, 107	9.6
OHBT	2(3H)-benzotiazolona	151	151*, 123	9.6
Me-p-TSA	N,4-dimetil-benzosulfonamida	185	185*, 155, 121	9.6
Et-p-TSA	N-etil-4-metil-benzosulfonamida	199	155*, 184, 199	9.9
XTR	5,6-dimetil-1H-benzotriazol	147	118*, 147	9.9
BrBSA	4-bromobenzosulfonamida	235	237*, 155, 135, 221	10.9

* Ió quantificador

5.5. Resultats i discussió

5.5.1. Preparació patrons

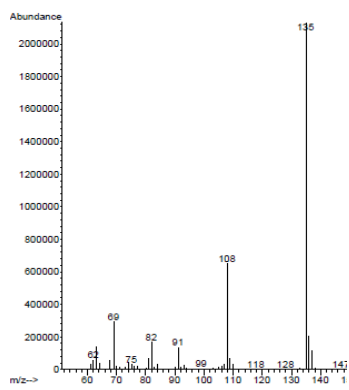
Primerament, es van preparar els patrons individuals dels compostos de les tres famílies en metanol a una concentració de 1000 mg/L, ja que d'aquesta manera presentaven gran estabilitat, per tal d'utilitzar-los per fer intermedis i concentracions menors per ser injectades al cromatògraf o dopar les mostres.

5.5.2. Optimització condicions GC-MS

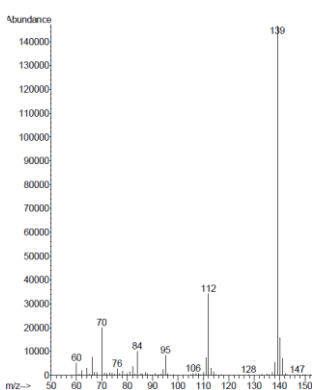
Com s'ha vist a la taula 2.2., generalment, s'ha utilitzat la cromatografia de líquids amb detector d'espectrometria de masses per a la determinació i l'anàlisi d'aquestes famílies de compostos. No obstant això, amb la cromatografia de gasos s'espera menor efecte matriu a més de provar més *clean-up* per tal de minimitzar-lo.

Inicialment, es va partir de les condicions descrites per Carpinteiro *et al.* [23] per tal d'identificar les espècies individuals en mode *Full Scan* a través dels seus espectres (Fig. 5.5.2.1.).

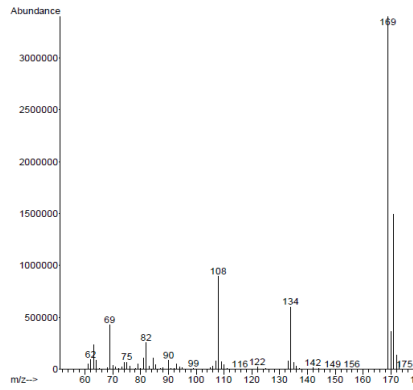
PART EXPERIMENTAL



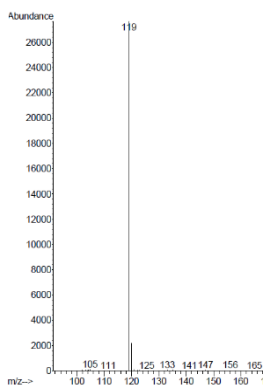
(1)



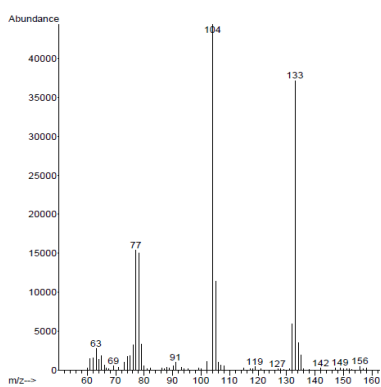
(2)



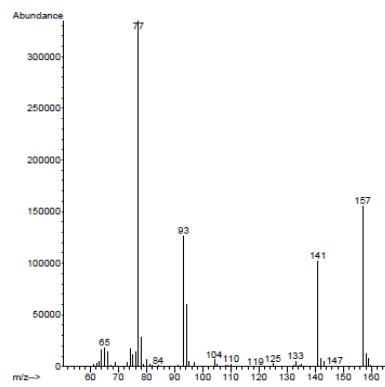
(3)



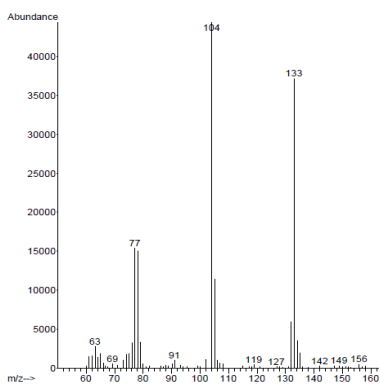
(4)



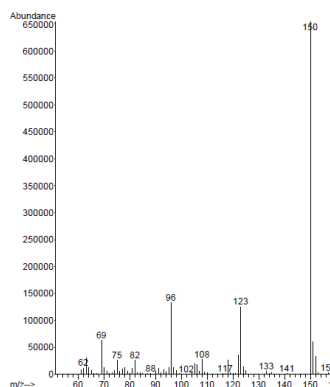
(5)



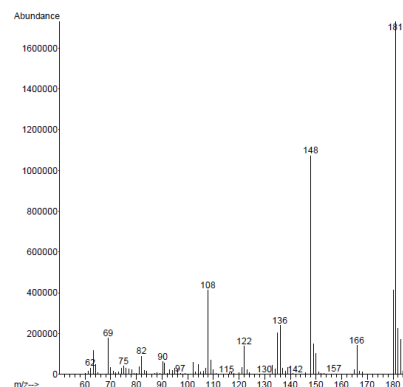
(6)



(7)

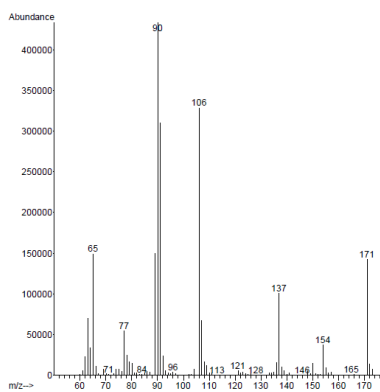


(8)

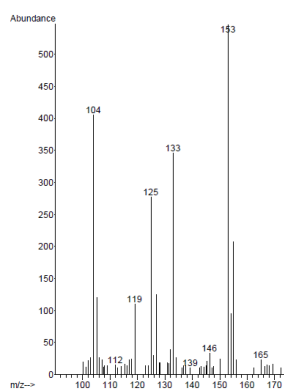


(9)

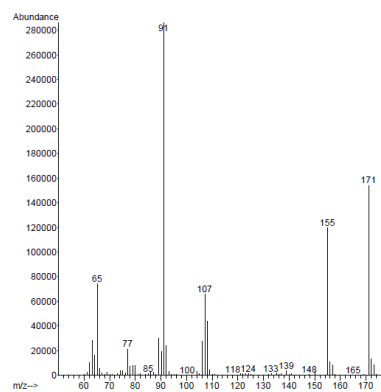
PART EXPERIMENTAL



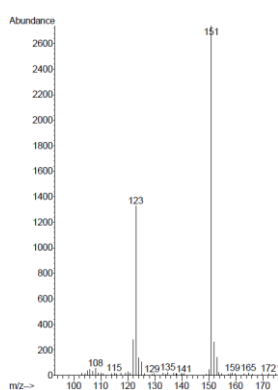
(10)



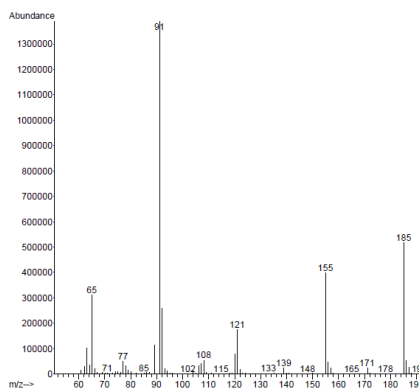
(11)



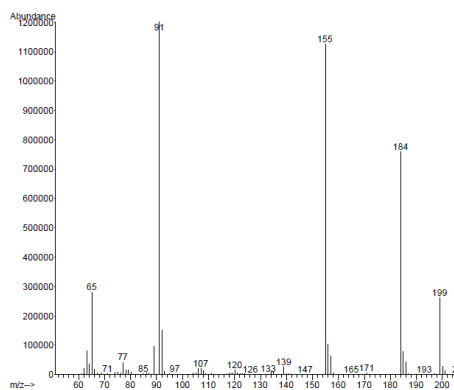
(12)



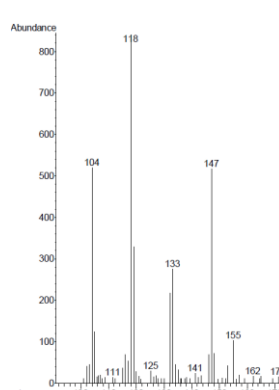
(13)



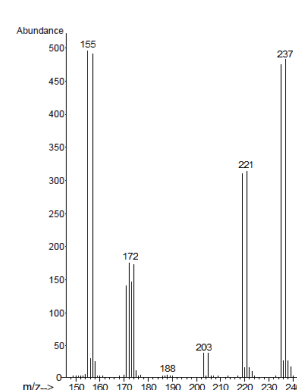
(14)



(15)



(16)



(17)

Fig. 5.5.2.1. Espectres de masses de (1) BT, (2) BT-d4, (3) CIBT, (4) BTR, (5) 4TTR, (6) BSA, (7) 5TTR, (8) NH2BT, (9) MeSBT, (10) o-TSA, (11) CIBTR, (12) p-TSA, (13) OHBT, (14) Me-p-TSA, (15) Et-p-TSA, (16) XTR, (17) BrBSA.

Una vegada identificats, es va preparar un patró amb totes les espècies a determinar. Cada família estava preparada a una concentració adient per ser detectada; la de benzotriazols a 50 mg/L, la de benzotiazols a 50 mg/L i la de benzosulfonamides a 25 mg/L. Una vegada es va comprovar que les condicions inicials no eren òptimes en

l'estudi, es van provar d'altres per tal d'arribar a les més adients i separar els pics per evitar el solapament.

Es va observar com alguns dels compostos donaven problemes a l'hora de ser identificats i es va decidir eliminar-los i seguir l'estudi només amb aquells que es poguessin identificar i quantificar sense problemes. Els eliminats van ser aquells que donaven molt poca senyal i no era possible identificar-los; van ser: 1H-benzotriazol, 5,6-dimetil-1H-benzotriazol, 2(3H)-benzotiazolona, 4-bromobenzosulfonamida i 5-cloro-1H-benzotriazol. A la figura 5.5.2.2. es mostra la separació cromatogràfica òptima en mode *Full Scan* dels onze compostos i el patró intern, i els ions extrets de cadascun d'ells.

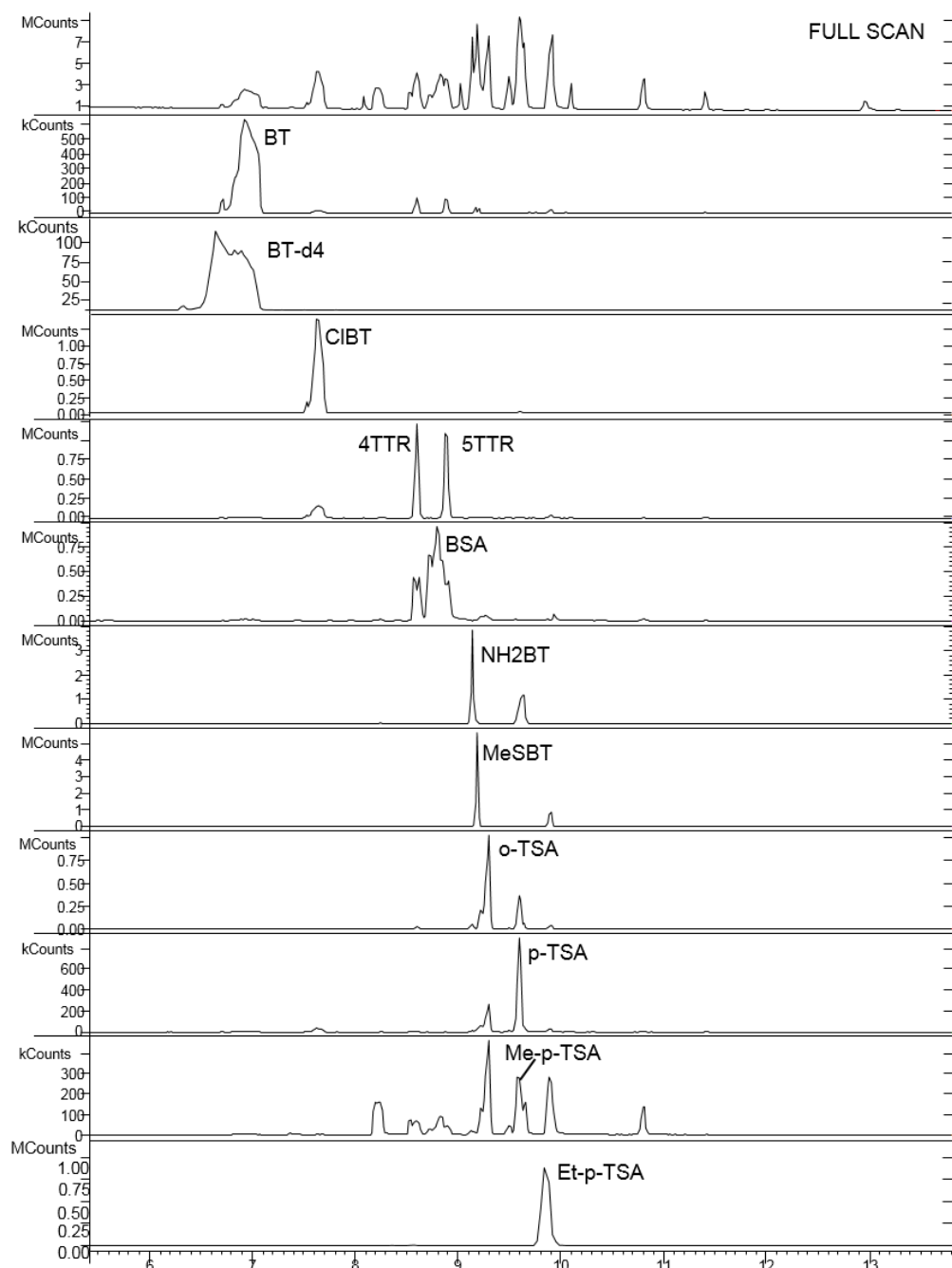


Fig. 5.5.2.2. Cromatograma en mode *Full Scan* dels onze compostos i el patró intern amb els ions extrets.

Quan es va haver optimitzat el gradient de temperatura (apartat 5.4.) i ja es coneixien els ions de cadascun dels compostos, es van optimitzar les condicions del mode *SIM*. Per fer-ho, es van tenir en compte el temps de retenció de cada compost obtinguts en el patró mescla i els ions més representatius d'ells. Per triar aquests últims es va tenir en compte la seva abundància i els de *m/z* més alta. Per la separació entre els pics, es va decidir fer dues finestres tenint en compte els ions i els temps de retenció dels compostos (Taula 5.4.1.). La primera va del minut 2 al 7.90 i conté al BT, BT-d4 i CIBT amb els seus respectius ions; la segona va del minut 7.90 al final de l'anàlisi i conté als restants compostos.

5.5.3. Optimització condicions PLE

Inicialment, es va partir de les condicions trobades a la bibliografia [4] per tal d'optimitzar el solvent d'extracció més adient per obtenir millors recuperacions dels anàlits. L'extracció es va dur a terme a 80 °C, amb la cel·la pressuritzada a 1500 psi, usant un cicle estàtic de 5 min. El volum d'esbandir va ser de 6,6 mL, corresponent al 60% de la cel·la, i el temps de purga (utilitzant nitrogen), de 120 segons.

Es va provar de fer les extraccions en aigua, metanol i una mescla metanol:aigua (1:1). Es va realitzar tot el mètode utilitzant els diferents solvents d'extracció per tal de calcular les recuperacions amb cadascun d'ells. Es van calcular fent ús de les equacions 5.5.3.-1, 5.5.3.-2, 5.5.3.-3, 5.5.3.-4 i 5.5.3.-5. Cal dir que les divisions per calcular les recuperacions són relacions de les àrees dels compostos amb el patró intern. El patró que apareix a les equacions es tracta d'un patró amb tots els compostos i el patró intern preparat a 50 mg/L i injectat directament al GC-MS.

$$\% \text{ Rec. aparent} = \frac{\text{mostra dopada a l'inici}}{\text{patró}} \cdot 100 \quad (5.5.3.-1)$$

$$\% \text{ Rec. PLE} = \frac{\text{mostra dopada a l'inici}}{\text{mostra dopada després PLE}} \cdot 100 \quad (5.5.3.-2)$$

$$\% \text{ Rec. evaporació} = \frac{\text{mostra dopada després PLE}}{\text{mostra dopada després evaporació}} \cdot 100 \quad (5.5.3.-3)$$

$$\% \text{ Rec. SPE} = \frac{\text{mostra dopada després evaporació}}{\text{mostra dopada després SPE}} \cdot 100 \quad (5.5.3.-4)$$

$$\% \text{ Efecte matriu} = \frac{(\text{mostra dopada després SPE}) - \text{patró}}{\text{patró}} \cdot 100 \quad (5.5.3.-5)$$

En el cas d'utilitzar metanol:aigua com a solvent d'extracció del PLE, es van tenir en compte les etapes de l'esquema 5.5.3.1. En el cas de la utilització d'aigua, es va seguir l'esquema 5.5.3.2. A diferència de la utilització de metanol:aigua com a solvent, en aquest cas, no cal una etapa d'evaporació després del PLE ja que l'extracte només té aigua. Finalment, per a l'extracció amb metanol es va tenir en compte les etapes de l'esquema 5.5.3.3. En els tres casos es va calcular la recuperació aparent, la del PLE i l'efecte matriu. Amb aigua com a solvent, també, la recuperació de l'etapa de SPE i amb l'aigua:metanol, a més, l'etapa d'evaporació de després del PLE. El moment on es dopa la mostra o l'extracte s'indica amb un asterisc (*) en els esquemes.

(*) PLE $\xrightarrow{(*)}$ Evaporació $\xrightarrow{(*)}$ SPE $\xrightarrow{(*)}$ Evaporació \longrightarrow Filtració \longrightarrow 1 mL

Esquema 5.5.3.1. Etapes del mètode utilitzant metanol:aigua com a solvent d'extracció del PLE.

(*) PLE $\xrightarrow{(*)}$ SPE $\xrightarrow{(*)}$ Evaporació \longrightarrow Filtració \longrightarrow 1 mL

Esquema 5.5.3.2. Etapes del mètode utilitzant aigua com a solvent d'extracció del PLE.

(*) PLE $\xrightarrow{(*)}$ Evaporació \longrightarrow Filtració \longrightarrow 1 mL

Esquema 5.5.3.3. Etapes del mètode utilitzant metanol com a solvent d'extracció del PLE.

Es van dopar 3 g de mostra de salmó per tal de tenir una concentració dels anàlits de 50 mg/kg seguint el procés de l'apartat 5.3. i es va calcular la recuperació aparent dels compostos.

Segons la figura 5.5.3.1., es va observar que utilitzar la mescla de metanol:aigua (1:1) donava millors recuperacions per tots els compostos excepte per BT i CIBT que baixaven respecte a utilitzar aigua com a solvent d'extracció. No es mostren els resultats obtinguts amb el metanol com a solvent d'extracció ja que, a causa del gran efecte matriu que hi va haver, es feia impossible identificar els compostos.

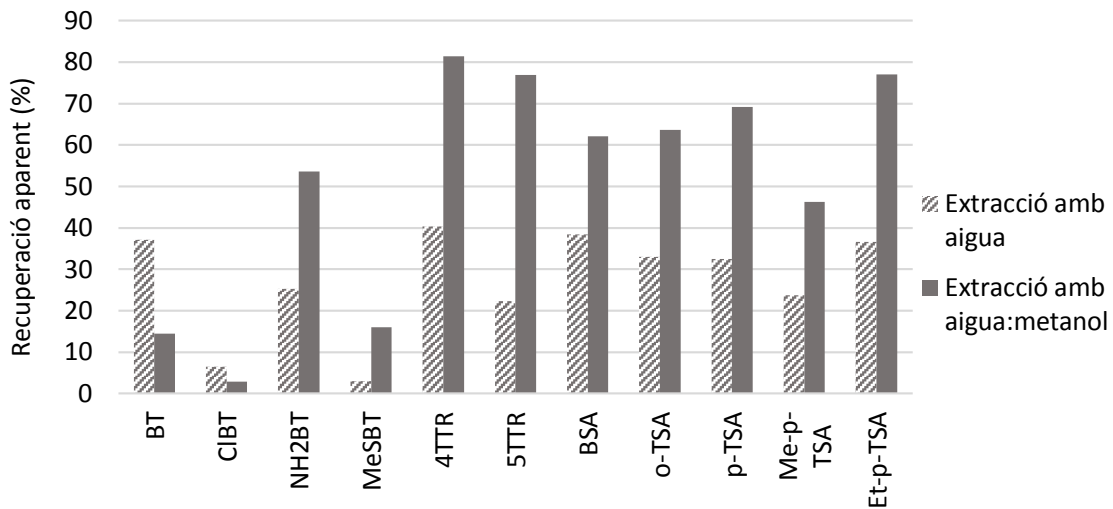


Fig. 5.5.3.1. Recuperacions aparents amb aigua i metanol:aigua (1:1) com a solvents d'extracció en l'etapa de PLE del salmó.

Donat que les mostres de salmó, en presentar tant de greix, donaven certs problemes a l'hora d'analitzar-les per GC-MS, es va decidir canviar de mostra, analitzant així mostres de lluç, un peix amb menys contingut de lípids i el qual presentaria menys problemes. El percentatge lipídic va ser calculat anteriorment per determinació gravimètrica [24]. Primer, es va pesar una quantitat determinada de grams de peix i es van posar en un vial prèviament pesat; el vial amb el peix es va pesar. Seguidament, el vial amb el peix es va deixar durant dues hores a la mufla i es va tornar a pesar, es va tornar a deixar durant trenta minuts més i es va repetir el procediment fins el moment en què el pes del vial amb el peix es mantenia constant. Mitjançant les equacions 5.5.3.-6 i 5.5.3.-7 es va calcular el percentatge lipídic del peix en qüestió. Cal dir, a més, que el lluç també és un dels peixos més consumits per la societat i l'estudi també hi té aplicabilitat.

$$(\text{pes vial ple} - \text{pes vial buit}) = x \text{ g} \quad (5.5.3.-6)$$

$$\% \text{ lipídic} = \frac{x \text{ g}}{\text{pes peix inici}} \cdot 100 \quad (5.5.3.-7)$$

Es va continuar l'estudi amb aquesta matriu i es van calcular les recuperacions de cadascuna de les etapes segons el solvents d'extracció del PLE.

Com es mostra a la figura 5.5.3.2., moltes de les recuperacions superen el 100 % degut a l'efecte matriu. No obstant això, no hi va haver problemes per poder identificar cap compost i les recuperacions que es mantenen per sota del 100 % són raonables a cadascuna de les etapes, sent més baixes les aparents que tenen en compte tot el mètode seguides de les de l'etapa de PLE, evaporació i de SPE. Cal destacar el Et-p-TSA com el que dóna unes recuperacions majors en tractar-se de l'últim compost en sortir al cromatograma i, en conseqüència, el que apareix més ample per l'efecte matriu.

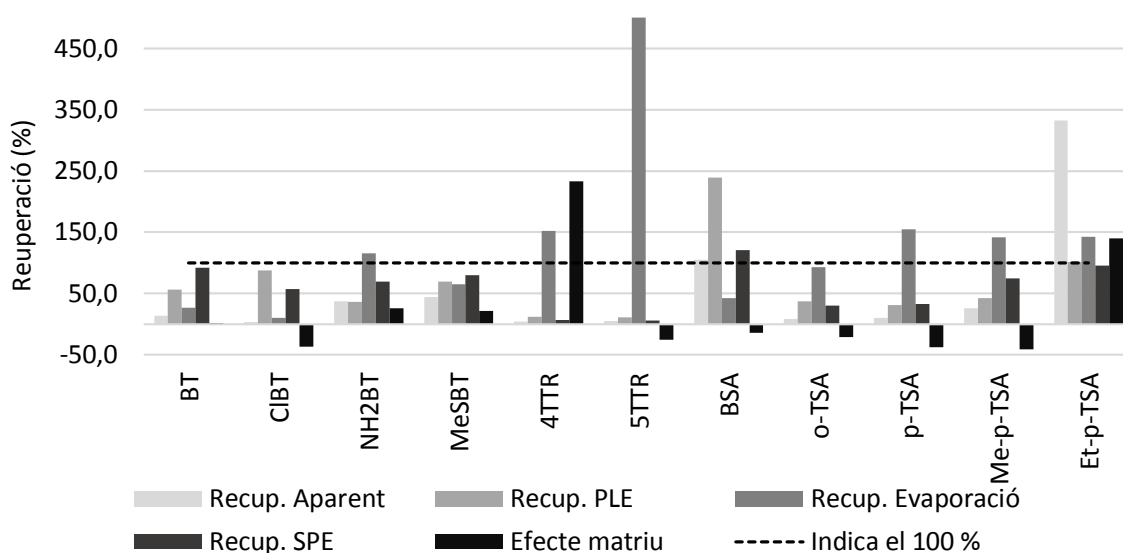


Fig. 5.5.3.2. Recuperacions amb extracció de metanol:aigua en lluç.

A la figura 5.5.3.3. s'observa com l'efecte matriu és present en tots els compostos fent que algunes de les recuperacions de l'etapa del SPE sobrepassin el 100 %. No obstant això, les que es mantenen per sota corresponen a unes recuperacions raonables segons les etapes. L'únic compost que no es va poder identificar és el o-TSA, el qual no apareix tant en la recuperació aparent com en la de l'etapa del PLE. Altra vegada, és el Et-p-TSA el compost que dóna unes recuperacions molt més altes del 100 % altra vegada per l'efecte matriu.

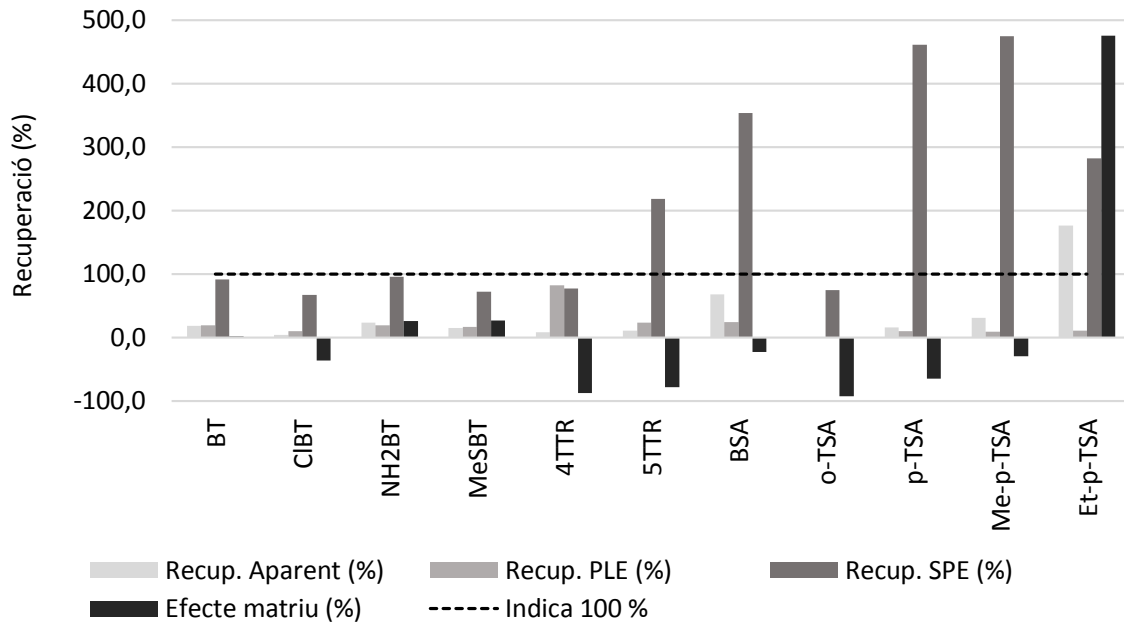


Fig. 5.5.3.3. Recuperacions amb extracció d'aigua en lluç.

Amb la utilització del metanol com a solvent d'extracció es fa impossible identificar molts dels compostos com es mostra a la figura 5.5.3.4. L'efecte matriu és molt alt en tots els compostos el que suposa un augment de les recuperacions en els identificats, per tant, es pot concloure que el metanol extrau moltes interferències. Per tots aquests desavantatges de la utilització del metanol, queda descartat com a solvent d'extracció en l'etapa del PLE.

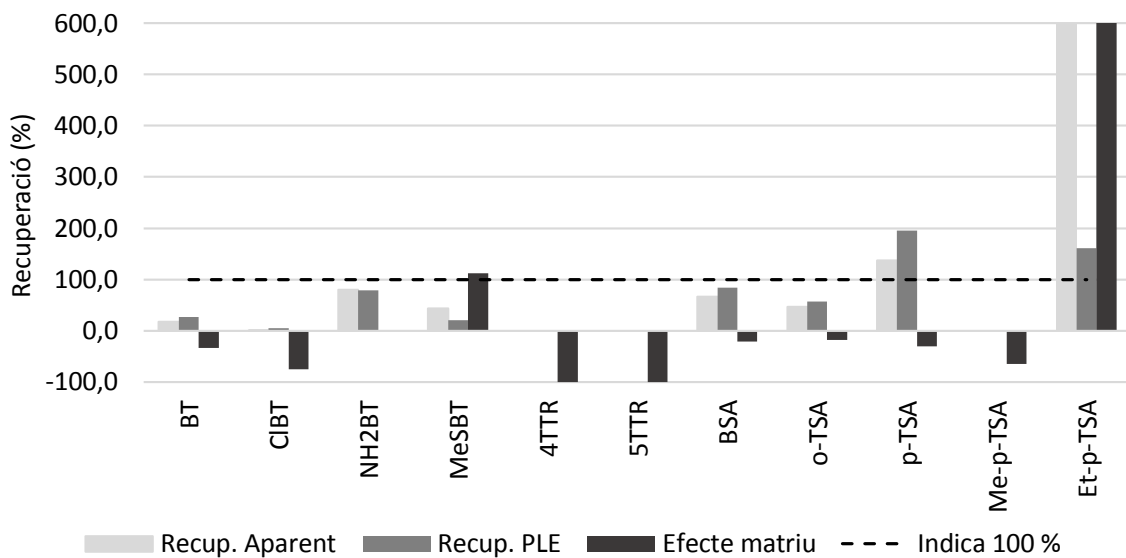


Fig. 5.5.3.4. Recuperacions amb extracció de metanol en lluç.

Es comparen les recuperacions aparents, de l'etapa de PLE i l'efecte matriu, que són les úniques comunes als tres solvents utilitzats. Inicialment, es va descartar el metanol com a solvent perquè, a causa del seu efecte matriu, no es podien identificar alguns dels compostos com el 4TTR, 5TTR i Me-p-TSA en les recuperacions aparents (Fig. 5.5.3.5.) i en les de l'etapa del PLE (Fig. 5.5.3.6.), a més de les dificultats per identificar i quantificar la resta de compostos.

Comparant les recuperacions aparents i les de l'etapa de PLE, s'observa que amb aigua i aigua:metanol, aquestes són molt semblants, i es comprova que l'efecte matriu amb metanol com a solvent d'extracció és molt gran (Fig. 5.5.3.7.).

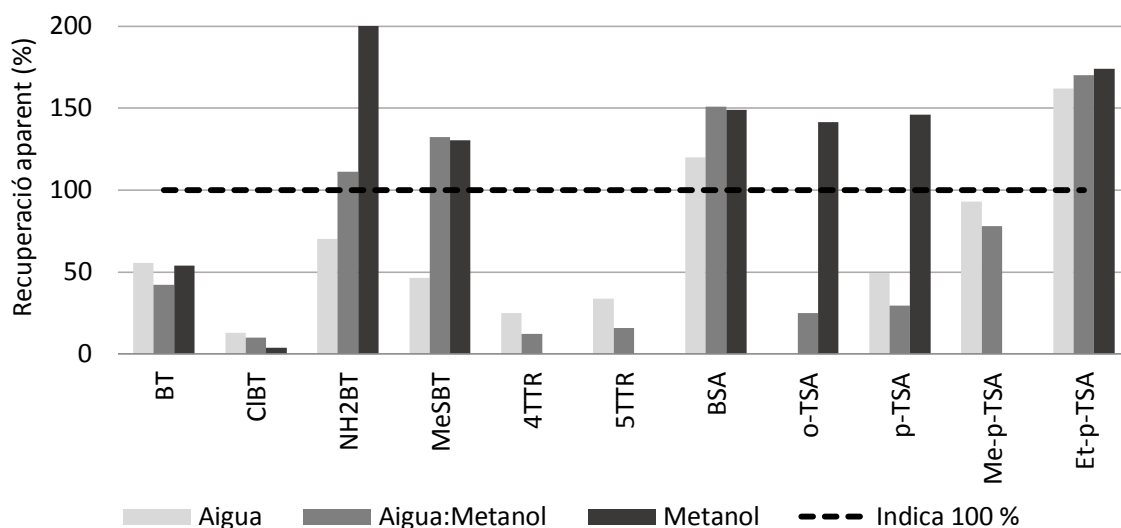


Fig. 5.5.3.5. Recuperacions aparents amb aigua, metanol:aigua (1:1) i metanol com a solvents d'extracció en l'etapa de PLE de lluç.

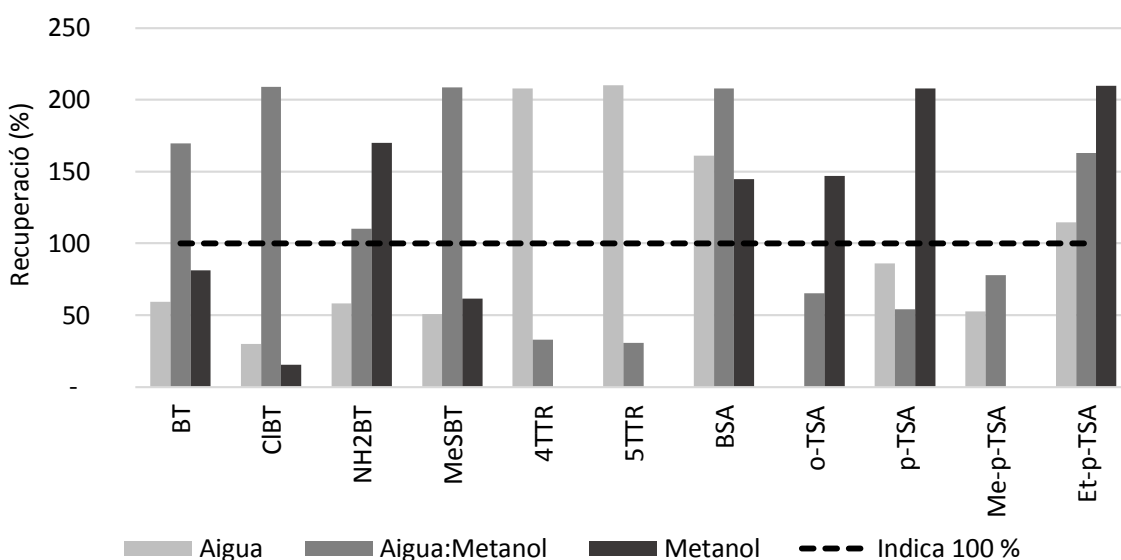


Fig. 5.5.3.6. Recuperacions de l'etapa de PLE amb aigua, metanol:aigua (1:1) i metanol com a solvents d'extracció de lluç.

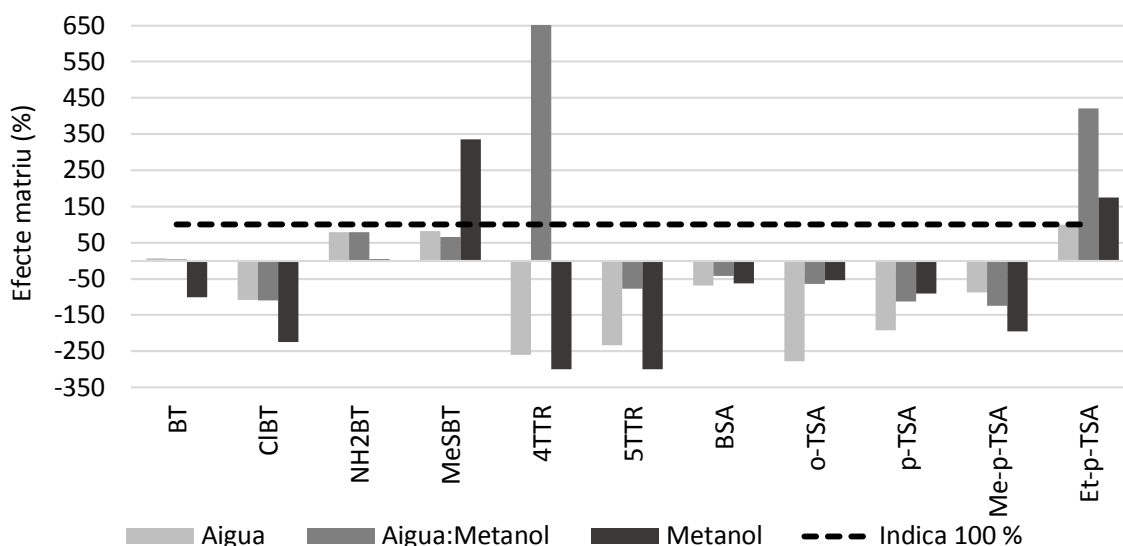


Fig. 5.5.3.7. Efecte matriu amb aigua, metanol:aigua (1:1) i metanol com a solvents d'extracció en l'etapa de PLE de lluç.

Si bé encara no es va optimitzar totalment l'etapa de PLE, va ser necessari disminuir l'efecte matriu per tal de poder observar correctament l'efecte dels diferents paràmetres del PLE. Per aquesta raó, es va seguir l'estudi amb l'optimització d'un *clean-up*.

5.5.4. Optimització Clean-Up

Pel fet de tractar-se d'una mostra de peix, l'extracte d'aquest presenta gran quantitat de lípids que interfereixen en l'anàlisi. Per tal de minimitzar l'efecte matriu, es va decidir fer una etapa de *clean-up* basada en l'eliminació dels lípids per a una millor determinació dels anàlisis. Els sorbents més adients per a l'eliminació de lípids apolars són el gel de sílice acidificat, Florisil i alúmina. En el cas de l'alúmina, també elimina els possibles colors de l'extracte [25].

En l'estudi, es va provar el Florisil acidificat amb àcid sulfúric com a sorbent, tant amb el mètode *in-cell* en l'etapa de PLE, substituint la terra de diatomees, com també utilitzat en l'etapa de SPE.

El Florisil va ser acidificat amb àcid sulfúric concentrat (1:1, w/w) agitant vigorosament per aconseguir que quedés homogeni i es va deixar reposar durant 24h.

En el cas de l'etapa del PLE, hi va haver certs problemes amb els filtres utilitzats en la cel·la, ja que eren de cel·lulosa i van ser cremats per la presència de l'àcid sulfúric (Fig. 5.5.4.1.).



Fig. 5.5.4.1. Filtre de cel·lulosa cremat per àcid sulfúric.

No obstant aquest problema, es van poder identificar els compostos a analitzar. A la figura 5.5.4.2. s'observa la diferència de les recuperacions entre la utilització del *clean-up in cell* en l'etapa de PLE i sense el *clean-up*. La majoria de compostos augmenten les recuperacions amb el *clean-up*, cal destacar, sobretot, que el o-TSA pot ser identificat quan prèviament era impossible. Només en els casos del BSA i Et-p-TSA és la recuperació sense *clean-up* la que és major però, alhora són compostos que donaven un

percentatge major del 100 % a causa de l'efecte matriu, així que es pot assumir que el *clean-up* ha suposat una disminució d'aquest efecte matriu fent disminuir les seves recuperacions a valors més raonables, per sota del 100 % en el cas del BSA i més pròxim al 100 % per l'Et-p-TSA.

En els casos del 4TTR i 5TTR en els que les recuperacions superen el 100 %, podria ser degut a la interferència del filtre de cel·lulosa dissolt en l'etapa del PLE a causa de l'àcid sulfúric.

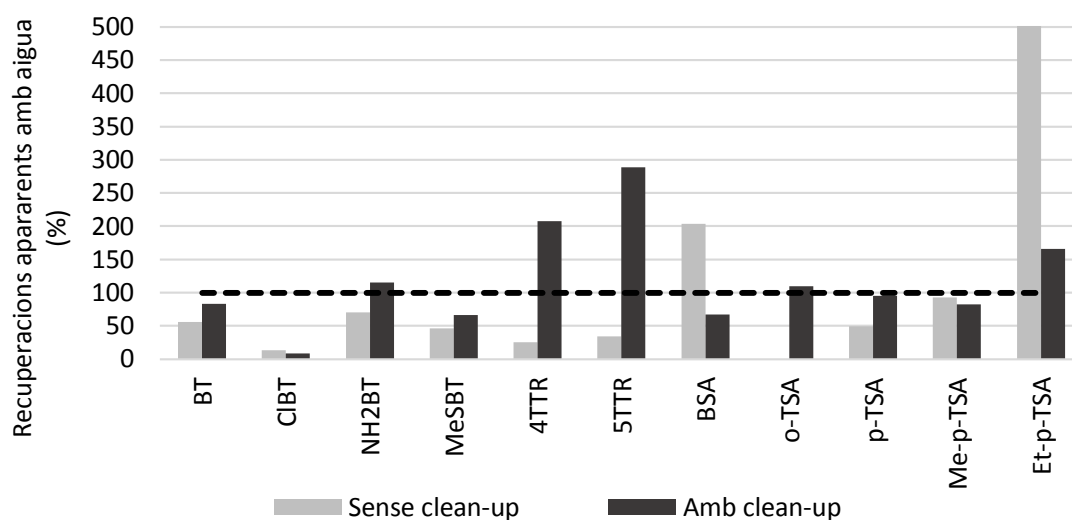


Fig. 5.5.4.2. Recuperacions aparents de les extraccions amb aigua amb i sense *clean-up* a l'etapa de PLE.

Amb la utilització de metanol:aigua com a solvent d'extracció, s'observa a la figura 5.5.4.3. com alguns dels compostos (o-TSA i Et-p-TSA) no es van poder identificar. En aquest cas, les recuperacions amb el *clean-up* augmenten només en tres casos i dos d'ells superen el 100 %. Cal suposar llavors, que amb l'aigua:metanol s'extrauen més interferents que dificulten a l'hora d'identificar els compostos i fent que les seves recuperacions siguin majors al 100 % o inclús, disminueixin respecte a no utilitzar *clean-up*.

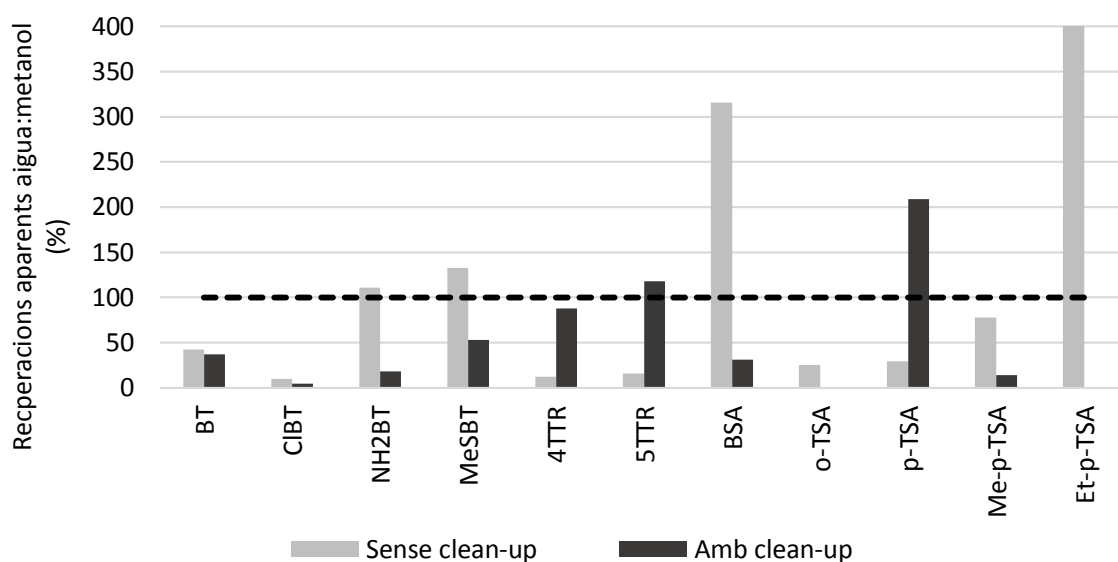


Fig. 5.5.4.3. Recuperacions aparents de les extraccions amb aigua:metanol amb i sense *clean-up* a l'etapa de PLE.

A causa d'aquests problemes amb el *clean-up* en l'etapa de PLE, es va decidir fer-lo en l'etapa de SPE per evitar que el filtre de cel·lulosa interferís en l'anàlisi. Es van preparar cartutxos de Florisil acidificat per substituir els de Florisil sense acidificar utilitzats en etapes anteriors.

L'etapa de PLE es va decidir fer-la amb aigua com a solvent d'extracció per facilitar el procés d'optimització i observar si hi havia alguna millora amb el nou *clean-up*. Una vegada obtingut l'extracte del PLE, es va fer passar primer pel cartutx del Florisil acidificat seguit en tàndem del d'Oasis HLB per tal d'aplicar primerament el *clean-up* i després retenir els anàlits en el següent cartutx (Fig. 5.5.4.4.). D'aquesta manera, l'ordre d'aplicació del *clean-up* no variava respecte el realitzat a l'etapa de PLE. Una vegada els anàlits estaven retinguts en el cartutx de Oasis HLB, es van eluir amb 6 mL metanol i es van recollir en vials.

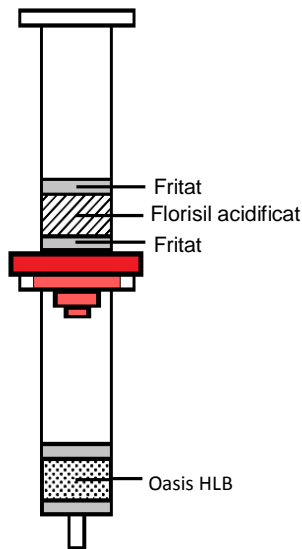


Fig. 5.5.4.4. Cartutxos de SPE en tàndem.

En aquest cas, ni els fritats ni els cartutxos van cremar-se ni fer-se malbé en estar en contacte amb l'àcid sulfúric. No obstant això, hi va haver problemes a l'hora de fer passar l'extracte a través del cartutx amb Florisil acidificat ja que aquest va quedar més compactat que el Florisil sense acidificar utilitzat anteriorment i, inclús aplicant el màxim de buit, el temps en passar l'extracte va ser molt llarg.

A la figura 5.5.4.5. es mostren les recuperacions dels compostos amb i sense *clean-up* utilitzant aigua com a solvent d'extracció a l'etapa del PLE. S'observa com encara els percentatges de recuperacions superen el 100 % a causa de l'efecte matriu, per conseqüència, el *clean-up* amb Florisil no és l'òptim per algunes espècies. Per a unes altres com 4TTR i 5TTR, la recuperació augmenta considerablement amb la utilització dels *clean-up*, no obstant això, superen el 100 %.

Comparant les recuperacions del *clean-up* en el PLE i el SPE, s'observa com fent el *clean-up* en el SPE, en la majoria de compostos les recuperacions disminueixen el que portaria a concloure que amb l'ús del *clean-up in-cell*, el filtre de cel·lulosa interferia en l'anàlisi dels compostos augmentant les recuperacions.

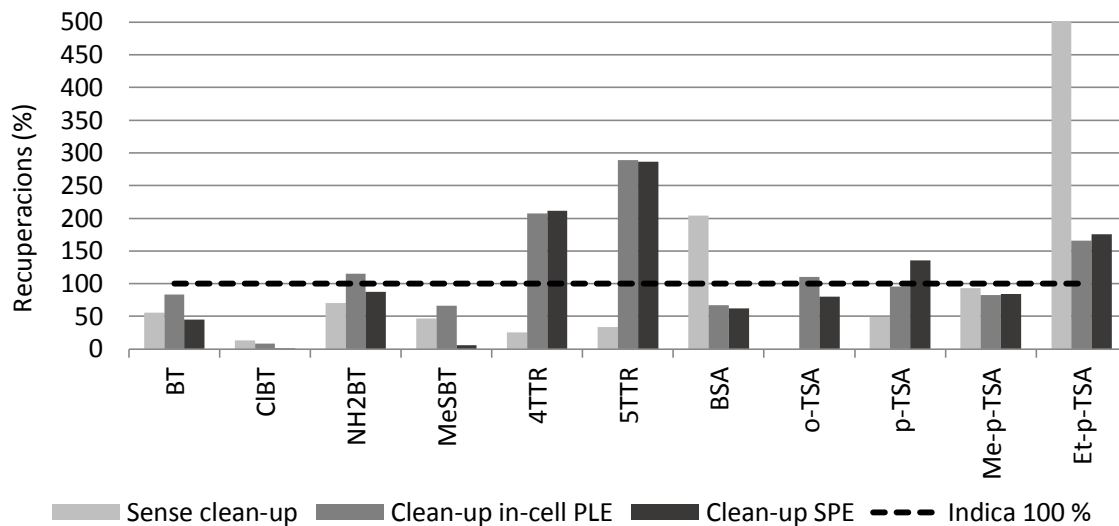


Fig. 5.5.4.5. Comparació de les recuperacions sense *clean-up*, amb *clean-up in-cell* al PLE i en l'etapa de SPE.

Després de comprovar que amb el Florisil acidificat no s'obtenen resultats òptims, es va decidir provar el gel de sílice acidificat amb àcid sulfúric, aquesta vegada directament en l'etapa del SPE per evitar qualsevol problema durant l'etapa de PLE amb els filtres o

l'aparell. Per acidificar el gel de sílice, es va deixar durant 24h en l'estufa [26] per eliminar l'aigua que hi hagués present i es va posar a refredar en un dessecador per a què no agafés aigua. Seguidament, es va barrejar amb àcid sulfúric concentrat i es van preparar els cartutxos amb 0.5 g d'aquesta.

En la comparació de les recuperacions amb els *clean-up* de Florisil acidificat i el de gel de sílice acidificat a la figura 5.5.4.6. es pot comprovar com tots els valors amb el gel de sílice es mantenen per sota del 100 % donant uns valors més raonables que amb el Florisil. També es poden identificar tots els compostos sense problema ja que les senyals que donaven als cromatogrames eren prou altes per ser també quantificats. Per aquesta raó, es pot concloure que el gel de sílice acidificat amb àcid sulfúric és un sorbent adequat per a ser utilitzat en el *clean-up* del mètode proposat en aquest estudi.

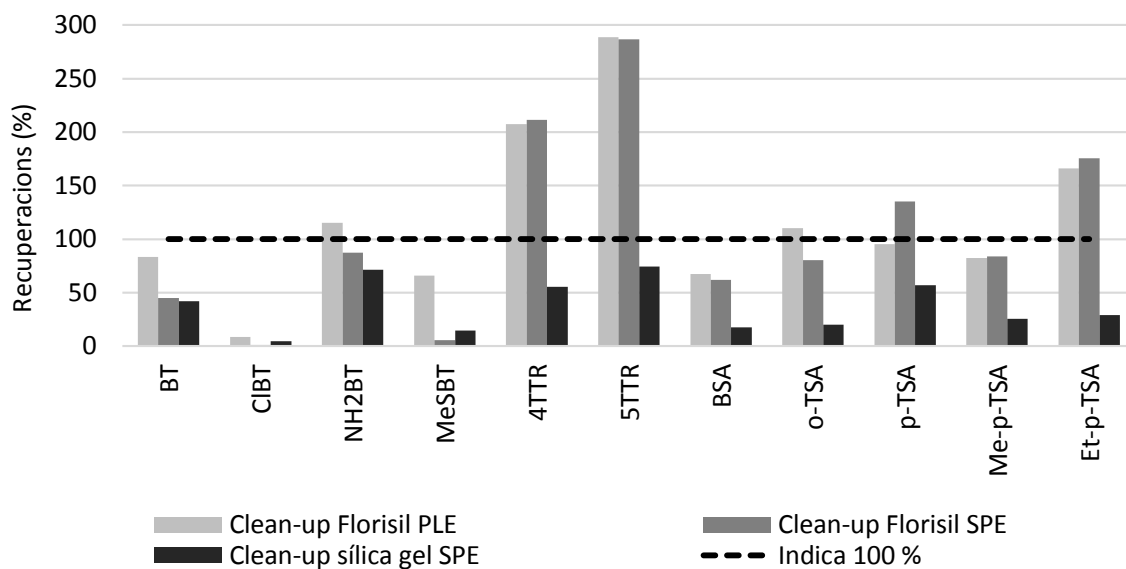


Fig. 5.5.4.6. Comparació de les recuperacions dels *clean-up* amb Florisil *in-cell* al PLE i en l'etapa de SPE, i amb gel de sílice al SPE.

6. CONCLUSIONS

For the first time, a sample extraction method for the determination of benzotriazoles, benzothiazoles and benzenesulfonamides in fish samples has been proposed. Although this project has represented a big step in studies with fish matrix, the optimisation of the method needs to be further developed. Its major advantages are: low consumption of organic solvents, integration of extraction and clean-up in the same step and using Milli-Q water as solvent in pressure liquid extraction. Thanks to the use of GC-MS as determination technique, the proposed method enables the sensitive determination of the target compounds.

Temperature gradient in GC-MS was optimised to separate correctly all the compounds. Moreover, extraction solvent of the PLE step and clean-up were optimised. Milli-Q water, methanol and Milli-Q water:methanol (1:1, v/v) were tested as extraction solvents. Methanol gave problems to identify compounds because of the matrix effect, so it was discarded. Milli-Q water gave better recoveries than Milli-Q water:methanol. Silica gel acidified with sulfuric acid was chosen as the optimum sorbent in the SPE step. Recoveries with clean-up step using silica gel were much better than without the other sorbent tested, acidified Florisil; the best recoveries values were around 74 %.

7. REFERÈNCIES

- [1] Geissen, V.; Mol, H.; Klumpp, E.; Umlauf, G.; Nadal, M.; van der Ploeg, M.; van de Zee, S. E.A.T.M; Ritsema, C. J. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research*. **2015**, *3*, 57–65
- [2] Barceló, D.; López de Alda, M. J. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. http://www.nuevaculturadelagua.es/phocadownload/P.CIENTIFICO/inf_contaminacion.pdf (Data de consulta: 4 de maig del 2016)
- [3] Diputació de Barcelona. Contaminants emergents. <http://www.diba.cat/documents/471041/57399c7d-d21e-4218-b99a-ae89c0a18829> (Data de consulta: 4 de maig del 2016)
- [4] Herrero, P.; Borrull, F.; Marcé, R.M.; Pocurull, E. A pressurised hot water extraction and liquid chromatography–high resolution mass spectrometry method to determine polar benzotriazole, benzothiazole and benzenesulfonamide derivatives in sewage sludge. *J. Chromatogr. A*, **2014**, *1355*, 53–60
- [5] Gil M. J. Soto, A. M.; Usma, J. I.; Gutiérrez, O. D. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + limpia*. **2012**, *7*, 52-73
- [6] The 2004 OECD List of High Production Volume Chemicals. OECD Environment Directorate. Environment, Health and Safety Division. www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/33883530.pdf (Data de consulta: 11 d'abril del 2016)
- [7] Copper Development Association Inc. Benzotriazole: An effective corrosion inhibitor for copper alloys. www.copper.org (Data de consulta: 8 d'abril del 2016)
- [8] Ali, R.; Siddiqui, N. Biological Aspects of Emerging Benzothiazoles: A Short Review. *Journal of Chemistry*, **2013**, *2013*, 12
- [9] Domínguez, C.; Reyes-Contreras, C.; Bayona, J. M. Determination of benzothiazoles and benzotriazoles by using ionic liquid stationary phases in gas chromatography mass spectrometry. Application to their characterization in wastewaters. *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1230*, 117– 122
- [10] N-BUTYL-BENZENESULFONAMIDE. <http://chemicalland21.com/industrialchem/plasticizer/N-BUTYL-BENZENESULFONAMIDE.htm> (Data de consulta: 25 d'abril del 2016)
- [11] Herrero, P.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marcé, R. M. Benzotriazoles, benzothiazoles and benzenesulfonamides in the environment: an overview of analytical methods and occurrence. *Trends Anal. Chem.*, **2014**, *62*, 46-55

- [12] Wang, L.; Asimakopoulos, A. G.; Moon, H.; Nakata, H.; Kannan, K. Benzotriazole, Benzothiazole, and Benzophenone Compounds in Indoor Dust from the United States and East Asian Countries. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 4752–4759
- [13] Carpinteiro, I.; Abuín, B.; Rodríguez, I.; Cela, R.; Ramil, M.. Headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry for the sensitive determination of benzotriazole UV stabilizers in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, *397*, 829–839
- [14] DC fine chemicals. <http://www.dcfinechemicals.com/files2/Hojas%20de%20seguridad/101630-SDS-ES.pdf> (Data de consulta: 6 d'abril del 2016)
- [15] Alfa Aesar. <https://www.alfa.com/> (Data de consulta: 6 d'abril del 2016)
- [16] Merck Millipore. Merck Millipore Corporation. www.merckmillipore.com (Data de consulta: 6 d'abril del 2016)
- [17] Santa Cruz Biotechnology. Ficha de datos de Seguridad. <http://datasheets.scbt.com/sds/WPNA/ES/sc-239295.pdf> (Data de consulta: 6 d'abril del 2016)
- [18] Sigma-Aldrich Co. Sigma-Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com> (Data de consulta: 6 d'abril del 2016)
- [19] Biosynth; Chemistry & Biology. <https://www.biosynth.com/> (Data de consulta: 6 d'abril del 2016)
- [20] Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. <http://www.insht.es> (Data de consulta: 6 d'abril del 2016)
- [21] ACROS ORGANICS. Ficha de datos de seguridad. https://extranet.fisher.co.uk/chemicalProductData_uk/wercs?itemCode=10016053&lang=ES (Data de consulta: 6 d'abril del 2016)
- [22] Waters Corporation. Solid-Phase Extraction with Oasis HLB Sorbent: Simple Procedures for Superior Sample Preparation. http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/my_oas98.pdf (Data de consulta: 26 d'abril del 2016)
- [23] Carpinteiro, I.; Abuín, B.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Cela, R. Pressurized solvent extraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry for the determination of benzotriazole light stabilizers in indoor dust. *J. Chromatogr. A*, **2010**, *1217*, 3729–3735

[24] Barón, E.; Eljarrat, E.; Barceló, D. Gas chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 19 brominated compounds in environmental and biological samples. *Anal Bioanal Chem.* **2014**, *406*, 7667–7676

[25] Thermo Scientific. Accelerated Solvent Extraction Techniques for In-Line Selective Removal of Interferences. www.thermoscientific.com (Data de consulta: 6 de maig del 2016)

[26] Losadaa, S.; Santosa, F.J.; Covacib, A.; Galcerana, M.T. Gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry method for the analysis of methoxylated polybrominated diphenyl ethers in fish. *J. Chromatogr. A*, **2010**, *1217*, 5253–5260