

Alba Maceira Torrents

**AVALUACIÓ DE NOUS MATERIALS PER A L'EXTRACCIÓ
D'EDULCORANTS EN MOSTRES AMBIENTALS AQUOSES**

TREBALL DE FI DE GRAU

dirigit per la Dra. Rosa Maria Marcé

Grau de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2014

Agraeixo el temps que ha dedicat
la meva tutora, Rosa Maria Marcé, en la
meva formació i en l'obtenció de
resultats en aquest treball.

Evidentment, també agraeixo l'ajuda
desinteressada del personal docent i dels
doctorands del grup, en especial,
als del laboratori de recerca 324 i a la Daniela Salas,
que sense ells, no hagués estat possible.

Dono les gràcies als meus companys,
amics i familiars pels ànims a seguir
lluitant pels meus somnis.

Índex

1. Abstract.....	3
2. Objectius.....	4
3. Introducció.....	4
3.1. Els edulcorants.....	4
3.2. Determinació d'edulcorants en aigües.....	7
4. Fonaments.....	8
4.1. Extracció mitjançant barres magnètiques (SBSE).....	8
4.2. Extracció en fase sòlida (SPE).....	10
4.3. Cromatografia de líquids – Espectrometria de masses (LC-MS)	13
5. Part experimental.....	16
5.1. Materials i estàndards	16
5.2. Anàlisi mitjançant LC-MS	17
5.3. Tècniques de tractament de mostra.....	18
6. Resultats i discussió.....	19
6.1. LC – MS.....	19
6.1.1. Optimització LC-MS	19
6.1.2. Validació instrumental.....	22
6.2. Tècniques d'extracció	23
6.2.1. Optimització de la SBSE	23
6.2.2. Optimització de la SPE	24

6.3. Validació del mètode	33
6.4. Anàlisi de mostres reals.....	34
7. Conclusions.....	37
8. Bibliografia.....	38

1. Abstract

Currently, sweeteners are an attractive alternative to replace the sugar because they are not sources of calories to our body. Due to the widespread use of sweeteners in food, drinks, drugs and sanitary products, these additives have been suggested as emerging organic contaminants (EOCs) because they are introduced in the environment by different pathways.

In this work, different materials for two extraction techniques (solid-phase extraction (SPE) and stir bar sorptive extraction (SBSE)) were evaluated for the determination of six artificial sweeteners (aspartame, saccharin, cyclamate, sucralose, acesulfame and neohesperidine dihydrochalcone) and a natural sweetener (stevioside) in environmental waters.

Two different polar coatings for SBSE, poly(ethyleneglycol) (PEG) and polyacrylate (PA), were tested for the extraction of these compounds but no recovery was observed for analytes. Two different mixed-mode ion-exchange polymeric sorbents, Oasis MAX and WAX, were evaluated for the SPE and Oasis WAX provide better results.

Therefore, we develop a method to determine these seven sweeteners in river water using SPE with weak anion-exchange polymeric sorbents (WAX) followed by liquid chromatography – (negative electrospray) – mass spectrometry (LC-(ESI(-))-MS).

The analysis of three different rivers from Spain showed that acesulfame, saccharine, cyclamate and sucralose can be found in the aquatic environment at concentrations up to $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$. Acesulfame and sucralose found at higher concentrations, $1.13 \mu\text{g L}^{-1}$ and $1.71 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

2. Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball és dur a terme un estudi sobre diferents tècniques d'extracció per a la determinació d'edulcorants en mostres ambientals aquoses.

S'avaluaran nous materials de dues tècniques d'extracció, l'extracció en fase sòlida (SPE) i l'extracció mitjançant barres magnètiques agitadores (SBSE). Per a l'SPE, s'avaluaran sorbents de mode mixt d'intercanvi aniònic i per la SBSE s'avaluaran sorbents comercials amb recobriments polars destinats a extreure aquests compostos polars.

3. Introducció

3.1. Els edulcorants

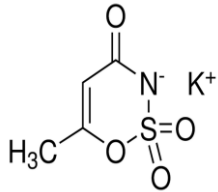
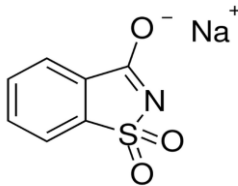
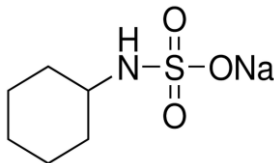
Els anàlits estudiats, l'estructura dels quals es mostra a la Taula 1, són de la família dels edulcorants; en concret, són edulcorants artificials, exceptuant-ne un que és natural (l'estèvia), i també són anomenats edulcorants no-nutritius o baixos en calories. Aquests compostos bàsicament es diferencien dels naturals per dos fets: el primer és que són espècies sintetitzades químicament o bé modificades a partir de les naturals, i que no es troben a la natura, i el segon fet és que no poden ser metabolitzades pel cos humà i per tant, no proporcionen calories o si ho fan en són molt poques. Degut a aquesta última raó, són els substituïts del sucre per excel·lència. La seva importància recau en què malalts de diabetis, d'hipertensió o obesitat, entre d'altres, poden gaudir del gust dolç sense patir les conseqüències de la metabolització del sucre [1]. Són entre 30 i 13.000 vegades més dolços que el sucre [2], i per tant, amb poca quantitat proporcionen la mateixa o superior intensitat de sabor.

D'ençà del descobriment d'aquests beneficis, van començar a créixer les quantitats d'aquests additius funcionals en menjars, begudes, fins i tot, en productes de cura personal i farmacèutics, com per exemple, en pastes dentífrícies pel control de les càries. Com a conseqüència, la societat ha augmentat el consum d'aquests productes baixos en calories i per tant, al no metabolitzar-se, s'expulsen per la orina o la femta directament a la natura sense patir canvis en la seva estructura.

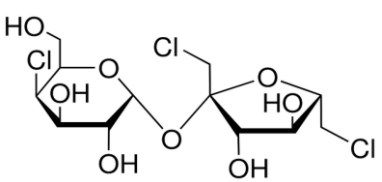
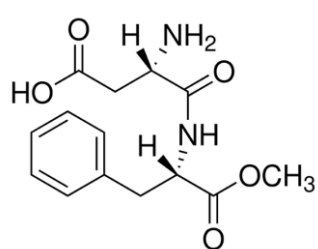
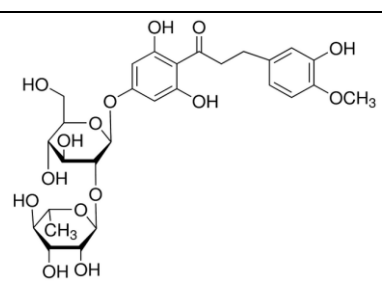
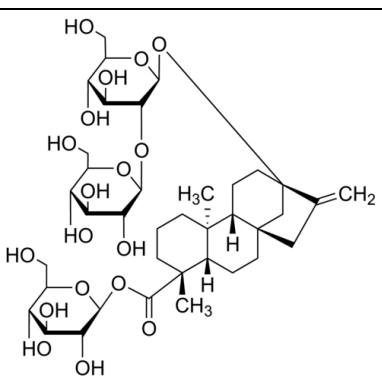
A causa d'aquest increment d'ús, en estudis científics es va demostrar que alguns edulcorants artificials poden causar tumors en certs animals i la preocupació pels efectes adversos en la salut humana va augmentar [3, 4]. Tot i que basant-se en la bibliografia actual, el risc dels edulcorants artificials per induir càncer és negligible [3, 5], existeixen diverses legislacions en diferents països sobre els límits de quantitat d'aquests additius permesos en els menjars [1, 2, 4 - 9].

Per la seva elevada ingesta, i per tant, la seva corresponent expulsió al medi ambient han esdevingut contaminants orgànics emergents (EOCs) [5], contaminants que s'expulsen al medi ambient i poden suposar un problema sanitari o ambiental que encara no està suficientment estudiat ni regulat, a causa de la seva extrema persistència i omnipresència en varis ecosistemes aquàtics. A més, la seva resistència als processos de tractament d'aigües residuals fa que siguin introduïts contínuament en els ambients aquàtics [5].

Taula 1. Edulcorants estudiats i les seves propietats físico-químiques.

Nom del compost	Fórmula	Estructura química	P.M. (g/mol)	pKa	Log K _{o/w}
Acesulfam (ACE)	C ₄ H ₄ KNO ₄ S		201.24	-0.28 ^a	-1.33 ^a
Sacarina (SAC)	C ₇ H ₅ NSO ₃ Na		205.17	1.60 ^a	0.910 ^a
Ciclamat (CYC)	C ₆ H ₁₃ NSO ₃ Na		201.22	-8.66 ^a	1.033 ^a

Taula 1. Continuació.

Sucralosa (SUC)	$C_{12}H_{19}Cl_3O_8$		397.63	12.52 ^a	0.229 ^a
Aspartam (ASP)	$C_{14}H_{18}N_2O_5$		294.31	3.71 àcid 7.55 bàsic ^a	0.542 ^a
Neohesperidina dihidrocalcona (NHDC)	$C_{28}H_{36}O_{15}$		612.58	6.85 ^a	0.205 ^a
Estèvia (STE)	$C_{36}H_{60}O_{18}$		804.87	12.51 ^b	0.64 ^b

^a Valors extrets de [7].^b Valors extrets del SciFinder. Calculats emprant Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2014 ACD/Labs).

3.2. Determinació d'edulcorants en aigües

Des que la societat ha augmentat la conscienciació sobre la contaminació ambiental, s'ha incrementat el desenvolupament de mètodes analítics pel control, determinació i la legislació d'aquests contaminants en l'ambient i en el nostre dia a dia. Es pretén desenvolupar procediments més ràpids, amb menys residus, capaços d'arribar a límits de detecció i quantificació més baixos i que siguin adients per a l'extracció i determinació simultània d'anàlits amb diferents propietats de diverses matrius.

Per a la separació i determinació simultània de diferents edulcorants, els mètodes més comuns són els que fan servir tècniques cromatogràfiques [2, 10], essent la més adequada la cromatografia de líquids (LC) [1, 4, 9] degut a l'elevada polaritat d'aquestes substàncies. El problema que hi ha en l'elecció de la tècnica recau en les diferències que hi poden haver entre les propietats fisicoquímiques d'una barreja complexa d'edulcorants, i per tant, es necessiten sistemes capaços de separar i detectar anàlits amb aquestes diferències [9]. Per tal de solucionar aquesta problemàtica els detectors que es fan servir habitualment són els d'espectrometria de masses (MS) [1, 2, 5-7, 9, 10]. Quan la MS s'acobla a la LC és necessari un sistema d'ionització i per a compostos polars, l'ionització d'electronebulització (ESI) és la més adequada. La tècnica de LC-MS ens permet la quantificació de la majoria dels anàlits amb una sensibilitat i rapidesa major que amb un detector de UV ja que s'haurien de derivatitzar els compostos perquè n'hi ha que no absorbeixen a la zona del UV/Visible (CYC i SUC, no tenen grups cromòfors)[2, 8].

Com ja s'ha dit prèviament, aquests compostos es troben en mostres complexes i a baixes concentracions, per tant, és necessària una tècnica d'extracció i preconcentració prèvia a l'anàlisi. L'objectiu és que aquestes tècniques siguin més eficients per tal d'extreure més anàlits amb diferents característiques i poder concentrar la mostra, i així, arribar a límits de detecció i quantificació més baixos. També es pretén minimitzar la manipulació de mostra, i per tant, el temps emprat, reduir el volum de solvent orgànic i eliminar el màxim d'interferents que hi puguin haver a la mostra. En mostres aquoses, la tècnica per excel·lència és la extracció en fase sòlida (SPE) la qual va reemplaçar la extracció líquid-líquid convencional (LLE).

L'avantatge de la SPE és la gran varietat de sorbents disponibles per tal de poder extreure un ampli ventall d'anàlits, fet que fa que estigui ben establerta per la seva capacitat de netejar i preconcentrar mostres aquoses.

Recentment, s'han introduït noves tècniques d'extracció que necessiten menys manipulació de mostra i menys solvent orgànic, com ara la microextracció en fase sòlida (SPME) o l'extracció mitjançant barres magnètiques agitadores (SBSE), tècnica basada en els mateixos principis que la SPME. La limitació d'aquestes és la poca disponibilitat de sorbents comercials, fet que limita els tipus de anàlits que es poden extreure. En la SBSE fins fa poc, l'únic sorbent comercial era el polidimetilsiloxà (PDMS) capaç d'extreure anàlits apolars o moderadament polars (generalment compostos amb $\log K_{o/w} > 3$) [11, 12]. La problemàtica dels edulcorants, com la de molts altres EOCs, és que tenen unes característiques polars. Per tal de solucionar-ho, recentment, s'han començat a comercialitzar nous recobriments basats en la modificació dels de silicó: el polietilenglicol (PEG), i el poliàcrilat (PA) [11]. Les estructures d'aquests nous recobriments milloren la polaritat mitjançant els grups hidroxil i èster, respectivament.

4. Fonaments

4.1. Extracció mitjançant barres magnètiques (SBSE)

La SBSE és una tècnica d'extracció relativament nova i va sorgir com a modificació de la SPME per tal d'augmentar l'àrea de contacte de les fibres de la SPME. Es basa en un agitador magnètic recobert d'un tub de vidre el qual suporta un recobriment polimèric. La mostra s'agita amb la barra fins que l'anàlit aconsegueix l'equilibri entre el material polimèric i la mostra aquosa depenent de la seva constant de distribució (Figura 1a). A part de poder fer l'extracció per immersió de la barra, també es pot fer per espai de cap per analits més volàtils, fet que dóna aplicabilitat i versatilitat a la tècnica. A l'hora de la desorció, aquesta pot ser líquida o tèrmica depenent de l'anàlisi posterior. Si la mostra és analitzada per cromatografia de gasos (GC) la desorció pot ser tèrmica, directament al mateix cromatògraf si es disposa de desorvidor tèrmic i aplicant temperatura, els anàlits volàtils es desorviran de la barra i entraran al cromatògraf (Figura 1b). En canvi, si l'anàlisi es realitza mitjançant cromatografia de líquids la desorció serà líquida, la barra es submergeix en un solvent en el qual els

compostos s'hi reparteixin segons la seva constant de partició ($\log K_{ow}$) (Figura 1c). També es pot fer servir la desorció líquida quan s'analitza per GC i no es disposa del desorvidor tèrmic.

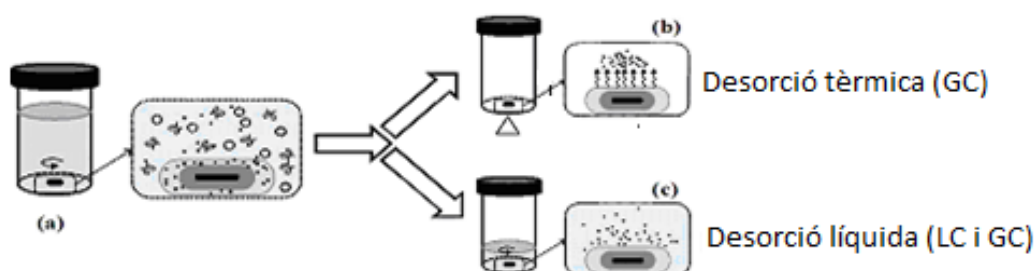


Figura 1. Esquema de la SBSE.

En la SBSE hi ha diverses variables que afecten l'etapa d'extracció i han de ser optimitzades. La més important és el tipus de material polimèric de la barra ja que d'ell en depèn la interacció amb l'anàlit. Altres variables que afecten aquest equilibri són: la velocitat d'agitació, el temps d'extracció, el volum de la mostra, el pH de la mostra, la dimensió de la barra, la temperatura i l'addició d'una sal inert per afavorir l'extracció. En la desorció tèrmica les variables que afecten són la temperatura de desorció i el temps, i en la desorció líquida afecta la natura del solvent orgànic, el volum d'aquest i el temps de desorció.

En els últims anys, ha augmentat l'ús de la SBSE com a tècnica d'extracció de contaminants orgànics en matrius complexes per la seva simplicitat i sensibilitat. La seva limitació és la poca disponibilitat de sorbents comercials per a l'extracció de famílies de compostos amb característiques polars. Actualment, només es disposen d'aquests sorbents: el PDMS (Twister[®]), ben establert des de fa uns quants anys per a compostos apolars, el PEG (EG Silicone Twister[®]), un copolímer d'etilenglicol i de poldimetilsiloxà (PDMS), comercialitzat recentment i el PA (Acrylate Twister[®]), encara en fase pilot, fet de poliacrilat i PDMS. Les seves estructures es mostren a la Figura 2. Degut a la recent aparició dels PEG i PA, es disposa de poques dades sobre la capacitat d'aquests sorbents per extreure compostos de diferents característiques, tot i que estan recomanats per a compostos polars, que no queden retinguts als recobriments de PDMS.

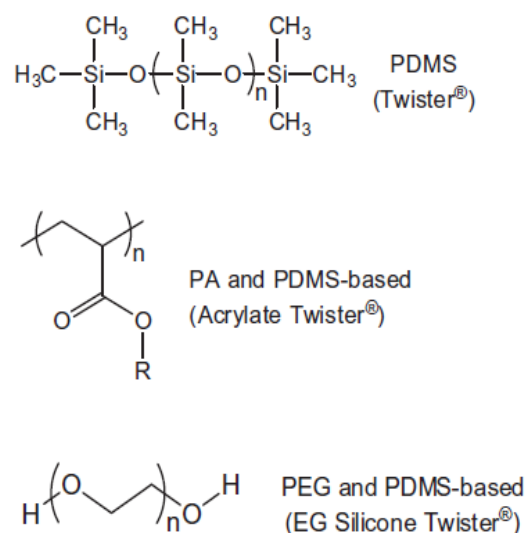


Figura 2. Estructures dels diferents sorbents comercials de la SBSE.

4.2. Extracció en fase sòlida (SPE)

L'extracció en fase sòlida és la tècnica d'extracció més utilitzada per a mostres aquoses, basada en la retenció selectiva d'anàlits i la seva posterior elució. El principi d'aquesta tècnica implica un particionament entre un líquid (la mostra que conté els anàlits) i una fase sòlida (el sorbent del cartutx). Aquesta tècnica de tractament de mostra permet la concentració i la purificació dels anàlits d'una solució per sorció en un sorbent sòlid. El procediment general, mostrat a la Figura 3, consisteix en passar una solució, o varies, amb les característiques més semblants a la mostra per tal de condicionar el cartutx per la posterior càrrega de la mostra. Es fa passar la mostra, en les condicions òptimes, a través del cartutx a un flux baix i constant. En aquest pas és quan els anàlits i altres espècies semblants que hi hagin a la mostra, interaccionen amb el sorbent, i s'hi queden retinguts. Abans d'eluir les espècies d'interès del cartutx, es pot fer una neteja depenent de la complexitat de la mostra. Aquesta etapa consisteix en fer passar una solució que sigui capaç d'eluir el màxim d'interferents que hi hagi retinguts al sorbent sense que es perdin els anàlits. Posteriorment, depenent de si el solvent d'elució és compatible amb el de la neteja, es pot secar el cartutx fent passar un corrent d'aire o de nitrogen, en funció de l'estabilitat dels anàlits. Finalment es fa passar una altra solució per tal d'eluir els anàlits i l'extracte normalment s'evapora per una millor concentració. Un cop tot el solvent evaporat, es reconstitueix en la mínima

quantitat de solvent per tal de concentrar al màxim, i normalment es dissol en una solució compatible amb la posterior tècnica instrumental.



Figura 3. Procés general per la SPE.

Hi ha diferents variables experimentals que afecten la SPE, la principal de les quals és el tipus i les característiques del sorbent del cartutx ja que ha de ser adequat per als anàlits d'interès. Una altra variable són les condicions en que ha d'estar la mostra a l'hora de passar-la pel cartutx per tal d'afavorir la interacció, i s'ha de tenir en compte el pH, la força iònica, si necessita l'addició d'un solvent, etc. El volum de mostra també és important per arribar a concentrar més analits però sense arribar a superar el volum de ruptura, ja que si no es perden compostos a la càrrega. També s'ha d'optimitzar el tipus de solvent orgànic i el seu volum, i en algun cas pot ser que, també calgui optimitza el pH del solvent d'elució. El flux en què es passa la mostra també afecta, i ha de ser lent per tal de que la fase sòlida i la líquida tinguin temps a establir les interaccions.

El gran avantatge de la SPE en front moltes altres tècniques d'extracció és l'àmplia disponibilitat de sorbents. Gràcies a aquest ventall es poden extreure diferents famílies de compostos depenent de com interaccionen aquests sorbents amb les espècies. El sorbent polimèric més estès és el Oasis® HLB ja que pot extreure espècies de diferent polaritat. Té una part hidrofílica (vinilpirrolidona), capaç de retenir compostos polars, i una part hidrofòbica (divinilbenzè), capaç de retenir compostos apolars (Figura 4). Tot i

que aquests sorbents tenen una elevada capacitat de retenció de compostos de diferents característiques, no presenten selectivitat, que pot ser necessària en algunes aplicacions [13].

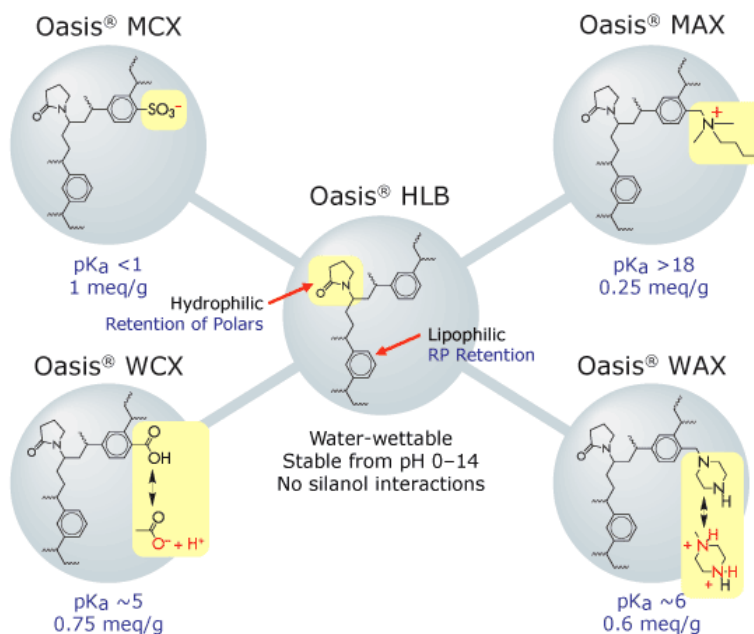


Figura 4. Modificacions a partir del sorbent Oasis HLB per obtenir els diferents sorbents Oasis de mode mixt d'intercanvi iònic (Waters Corporation).

Per tal de combinar capacitat i selectivitat en un sol cartutx es van començar a comercialitzar els sorbents polimèrics de mode mixt. Aquests sorbents estan sintetitzats a partir de polímers de fase invertida, al qual se li inclouen grups iònics (catiònics i aniònics) de diferent força (forts i febles). Exemples de sorbents de mode mixt comercials són els de la casa Waters basats en el Oasis HLB, l'estructura dels quals s'inclou a la Figura 4. Aquestes modificacions proporcionen una elevada selectivitat a la pròpia capacitat del sorbent HLB. A continuació, es presenten dos dels que van ser avaluats per a aquest estudi:

- Els sorbents de mode mixt d'intercanvi aniònic fort (Strong anion-exchange, SAX) consten d'una estructura polimèrica la qual, addicionalment, es modificada amb grups catiònics forts (amines quaternàries, normalment) fent que el seu pK_a sigui al voltant de 18 (Figura 4) [13]. El grup catiònic promou les interaccions iòniques amb els compostos aniònics de la mostra, en canvi, l'estructura polimèrica promou les interaccions per fase reversa amb els anàlits (protonats, desprotonats i neutres) i les interferències de la mostra. Per

aquests fets, els sorbents SAX són els més adequats per extreure selectivament compostos àcids de mostres amb matrius complexes.

- Els sorbents de mode mixt d'intercanvi aniònic feble (Weak anion-exchange, WAX) tenen una estructura polimèrica modificada amb grups catiònics febles (normalment amines secundàries o terciàries) els quals tenen un $pK_a \sim 5$ (Figura 4) [13]. Aquests grups fomenten les interaccions iòniques amb els compostos aniònics (compostos àcids desprotonats) de la mostra. I, com els altres sorbents de mode mixt, tots els anàlits i interferències de la mostra poden establir interaccions hidrofòbiques amb l'estructura polimèrica. La feble basicitat dels grups iònics dóna joc a que la protonació/desprotonació del sorbent i dels anàlits pot ser commutada en termes de pH. Gràcies a aquest fet, aquest tipus de sorbent és emprat en l'extracció selectiva de compostos àcids de matrius complexes.

4.3. Cromatografia de líquids – Espectrometria de masses (LC-MS)

La cromatografia de líquids és una tècnica de separació que utilitza una fase mòbil i una fase estacionària. La fase mòbil consisteix en un líquid o una barreja de líquids, amb una composició determinada, que s'encarrega de fer fluir la mostra a través del sistema, passant per la columna cromatogràfica, que és on hi ha la fase estacionària, fins arribar al detector que és el que ens dóna el senyal elèctric que es relaciona amb la concentració. Aquesta fase mòbil ha de solubilitzar la mostra i ser compatible amb el detector. L'equilibri entre la fase estacionària i la fase mòbil és principalment l'encarregat de la separació dels anàlits. Cada espècie té unes interaccions (processos químics i/o físics) diferents amb cada fase, i per tant, optimitzant els paràmetres que afecten a cada fase, s'afavorirà una interacció o l'altre. Els anàlits menys afins amb la fase estacionària eluiran primer i els que siguin més afins costarà més que la fase mòbil els arrossegui i eluiran més tard. El gràfic resultant és el cromatograma, el qual relaciona la resposta del detector, el senyal elèctric (directament proporcional a la concentració de l'anàlit), amb el temps de retenció de les substàncies d'interès.

Per la cromatografia de líquids el detector més habitual és l'espectròmetre de masses amb font d'ionització d'electronebulització. És un mètode utilitzat per a la medicació de

pesos molecular de substàncies en fase gasosa, que permet la seva identificació o estudi estructural. Proporciona informació tant qualitativa com quantitativa, una elevada selectivitat i sensibilitat, una resposta lineal i és compatible amb una elució amb gradient. L'espectrometria de masses treballa amb ions en fase gasosa (font d'ionització), els quals són separats d'acord a la seva relació massa/càrrega (m/z) a l'analitzador i detectats al detector (Figura 5). El senyal obtingut es denomina espectre de masses i en ell es pot observar la intensitat relativa dels ions en front la seva m/z .

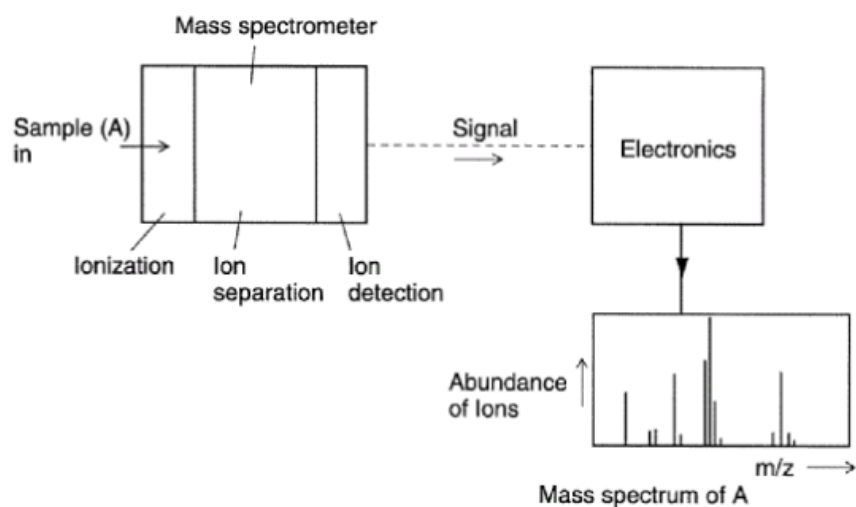


Figura 5. Esquema del sistema d'espectrometria de masses.

Les elucions (els anàlits) procedents de la cromatografia de líquids van arribant a la font de ionització dissoltes en la fase mòbil (que ha de ser volàtil). Les fonts d'ionització més comunes per a la tècnica LC-MS són les de ionització a pressió atmosfèrica (API). Dins de les tècniques d'API, es diferencien dos tècniques a l'hora d'ionitzar la mostra segons les característiques dels anàlits. Si els compostos a analitzar tenen característiques polars, la ionització més adequada és la electronebulització (ESI) i la ionització es produirà en fase líquida. En canvi, si els compostos a analitzar són moderadament menys polars, la ionització serà química a pressió atmosfèrica (APCI) i la ionització es produeix en fase gas.

Quan arriben a la font d'ionització ESI, que permet l'ingrés de la mostra des de la cromatografia líquida i la seva ionització en forma conjunta, la mostra és introduïda a través d'un capil·lar, en el qual al seu extrem s'aplica un potencial negatiu o positiu (depenent de si es volen formar anions o cations). Aquest alt potencial sumat al petit

radi de curvatura del capil·lar genera un fort camp elèctric que causa que el líquid que va sortint del capil·lar sigui una mescla de petites gotes i vapor (aerosol) amb càrrega superficial. Aquest aerosol gràcies a l'ajuda de temperatura i d'uns gasos inerts és desolvatat, i per tant, el solvent és evaporat. Les gotes redueixen la seva mida incrementant la repulsió de càrregues, quan la repulsió és major que la tensió superficial es produeix una fissió generant gotes molt petites carregades elèctricament. Aquests ions generats entren a la cambra de l'analitzador de masses on són separats segons la seva relació m/z . Hi ha diferents tipus d'analitzadors, tot i que els més emprats són els de quadrupol. L'analitzador de quadrupol consisteix en dos parells de barres metàl·liques exactament paral·leles entre si, controlades per una combinació de potencials. Els ions són orientats per variació de voltatges en aquestes barres. Un cop els ions d'interès són separats, aquests han de ser convertits en un senyal fàcilment interpretable pel sistema d'adquisició de dades, aquesta és la funció del detector. Finalment, aquest senyal arriba al sistema d'adquisició de dades, i gràcies a ell es pot processar i interpretar el senyal.

Hi ha diferents modes d'adquirir dades de l'analitzador. Si treballem en full-scan (Figura 6) s'enregistren tots els ions de l'interval de m/z que s'hagi seleccionat, i permet obtenir l'espectre de cada pic. Si treballem en mode SIM (*Selected-ion monitoring*) s'enregistraran només els ions seleccionats, per tant, no permet obtenir l'espectre però és més sensible.

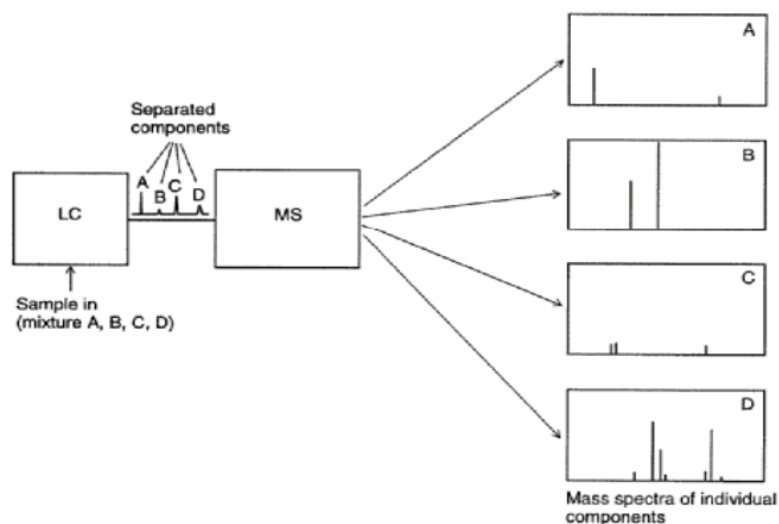


Figura 6. Esquema d'un LC-MS en mode full-scan.

5. Part experimental

5.1. Materials i estàndards

Els diferents anàlits: acesulfam de potassi (ACE), ciclatat de sodi (CYC), sacarina sòdica (SAC), aspartam (ASP), sucralosa (SUC), neohesperidina dihidrocalcona (NHDC) i l'estèvia (STE), tots d'elevada puresa (>98%) van ser comprats a Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Es van preparar solucions patró individuals dissolent cada sòlid pur en metanol (MeOH) amb una concentració de 1.000 mg L^{-1} i es van guardar a -20°C . Només per l'estèvia va ser necessària una proporció d'aigua ultrapura (Milli-Q) (1:10 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$) per tal de dissoldre completament el sòlid. Pel treball diari es preparava setmanalment una solució intermèdia de tots els compostos en una concentració de 100 mg L^{-1} preparada en aigua Milli-Q i era guardada a 4°C a la foscor.

Per a la separació cromatogràfica i les anàlisis, l'aigua ultrapura emprada era procedent d'un sistema de purificació d'aigua (Veolia, Sant Cugat del Vallès, Espanya), el metanol de qualitat HPLC va ser comprat a J. T. Baker (Deventer, Països Baixos). L'àcid fòrmic (HCOOH) necessari per l'ajust del pH de la fase mòbil va ser obtingut de Sigma-Aldrich.

L'hidròxid d'amoni (NH_4OH), obtingut de Panreac (Barcelona, Espanya), l'àcid clorhídric (HCL) de Scharlab (Barcelona, Espanya) i l'acetonitril (ACN) comprat a J. T. Baker van ser necessaris per les tècniques d'extracció i per l'ajust del pH de la mostra. El nitrogen emprat pel secat dels cartutxos en l'extracció en fase sòlida va ser subministrat de Carburos Metàlics (El Morell, Tarragona, Espanya).

Les mostres analitzades van ser aigües de dos tipus diferents: aigua de riu (riu Segre, riu Ebre i riu Francolí) i aigua de sortida de depuradora de Tarragona. Les mostres d'aigua de riu es van filtrar amb l'ajuda d'una bomba a través d'un filtre de membrana de nylon de porositat $0.22 \mu\text{m}$ (FILTER-LAB, Barcelona, Espanya). Les mostres de sortida de depuradora es van filtrar primer amb un filtre de membrana de vidre d' $1 \mu\text{m}$ (Fisher Scientific, UE), seguit d'un filtre de nylon de $0.45 \mu\text{m}$ (Scharlab, Barcelona, Espanya) i finalment aquest filtrat es va tornar a passar a través d'un filtre de membrana de nylon de $0.22 \mu\text{m}$. Totes les mostres van ser guardades a 4°C .

5.2. Anàlisi mitjançant LC-MS

L'instrument cromatogràfic va ser un HP1100 series LC-Mass Selective Detector amb detector de quadrupol (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanya) amb un electronebulitzador (ESI) com a font de ionització i equipat amb un injector automàtic, un desgasificador, una bomba quaternària i un forn de columna. La columna cromatogràfica va ser una ZORBAX Eclipse XDB-C8 (4.6 x 150 mm) amb una dimensió de partícula de 5 µm (Agilent Technologies, USA) i el volum d'injecció va ser de 20µL. El flux de fase mòbil va ser de 0.6 mL min⁻¹ i la temperatura del forn de la columna va ser fixada a 25°C.

El solvent A pel gradient del anàlisi va ser aigua ultrapura ajustada a pH 2.8 amb àcid fòrmic i el solvent B va ser metanol. El gradient va ser: inicialment 15% de B, increment al 100% de B en 15 minuts, 100% de B durant 5 minuts i finalment retorn al 15% en 5 minuts més.

El detector d'espectrometria de masses va adquirir les dades en SIM; els ions que van ser seleccionats per quantificar i confirmar els anàlits es mostren a la Taula 2. El mode d'ionització va ser en negatiu ja que els compostos donaven millor senyal. Les condicions seleccionades del ESI(-) van ser: pressió del nebulitzador de 45 psi, el flux del gas d'assecat va ser de 11.0 L min⁻¹, la temperatura del gas d'assecat va ser de 350 °C i el voltatge del capil·lar de 4.000 V. Els voltatges de fragmentació van ser definits individualment per a cada anàlit i es mostren a la Taula 2.

Taula 2. Compostos estudiats amb els ions seleccionats per a la quantificació en el mode SIM. La abundància està entre parentèsis.

Compostos	Ió molecular m/z (Quantificació)		Ió producte m/z (Confirmació)	Fragmentador (V)
ACE	162 (100%)	[M] ⁻	-	80
SAC	178 (100%)	[M] ⁻	-	100
CYC	182 (100%)	[M] ⁻	-	100
SUC	397 (100%)	[M-H] ⁻	293 (10%)	100
ASP	293 (100%)	[M-H] ⁻	181.9 (12%)	100
NHDC	612 (100%)	[M-H] ⁻	-	200
STE	803 (100%)	[M-H] ⁻	-	160

5.3. Tècniques de tractament de mostra

Per les anàlisis de mostres reals es van triar els cartutxos amb sorbents de mode mix d'intercanvi aniònic feble, els Oasis Wax de 150 mg (Waters, Milford, MA, USA).

Els cartutxos es condicionen amb el pas de 3 mL de metanol, deixant assecar el cartutx amb aire abans de passar dos vegades 3 mL d'aigua ultrapura. Després, es passen 100 mL de mostra ajustada a pH 7 amb àcid clorhídric, posteriorment es deixa assecar el cartutx durant 30 minuts. Finalment, els anàlits s'elueixen amb 5 mL de metanol al 10% d'hidròxid d'amoni, es recullen en un vial on s'evapora el solvent i es reconstitueix amb 1 mL d'una mescla 15:85 de metanol/aigua ultrapura (ajustada a pH=2.8), el qual és filtrat amb un filtre de 0.2 µm GHP Acrodisc (VWR, Barcelona, Espanya) per la posterior anàlisi per LC-MS.

6. Resultats i discussió

6.1. LC – MS

6.1.1. Optimització LC-MS

S'inicia l'estudi amb les condicions d'un treball anterior [14], fet al mateix grup de recerca on s'havia emprat un triple quadrupol com analitzador. Es va partir d'aquestes condicions prèvies, es van comprovar i optimitzar.

L'optimització de la LC-MS es va dur a terme amb patrons fets amb aigua ultrapura d'una concentració relativament alta (5 mg L^{-1}) per tal de poder veure una bona resposta a l'equip.

Per tal de garantir una bona separació cromatogràfica en el nostre equip, s'han d'optimitzar les diferents variables que afecten a la separació i a la posterior detecció dels anàlits.

Primer es van provar dues columnes diferents (A = Ascentis Express RP-Amide C13 $2.7 \mu\text{m}$, $2.1 \times 100 \text{ mm}$ i B = ZORBAX Eclipse XDB-C8 $5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 150 \text{ mm}$). Es va veure que amb la columna A, tot i canviar el solvent B de la fase mòbil d'acetonitril a metanol, reduir el flux de l'anàlisi i variar el gradient d'elució, no es separaven completament el compostos; a més, degut a la menor mida de partícula, l'equip treballava a pressions més elevades, les quals no podia suportar.

Es va seguir optimitzant el gradient d'elució amb la columna B, amb metanol com a solvent B de la fase mòbil, amb un flux de 0.6 mL min^{-1} i una temperatura de 25°C . El primer gradient que es provar va ser: inicialment 5% de B, increment al 30% de B en 3 minuts, un altre increment al 60% de B en 12 minuts i finalment retorna al 5% en 3 minuts més, obtenint el cromatograma que s'observa a la Figura 7.

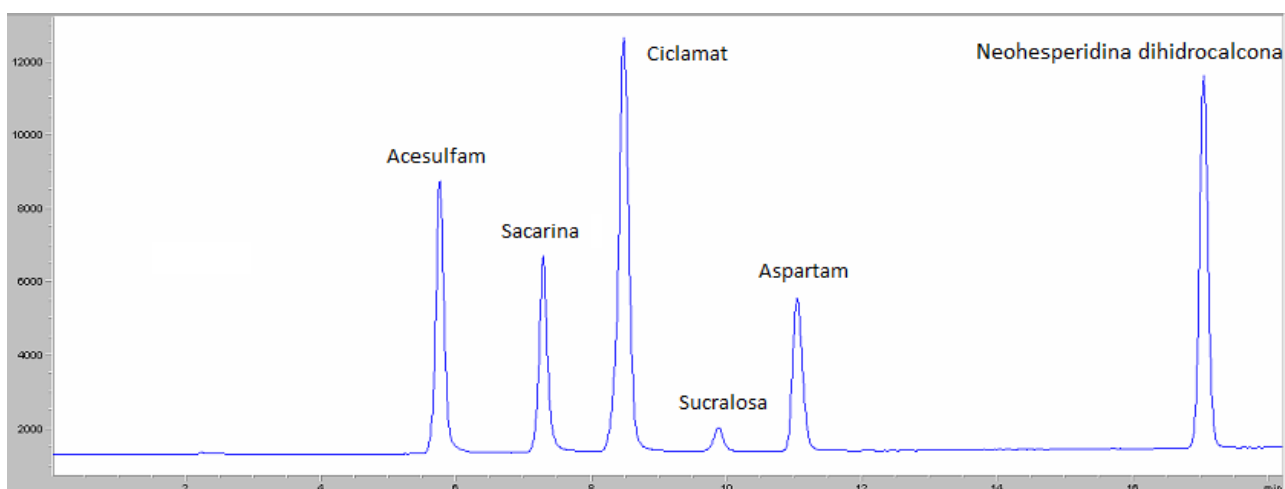


Figura 7. Cromatograma obtingut amb les condicions inicials.

Es va observar que faltava un compost per eluir (l'estèvia), i per tant, es van provar diferents gradients d'elució, variant el % de metanol per aconseguir l'elució de tots els compostos i minimitzar el temps d'anàlisi, de manera que el primer pic sortís més tard dels 5 minuts (per evitar les possibles interferències que hi puguin haver a l'hora d'analitzar mostres reals) i que els pics sortissin suficientment separats (resolució) i amb bona eficàcia (pics estrets).

Finalment, es van triar el gradient i les diferents variables que afecten a la cromatografia de líquids explicades a la part experimental 4.2. i es va obtenir el cromatograma de la Figura 8.

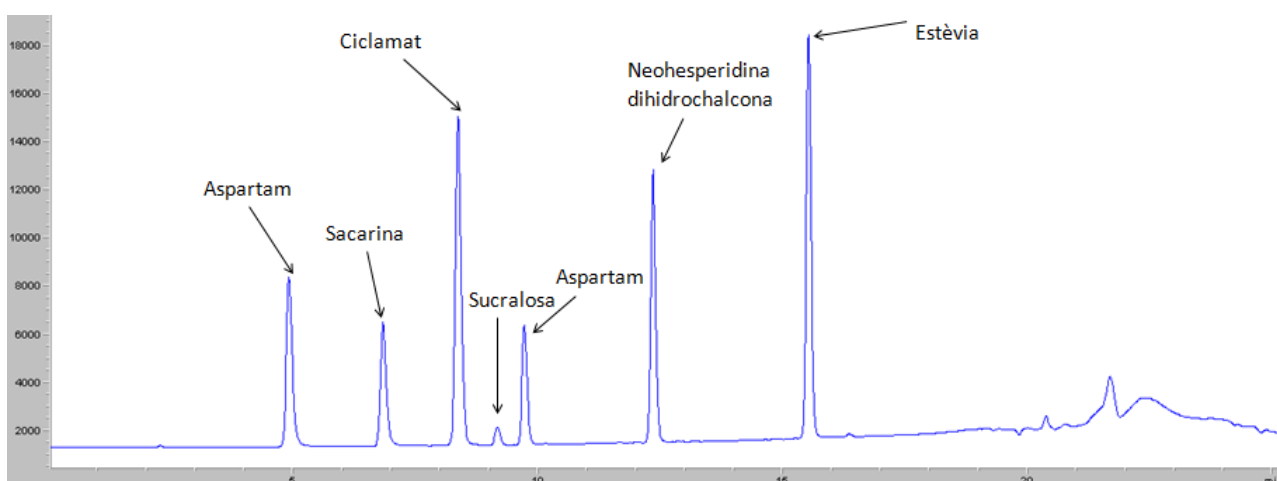


Figura 8. Cromatograma obtingut amb les condicions òptimes.

Pel que fa al detector d'espectrometria de masses, es van optimitzar les variables que afecten a la fragmentació dels anàlits, i es van confirmar com a bones les variables que afecten a la font d'ionització de l'article [14].

Es van fer varies anàlisis en mode full-scan a diversos voltatges de fragmentador (60, 80, 100, 120 i 140 V) per millorar el senyal. Es va observar que en totes les anàlisis, els pics base de cada espècie no variaven amb el voltatge i per tant, van ser els escollits per a la quantificació (Part experimental 4.2). També es va veure la poca fragmentació d'aquests compostos, ja que no es van observar gaires ions productes amb una elevada abundància relativa per a la confirmació de cada anàlit.

Posteriorment, es van fer diverses anàlisis d'un mateix patró a diferents voltatges (60, 80, 100, 120, 140, 160 i 200 V) en mode SIM amb els ions moleculars trobats anteriorment, amb l'objectiu de trobar el voltatge del fragmentador adequat per a cada anàlit. Aquests voltatges van ser triats segons la resposta de l'equip; com més elevada era l'àrea del pic obtingut, més sensibilitat proporcionava el mètode. Es va observar que l'estèvia (STE) i la neohesperidina dihidrocalcona (NHDC), al ser molècules amb elevat pes molecular, necessitaven un voltatge més elevat per a la seva fragmentació, tal i com es pot observar en la Figura 9.

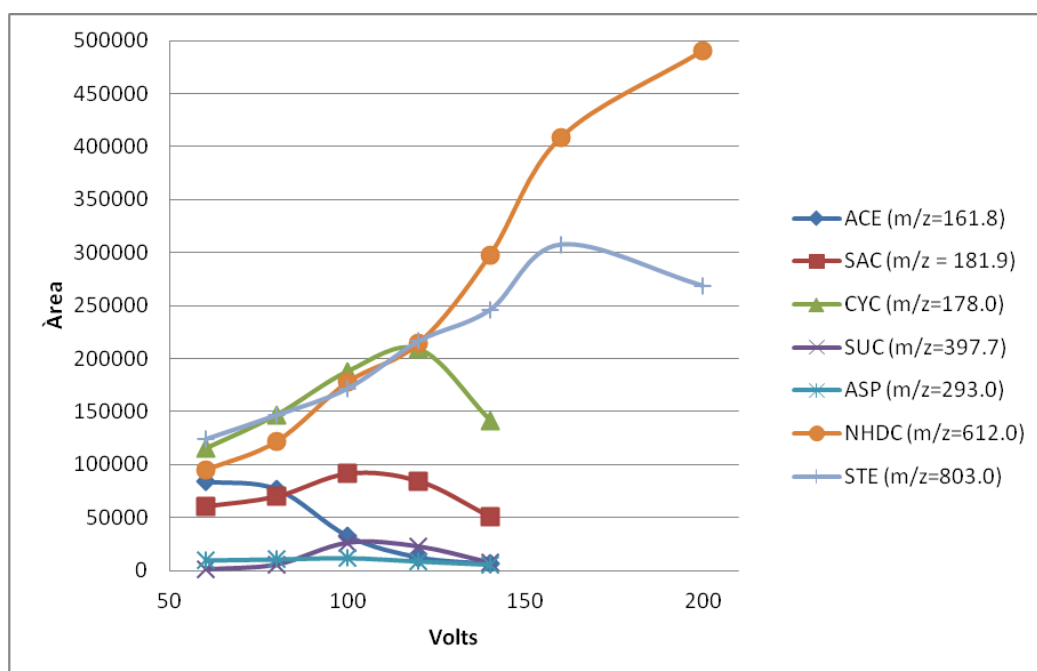


Figura 9. Optimització del voltatge del fragmentador. Evolució de les àrees de cada pic molecular de l'anàlit en front el voltatge del fragmentador.

En canvi, es va observar que la resta d'anàlits (ACE, SAC, CYC, SUC i ASP) a mesura que s'augmentava el voltatge del fragmentador es perdia resposta. Aquest fet es pot explicar pel fet que tenen menor pes molecular, i per tant, en aplicar voltatges més elevats la molècula es fracciona més i es perd resposta del pic molecular. Les condicions finals es presenten a la secció 5.2. de la part experimental.

6.1.2. Validació instrumental

La validació instrumental es va fer amb patrons preparats amb aigua ultrapura. Per avaluar la linealitat de cada anàlit, es van preparar patrons amb aigua ultrapura a dotze nivells diferents amb la solució intermèdia de treball per tal d'observar la linealitat en aquests nivells mitjançant l'anàlisi de residuals i amb el coeficient de correlació (r^2). Per tal de calcular els límit de detecció (LODs) i de quantificació (LOQs) es van triar els nivells que corresponien a una relació senyal/soroll (S/N) igual a 3 i a 10, respectivament. Es va comprovar i es va confirmar que els LOQs entraven a l'interval de linealitat de cada compost per a la seva correcta quantificació.

Per a la precisió intradiària, es va avaluar la repetibilitat injectant a l'equip cinc patrons amb aigua ultrapura a un mateix nivell el mateix dia i expressant-la en percentatge de desviació estàndard relativa. Per a la precisió interdiària, es va avaluar la reproductibilitat injectant a l'equip tres patrons preparats amb aigua ultrapura a un mateix nivell entre diferents dies i expressant-la de la mateixa manera que l'anterior. Les dades es resumeixen a la Taula 3.

Taula 3. Linealitat, límits de detecció, de quantificació, repetibilitat i reproductibilitat en aigua ultrapura dels edulcorants presents en aquest estudi.

Compost	Interval de linealitat ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetibilitat %RSD ^a	Reproductibilitat %RSD ^b
ACE	10 – 15.000	0.9995	5	10	8.8	6.9
SAC	10 – 15.000	0.9976	5	10	6.0	6.7
CYC	10 – 10.000	0.9966	5	10	7.2	5.4
SUC	10 – 10.000	0.9982	5	10	7.4	6.4
ASP	100 – 15.000	0.9826	25	100	14.4	8.3
NHDC	5 – 15.000	0.9984	2	5	5.6	2.8
STE	5 – 10.000	0.9981	2	5	7.3	12.5

^a Precisió intradiària (n=5). A la concentració de 5 mg L⁻¹.

^b Precisió inerdiària (n=3). A la concentració de 1 mg L⁻¹.

Es pot observar la diferent resposta per a cada compost i una bona linealitat per a l'interval de treball. També es poden observar els baixos nivells de %RSD per a la gran majoria de compostos (menor al 10%), fet que dóna precisió a l'instrument.

6.2. Tècniques d'extracció

6.2.1. Optimització de la SBSE

Un dels objectius principals d'aquest treball era provar els nous recobriments comercials polars de les barres magnètiques agitadores per a l'extracció de compostos polars, els edulcorants. Aquests recobriments polimèrics són relativament nous, i per tant, hi ha poques publicacions sobre les seves aplicacions. No s'ha trobat cap treball de l'aplicació d'aquests per a la família dels edulcorants.

Per a l'optimització, es van fer servir els dos únics recobriments polars que hi ha al mercat, el PEG i el PA (GERSTEL GmbH & Co.KG, Mülheim an der Ruhr, Alemanya).

Es van dur a terme diferents proves amb 50 mL de solució estàndard en aigua ultrapura, com a volum de mostra, i amb 3 mL de metanol per a la desorció. Es van anar variant els temps d'extracció i desorció, carregant sempre a $\text{pH} < 3$ per tal de tenir els anàlits protonats i afavorir així les interaccions polars i fent servir metanol com a solvent per la desorció líquida per immersió. Es va observar que, pels dos recobriments, a mesura que s'augmentaven els temps avaluats de desorció (fins a 3 hores) la recuperació dels anàlits era superior, però sense superar mai el 10% en la majoria d'espècies.

Per tal de descartar que la baixa recuperació dels compostos era un problema de desorció d'aquests, es va allargar el temps d'extracció fins a 16 hores per assegurar que s'arribava a l'equilibri de partició. Es van analitzar aquestes càrregues prèvies a la desorció i es va observar que tots els anàlits hi eren presents en concentracions pròximes a les de la càrrega, per tant, no aconseguien retencions a la barra superiors al 10%.

Finalment, es va decidir que aquests recobriments, tot i que estiguin destinats a l'extracció de compostos polars, no són adequats per a la família de compostos estudiats, els edulcorants, tot i presentar aquestes característiques.

6.2.2. Optimització de la SPE

En aquest estudi, es comparen dos sorbents polimèrics diferents en cartutxos d'intercanvi iònic de mode mixt per a l'extracció en fase sòlida. Els dos materials són d'intercanvi aniònic però el que els diferencia és que un és d'intercanvi aniònic fort (Strong anion-exchange, SAX) i l'altre d'intercanvi aniònic feble (Weak anion-exchange, WAX).

Inicialment, es van avaluar els sorbents SAX. Per a l'optimització de la SPE amb aquests sorbents es van fer servir cartutxos Oasis MAX 150 mg (Waters, Milford, MA, USA) i es van optimitzar els diferents paràmetres que afecten a les recuperacions dels edulcorants.

Les condicions inicials per als diferents passos de l'extracció, van ser les del protocol establert per aquest tipus de sorbent [13]:

1. **Condicionament:** pas de solvent orgànic (3 mL de metanol) i de solució aquosa el més similar a la mostra (2 x 3 mL d'aigua ultrapura).
2. **Càrrega:** mostra neutra (ajustada a pH 7).
3. **Neteja:** solució bàsica aquosa (aigua ultrapura amb 5% d'hidròxid amònic) i solvent orgànic pur (metanol).
4. **Elució:** solució àcida (àcid fòrmic) en un solvent orgànic pur (metanol).

Primerament es va optimitzar el solvent d'elució sense fer neteja prèvia del cartutx ni evaporació final, per tal de poder observar únicament com afectava aquest a les recuperacions de cada anàlit. Es van carregar 50 mL de solució estàndard en aigua ultrapura i es van provar tres solvents d'elució diferents: metanol al 5%, al 10% i al 15% d'àcid fòrmic; també van ser provats tres volums diferents del solvent: 3 mL, 5 mL i 7.5 mL. Es va veure que a mesura que s'augmentava el percentatge d'àcid del solvent d'elució i el volum d'aquest, els tres compostos iònics presents a la mostra (ACE, CYC i SAC) s'eluien en major quantitat, sense superar mai recuperacions superiors a un 15%. Per molt que s'acidificava el metanol no era capaç de trencar la interacció iònica entre les amines quaternàries del cartutx i els compostos aniònics de la mostra. Pel que fa a la resta d'anàlits no iònics (SUC, ASP, NHDC i STE), es va observar que amb poca quantitat de solvent s'eluien obtenint bones recuperacions (superiors al 85%) ja que el metanol trencava fàcilment les interaccions per fase invertida entre la part hidrofòbica del cartutx i la dels compostos. També es van analitzar les càrregues un cop passades pel cartutx, i es va observar que el 100% dels anàlits quedaven retinguts en ell. Es va refutar la possibilitat de perdre compostos en la càrrega, i per tant, es van evitar possibles errors a l'hora de calcular les recuperacions de cada espècie i la seva conseqüent interpretació.

Posteriorment, es va fer el procediment incloent el pas de neteja amb aigua àcida i metanol. A la taula 4, es resumeixen les recuperacions de cada anàlit, obtingudes eluint amb 7.5 mL de metanol al 15% d'àcid fòrmic. Es presenten els resultats per al

procediment sense el pas de neteja i els resultats incloent el pas de neteja amb dos volums diferents de solvents de neteja.

Taula 4. Recuperacions de diferents procediments (amb neteja i sense) pel cartutx Oasisi MAX.

Compost	% Recuperació SPE sense neteja	% Recuperació SPE amb neteja	
		10 mL H ₂ O 5% NH ₄ OH + 10 mL MeOH	5 mL H ₂ O 5% NH ₄ OH + 5 mL MeOH
ACE	0.4	-	-
SAC	3	-	0.3
CYC	27.8	2.1	2.6
SUC	48.2	6.2	0.8
ASP	84	21	68
NHDC	81	38	87
STE	97	-	-

Es va observar que els compostos no iònics es perdien en el pas de neteja amb percentatges elevats (al voltant del 60%). Finalment, es va abandonar l'optimització amb aquests cartutxos ja que no es recuperaven els anàlits iònics i la majoria dels no iònics es perdien en el pas de neteja, per tant, no eren els adequats per a la família de compostos estudiada.

Es va continuar l'estudi i l'optimització de la SPE amb uns sorbents diferents, els de tipus WAX. Es van fer servir els cartutxos Oasis WAX 150 mg (Waters, Milford, MA, USA). Igual que en l'anterior cas, es van avaluar els diferents paràmetres que afectaven a la recuperació dels anàlits, per tal d'obtenir el màxim rendiment.

Les condicions inicials van ser les d'un protocol establert per aquest tipus de sorbent [13]:

1. **Condicionament:** pas de solvent orgànic (3 mL de metanol) i de solució aquosa el més similar a la mostra (2 x 3 mL d'aigua ultrapura).
2. **Càrrega:** Mostra neutra (ajustada a pH 7).
3. **Neteja:** solució àcida aquosa (aigua ultrapura amb 5% d'àcid fòrmic) i solvent orgànic pur (metanol).
4. **Elució:** solució bàsica (hidròxid amònic) en un solvent orgànic pur (metanol).

Es va començar l'avaluació igual que en el cas anterior, sense neteja ni evaporació, per evitar qualsevol possible pèrdua d'anàlit. Per a l'optimització del solvent d'elució es van carregar 50 mL de solució estàndard en aigua ultrapura i es van provar dos tipus de solvent (metanol al 5% i al 10% d'hidròxid amònic) i dos volums diferents (5 mL i 7.5 mL). Es va observar que amb major percentatge de base s'augmentava la recuperació de cada espècie (recuperacions superiors al 85%, excepte l'aspartam, el qual es va observar que es degradava en medi bàsic). En canvi, pel volum de solvent d'elució no es va observar cap diferència significativa entre fer servir 5 mL o 7.5 mL ja que les recuperacions eren del mateix ordre, per tant, es va triar la mínima quantitat. També es van analitzar les càrregues un cop passades pel cartutx i es va veure que totes les espècies hi quedaven retingudes, i per tant, no es perdien en el pas de mostra.

Posteriorment, es va avaluar el pas de neteja, i es van analitzar els solvents un cop passats pel cartutx. Es va observar que amb 5 mL d'aigua ultrapura al 5% d'àcid fòrmic es perdien dos anàlits (SUC i ASP) en l'ordre d'un 40%. L'aspartam és un àcid, el qual estava desprotonat a l'hora de la càrrega, i per tant, quedava retingut al sorbent per interacció iònica. Quan es passa l'aigua àcida, l'aspartam es protona i es trenca la interacció amb el sorbent. Pel cas de la sucralosa, s'explica l'elució degut a la seva polaritat, fet que fa que l'aigua l'elueixi. També es va observar que amb 5 mL de metanol pur, es perdia part dels compostos no iònics (SUC, ASP, NHDC i STE) ja que el metanol trencava les interaccions per fase invertida d'aquests amb el sorbent. Finalment, es va decidir no fer neteja àcida ja que es perdien compostos, i pel cas de la

neteja amb metanol pur es va decidir que s'avaluaria aquest procés en mostres aquoses reals.

Per a l'optimització del volum de mostra, es van provar diferents quantitats: 50 mL, 100 mL, 250 mL i 500 mL. Es van analitzar les mostres un cop passades pel cartutx, per tal d'observar els anàlits que es perdien per la superació del volum de ruptura¹. A la Figura 10 es mostra el percentatge de retenció de cada analit en front el volum de mostra passat. S'observa que a mesura que s'augmenta el volum de mostra, la pèrdua d'alguns anàlits és major. Finalment, es va triar 100 mL de mostra ja que és un volum prou elevat per tal de poder concentrar més en el sorbent, i només es perdia menys del 10% d'un dels compostos (la SUC).

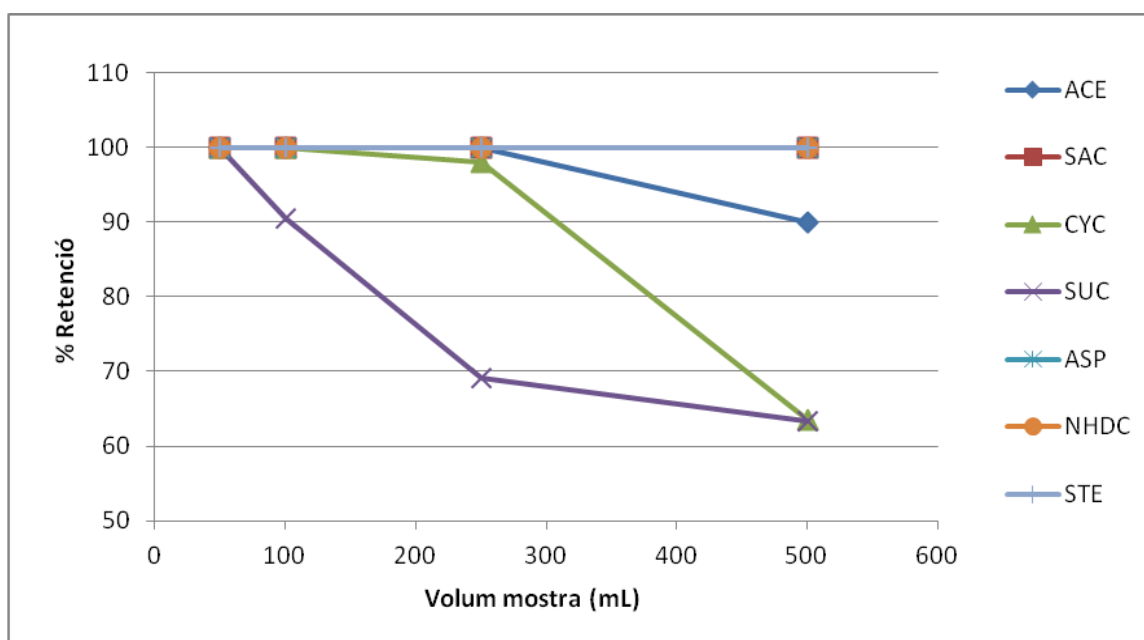


Figura 10. Percentatge de retenció de cada analit en front el volum de mostra passat.

Un cop optimitzades les diferents variables que afecten a la recuperació dels anàlits, es va fer un procediment amb les condicions òptimes i afegint el pas d'evaporació fins a sequedat i reconstituïnt en 1 mL, per tal d'observar que incloent aquest pas tampoc es perdien els anàlits. Es va veure que no hi havia pèrdua d'analit, i per tant, es podia dur a terme aquesta preconcentració de l'extracte d'elució.

¹ Correspon al volum de mostra aquosa que es pot introduir a través del sorbent sense que hi hagi pèrdua d'analit.

L'última optimització amb patrons es va fer per tal de triar el filtre que s'havia d'emprar un cop es reconstituïa l'extracte evaporat, ja que en treballs anteriors al grup es van observar pèrdues d'anàlit per culpa d'aquest. El filtre era necessari per a les posteriors anàlisis amb mostres reals, per tal evitar l'entrada de partícules a l'equip. Es van avaluar diferents tipus de filtres de porositat igual a 0'2 µm. Les recuperacions per a cada filtre es mostren a la Figura 11, s'observa que el filtre de 0.2 µm GHP és el que obté unes recuperacions més elevades per a tots els anàlits, i per tant, és el que es va escollir.

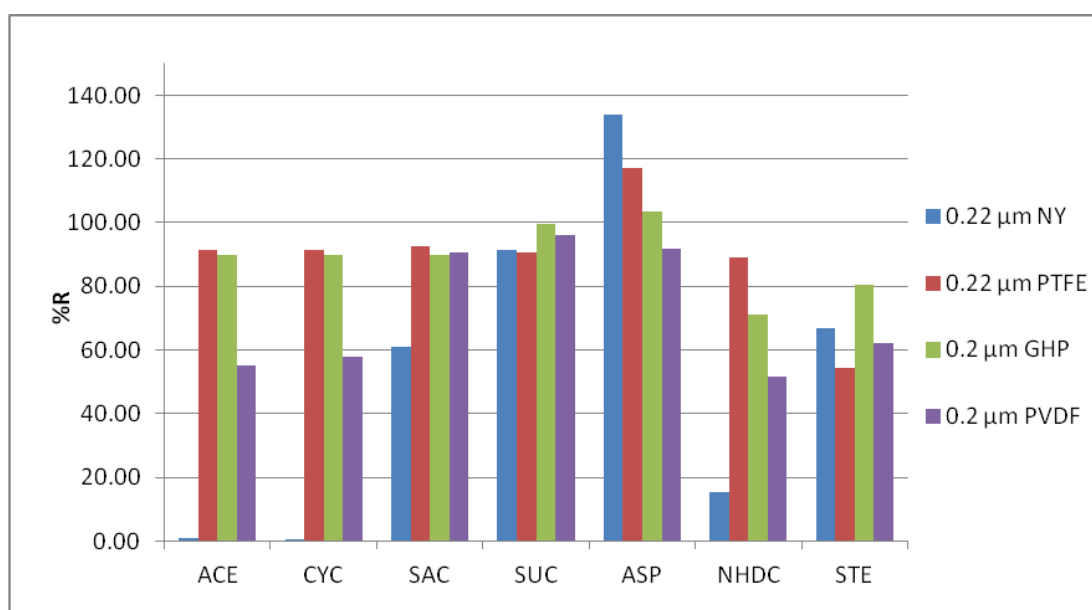


Figura 11. Percentatges de recuperació de cada filtre per a cada anàlit.

Finalment, es van avaluar els paràmetres optimitzats en mostres reals: en aigua de riu i en aigua de sortida de depuradora. Es van comparar els percentatges de recuperació totals del mètode amb neteja i els del mètode sense neteja, incloent l'efecte matriu i la pèrdua pel procés d'extracció.

Per tal d'avaluar el percentatge total de recuperació del mètode es van realitzar dos procediments: un amb la mostra fortificada amb patró abans de l'extracció i un altre amb la mostra sense fortificar (blanc). Es va restar el blanc a la mostra fortificada, tal com s'indica a la Equació 1, per saber el percentatge de recuperació total.

Per saber la pèrdua de resposta per culpa de la supressió iònica² que pateix el detector a l'hora de ionitzar la mostra (efecte matriu), es van dur a terme dos procediments: un amb la mostra fortificada després de tot el procés i l'altre amb la mostra sense fortificar (blanc). Es va calcular aquest percentatge de pèrdua per efecte matriu amb l'Equació 2.

Finalment, es va avaluar el percentatge de recuperació del procés d'extracció (SPE) únicament. Es van agafar els resultats dels anteriors procediments i es va calcular tal com s'indica a l'Equació 3.

Els resultats per a aigua de sortida de depuradora i per a aigua de riu, fent neteja i sense, es mostren a la Taula 5 i 6, respectivament.

$$\%R \text{ total} = \frac{[\text{experimental fortificat abans}] - [\text{blanc}]}{[\text{teòrica}]} \times 100 \quad \text{Equació 1}$$

$$\%E. M. = \left(\frac{[\text{experimental fortificat després}] - [\text{blanc}]}{[\text{teòrica}]} \times 100 \right) - 100 \quad \text{Equació 2}$$

$$\%R \text{ SPE} = \frac{[\text{experimental fortificat després}] - [\text{blanc}]}{[\text{experimental fortificat abans}] - [\text{blanc}]} \times 100 \quad \text{Equació 3}$$

² Es refereix a la reducció de la resposta del detector, deguda a la competència per l'eficiència d'ionització a la font de ionització entre els anàlisis d'interès i les espècies que no han estat eliminades de la matriu de la mostra durant el procés d'extracció.

Taula 5. Comparació del mètode amb neteja i sense neteja per a aigua de riu.

<u>Aigua de riu</u>						
	Mètode amb neteja			Mètode sense neteja		
Compost	%R mètode	% E. M.	%R SPE	%R mètode	% E. M.	%R SPE
ACE	67	-32	99	52	-37	83
SAC	69	-29	98	56	-33	84
CYC	72	-27	102	52	-35	80
SUC	0	-45	2	39	-43	70
ASP	6	-24	7	31	-19	38
NHDC	3	-27	4	32	-35	50
STE	1	-30	1	53	-31	79

Tal i com es pot observar a la Taula 5, amb el mètode que inclou el pas de neteja s'obtenen baixos percentatges de recuperació totals i de la SPE per als anàlits no iònics, tal i com s'explica en l'optimització de la SPE. En canvi, les recuperacions dels anàlits iònics es mantenen de l'ordre entre els dos mètodes. També s'observa que no hi ha diferències significatives entre les pèrdues d'anàlit per efecte matriu tan si es fa neteja com si no.

Taula 6. Comparació del mètode amb neteja i sense neteja per a aigua de sortida de depuradora.

<u>Aigua de sortida de depuradora</u>						
	Mètode amb neteja			Mètode sense neteja		
Compost	%R mètode	% E. M.	%R SPE	%R mètode	% E. M.	%R SPE
ACE	49	-55	89	46	-51	94
SAC	50	-53	94	49	-52	97
CYC	48	-55	88	54	-56	99
SUC	0	-23	0	22	-28	80
ASP	2	-42	4	15	-57	28
NHDC	2	-40	5	35	-36	93
STE	1	-40	1	27	-33	86

Pel que fa als resultats amb mostres d'aigua de sortida de depuradora (Taula 6), s'observa una disminució en els percentatges de recuperació totals i un petit augment en els percentatges de pèrdua per efecte matriu, respecte als de mostres aquoses de riu. Aquest fet pot ser explicat pel canvi de matriu de la mostra; l'aigua de riu és menys complexa que la de sortida de depuradora. També s'observa que quan s'inclou el pas de neteja en el mètode, les recuperacions del mètode disminueixen considerablement per als anàlits no iònics, tal i com s'explicava en l'anterior matriu. En canvi, es veu un petit augment en les recuperacions totals per als compostos iònics quan el mètode emprat conté el pas de neteja en el tractament de mostra.

Finalment, degut a que amb cap de les dues matrius no es van observar diferències significatives entre les pèrdues per efecte matriu si es feia el pas de neteja o no, i per tant, la neteja no millorava la resposta si no que feia perdre anàlit, es va decidir no incloure-la i així poder determinar tots els compostos.

6.3. Validació del mètode

La validació del mètode es va fer seguint el procediment optimitzat. Es va validar el mètode però tan sols es va tenir temps de fer-ho amb aigua de riu.

Degut a l'efecte matriu present a la mostra es va realitzar la calibració en matriu, i per això, es van fortificar sis mostres d'aigua de riu a diferents nivells (entre 0.1 i 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) i es va fer un blanc. Després del procediment i de la posterior anàlisi, es va restar el blanc a totes les mostres fortificades i es va fer la recta de calibratge. Es va observar linealitat en l'interval proposat, tal com s'indica a la Taula 7.

Es van agafar els punts més baixos de la recta de calibratge amb efecte matriu com els límits de quantificació, ja que eren superiors a 10 vegades la relació senyal/soroll i entraven dins de l'interval de linealitat. No es va tenir temps de calcular els límits de detecció, s'haguessin hagut de preparar diferents mostres fortificades a nivells més baixos per tal d'observar quin era el nivell que corresponia a la relació senyal/soroll triada per al límit. Aquests resultats es mostren a la Taula 7.

Per calcular la precisió es va avaluar la repetibilitat i la reproductibilitat fortificant amb patró l'aigua de riu al mateix nivell. Per a la repetibilitat es van dur a terme cinc repeticions del mètode el mateix dia i es va expressar com a percentatge de desviació estàndard relativa (%RSD). La reproductibilitat es va estudiar fent tres repeticions interdiàries del mètode i expressant-la com a %RSD. Tal i com es pot observar a la Taula 7, hi ha alguns anàlisis (SUC, ASP, NHDC i STE) que són tan reproduïbles en aquest mètode ja que tenen valors de %RSD més elevats. El percentatge més elevat és per l'aspartam, ja que aquest anàlisis es degrada en medi bàsic amb el temps. En canvi, s'observa bona reproductibilitat per la resta de compostos, amb valor de %RSD menors al 10%.

Taula 7. Precisió (repetibilitat i reproductibilitat), exactitud i interval de linealitat dels anàlits estudiats pel mètode.

Compost	Interval de linealitat ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Repetibilitat ^c (%RSD)	Reproductibilitat ^d (%RSD)	LOQs ($\mu\text{g L}^{-1}$)
ACE	0.1 – 50 ^a	0.9981 ^a	6.45	4.43	0.1
SAC	0.1 - 50 ^a	0.9978 ^a	7.18	1.39	0.1
CYC	0.1 - 50 ^a	0.9996 ^a	6.14	6.96	0.1
SUC	0.1 - 50 ^a	0.9933 ^a	7.95	14.09	0.1
ASP	5 - 50 ^b	0.9996 ^b	21.24	11.27	5
NHDC	0.1 - 50 ^a	0.9975 ^a	12.55	16.25	0.1
STE	0.1 - 50 ^a	0.9972 ^a	11.92	3.96	0.1

^a Valor trobat amb 6 punts.^b Valor trobat amb 3 punts.^c Valor calculat a partir de 5 repeticions.^d Valor calculat a partir de 3 repeticions.

Per la falta de temps no es va poder validar el mètode en aigua de depuradora, i per tant, no s'han pogut analitzar aquest tipus de mostra.

6.4. Anàlisi de mostres reals

El mètode desenvolupat, SPE/LC-MS, es va aplicar per a la determinació dels edulcorants estudiats en mostres d'aigua de riu. Les mostres van ser preses de tres rius diferents (riu Ebre, riu Segre i riu Francolí) a meitats del mes de març. Els resultats es mostren a la Taula 8.

L'aspartam (ASP), la neohesperidina dihidrocalcona (NHDC) i l'estèvia (STE), no es van trobar en cap de les mostres analitzades tal i com es pot observar a la Figura 12, resultats que corresponen als observats en estudis anteriors [5, 15]. En canvi, els altres quatre anàlits: l'acesulfam (ACE), la sacarina (SAC), el ciclamat (CYC) i la sucralosa (SUC) es van trobar a totes les mostres que van ser analitzades. Aquests compostos també s'han trobat anteriorment en mostres de rius, com per exemple, en mostres dels rius Sava i Danubi on es troben en concentracions entre 0.06 i 0.31 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivament [5, 16].

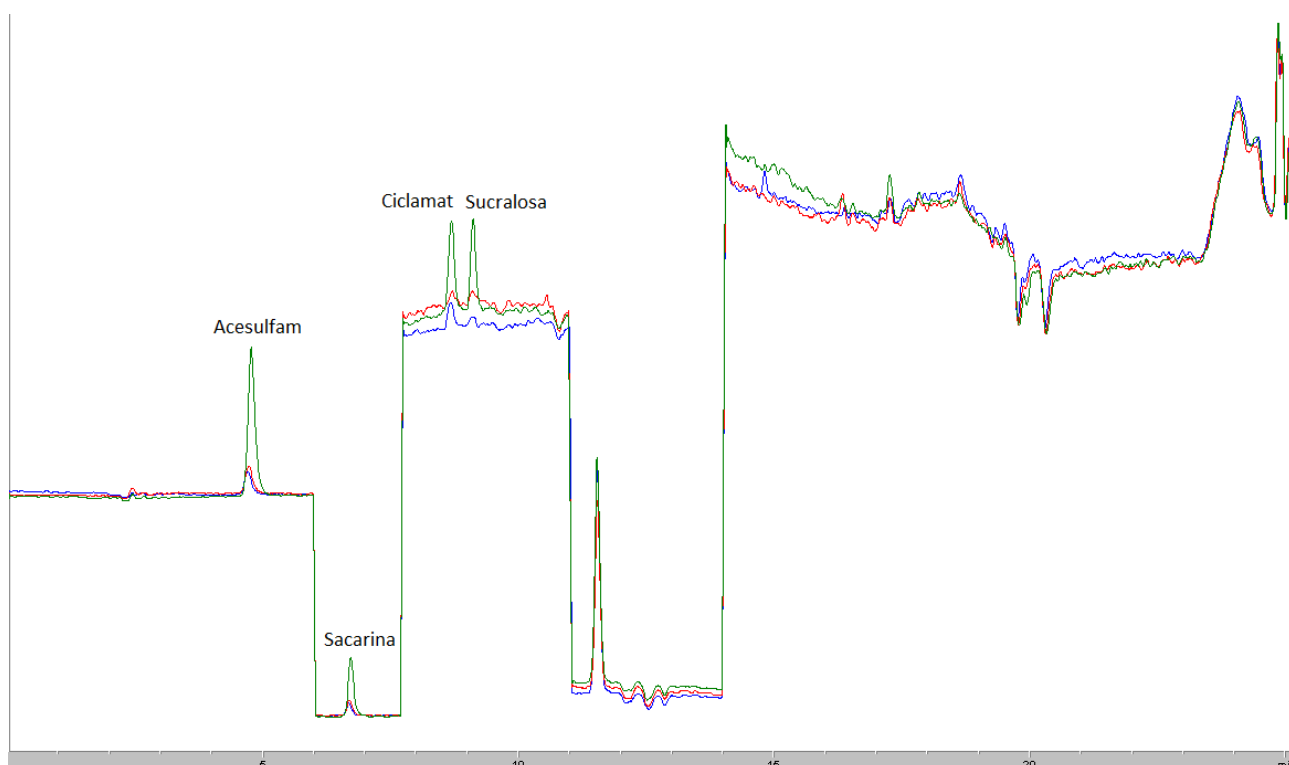


Figura 12. Cromatogrames superposats de les tres mostres de riu analitzades: riu Francolí (en color verd), riu Segre (en color blau) i el riu Ebre (en color vermell).

Només per l'aigua del riu Francolí es van poder calcular les concentracions de la majoria dels compostos trobats. Per la resta d'anàlits no es va poder calcular la concentració, ja que l'àrea trobada no entrava dins l'interval de linearitat del mètode, i per tant, no podien ser quantificats. Com que els pics es podien veure bé i complien la relació senyal/soroll > 3 , es va suposar que la seva concentració era superior al LOD i es van expressar com a $< \text{LOQ}$.

Taula 8. Concentracions dels edulcorants estudiats en les tres mostres de riu diferents.

Compost	Riu Francolí	Riu Ebre	Riu Segre
ACE	1.13 $\mu\text{g L}^{-1}$	< LOQ	< LOQ
SAC	< LOQ	< LOQ	< LOQ
CYC	0.12 $\mu\text{g L}^{-1}$	< LOQ	< LOQ
SUC	1.71 $\mu\text{g L}^{-1}$	< LOQ	< LOQ
ASP	-	-	-
NHDC	-	-	-
STE	-	-	-

* Inferior al límit de quantificació (< 0'1 $\mu\text{g L}^{-1}$).

S'observa que els valors trobats de ACE, CYC i SUC al riu Francolí són similars als trobats a la bibliografia [15].

Com que no es va tenir temps suficient per a la validació del mètode en aigües residuals, no es va poder avaluar l'eficàcia d'aquestes plantes depuradores. Tot i això, la presència d'alguns dels edulcorants estudiats en les mostres de riu processades confirma la seva capacitat per arribar a les aigües superficials i migrar al medi aquàtic, i per tant, seria interessant avaluar l'eficàcia d'eliminació de les plantes depuradores.

7. Conclusions

- Liquid chromatography – mass spectrometry in negative mode of ionization is well suited to determine sweeteners in water samples.
- The new materials, PEG and PA, of stir bar sorptive extraction (SBSE) as a sample pre-treatment are not suitable for the extraction of sweeteners from aquatic environmental samples.
- The SAX sorbents, specifically Oasis MAX 150 mg, were not suitable for the extraction of sweeteners from aquatic samples because some analytes and the sorbent interact strongly.
- The procedure applied with the WAX sorbent can not include a clean-up step with methanol because some analytes are eluted.
- Care must be taken with aspartame since it degrades over time in basic media.
- The method based on SPE with LC-MS, developed for the determination of sweeteners in river water, enable these contaminants to be determined at low $\mu\text{g L}^{-1}$ levels.
- When the method was applied to determine these compounds in three rivers, acesulfame, saccharin, sucralose and cyclamate were present in the different samples analyzed, being acesulfame and sucralose with the highest values.

8. Bibliografia

- [1] Chang, C.-S.; Yeh, T. S. *Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Food and Drug Analysis.* **2014**, XXX, 1-11.
- [2] Zygler, A.; Wasik, A.; Kot-Wasik, A. *Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400, 2159-2172.
- [3] Scheurer, M.; Brauch, H.-J.; Lange, F. T. *Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 394, 1585-1594.
- [4] Ferrer, I.; Thurman, E.M. *Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. J. Chromatogr. A.* **2010**, 1217, 4127-4134.
- [5] Ordóñez, E. Y.; Quintana, J. B.; Rodil, R.; Cela, R. *Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A.* **2012**, 1256, 197-205.
- [6] Weihrauch, M. R.; Diehl, V. *Artificial sweeteners – do they bear a carcinogenic risk?. Annals of Oncology.* **2004**, 15, 1460-1465.
- [7] Loos, R.; Gawlik, M. G.; Boettcher, K.; Locoro, G. *Sucralose screening in European surface waters using solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method. J. Chromatogr. A.* **2008**, 1216, 1126-1131.
- [8] Wasik, A.; McCourt, J.; Buchgraber, M. *Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection – Development and single-laboratory validation. J. Chromatogr. A.* **2007**, 1157, 187-196.
- [9] Yang, D.-J.; Chen, B. *Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS. J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 3022-3027.

- [10] Kokotou, M. G.; Asimakopoulos, A.G.; Thomaidis, N. S. *Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact. Anal. Methods.* **2012**, *4*, 3057-3069.
- [11] Gilart, N.; Marcé, R. M.; Borrull, F.; Fontanals, N. *New coatings for stir-bar sorptive extraction of polar emerging organic contaminants. Trends in Analytical Chemistry.* **2014**, *54*, 11-23.
- [12] Gilart, N.; Cormack, P.A.G.; Marcé, R. M.; Borrull, F.; Fontanals, N. *Preparation of a polar monolithic coating for stir bar sorptive extraction of emerging contaminants from wastewaters. J. Chromatogr. A.* **2013**, *1295*, 42-47.
- [13] Fontanals, N.; Cormack, P. A. G.; Marcé, R. M.; Borrull, F. *Mixed-mode ion-exchange polymeric sorbents: dual-phase materials that improve selectivity and capacity. Trends in Analytical Chemistry.* **2010**, *29*, 765-779.
- [14] Arbeláez, P.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marcé, R. M. *LC-Tandem MS to determine sweeteners in wastewater and surface water.* (Pendent de publicació)
- [15] Lange, F. T.; Scheurer, M.; Brauch, H. J. *Artificial sweeteners – a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review.* **2012**, *403*, 2503-2518.



Avaluació de nous materials per a l'extracció d'edulcorants en mostres ambientals aquoses by [Maceira Torrents, Alba Rosa Maria Marcé](#) is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](#).

Puede hallar permisos más allá de los concedidos con esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.ca>