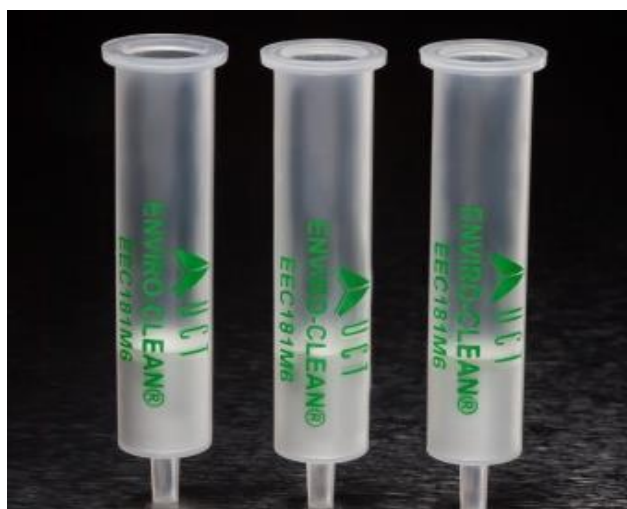




UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

## AVALUACIÓ DE NOUS MATERIALS PER LA SEVA UTILITZACIÓ EN TÈCNIQUES D'EXTRACCIÓ



**Autor:** Adrián Villa Gabarrón

**Assignatura:** Treball de fi de grau

**Departament:** Q. analítica i Q. orgànica

**Tutors:** Rosa Maria Marcé

Núria Fontanals

**Data:** 16/06/2023



# ÍNDEX

RESUM .....	1
1. OBJECTIU.....	2
2. INTRODUCCIÓ, FONAMENTS I ANTECEDENTS BIBLIOGRÀFICS .....	2
2.1. EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA .....	3
2.1.1. TIPUS DE SORBENTS .....	4
2.1.2. SORBENTS D'INTERCANVI IÒNIC DE MODE MIXT .....	5
2.1.2.1. MATERIALS DE BASE SÍLICE.....	6
2.1.2.1. MATERIALS DE BASE POLIMÈRICA.....	7
2.2. CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS D'ALTA EFICÀCIA .....	8
3. PART EXPERIMENTAL .....	10
3.1. REACTIUS I PATRONS.....	10
3.1.1. REACTIUS UTILITZATS .....	10
3.1.2. PREPARACIÓ DELS PATRONS.....	12
3.1.3. PREPARACIÓ DE LES FASES MÒBILS.....	15
3.1.4. PREPARACIÓ DELS CARTUTXOS D'EXTRACCIÓ .....	16
3.2. PROCÉS DE L'EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA .....	16
3.3. CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES .....	18
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	20
4.1. SEPARACIÓ CROMATOGRÀFICA .....	20
4.2. RECTA DE CALIBRATGE .....	22
4.3. OPTIMITZACIÓ DE L'EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA.....	23
4.3.1. RESULTATS AMB ISOLUT SCX .....	23
4.3.1.1. MOSTRES D'AIGUA ULTRAPURA .....	24
4.3.1.2. MOSTRES D'AIGUA DE RIU .....	26
4.3.1.3. MOSTRES D'AIGUA DE SORTIDA DE DEPURADORA.....	27
4.3.2. RESULTATS AMB SUPELCLEAN SAX .....	28
4.3.2.1. MOSTRES D'AIGUA ULTRAPURA .....	28
4.3.2.2. MOSTRES D'AIGUA DE RIU .....	29
4.3.2.3. MOSTRES D'AIGUA DE SORTIDA DE DEPURADORA.....	30
4.3.3. SCX/SAX COMBINAT .....	30
4.3.3.1. MOSTRES D'AIGUA ULTRAPURA .....	31
4.3.3.2. MOSTRES D'AIGUA DE RIU .....	35

4.3.3.3. MOSTRES D'AIGUA DE SORTIDA DE DEPURADORA.....	36
4.3.4. COMPARACIÓ DE RESULTATS.....	37
5. CONCLUSIONS.....	39
6. BIBLIOGRAFIA .....	40

## **RESUM**

En aquest treball s'ha realitzat una avaluació de diversos sorbents per la seva utilització en tècniques de extracció d'un grup de fàrmacs. La tècnica d'extracció utilitzada en aquesta avaluació és l'extracció en fase sòlida (SPE).

Els sorbents avaluats són l'Isolute SCX, el Supelclean SAX i una combinació dels dos sorbents. Són sorbents de mode mixte d'intercanvi iònic de base sílice. L'Isolute SCX és d'intercanvi catiònic i el Supelclean SAX és d'intercanvi aniònic.

Per dur a terme l'avaluació, s'han optimitzat les condicions cromatogràfiques per poder avaluar i optimitzar el procés de SPE.

El mètode optimitzat s'ha avaluat a diferents tipus de mostra de complexitat diversa. S'han analitzat mostres d'aigua ultrapura, de riu i de depuradora. Els resultats obtinguts del sorbent SCX són satisfactoris, ja que retenen selectivament els compostos bàsics, però pel sorbent SAX i al sorbent combinat, els resultats són menys satisfactoris, ja que els anàlits àcids no interaccionen de la manera esperada amb el sorbent SAX.

## **ABSTRACT**

In this work, an evaluation of several sorbents for use in extraction techniques for a group of drugs has been carried out. The extraction technique used in this evaluation is solid phase extraction (SPE).

The sorbents evaluated are Isolute SCX, Supelclean SAX and a combination of the two sorbents. They are silica-based mixed-mode ion exchange sorbents. Isolute SCX is cation exchange and Supelclean SAX is anion exchange.

To perform the evaluation, the chromatographic conditions have been optimized to evaluate and optimize the SPE process.

The optimized method has been evaluated on different sample types of varying complexity. The results obtained for the SCX sorbent are satisfactory, since they selectively retain the basic compounds, but for the SAX sorbent and the combined sorbent, the results are less satisfactory, since the acidic analytes do not interact as expected with the SAX sorbent.

## 1. OBJECTIU

En aquest treball, l'objectiu principal és avaluar nous materials per utilitzar-los com a sorbents en tècniques d'extracció, especialment en l'extracció en fase sòlida.

S'han seleccionat diferents fàrmacs per dur a terme aquesta avaluació. Els fàrmacs s'han determinat per HPLC-UV amb detector de díodes en fila (DAD). S'ha avaluat l'extracció dels anàlits en diferents mostres d'aigua.

A partir dels resultats obtinguts, es calcula la recuperació dels diferents anàlits en cada tipus de mostra i per cada tipus de sorbent.

Per tant, en aquest treball, a més de l'objectiu principal, es pretén:

- Assolir coneixements sobre la tècnica SPE.
- Entendre el funcionament de la tècnica HPLC-UV/DAD.
- Optimitzar les condicions de treball per a obtenir resultats fiables.
- Interpretar els resultats obtinguts.

## 2. INTRODUCCIÓ, FONAMENTS I ANTECEDENTS BIBLIOGRÀFICS

El treball ha estat realitzat al laboratori del grup de Cromatografia i Aplicacions mediambientals a la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili, sota la supervisió de la Dra. Rosa Maria Marcé i la Dra. Núria Fontanals. El grup de recerca té una línia centrada en el desenvolupament de nous materials per a tècniques d'extracció.

El treball es basa en l'avaluació de nous materials per a la seva utilització en tècniques d'extracció. Aquesta avaluació es duu a terme determinant un grup de fàrmacs, considerats contaminants emergents, en aigua.

Els productes farmacèutics (PFs) constitueixen un grup important dels contaminants emergents (CE)<sup>1</sup>, degut al seu potencial per induir efectes fisiològics adversos a baixes concentracions en humans i animals. Molts estudis<sup>1</sup> arreu del món han reportat la presència d'un gran nombre d'aquests compostos en diferents medis aquàtics<sup>2</sup>, cosa que genera preocupació pels possibles efectes negatius que es produeixen a l'aigua, la salut humana i la vida silvestre. La presència de PFs a l'ambient aquàtic preocupa per la seva persistència, la bioacumulació, la toxicitat i la generació de resistència a antibiòtics de molts microorganismes, entre altres conseqüències encara no estudiades a l'ambient.

Per determinar aquests fàrmacs s'utilitza generalment el mètode cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses (LC-MS/MS)<sup>3</sup> amb preconcentració de la mostra emprant una tècnica d'extracció.

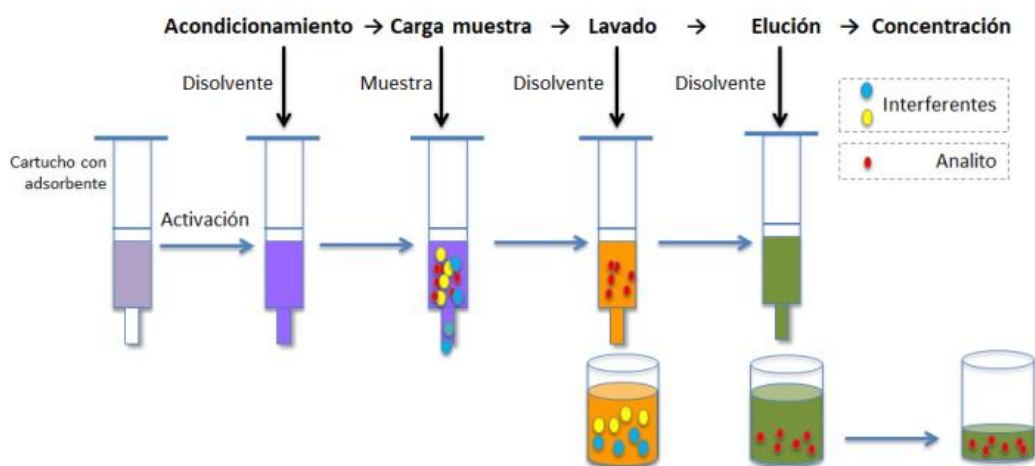
Entre les diferents tècniques d'extracció<sup>4</sup> pel tractament de mostres líquides destaquen l'extracció líquid-líquid, l'extracció en fase sòlida (SPE), la microextracció en fase sòlida (SPME), i l'extracció amb barres magnètiques agitadores<sup>5</sup>, essent l'SPE una de les més emprades.

## 2.1. EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA

L'extracció en fase sòlida (SPE) és una tècnica dissenyada per a la preparació i la purificació ràpides i selectives de la mostra abans de l'anàlisi cromatogràfica. A la SPE, s'aïllen un o més anàlits d'una mostra líquida mitjançant la seva retenció a una fase estacionària sòlida.<sup>4</sup>

Un mètode SPE consta generalment de quatre etapes. Es pot observar a la imatge 1.

- Condicionament. Preparació del sorbent per processar la mostra.
- Càrrega de la mostra. Passar la mostra a través del cartutx per tal que els anàlits quedin retinguts.
- Rentat. Arrossegament per rentat de compostos no desitjats que hagin quedat retinguts.
- Elució. Desorció selectiva i recollida dels anàlits d'interès.



Imatge 1. Procediment de l'extracció en fase sòlida.

La preparació de la mostra mitjançant SPE canvia la matriu original d'una mostra a un entorn de matriu més senzilla. Això simplifica i millora l'anàlisi qualitativa i quantitativa final. Un procediment òptim de SPE permet: <sup>4</sup>

- Canviar les matrius de mostra perquè siguin més compatibles amb el mètode cromatogràfic que s'utilitzi.

- Concentrar els anàlits per augmentar la sensibilitat.
- Eliminar les interferències que provoquen un soroll elevat de fons, pics erronis o poca sensibilitat durant l'anàlisi cromatogràfica.
- Protegir la columna analítica dels contaminants.
- Automatitzar el procés d'extracció.

### 2.1.1. TIPUS DE SORBENTS

Un sorbent és un material utilitzat per retenir líquids, gasos o partícules sòlides. Les característiques generals que un sorbent ha de tenir són:

- Alta capacitat d'absorció o adsorció. Un bon sorbent ha de tenir la capacitat de retenir una quantitat significativa dels anàlits d'interès.
- Selectivitat. Idealment, un sorbent hauria de tenir la capacitat de retenir selectivament l'anàlit o grup d'anàlits d'interès, sense afectar en gran mesura altres substàncies presents a l'entorn.
- Velocitat d'absorció o adsorció. Un eficient sorbent ha d'actuar ràpidament per retenir l'anàlit o grup d'anàlits d'interès.
- Estabilitat química. És desitjable que un sorbent sigui químicament estable, resistent a la degradació o reaccions químiques indesitjables amb la substància que es busca absorbir o adsorbir.
- Reutilització o regeneració. En molts casos, és avantatjós que un sorbent sigui reutilitzable o regenerable, cosa que permet el seu ús repetit i redueix els costos i residus associats.
- Baixa toxicitat. Ha de ser segur per manipular-lo i utilitzar-lo, especialment en aplicacions on pot entrar en contacte amb aliments, aigua potable o altres productes sensibles.

La selecció del material sorbent és determinant per aconseguir la selectivitat adequada del nostre procediment d'extracció; per això haurem de considerar les característiques de la matriu de la mostra, la naturalesa i la concentració dels anàlits d'interès, així com els compostos presents a la mostra que poden provocar interferències.

Els materials sorbents es poden classificar<sup>6</sup> en:

- Sorbents hidrofòbics. En fase invertida, els grups funcionals no polars del sorbent actuen segons les forces de Van der Waals. Les cadenes alquíliques i aromàtiques són grups funcionals que mostren afinitat amb compostos de polaritat mitjana i baixa. Els grups silanols lliures de l'adsorbent afavoreixen les interaccions polars.



- Sorbents hidrofílics. Les fases normals permeten una neteja eficient de molècules amb grups polars. Presenten grups polars a l'estructura. Per exemple, els grups funcionals diol poden millorar l'extracció de compostos polars davant de C<sub>18</sub>. Un exemple de sorbent hidrofílic és el sorbent Oasis HLB, que és un sorbent polimèric universal de fase invertida, que es va desenvolupar per a l'extracció d'una àmplia gamma de compostos àcids, bàsics i neutres de diverses matrius mitjançant la utilització d'un protocol senzill i genèric. Com que el sorbent Oasis HLB s'humiteja amb l'aigua, manté la seva capacitat per a una major retenció i excel·lents recuperacions tot i que el sorbent s'assequi.<sup>7</sup>
- Sorbents d'intercanvi iònic. La retenció d'intercanvi iònic es basa en la interacció iònica. Aquest sorbent crea una forta atracció amb els grups funcionals de càrrega oposada dels compostos de la mostra.
- Sorbents d'afinitat. Els sorbents per afinitat es preparen immobilitzant sobre la superfície del suport els lligands que interaccionen específicament amb les macromolècules d'interès. Les molècules utilitzades com a lligands bioespecífics o pseudoespecífics inclouen anticossos, proteïnes, inhibidors, cofactors, colorants i ions quelatants.
- Sorbents mixts. Els sorbents mixts mostren més selectivitat que els anteriors. Les cadenes d'intercanvi iònic i hidrofòbiques, químicament lligades a la sílice o al polímer, ofereixen una selectivitat única. Els compostos que tinguin funcionalitat àcida o bàsica són retinguts per la funció d'intercanvi.<sup>6</sup>

Actualment els sorbents d'intercanvi iònic de mode mixt han agafat molta importància, ja que combinen una alta selectivitat i una bona capacitat de retenció.

### **2.1.2. SORBENTS D'INTERCANVI IÒNIC DE MODE MIXT**

Els sorbents d'intercanvi iònic de mode mixt es poden classificar en quatre grups segons la part iònica que s'hi uneix.<sup>6</sup>

Els materials d'intercanvi catiònic fort (SCX) estan funcionalitzats amb grups sulfònics ( $pK_a < 1$ ), que es mantenen carregats negativament independentment de les condicions de pH. Aquests materials estableixen interaccions d'intercanvi catiònic amb els compostos protonats (bàsics) de la mostra.

En canvi, els materials forts d'intercanvi d'anions (SAX) que estan funcionalitzats amb amines quaternàries es mantenen carregats positivament i estableixen interaccions d'intercanvi d'anions amb compostos desprotonats (àcids) de la mostra.

La característica comuna d'aquests materials és que el material es manté carregat independentment del pH, i les interaccions amb els anàlits es poden promoure o

interrompre en funció de la capacitat de càrrega dels compostos en les diferents etapes d'extracció.

Els materials d'intercanvi catiònic feble (WCX) solen modificar-se amb àcid carboxílic o qualsevol grup àcid feble ( $pK_a < 4$ ) que estigui carregat negativament a valors de pH per sobre del seu  $pK_a$ . Aquest grup estableix interaccions d'intercanvi catiònic amb els compostos protonats (bàsics) de la mostra. Durant l'etapa d'elució, l'additiu àcid assegura la protonació del fragment àcid feble (àcid carboxílic) del material en lloc de canviar la capacitat de càrrega dels compostos. A mesura que els grups iònics del material adopten la seva forma neutra, ja no poden establir interaccions iòniques amb els compostos, que elueixen gràcies a la força d'elució del dissolvent orgànic.

Els materials d'intercanvi d'anions febles (WAX) es modifiquen amb amines primàries, secundàries o terciàries ( $pK_a > 6$ ). Aquest grup catiònic afavoreix les interaccions d'intercanvi iònic amb els compostos àcids desprotonats ( $pK_a < 4$ ) de la mostra en condicions de pH neutre, quan els dos grups funcionals estan en la seva forma carregada.

En general, les interaccions iòniques específiques entre els materials d'intercanvi iònic en mode mixt i els compostos no es veuen alterades tret que es modifiqui el pH. També permet utilitzar dissolvents d'alta força d'elució durant l'etapa de rentat, la qual cosa afavoreix la selectivitat quan s'utilitzen materials d'intercanvi d'ions en mode mixt en les tècniques d'extracció.

### **2.1.2.1. MATERIALS DE BASE SÍLICE**

Els sorbents basats en sílice<sup>8</sup> d'intercanvi iònic de mode mixt combinen tant fragments d'intercanvi iònic com grups de cadena alquil de manera que puguin establir simultàniament interaccions iòniques i interaccions en fase invertida, respectivament. Diverses marques comercials proporcionen aquest tipus de absorbents. Per exemple, la sèrie Isolute de Biotage ofereix Isolute HCX (SCX), HCX-Q (WCX) i HAX (SAX). En particular, Isolute HCX combina cadenes d'alquil  $C_8$  (no polars) i el grup funcional  $-SO_3^-$  (SCX).

ISOLUTE HCX, HCX-3 i HCX-5 es basen en una combinació de grups químics d'intercanvi catiònic fort i cadenes no polars ( $C_8$ ,  $C_{18}$  i  $C_4$  respectivament). Això permet eluir les interferències retingudes només per interaccions no polars o d'intercanvi catiònic. Només s'extreuen anàlits amb característiques no polars i bàsiques mitjançant la sèrie de sorbents ISOLUTE HCX i proporciona un extracte final extremadament pur.<sup>9</sup>

El sorbent SPE de mode mixt ISOLUTE HAX es basa en una combinació d'intercanvi d'anions fort i cadenes d'hidrocarburs no polars. Permet eluir les interferències retingudes només per interaccions no polars o d'intercanvi d'anions. Només els anàlits amb característiques no polars i àcides s'extreuen mitjançant el sorbent ISOLUTE HAX,

proporcionant un extracte final extremadament pur. L'enfocament de mode mixt per a l'extracció de fàrmacs és extremadament robust. El mecanisme de retenció inicial dels anàlits és no polar (hidrofòbic) i no es veu afectat per la força iònica alta o variable de la matriu.<sup>10</sup>

En general, aquests sorbents es basen en la sílice, que és un compost químic format principalment per àtoms de silici i oxigen (SiO<sub>2</sub>). A continuació, es presenten algunes característiques generals dels sorbents de base sílícia: <sup>11</sup>

- Àrea superficial. Al voltant de 500 m<sup>2</sup>/g com a màxim. Permet una capacitat d'adsorció gran i una interacció eficient amb els compostos a separar.
- Porositat controlada. Permet ajustar la selectivitat i la capacitat de retenció dels compostos objectiu.
- Estabilitat química. Poden arribar a degradar-se.
- Baixa afinitat per compostos polars. Atès que aquests sorbents normalment estan funcionalitzats amb grups apolars, tenen una baixa afinitat per compostos polars, cosa que els fa adequats per a la separació de compostos no polars o lleugerament polars. Tot i això, es poden modificar químicament per millorar la seva capacitat de retenció de compostos polars.
- Versatilitat. La superfície dels sorbents de base sílice es pot modificar químicament mitjançant diferents grups funcionals. Això permet ajustar i millorar la selectivitat i la capacitat de retenció dels anàlisis d'interès.

### **2.1.2.1. MATERIALS DE BASE POLIMÈRICA**

Els materials polimèrics d'intercanvi iònic de mode mixtes<sup>12</sup> preparen incorporant grups funcionals iònics a l'estructura polimèrica. Es poden introduir funcionalitzant el polímer amb un grup iònic o per copolimerització amb un monòmer que ja conté aquest grup iònic. De la mateixa manera, els grups iònics es poden classificar com SCX (àcid sulfònic), SAX (amina quaternària), WCX (àcid carboxílic) o WAX (amina primària, secundària o terciària).

L'estructura polimèrica que regeix les interaccions de fase invertida pot ser macroporosa o hiperreticulada. Depenent de la morfologia del polímer (macroporosa o hiperreticulada) i de la polaritat de l'estructura polimèrica (hidrofòbica o hidròfila), la retenció dels sorbents polimèrics d'intercanvi iònic de mode mixt<sup>12</sup> es millora en comparació amb la dels sorbents basats en sílice.

Hi ha diferents marques que ofereixen una àmplia gama d'aquests tipus de sorbents. Entre d'altres, destaquen la sèrie Oasis de Waters, la sèrie Strata de Phenomenex, sèrie Bond Elut Plexa d'Agilent Technologies, Chromabond HR de Macherey-Nagel i la família Cleanert (PS-DVB funcionalitzat, 600 m<sup>2</sup>/g) de Bonna-Agela Technologies.

Per exemple, Oasis HLB és un polímer multiusos, molt hidrofílic, humectable amb aigua amb un equilibri hidrofílic-lipofílic únic. Oasis HLB manté una retenció i capacitat elevades fins i tot si s'asseca després del condicionament. Aquest sorbent de fase invertida és ideal per a anàlisis neutres, bàsics i àcids. A partir de l'Oasis HLB, s'obtenen altres sorbents d'intercanvi iònic de mode mixte. Aquests sorbents són un polímers de mode mixt, de fase invertida/intercanvi catiònic fort, humectable amb aigua: Oasis MCX (intercanvi catiònic fort), OASIS MAX (intercanvi aniònic fort), OASIS WCX (intercanvi catiònic feble) i OASIS WAX (intercanvi aniònic feble).<sup>7</sup>

Un altre exemple és Bond Elut Plexa. Aquesta marca ofereix mètodes fàcils d'utilitzar per a l'extracció de propòsit general. També està disponible en formats SPE d'intercanvi iònic, Plexa PCX SPE per a l'intercanvi catiònic i Plexa PAX per a l'intercanvi d'anions.

Chromabond HR de Macherey-Nagel ofereix diferents tipus de sorbents polimèrics. Per exemple, HR-XC, un fort intercanviador de cations d'àcid benzensulfònic de copolímer de poliestirè-divinilbenzè com a base de material; HR-XA, un fort intercanviador d'anions d'amoni quaternari bàsic de copolímer de poliestirè-divinilbenzè com a material base; HR-XAW, un intercanviador d'anions d'amoni secundari i terciari bàsic feble de copolímer PS/DVB esfèric com a material base; HR-P, una resina sorbent de poliestirè-divinilbenzè altament porosa.

## **2.2. CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS D'ALTA EFICÀCIA**

La cromatografia de líquids és una tècnica que s'utilitza per a la separació i l'anàlisi dels components químics d'una barreja<sup>13</sup>. En aquest mètode hi participen les fases mòbil i estacionària (immiscibles entre sí). La fase mòbil és líquida i la seva funció és portar la mostra a través de la fase estacionària. Les diferents forces químiques i físiques que actuen entre la barreja a analitzar i les dues fases determinen la retenció i separació de cadascun dels components de la barreja. Els components amb més afinitat amb la fase estacionària es desplaçaran amb menys velocitat que aquells que presenten menys afinitat, i per tant sortiran a temps de retenció més elevats. Aquestes diferències de velocitats donen origen a la separació dels components.

El mètode HPLC es pot dur a terme de diferents modes: en fase normal, en fase inversa, per exclusió de mida, d'intercanvi iònic, etc.

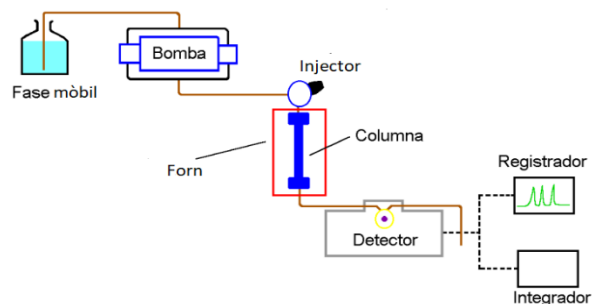
Actualment, pel fet que és més reproduïble i té una àmplia aplicabilitat, la cromatografia de fase invertida s'utilitza per aproximadament el 75% de tots els mètodes d'HPLC. A la cromatografia en fase invertida, la fase estacionària és apolar, i la fase mòbil és relativament polar (com l'aigua, metanol o acetonitril). En aquest mètode, els components més polars apareixen primer, i un augment de la polaritat de la fase mòbil augmenta el temps d'elució.

El funcionament de l'instrument es pot observar a la imatge 2. Les seves parts són:

- Bomba. Produeix alta pressió que proporciona un flux continu i repetible de fase mòbil a tot el sistema d'HPLC.
- Fase mòbil. Solvent o combinació d'aigua amb solvents orgànics.
- Desgasificador. Elimina la pressió d'aire.
- Injector. S'utilitza per injectar una solució de mostra al sistema d'HPLC. Pot ser automàtic o manual.
- Columna. Conté la fase estacionària, que és responsable de separar els anàlits de la mescla de mostra. Les columnes estan dissenyades per al seu ús a alta pressió en tubs d'acer inoxidable.
- Forn. Serveix per controlar la temperatura d'una columna.
- Detector. Part de l'instrument utilitzat per detectar els compostos separats d'una columna. El detector pot ser d'absorbància ultraviolada-visible, com ara el detector de longitud d'ona variable (VWD o de díodes en fila (DAD)). També pot ser un detector d'espectrometria de masses (MS) o un detector de fluorescència, etc. S'ha de destacar el detector UV/DAD, ja que és un dels més comuns, senzills, i no destructiu. El feix de radiació que travessa una cubeta de flux continu, a través de la qual circula la fase mòbil procedent de la columna cromatogràfica, és dispersat per mitjà d'una xarxa de difracció fixa, i són recollides simultàniament totes les longituds d'ona dispersades mitjançant una matriu de fotodíodes.

A diferència d'altres tècniques, la HPLC compta amb diversos avantatges:

- Ampli interval d'aplicabilitat i alta precisió en els resultats.
- Fàcil manipulació dels gradients generats a la fase mòbil.
- Alta reproductibilitat en les anàlisis quantitatives.
- Alt poder de separació amb detecció sensible.
- És flexible, automatitzada, i no destructiva.
- No està restringida per la volatilitat o l'estabilitat tèrmica de la mostra.



*Imatge 2. Procés de la cromatografia de líquids.*

### 3. PART EXPERIMENTAL

El treball realitzat al laboratori ha estat avaluar dos sorbents de base sílice, l'Isolute SCX i el Supelclean SAX, tant per separat com combinats entre ells per a l'extracció d'un grup de fàrmacs. Per avaluar-los, es van optimitzar les diferents variables del procés de SPE i per avaluar l'eficàcia es va calcular la recuperació. Es va utilitzar la tècnica d'extracció en fase sòlida (SPE) com a pretractament, i la separació dels anàlits es va dur a terme mitjançant la tècnica HPLC-UV/DAD. Per tant, per realitzar aquests anàlisis, es va dur a terme una optimització de les condicions cromatogràfiques i del procés de SPE.

Es van seleccionar tretze fàrmacs per a l'avaluació dels sorbents. Sis d'aquests eren bàsics, atenolol (ATE), trimetoprima (TRI), metoprolol (MTO), venlafaxina (VEN), ranitidina (RAN) i propranolol (PRO), mentre que set eren àcids, bezafibrat (BEZ), àcid clofibrí (CLO), diclofenac. (DICLO), fenoprofè (FEN), flurbiprofè (FLB), naproxè (NPX) i valsartan (VAL). Aquests fàrmacs es van comprar com a estàndards purs (puresa > 96%) a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

#### 3.1. REACTIUS I PATRONS

##### 3.1.1. REACTIUS UTILITZATS

En la part experimental s'han utilitzat diferents reactius. Aquests reactius es descriuen a la taula 1, indicant les seves propietats, la seva toxicitat i com s'han de manipular correctament.

*Taula 1. Característiques dels reactius utilitzats.*

REACTIUS	PROPIETATS	TOXICITAT	MANIPULACIÓ	UTILITZACIÓ
<b>Aigua ultrapura</b>	Aigua ultrapura proporcionada per un sistema de purificació d'aigua (Millipore, Burlington, Estats Units).	No és tòxic.	Es pot manipular sense utilitzar equips de protecció individual.	Preparació d'una de les fases mòbils. Solvent per a preparar els patrons de la recta de calibratge. Preparació de la mostres d'aigua ultrapura.

<b>Acetonitril (CH<sub>3</sub>CN) HPLC grade</b>	PM: 41,05 g/mol Densitat: 0.781- 0.785 g/cm <sup>3</sup> T. fusió: -48 °C T. ebullició: 82 °C Puresa: ≥ 99.9 % Incolor	Líquid i vapors molt inflamables, nociu en cas d'ingestió, contacte amb la pell o inhalació, provoca irritació ocular greu.	Portar guants, bata, ulleres, màscara de protecció. En cas de ventilació insuficient, portar equip de protecció respiratòria. Ús de campana extractora.	Fase mòbil del cromatògraf.
<b>Metanol (CH<sub>3</sub>OH) HPLC grade</b>	PM: 32 g/mol Densitat: 0.7910-0.7930 g/cm <sup>3</sup> T. fusió: -98 °C T. ebullició: 65 °C Puresa: ≥ 99.9 % Incolor	Líquid i vapor altament inflamables, tòxic en cas d'ingestió, tòxic en contacte amb la pell, tòxic si s'inhala, causa danys als òrgans.	Portar guants, bata, ulleres, màscara de protecció. En cas de ventilació insuficient, portar equip de protecció respiratòria. Ús de campana extractora.	Preparació dels patrons de la recta de calibratge. Durant l'extracció en fase sòlida.
<b>Àcid clorhídric (HCl)</b>	PM: 36,46 g/mol Densitat: 1.19 g/cm <sup>3</sup> Soluble en aigua T. fusió: -28 °C T. ebullició: 50 °C Incolor	És tòxic i corrosiu, provoca cremades greus a la pell i lesions oculars greus, pot irritar les vies respiratòries.	Portar guants, bata, ulleres, màscara de protecció. En cas de ventilació insuficient, portar equip de protecció respiratòria. Ús de campana extractora.	Per ajustar a pH 3 tant la fase mòbil, com les mostres.

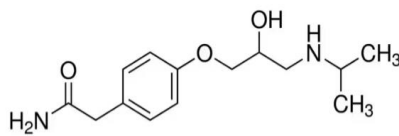
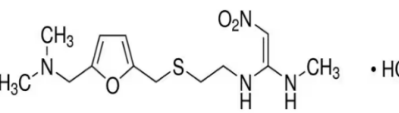
<b>Àcid fòrmic (HCOOH)</b>	PM: 46.03 g/mol Densitat: 1.215 - 1.225 g/cm <sup>3</sup> Soluble en aigua T. fusió: 8 °C T. ebullició: 100.4 °C Puresa: ≥ 95 % Incolor	Líquid i vapor inflamables, nociu per ingestió, provoca cremades greus a la pell i danys als ulls, tòxic si s'inhala.	Portar guants, bata, ulleres, màscara de protecció. En cas de ventilació insuficient, portar equip de protecció respiratòria. Ús de campana extractora.	Preparació d'una solució amb metanol (MeOH amb 5% HCOOH) per a eluir els anàlits durant l'extracció en fase sòlida.
----------------------------	---	---	---	---

<b>Amoníac aq. (NH<sub>4</sub>OH)</b>	PM: 17,03 g/mol Densitat: ~ 0,90 g/cm <sup>3</sup> Soluble en aigua T. fusió: -63 °C T. ebullició: 36 °C Puresa: ≥ 99.9 % Incolor	Provoca cremades greus a la pell i lesions oculars greus, pot irritar les vies respiratòries, molt tòxic per als organismes aquàtics.	Portar guants, bata, ulleres, màscara de protecció. En cas de ventilació insuficient, portar equip de protecció respiratòria. Ús de campana extractora.	Preparació d'una solució amb metanol (MeOH amb 5% NH <sub>3</sub> ) per a eluir els anàlits durant l'extracció en fase sòlida.
---------------------------------------	---	---	---	--

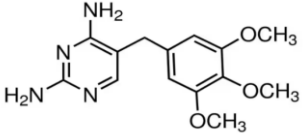
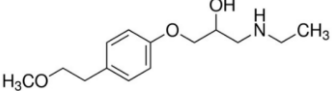
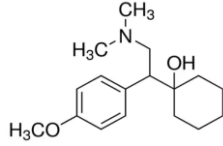
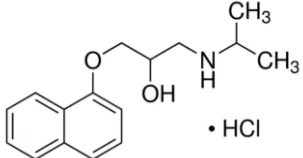
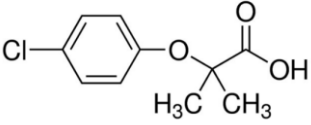
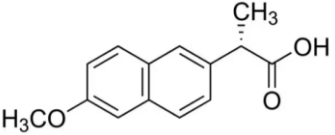
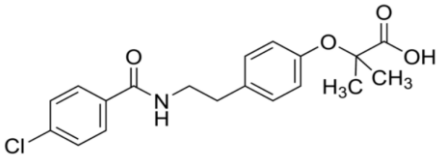
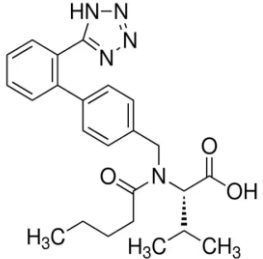
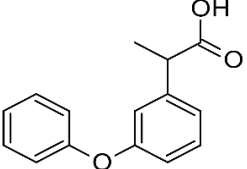
### 3.1.2. PREPARACIÓ DELS PATRONS

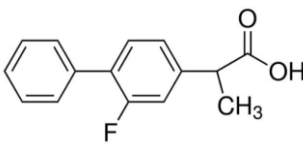
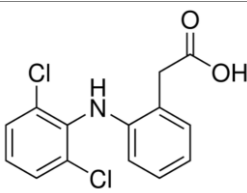
A la taula 2 es descriuen els fàrmacs que s'han analitzat per avaluar els sorbents.

Taula 2. Característiques dels fàrmacs utilitzats.

FÀRMACS	PROPIETATS	pKa	Estructura
<b>Atenolol (ATE)</b>	Puresa: ≥ 98% Naturalesa: Bàsic PM: 266.34 g/mol	9.6	
<b>Ranitidine (RAN)</b>	Puresa: ≥ 96% Naturalesa: Bàsic PM: 350.86 g/mol	8.2	 · HCl



<b>Trimethoprim (TRI)</b>	Puresa: $\geq 99\%$ Naturalesa: Bàsic PM: 290.32 g/mol	7.1	
<b>Metoprolol (MTO)</b>	Puresa: $\geq 98\%$ Naturalesa: Bàsic PM: 253.34 g/mol	9.7	
<b>Venlafaxine (VEN)</b>	Puresa: $\geq 96\%$ Naturalesa: Bàsic PM: 313.86 g/mol	10.1	 • HCl
<b>Propranolol (PRO)</b>	Puresa: $\geq 98\%$ Naturalesa: Bàsic PM: 295.80 g/mol	9.4	 • HCl
<b>Clofibric acid (CLO)</b>	Puresa: $\geq 97\%$ Naturalesa: Àcid PM: 214.65 g/mol	3.2	
<b>Naproxén (NPX)</b>	Puresa: $\geq 96\%$ Naturalesa: Àcid PM: 230.26 g/mol	4.1	
<b>Bezafibrat (BEZ)</b>	Puresa: $\geq 98\%$ Naturalesa: Àcid PM: 361.82 g/mol	3.8	
<b>Valsartan (VAL)</b>	Puresa: $\geq 98\%$ Naturalesa: Àcid PM: 435.52 g/mol	3.6	
<b>Fenoprofen (FEN)</b>	Puresa: $\geq 99\%$ Naturalesa: Àcid PM: 242.27 g/mol	4.5	

<b>Flurbiprofen (FLB)</b>	Puresa: ≥ 98% Naturalesa: Àcid PM: 244.26 g/mol	4.4	
<b>Diclofenac (DICLO)</b>	Puresa: ≥ 98% Naturalesa: Àcid PM: 296.15 g/mol	4.1	

Es preparen les tretze solucions stock d'estàndards individuals en metanol (MeOH) a una concentració de 1000 mg/L a partir d'estàndards sòlids obtinguts de Sigma-Aldrich (puresa > 96%), i s'emmagatzemen a -20 °C. El metanol també ha de ser tipus "HPLC - GOLD - Ultragradient grade".

Després, es preparen 10 mL de solucions de treball de 50 mg/L de concentració d'una barreja de tots els compostos setmanalment en una barreja d'aigua ultrapura i MeOH (50/50, v/v) i s'emmagatzemen a 4 °C en ampolles àmbars a la foscor.<sup>8</sup>

Per preparar la solució de treball, s'afegeixen 500 µL de cadascuna de les solucions stock d'estàndards individuals (1000 mg/L), i s'enrasa amb aigua ultrapura fins a 10 mL. Finalment, queda una solució amb una concentració de 50 mg/L de cada anàlit.

Amb la solució de treball, es preparen els patrons necessaris per obtenir la recta de calibratge. Els patrons es preparen amb una solució de metanol i aigua ultrapura (10/90, v/v). S'utilitzen matrassos de 5 mL.

En primer lloc, s'afegeixen els diferents volums, segons la concentració a obtenir desitjada, de la solució treball de 50 mg/L que conté els tretze anàlits al matràs de 5 mL. Després, s'enrasa cadascun dels patrons amb una solució de metanol i aigua ultrapura (10/90, v/v) fins als 5 mL, com es pot observar a la taula 3. Per exemple, el càlcul per determinar el volum que s'afegeix al patró amb concentració de 5 mg/L seria el següent:

$$5 \text{ mL} \cdot \frac{5 \text{ mg}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1 \text{ L}}{50 \text{ mg}} \cdot \frac{10^6 \mu\text{L}}{1 \text{ L}} = 500 \mu\text{L de la solució treball}$$

La informació sobre els diferents patrons es resumeix a la taula 3.

Taula 3. Patrons de la recta de calibratge.

RECTA DE CALIBRATGE		
CONCENTRACIÓ PATRÓ (mg/L)	VOLUM AFEGIT PATRÓ ( $\mu$ L)	VOLUM FINAL (mL)
0.1	10	5
0.25	25	5
0.5	50	5
1	100	5
2	200	5
5	500	5
10	1000	5

### 3.1.3. PREPARACIÓ DE LES FASES MÒBILS

Es preparen dos solvents per la fase mòbil que es combinen seguint un gradient en els diferents anàlisis. Es pot observar a la imatge 3.

- Fase mòbil A. Es prepara ajustant 1 L d'aigua ultrapura a pH 3. Per ajustar l'aigua ultrapura, s'afegeix un petit volum d'HCl amb una pipeta Pasteur fins a arribar al pH de treball (pH 3). Aquesta fase mòbil s'ha d'anar canviant per tal d'assegurar una separació reproducible i estable dels diferents anàlisis i obtenir uns cromatogrames amb una bona resolució i sensibilitat.
- Fase mòbil B. La fase mòbil B és acetonitril. L'acetonitril ha de ser tipus "HPLC - GOLD - Ultragradient grade" (imatge 4), ja que és necessari que els solvents siguin d'alta qualitat. Aquest tipus de solvents permeten minimitzar l'efecte de gradient del dissolvent implicat, i obtenir una alta resolució i sensibilitat, així com una separació optimitzada de la línia de base dels pics.



Imatge 3. Recipients de la fase mòbil.



Imatge 4. Acetonitril "HPLC Ultragradient".

### 3.1.4. PREPARACIÓ DELS CARTUTXOS D'EXTRACCIÓ

S'avaluen tres sorbents diferents. A la imatge 5 es poden observar els cartutxos utilitzats.

- Si-SCX (Isolute-SCX): és un sorbent de Si enllaçat amb àcid benzensulfònic utilitzat per a l'extracció d'anàlits bàsics de mostres aquoses mitjançant un fort mecanisme de retenció d'intercanvi catiònic. El cartutx es prepara afegint 200 mg de sorbent Isolute SCX.
- Si-SAX (Supelclean-SAX): és un sorbent de Si funcionalitzat amb grups carregats positivament que actuen com a llocs d'intercanvi d'anions. S'utilitza per a l'extracció d'anàlits àcids de mostres aquoses mitjançant un fort mecanisme de retenció d'intercanvi aniónic. El cartutx es prepara afegint 200 mg de Supelclean-SAX.
- Si-SCX/SAX: el cartutx es prepara afegint 100 mg de Isolute-SXC i 100 mg de Supelclean-SAX.



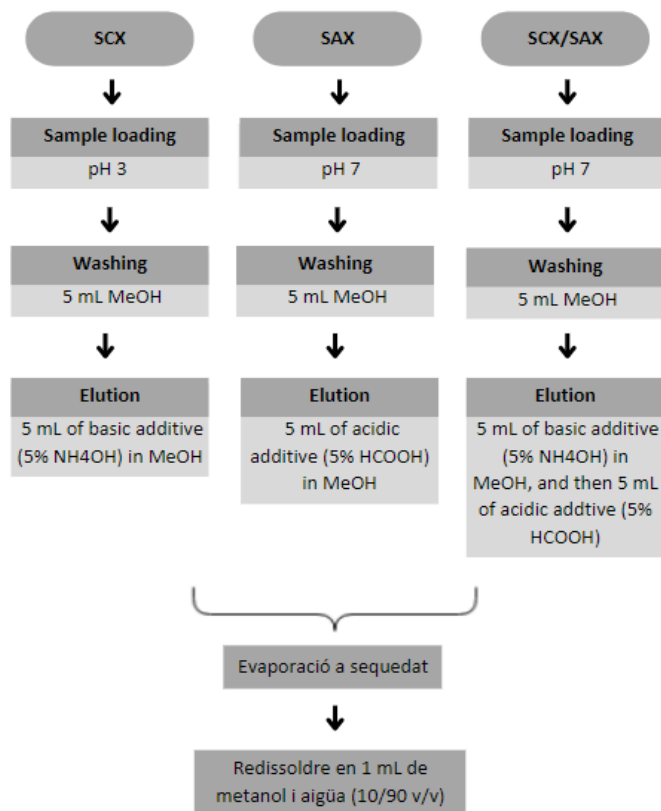
*Imatge 5. Cartutxos dels sorbents per a l'SPE.*

### 3.2. PROCÉS DE L'EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA

Durant la part experimental realitzada al laboratori, s'ha avaluat la tècnica SPE pels tretze fàrmacs (anàlits d'interès) en diferents tipus de mostra.

El tractament d'aquestes mostres s'ha dut a terme mitjançant la tècnica d'extracció en fase sòlida (SPE) utilitzant els dos sorbents (Isolute SCX i Supelclean SAX) per separat, i amb el sorbent combinat (SCX/SAX). Es busca avaluar la capacitat dels sorbents per retenir els diferents anàlits en diferents mostres.

Les condicions del procés d'extracció en fase sòlida es descriuen en la imatge 6. <sup>6</sup>



Imatge 6. Esquema del procés SPE utilitzat.

En primer lloc, es realitza la SPE per les solucions d'aigua ultrapura (un blanc i dues mostres fortificades) a pH 3 i a pH 7 utilitzant els sorbents per separat i a pH 7 per al sorbent combinat. Aquestes solucions es preparen afegint a un matràs de 100 mL un volum determinat de la solució treball (50 mg/L) per fortificar la mostra, enrasant amb aigua ultrapura. La concentració final dels anàlits ha de ser de 5 mg/L en 1 mL, ja que com s'explica a la imatge 6, la mostra s'evapora a sequedat i es redissol en 1 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (10/90, v/v). Si per 1 mL, la concentració d'anàlits en la mostra ha de ser de 5 mg/L, la concentració serà de 0.05 mg/L en 100 mL de mostra.

$$\frac{5 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \cdot 1 \text{ mL} \cdot \frac{1}{0.1 \text{ L}} = 0.05 \text{ mg/L}$$

$$100 \text{ mL mostra} \cdot \frac{0.05 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1000 \text{ mL}}{50 \text{ mg sol. treball}} \cdot \frac{10^3 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 100 \mu\text{L sol. treball}$$

En segon lloc, es realitza el mateix procés per les mostres d'aigua de riu. El volum de mostra també és de 100 mL, i la concentració final dels anàlits també ha de ser de 5 mg/L a les mostres fortificades.

I per últim, per les mostres d'aigua de sortida de la depuradora. El volum de mostra ara és de 50 mL, i la concentració final dels anàlits també ha de ser de 5 mg/L. A les mostres de 50 mL, els anàlits tindran una concentració de 0.1 mg/L.

Tant l'aigua de riu com l'aigua de la depuradora han de ser filtrades prèviament mitjançant un filtre de membrana de Nylon de 0.45 µm (Scharlab). Les mostres d'efluents es van filtrar prèviament amb un filtre de fibra de vidre d'1.2 µm, i seguidament mitjançant un filtre de membrana de Nylon de 0.45 µm.

L'evaporació a sequedat es duu a terme al centrifugador MiVac Pro. El temps que triga a evaporar-se són unes 2-3 hores.

### 3.3. CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES

Es treballa amb cromatografia de líquids en fase invertida. L'instrument es pot veure a la imatge 7.

Per treballar amb cromatografia de líquids (HPLC), és necessari seleccionar la columna cromatogràfica, i optimitzar la fase mòbil, la temperatura, el flux i el tipus d'elució. Les condicions s'obtenen d'un estudi del grup de recerca.<sup>8</sup>

- Columna cromatogràfica: La columna és la Luna Omega Polar C18. Les seves dimensions són 150 x 3 mm, i la mida de partícula és de 5 µm. La fase estacionària té un 100% d'estabilitat aquosa i una selectivitat/retenció millorada per a anàlisis polars sense disminuir la retenció no polar útil. El lligand C18 proporciona interaccions hidrofòbiques.
- Fase mòbil: El solvent A és aigua Milli-Q ajustada a pH 3 amb àcid clorhídric. El solvent B és ACN "HPLC Grade". Els percentatges de volums de fases mòbils utilitzats varien seguint el gradient descrit a la taula 4.
- Tipus d'elució: S'utilitza l'elució en gradient, ja que aquest tipus d'elució permet escurçar el temps de retenció, i consegüentment, el temps d'anàlisi, modificant els percentatges de volum de les fases mòbils utilitzades. El gradient es troba descrit en la taula 4.

Taula 4. Gradient d'elució optimitzat.

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
10	60	40
14	55	45
19	0	100
21	0	100
23	95	5
28	95	5

- Temperatura: La temperatura fixada durant l'anàlisi ha estat de 30°C. S'ha de mantenir una temperatura constant per a què no es produeixin canvis bruscos que poguessin afectar en la separació dels anàlits.
- Flux: S'ha de tenir en compte que el flux està limitat per la pressió del sistema, per tant, el flux depèn de la mida del diàmetre de la columna i de la partícula. Si el diàmetre és major, la pressió serà menor, i el flux es podrà augmentar. Per diàmetres de 4.6 mm, l'interval de flux òptim sol ser entre 0.4 mL/min i 1 mL/min. Finalment, s'ha determinat que el flux ha de ser 0.4 mL/min, ja que així també s'estalvia fase mòbil.



*Imatge 7. Instrument d'HPLC utilitzat.*

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

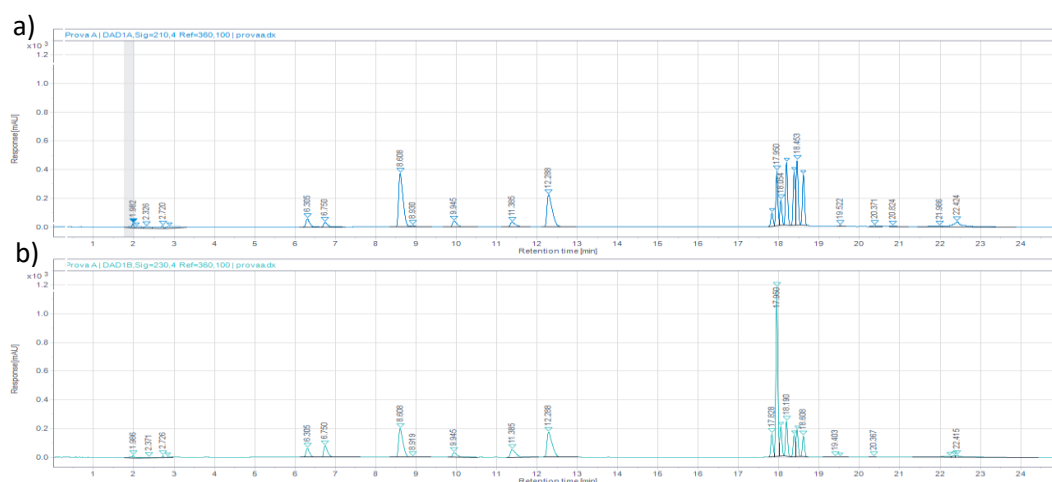
### 4.1. SEPARACIÓ CROMATOGRÀFICA

Abans d'iniciar les anàlisis, s'han d'optimitzar les condicions cromatogràfiques. Les condicions inicials s'obtenen d'un estudi anterior del grup de recerca<sup>8</sup>. El perfil de gradient inicial va començar amb un 5% de B. El % de B es va augmentar al 40% en 10 min, després al 45% en 4 min, i finalment al 100% en 1 min. Després es va mantenir al 100% durant 3 min abans de tornar a les condicions inicials en 2 min, on es va mantenir durant 5 min per estabilitzar la columna. Es pot observar a la taula 5.

Taula 5. Gradient d'elució inicial.

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
10	60	40
14	55	45
15	0	100
18	0	100
20	95	5
25	95	5

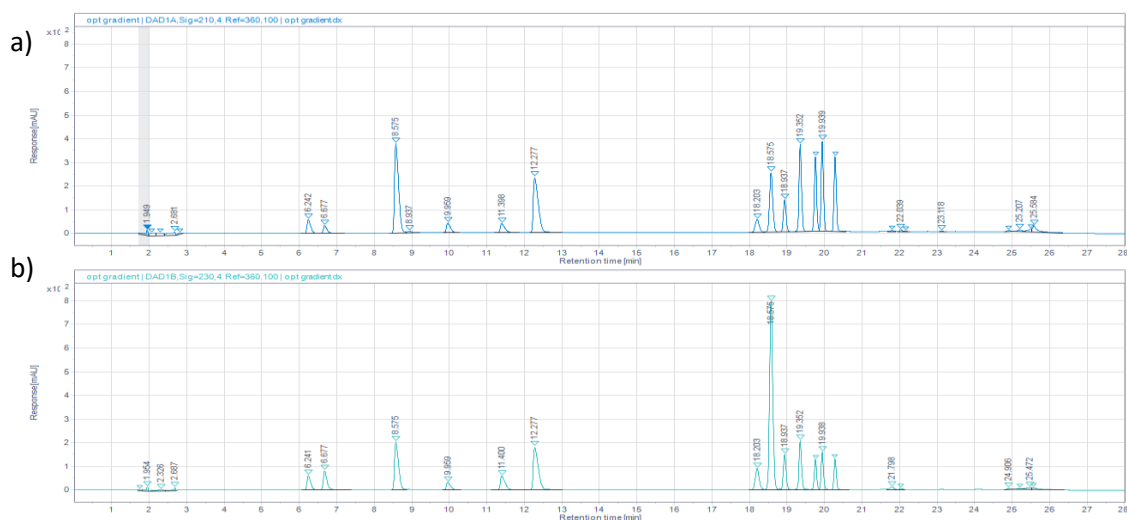
Seguint aquest gradient, els pics d'alguns fàrmacs de naturalesa àcida surten desdoblats i no es veuen clarament. Per això, es modifica el gradient. A la imatge 8, es veuen els cromatogrames resultant amb el gradient inicial obtinguts a 210 i 230 nm. Els pics que surten entre els 17-19 min surten massa propers i són difícils d'interpretar. A més, hi ha dos pics a 18 min que surten desdoblats. Per això s'amplia el temps entre 14 i 19 min per passar al 100% de solvent B. El nou gradient modificat es troba a la taula 4.



Imatge 8. Cromatograma resultant d'un patró amb el gradient sense optimitzar: a) 210 nm i b) 230 nm



Seguint el nou gradient modificat, s'aconsegueix separar més aquests pics i permet una millor identificació dels compostos. El cromatograma corresponent al nou gradient es pot observar a la imatge 9.



Imatge 9. Cromatogrames resultants d'un patró amb el gradient optimitzat: a) 210 nm i b) 230 nm

Tenint els pics cromatogràfics ja ben separats, es van injectar per separat els anàlits en una concentració de 5 mg/L per identificar-los i obtenir els temps de retenció. Els temps de retenció es troben recollits a la taula 6, així com també la longitud d'ona d'adquisició de cada compost.

Taula 6. Temps de retenció dels anàlits.

Naturalesa	Anàlits	tR (min)	$\lambda$ (nm)
Bases	ATE	6,241	230
	RAN	6,677	230
	TRI	8,575	210
	MTO	9,959	210
	VEN	11,400	230
	PRO	12,277	210
Àcids	CLO	18,203	230
	NPX	18,575	230
	BEZ	18,937	230
	VAL	19,352	210
	FEN	19,756	210
	FLB	19,939	210
	DICLO	20,281	210

## 4.2. RECTA DE CALIBRATGE

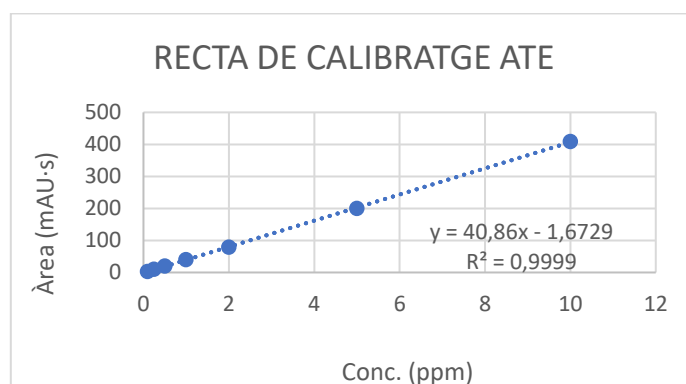
Per la recta de calibratge, es preparen una sèrie de patrons de diferent concentració cadascun. Les concentracions són 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10 mg/L. Mitjançant les àrees i les diferents concentracions de cadascun dels anàlits, s'obtenen els gràfics amb la seva corresponent equació de la recta i el coeficient de determinació ( $R^2$ ).

A la taula 7 es descriuen el pendent i l'ordenada d'origen de cadascun dels anàlits. Amb les diferents equacions, es pot calcular la concentració dels anàlits en els anàlisis de les mostres, ja que obtenim l'àrea gràcies a la quantificació per HPLC-UV/DAD.

Taula 7. Resultats de la recta de calibratge dels patrons.

ANÀLIT	PENDENT	ORDENADA ORIGEN	$R^2$
ATE	40.86	-1.6729	0.9999
RAN	53.69	-5.7531	0.9996
TRI	283.97	-13.055	0.9999
MTO	31.416	-2.1427	0.9999
VEN	47.714	-3.38	0.9998
PRO	214.77	-19.97	0.9996
CLO	66.716	-2.4807	0.9999
NPX	477.09	-3.1785	1
BEZ	76.948	-2.8399	0.9999
VAL	163.83	14.13	0.9997
FEN	136.13	12.934	0.9996
FLB	164.89	0.3934	0.9999
DICLO	134.17	0.7331	0.9999

A la imatge 10 es pot veure com a exemple la recta de calibratge de l'atenolol.



Imatge 10. Recta de calibratge de l'atenolol.

### 4.3. OPTIMITZACIÓ DE L'EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA

Inicialment, es realitza una extracció en fase sòlida de les mostres a pH 3 i a pH 7. La finalitat és avaluar els sorbents Isolute SCX i Supelclean SAX per separat, i un sorbent combinat dels dos anteriors. Per avaluar aquests sorbents, les mostres, després de ser tractades, són analitzades al cromatògraf d'HPLC-UV/DAD. A partir de la quantificació dels anàlits d'interès, es calcula la recuperació d'aquests segons el sorbent utilitzat.

Per dur a terme l'extracció amb el sorbent SCX, el pH de treball és 3, tal com s'explica en un estudi anterior realitzat pel grup de recerca<sup>6</sup>. Per tant, els anàlits bàsics estan protonats, és a dir, carregats positivament ( $pK_a > pH$ ), i poden interaccionar amb el sorbent SCX, ja que aquest té  $SO_3^-$  com a grup funcional. L'etapa de neteja es duu a terme amb MeOH pur. Aquests anàlits retinguts s'elueixen utilitzant MeOH amb un 5% de  $NH_4OH$  com a solvent d'elució.

Amb el sorbent SAX, el pH de treball és 7.<sup>6</sup> Per tant, els anàlits àcids estan desprotonats, és a dir, carregats negativament ( $pK_a < pH$ ), i poden interaccionar amb el sorbent SAX, ja que aquest té  $NH_4^+$  com a grup funcional. L'etapa de neteja es duu a terme amb MeOH pur. Aquests anàlits retinguts s'elueixen utilitzant MeOH amb un 5% de HCOOH com a solvent d'elució.

Per últim, amb el sorbent combinat SCX/SAX, el pH de treball és 7. A pH 7, els anàlits àcids estan desprotonats, per tant, poden interaccionar amb la part SAX. En canvi, els anàlits bàsics estan protonats, ja que tenen  $pK_a$  superiors a 7, i per tant, poden interaccionar amb la part SCX del sorbent combinat.

#### 4.3.1. RESULTATS AMB ISOLUT SCX

L'Isolut SCX és un sorbent d'intercanvi catiònic de mode mixt de base sílice. Es tracten mostres d'aigua ultrapura, mostres d'aigua de riu i mostres d'aigua de sortida de depuradora.

L'extracció en fase sòlida amb el sorbent SCX es realitza a pH 3.

Es condiciona el sorbent amb MeOH, es carrega el sorbent amb el medi de treball, es passa el volum de mostra (50 o 100 mL segons el tipus de mostra), s'afegeixen 5 mL de MeOH pur com a solvent de neteja, i per últim, els anàlits s'elueixen amb el solvent d'elució corresponent, en aquest cas 5 mL de MeOH amb un 5 % de  $NH_4OH$ .

#### 4.3.1.1. MOSTRES D'AIGUA ULTRAPURA

Es realitza una prova sense l'etapa de neteja amb MeOH. Es fa una anàlisi per duplicat. Els resultats s'han recollit a la taula 8.

*Taula 8. Recuperacions de la prova per mostres d'aigua ultrapura amb el sorbent SCX a pH 3 sense l'etapa de neteja.*

	Anàlits	R1 (%)	R2 (%)
<b>Bases</b>	<b>ATE</b>	1	1
	<b>RAN</b>	168	171
	<b>TRI</b>	92	95
	<b>MTO</b>	98	101
	<b>VEN</b>	99	102
	<b>PRO</b>	102	105
	<b>Àcids</b>	<b>CLO</b>	0
<b>NPX</b>		0	0
<b>BEZ</b>		7	0
<b>VAL</b>		2	0
<b>FEN</b>		5	0
<b>FLB</b>		8	0
<b>DICLO</b>		11	0

Com es pot observar a la taula 8, només queden retinguts al sorbent SCX els anàlits que són de naturalesa bàsica, ja que l'extracció es realitza a pH 3.

A pH 3, els anàlits de naturalesa bàsica estan protonats, és a dir, tenen càrrega positiva, i per tant, interaccionen amb el sorbent SCX (carregat negativament). Després s'elueixen amb 5 mL de MeOH amb un 5% NH<sub>4</sub>OH.

Es pot veure com les recuperacions dels compostos bàsics són pràcticament totes del 100%, excepte en l'atenolol (ATE) i la ranitidina (RAN). El pic surt desdoblada al cromatograma, ja que els temps de retenció són propers.

En canvi, els anàlits de naturalesa àcida romanen neutres a pH 3, i no estan carregats. Això fa que no interaccionin o gairebé no interaccionin amb el sorbent utilitzat.

Per poder determinar si el pic desdoblada és degut al solvent d'elució, que és el que s'injecta al cromatògraf, es realitza una prova preparant patrons amb una concentració de 5 mg/L, fent servir MeOH amb 5% de NH<sub>4</sub>OH, i MeOH amb 5% d'àcid fòrmic com a solvents. Aquests patrons s'evaporen a sequedat, i es porten a 1 mL amb MeOH/H<sub>2</sub>O (10/90, v/v) com a solvent. Quan s'injecta aquesta solució, els pics queden ben definits, i per tant, a partir d'ara s'evapora el solvent d'elució.

Posteriorment, s'avalua la recuperació de tot el procés (n = 3), incloent l'etapa de neteja i l'evaporació a sequedat. L'etapa de neteja serveix per arrossegar alguns compostos no desitjats que hagin estat retinguts, i l'evaporació a sequedat, per eliminar interferències amb el solvent d'elució (amoníac o àcid fòrmic), i per poder determinar concentracions més baixes. Es redissol en un 1 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (10/90, v/v). Els resultats obtinguts s'expressen a la taula 9.

*Taula 9. Recuperacions obtingudes per mostres d'aigua ultrapura amb el sorbent SCX a pH 3.*

	<b>Anàlits</b>	<b>R1 (%)</b>	<b>R2 (%)</b>	<b>R3 (%)</b>	<b>Mitjana</b>	<b>RSD (%) (n = 3)</b>
<b>Bases</b>	<b>ATE</b>	95	106	113	105	9
	<b>RAN</b>	100	86	90	92	8
	<b>TRI</b>	93	96	84	91	7
	<b>MTO</b>	102	102	97	101	3
	<b>VEN</b>	99	104	93	99	5
	<b>PRO</b>	102	87	78	89	13
<b>Àcids</b>	<b>CLO</b>	25	0	0	8	-
	<b>NPX</b>	0	0	0	0	-
	<b>BEZ</b>	5	0	0	2	-
	<b>VAL</b>	4	0	0	1	-
	<b>FEN</b>	3	0	0	1	-
	<b>FLB</b>	6	0	0	2	-
	<b>DICLO</b>	8	0	0	3	-

Amb aquestes condicions, els pics queden separats i no es desdoblen, i això permet calcular la concentració, i realitzar el càlcul de la recuperació. Els pics dels diferents cromatogrames tenen una bona resolució i sensibilitat.

Les recuperacions dels anàlits bàsics són molt bones, des del 90% al 100%, i la precisió de l'extracció, expressada en la RSD  $\leq$  13.

També podem confirmar que els anàlits àcids no interaccionen amb el sorbent SCX, i per tant, no es recuperen.

#### 4.3.1.2. MOSTRES D'AIGUA DE RIU

Després d'avaluar els sorbents en les mostres d'aigua ultrapura, s'avaluen en mostres reals, com per exemple en aigua de riu o aigua de sortida de la depuradora.

Es treballa a pH 3, amb 100 mL com a volum de mostra, i ja s'incorpora des d'un principi l'etapa de neteja (5 mL de MeOH). Els anàlits s'elueixen amb 5 mL de MeOH amb un 5% de NH<sub>4</sub>OH. El solvent d'elució s'evapora com s'ha explicat abans.

L'anàlisi es duu a terme per duplicat, per tant, no es pot calcular la RSD (%).

L'anàlisi inclou un blanc i dues mostres fortificades d'una concentració de 0.05 mg/L de la solució de treball (conté els fàrmacs amb una concentració de 50 mg/L). Al blanc es mira si hi ha algun dels fàrmacs que pugui afectar al càlcul de la recuperació, però no hi ha cap coincidència en els temps de retenció.

Els resultats es mostren a la taula 10.

*Taula 10. Recuperacions obtingudes per mostres d'aigua de riu amb el sorbent SCX a pH 3.*

	<b>Anàlits</b>	<b>R1 (%)</b>	<b>R2 (%)</b>	<b>Mitjana</b>
<b>Bases</b>	<b>ATE</b>	67	77	72
	<b>RAN</b>	75	78	77
	<b>TRI</b>	79	85	82
	<b>MTO</b>	84	95	89
	<b>VEN</b>	82	91	87
	<b>PRO</b>	80	79	79
<b>Àcids</b>	<b>CLO</b>	0	0	0
	<b>NPX</b>	0	0	0
	<b>BEZ</b>	0	0	0
	<b>VAL</b>	0	0	0
	<b>FEN</b>	0	0	0
	<b>FLB</b>	1	0	0
	<b>DICLO</b>	1	0	0

A la taula 10, s'observen recuperacions amb valors al voltant del 70-80 %, pels anàlits de naturalesa bàsica, com era d'esperar segons estudis<sup>14</sup> realitzats prèviament en el grup de recerca. Comparant amb els resultats, un sorbent polimèric avaluat a l'estudi aconseguix unes recuperacions més elevades i precises.

Si els resultats es comparen amb les recuperacions en les solucions amb aigua ultrapura, es pot veure que han disminuït degut a que la mostra és més complexa, tot i que segueixen sent prou bones.

#### 4.3.1.3. MOSTRES D'AIGUA DE SORTIDA DE DEPURADORA

També s'avaluen els sorbents en mostres d'aigua de depuradora. Les condicions del procés d'extracció en fase sòlida són les mateixes, excepte el volum de mostra. El volum de mostra per les mostres d'aigua de sortida és de 50 mL, per tant, les mostres es fortifiquen en una concentració de 0.1 mg/L. L'anàlisi es realitza per duplicat.

En el blanc, s'observen alguns compostos que coincideixen més o menys amb els temps de retenció. Hi ha coincidències en els temps de retenció de TRI, NPX, VAL, FLB, DICLO. Per calcular la recuperació, s'ha de restar l'àrea de l'anàlit corresponent en el blanc a l'àrea del mateix en la mostra.

A la taula 11, les recuperacions són altes i bones pels compostos de naturalesa bàsica, entorn al 80-100 %. Per les dues mostres, els resultats són repetitius. Com ha succeït anteriorment amb les altres mostres, els fàrmacs de naturalesa àcida no es recuperen, ja que no queden retinguts al sorbent.

*Taula 11. Recuperacions obtingudes per mostres d'aigua de sortida de depuradora amb el sorbent SCX a pH 3.*

	<b>Anàlits</b>	<b>R1 (%)</b>	<b>R2 (%)</b>	<b>Mitjana</b>
<b>Bases</b>	<b>ATE</b>	78	88	83
	<b>RAN</b>	78	94	86
	<b>TRI</b>	94	96	95
	<b>MTO</b>	99	102	101
	<b>VEN</b>	91	99	95
	<b>PRO</b>	75	79	77
<b>Àcids</b>	<b>CLO</b>	0	0	0
	<b>NPX</b>	0	0	0
	<b>BEZ</b>	0	0	0
	<b>VAL</b>	0	0	0
	<b>FEN</b>	0	0	0
	<b>FLB</b>	0	0	0
	<b>DICLO</b>	0	0	0

### 4.3.2. RESULTATS AMB SUPELCLEAN SAX

Supelclean SAX és un sorbent d'intercanvi aniònic de mode mixt de base sílice. Es tracten mostres d'aigua ultrapura, mostres d'aigua de riu i mostres d'aigua de sortida de depuradora, com amb el sorbent Isolute SCX.

Les condicions en el procés de SPE són les emprades amb el sorbent Isolute SCX, excepte que es treballa a pH 7 com s'ha comentat anteriorment., s'utilitza el MeOH amb un 5% d'HCOOH com a solvent d'elució per eluir els compostos d'interès en les anàlisis a pH 7. El HCOOH neutralitza els anàlits àcids i trenca la interacció electrostàtica.

#### 4.3.2.1. MOSTRES D'AIGUA ULTRAPURA

De la mateixa manera que amb el sorbent SCX, es fa una anàlisi per duplicat, és a dir, un blanc i dues mostres fortificades d'una concentració de 0.05 mg/L, ja que el volum de mostra és de 100 mL.

A la taula 12, es pot veure com les recuperacions tenen valors al voltant del 90-100%. En canvi, els anàlits de naturalesa bàsica romanen neutres a pH 7, i no estan carregats. Això fa que no interaccionin o gairebé no interaccionin amb el sorbent utilitzat. A més, la precisió és alta, ja que s'observen uns valors de % RSD  $\leq 12$  pels compostos àcids.

*Taula 12. Recuperacions obtingudes per mostres d'aigua ultrapura amb el sorbent SAX a pH 7.*

	Anàlits	R1 (%)	R2 (%)	R3 (%)	Mitjana	RSD (%)
<b>Bases</b>	<b>ATE</b>	0	0	0	0	-
	<b>RAN</b>	0	0	0	2	-
	<b>TRI</b>	0	0	0	0	-
	<b>MTO</b>	0	0	0	0	-
	<b>VEN</b>	0	0	0	0	-
	<b>PRO</b>	3	2	2	2	-
<b>Àcids</b>	<b>CLO</b>	90	102	91	94	7
	<b>NPX</b>	82	96	87	88	8
	<b>BEZ</b>	91	105	103	99	7
	<b>VAL</b>	82	93	84	86	7
	<b>FEN</b>	92	106	93	97	8
	<b>FLB</b>	92	107	86	95	11
	<b>DICLO</b>	91	109	89	96	12



#### 4.3.2.2. MOSTRES D'AIGUA DE RIU

En observar els resultats esperats en l'extracció dels fàrmacs àcids en les solucions d'aigua ultrapura, es vol avaluar la recuperació d'aquests fàrmacs en mostres reals, tal i com es fa amb el sorbent d'intercanvi catiònic.

Les condicions del procés d'extracció són les mateixes. L'anàlisi es du a terme per duplicat.

Hem de tenir en compte, que en ser una mostra real, hi pot haver alguns dels compostos a determinar, presents en la seva composició. Per tant, es mira el cromatograma resultant del blanc per saber si hi ha coincidències en els temps de retenció.

Els resultats es troben representats a la taula 13.

*Taula 13. Recuperacions obtingudes per mostres d'aigua de riu amb el sorbent SAX a pH 7.*

	<b>Anàlits</b>	<b>R1 (%)</b>	<b>R2 (%)</b>	<b>Mitjana</b>
<b>Bases</b>	<b>ATE</b>	0	0	0
	<b>RAN</b>	0	0	0
	<b>TRI</b>	0	0	0
	<b>MTO</b>	0	0	0
	<b>VEN</b>	0	0	0
	<b>PRO</b>	3	2	2
<b>Àcids</b>	<b>CLO</b>	0	0	0
	<b>NPX</b>	5	4	4
	<b>BEZ</b>	3	0	2
	<b>VAL</b>	87	81	84
	<b>FEN</b>	0	0	0
	<b>FLB</b>	4	2	3
	<b>DICLO</b>	8	7	7

Com es pot observar a la taula 13, no s'obtenen bons resultats en les recuperacions, ja que només es recupera en un 84% el valsartan. Aquesta disminució en les recuperacions pot ser degut a la presència d'àcids húmics i fúlvics en la composició de l'aigua del riu, i deuen impossibilitar la retenció dels anàlits.

S'ha intentat explicar el cas del valsartan, però observant la seva estructura i les seves propietats, no hi ha cap evidència clara. Una altra opció és la presència a la mostra d'un altre compost que s'elueix al mateix temps de retenció del valsartan.

Com s'ha explicat anteriorment, les recuperacions són més altes i precises si s'utilitza un sorbent polimèric.<sup>14</sup>

#### 4.3.2.3. MOSTRES D'AIGUA DE SORTIDA DE DEPURADORA

L'anàlisi es duu a terme per duplicat. En les mostres d'aigua de sortida de depuradora, el volum de mostra es disminueix a 50 mL, ja que la mostra és molt més complexa.

*Taula 14. Recuperacions obtingudes per mostres d'aigua de sortida de depuradora amb el sorbent SAX a pH 7.*

	<b>Anàlits</b>	<b>R1 (%)</b>	<b>R2 (%)</b>	<b>Mitjana</b>
<b>Bases</b>	<b>ATE</b>	0	0	0
	<b>RAN</b>	0	0	0
	<b>TRI</b>	0	2	0
	<b>MTO</b>	0	0	0
	<b>VEN</b>	8	8	0
	<b>PRO</b>	0	2	1
<b>Àcids</b>	<b>CLO</b>	6	6	6
	<b>NPX</b>	3	4	4
	<b>BEZ</b>	3	4	3
	<b>VAL</b>	97	94	96
	<b>FEN</b>	0	0	0
	<b>FLB</b>	2	3	3
	<b>DICLO</b>	9	10	10

A la taula 14, s'observa pràcticament el mateix que en l'aigua de riu. Només es recupera el valsartan al 96%. L'aigua de sortida de depuradora deu tenir una alta composició de compostos orgànics que inhibeixen la interacció del sorbent amb els anàlits d'interès. Hi ha un problema similar al que tenen les mostres d'aigua de riu. Per tant, aquest tipus de sorbent no és eficient per extreure els compostos àcids.

#### 4.3.3. SCX/SAX COMBINAT

L'últim sorbent a avaluar és la combinació entre l'Isolut-SCX i el Supelclean-SAX. Aquesta combinació ha de ser capaç de retenir tots els anàlits d'interès sobre el paper a un pH de treball òptim.

Les condicions són les mateixes que s'utilitzen amb els sorbents per separat, però en l'etapa de l'elució, es fan servir els dos solvents d'elució, tant el MeOH amb un 5% de NH<sub>4</sub>OH com el MeOH amb un 5% d'HCOOH. Els volum de mostra segueixen sent els

mateixos depenent del tipus de mostra. Inicialment, es prova avaluar tant a pH 3 com a pH 7.

#### 4.3.3.1. MOSTRES D'AIGUA ULTRAPURA

Primerament, es duen a terme dos anàlisis de prova per determinar el pH òptim de treball, un a pH 3 i un a pH 7. Les condicions del procés SPE són 100 mL de mostra, neteja amb 5 mL de MeOH pur, i elució amb 5 mL de MeOH amb un 5% de NH<sub>4</sub>OH i 5 mL de MeOH amb un 5% d'HCOOH. Les mostres també s'evaporen a sequedat, i es redissolen en una solució de MeOH/H<sub>2</sub>O (10/90, v/v).

A la taula 15 es poden observar els resultats a pH 3.

*Taula 15. Recuperacions obtingudes de la prova per mostres d'aigua ultrapura amb el sorbent SCX/SAX a pH 3, primer eluint amb MeOH amb 5% de NH<sub>4</sub>OH, i després amb MeOH amb 5% d'HCOOH.*

		Elució MeOH amb 5% NH <sub>4</sub> OH	Elució MeOH amb 5% HCOOH
	Anàlits	R1 (%)	R1 (%)
<b>Bases</b>	ATE	105	0
	RAN	89	0
	TRI	96	2
	MTO	103	0
	VEN	102	0
	PRO	94	4
<b>Àcids</b>	CLO	6	0
	NPX	1	1
	BEZ	5	0
	VAL	80	32
	FEN	0	4
	FLB	2	6
	DICLO	7	5

Els resultats mostren que els anàlits bàsics interaccionen amb el sorbent combinat, donant altes recuperacions, però els anàlits àcids no queden retinguts excepte el valsartan, tal i com ja ha passat en l'avaluació individual dels sorbents.

A la taula 16 es mostren els resultats de la prova a pH 7.

Taula 16. Recuperacions obtingudes de la prova per mostres d'aigua ultrapura amb el sorbent SCX/SAX a pH 7, primer eluint amb MeOH amb 5% de NH<sub>4</sub>OH, i després amb MeOH amb 5% d'HCOOH.

	Anàlits	Elució	Elució	Elució	Elució	Mitjana
		MeOH amb 5% NH <sub>4</sub> OH	MeOH amb 5% HCOOH	MeOH amb 5% NH <sub>4</sub> OH	MeOH amb 5% HCOOH	
		R1 (%)	R1(%)	R2 (%)	R2 (%)	
<b>Bases</b>	ATE	100	0	107	0	104
	RAN	82	0	77	0	80
	TRI	92	0	95	0	94
	MTO	98	0	105	0	101
	VEN	100	0	103	0	101
	PRO	84	0	72	0	78
<b>Àcids</b>	CLO	0	75	82	0	78
	NPX	0	75	89	0	82
	BEZ	0	79	90	0	85
	VAL	1	82	63	31	89
	FEN	0	72	90	0	81
	FLB	0	69	90	0	79
	DICLO	1	67	89	0	79

A la taula 16, a la primera extracció, els anàlits bàsics es recuperen de manera exitosa, amb recuperacions al voltant del 80-100%, i els anàlits àcids, amb recuperacions de 70-80%. Per confirmar els resultats, es duu a terme una segona extracció.

A la primera extracció es recuperen bé, però a la segona s'elueixen tots amb el MeOH amb 5% de NH<sub>4</sub>OH, excepte el valsartan que s'acaba d'eluir amb el MeOH amb 5% d'HCOOH. Com s'ha comentat abans, no hi ha cap evidència que diferenciï el comportament del valsartan respecte els altres compostos.

Observant el resultats, es duu a terme l'extracció d'un blanc i dues mostres fortificades d'una concentració de 0.05 mg/L de la solució de treball. Les condicions del procés de SPE són les mateixes però, aquest cop, canviant el mode d'eluir els compostos. Els compostos s'elueixen primer amb 5 mL de MeOH amb 5% de NH<sub>4</sub>OH, després amb 2 mL del mateix solvent d'elució. I per últim, amb 3 mL del mateix solvent. Es treballa a pH 7, i el volum de mostra és 100 mL. Els resultats es troben recollits a la taula 17.

Taula 17. Recuperacions obtingudes per mostres d'aigua ultrapura amb el sorbent SCX/SAX a pH 7, eluint amb MeOH amb 5% de NH<sub>4</sub>OH.

Anàlits	5 mL solvent elució		Mitjana
	R1 (%)	R2 (%)	
ATE	123	120	121
RAN	111	107	109
TRI	109	105	107
MTO	127	123	125
VEN	117	110	113
PRO	96	88	92
CLO	0	0	0
NPX	1	1	1
BEZ	0	0	0
VAL	33	21	27
FEN	0	0	0
FLB	0	0	0
DICLO	2	2	2

A la taula 18, només apareixen els resultats pels 5 mL de MeOH amb 5% de NH<sub>4</sub>OH, ja que no s'elueixen més afegint més quantitat de solvent.

Els anàlits bàsics es recuperen al 100%. Els anàlits àcids no interaccionen, i per tant, no es recuperen, excepte el Valsartan, que es recupera en un 27%.

També es prova canviar l'ordre d'elució. Primer, eluir amb MeOH amb 5% d'HCOOH i després eluir amb MeOH amb 5% de NH<sub>4</sub>OH.

Observant la taula 18, les recuperacions són altes (80-100%) pels compostos bàsics, però pels compostos àcids són més baixes (per sota del 50%), excepte pel valsartan, que es recupera en un 77%.

Taula 18. Recuperacions obtingudes per mostres d'aigua ultrapura amb el sorbent SCX/SAX a pH 7, eluint amb MeOH amb 5% d'HCOOH i després amb MeOH amb 5% de NH<sub>4</sub>OH.

	Anàlits	Elució	Elució	Elució	Elució	Mitjana
		MeOH amb 5% HCOOH	MeOH amb 5% NH <sub>4</sub> OH	MeOH amb 5% HCOOH	MeOH amb 5% NH <sub>4</sub> OH	
		R1 (%)	R1(%)	R2 (%)	R2 (%)	
<b>Bases</b>	ATE	0	95	0	93	94
	RAN	0	71	0	75	73
	TRI	2	84	5	80	85
	MTO	0	89	8	86	92
	VEN	0	93	9	91	96
	PRO	3	76	5	79	81
<b>Àcids</b>	CLO	42	0	25	0	33
	NPX	55	0	36	0	46
	BEZ	46	0	29	0	37
	VAL	82	1	71	1	77
	FEN	48	0	32	0	40
	FLB	53	0	35	0	44
	DICLO	61	0	40	0	51

Finalment, es fa l'anàlisi (n = 3) tornant a l'ordre d'elució inicial (primer amb NH<sub>4</sub>OH, i després amb HCOOH). Els resultats es mostren a la taula 19.

Taula 19. Recuperació final obtinguda per mostres d'aigua ultrapura amb el sorbent SCX/SAX a pH 7.

	Anàlits	Mitjana (%)	Desv. Est.	RSD (%)
<b>Bases</b>	ATE	92	5	5
	RAN	74	3	4
	TRI	80	3	3
	MTO	89	3	3
	VEN	92	4	4
	PRO	64	7	11
<b>Àcids</b>	CLO	50	13	26
	NPX	60	12	19
	BEZ	53	14	26
	VAL	89	5	5
	FEN	55	14	26
	FLB	59	15	25
	DICLO	66	14	21

Les recuperacions envers les bases són bones, excepte en el propranolol (64%). A més, la % RSD és baixa per a tots els anàlits bàsics, per tant, hi ha repetibilitat en els resultats.

Les recuperacions envers els àcids són més baixes (50-60%) excepte pel valsartan (89%). Aquí, la % RSD té uns valors més alt, per la qual cosa el procés presenta menys precisió.

#### 4.3.3.2. MOSTRES D'AIGUA DE RIU

S'analitza una mostra d'aigua de riu (n = 2). Es mantenen les mateixes condicions emprades amb les mostres d'aigua ultrapura. Aquesta anàlisi inclou un blanc i dues mostres fortificades d'una concentració de 0.05 mg/L de la solució de treball.

Els resultats obtinguts es mostren a la taula 20. Al blanc no s'observa la presència de cap dels fàrmacs d'interès, ja que no hi ha coincidències en els temps de retenció.

*Taula 20. Recuperacions obtingudes per mostres d'aigua de riu amb el sorbent SCX/SAX a pH 7.*

	Anàlits	Elució	Elució	Elució	Elució	Mitjana
		MeOH amb 5% NH <sub>4</sub> OH	MeOH amb 5% HCOOH	MeOH amb 5% NH <sub>4</sub> OH	MeOH amb 5% HCOOH	
		R1 (%)	R1(%)	R2 (%)	R2 (%)	
<b>Bases</b>	ATE	42	0	42	0	42
	RAN	48	0	25	0	37
	TRI	56	0	54	0	55
	MTO	76	0	73	0	74
	VEN	71	0	69	0	70
	PRO	64	4	60	0	64
<b>Àcids</b>	CLO	0	0	0	0	0
	NPX	2	0	2	0	2
	BEZ	0	0	0	0	0
	VAL	5	0	2	0	4
	FEN	0	0	0	0	0
	FLB	1	0	1	0	1
	DICLO	0	0	2	0	1

A la taula 20 s'observa que només queden retinguts els anàlits bàsics, i es recuperen amb uns valors no massa alts. Per exemple, l'atenolol i la ranitidina tenen una recuperació inferior al 50%, ja que la mostra és molt més complexa i hi ha més interferències que impossibiliten la interacció amb el sorbent.

Els anàlits àcids no s'elueixen segurament degut a la presència d'àcids húmics i fúlvics presents en la composició de l'aigua de riu, com ja passava en els resultats obtinguts amb el sorbent individual SAX.

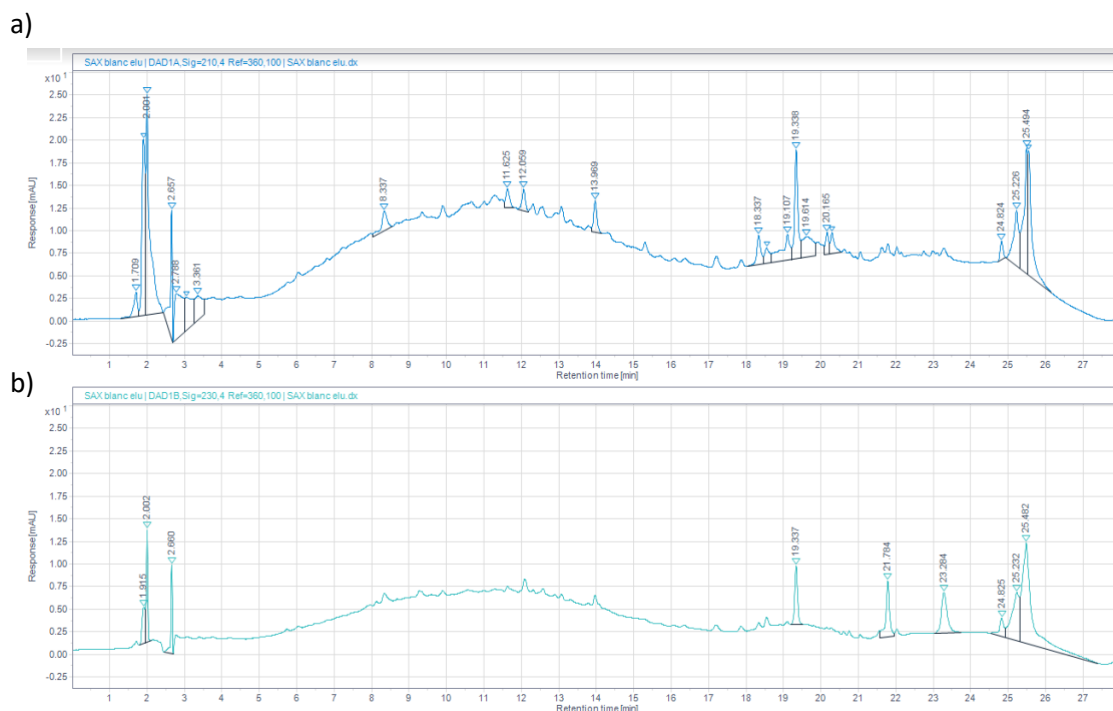
També es veu que el MeOH amb un 5% d'HCOOH no elueix pràcticament cap compost.

A un estudi<sup>8</sup> del grup de recerca, els anàlits àcids tampoc quedaven retinguts amb un sorbent combinat de base sílice.

#### 4.3.3.3. MOSTRES D'AIGUA DE SORTIDA DE DEPURADORA

S'analiza una mostra d'aigua de sortida de la depuradora (n = 2). Aquesta anàlisi inclou un blanc i dues mostres fortificades amb una concentració de 0.1 mg/L de la solució de treball, ja que el volum de mostra en les mostres de depuradora és de 50 mL, com ja s'ha explicat anteriorment.

A la imatge 11 es pot observar als cromatogrames realitzats a 210 nm i 230 nm, com en el blanc, els temps de retenció d'alguns compostos coincideixen, però amb molt poc senyal. El pic més significatiu és el que coincideix amb el temps de retenció del propranolol (12.3), o el pic que coincideix amb el temps de retenció del valsartan (19.3).



Imatge 11. Cromatogrames resultants del blanc de les mostres d'aigua de sortida de depuradora extretes amb el sorbent SCX/SAX. a) 210 nm b) 230 nm



Els resultats obtinguts es mostren a la taula 21.

Taula 21. Recuperacions obtingudes per mostres d'aigua de sortida de depuradora amb el sorbent SCX/SAX a pH 7.

	Anàlits	Elució	Elució	Elució	Elució	Mitjana
		MeOH amb 5% NH <sub>4</sub> OH	MeOH amb 5% HCOOH	MeOH amb 5% NH <sub>4</sub> OH	MeOH amb 5% HCOOH	
		R1 (%)	R1(%)	R2 (%)	R2 (%)	
<b>Bases</b>	ATE	59	0	55	0	57
	RAN	58	0	65	0	61
	TRI	76	0	79	0	78
	MTO	71	0	57	0	64
	VEN	48	0	56	0	52
	PRO	55	0	59	0	57
<b>Àcids</b>	CLO	24	0	0	0	12
	NPX	20	0	3	0	11
	BEZ	0	0	0	0	0
	VAL	0	0	54	0	27
	FEN	0	0	0	0	0
	FLB	2	0	1	0	1
	DICLO	4	0	3	0	4

A la taula 22, si s'observen els valors, apareixen unes recuperacions entorn al 50% en la majoria dels anàlits bàsics, excepte en el trimetoprim, que és més alta (78%).

Com ha passat amb les altres mostres, els anàlits àcids tenen una gran dificultat per interaccionar amb el sorbent. La mostra és molt complexa, i pot haver-hi compostos orgànics que impedeixin aquesta interacció, i per tant, aquests tipus de sorbents són adequats per extreure compostos bàsics, però no per compostos àcids.

#### 4.3.4. COMPARACIÓ DE RESULTATS

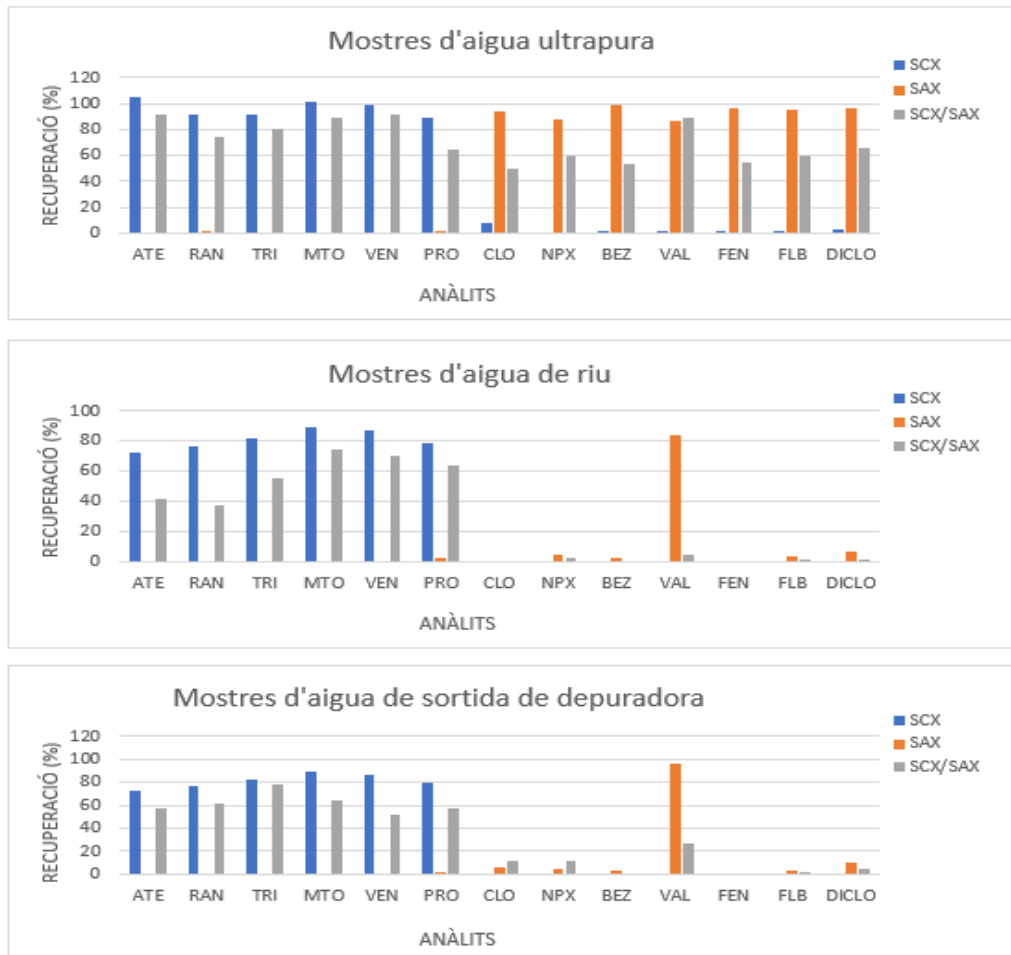
A la imatge 12, podem observar uns gràfics que representen la relació entre les recuperacions dels diferents fàrmacs per part dels diferents sorbents segons el tipus de mostra que s'analitza.

A les mostres d'aigua ultrapura, els sorbents individuals SCX i SAX presenten unes recuperacions altes respecte els anàlits bàsics i àcids, respectivament. El sorbent combinat presenta unes recuperacions inferiors respecte l'avaluació individual dels sorbents.

En aigua de riu, el sorbent SCX presenta una alta selectivitat respecte els compostos bàsics, encara que les recuperacions disminueixen respecte les obtingudes en les

solucions d'aigua ultrapura. El sorbent SAX i el sorbent combinat es veuen afectats per la complexitat de la mostra (hi ha compostos que impedeixen la retenció dels compostos àcids).

Respecte les mostres de l'aigua de sortida de la depuradora, els resultats són similars als de l'avaluació dels sorbents en aigua de riu, i amb recuperacions encara més baixes.



Imatge 12. Gràfics de les recuperacions dels anàlits per part dels diferents sorbents utilitzats segons el tipus de mostra.

## 5. CONCLUSIONS

S'ha desenvolupat i optimitzat el procés d'extracció en fase sòlida (SPE) segons els sorbents utilitzats.

S'ha desenvolupat i optimitzat un mètode basat en cromatografia de líquids amb un detector UV (DAD) per a avaluar els sorbents.

Els resultats obtinguts pel sorbent SCX són satisfactoris. Tant per mostres d'aigua ultrapura, de riu o de sortida de la depuradora, les recuperacions dels fàrmacs de naturalesa bàsica són molt altes (80-100%).

Els resultats obtinguts pel sorbent SAX no són satisfactoris. Per mostres d'aigua ultrapura, les recuperacions dels fàrmacs de naturalesa bàsica són molt altes (80-100%). Pel que fa a les mostres d'aigua de riu o de sortida de la depuradora, les recuperacions es veuen afectades.

Els resultats obtinguts pel sorbent combinat SCX/SAX no són gaire precisos en els anàlisis de naturalesa àcida.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- (1) Taheran, M.; Naghdi, M.; Brar, S. K.; Verma, M.; Surampalli, R. Y. Emerging Contaminants: Here Today, There Tomorrow! *Environ Nanotechnol Monit Manag* 2018, *10*, 122–126. <https://doi.org/10.1016/J.ENMM.2018.05.010>.
- (2) Pedrouzo, M.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marcé, R. M. Presence of Pharmaceuticals and Hormones in Waters from Sewage Treatment Plants. *Water Air Soil Pollut* 2011, *217* (1–4), 267–281. <https://doi.org/10.1007/S11270-010-0585-8/METRICS>.
- (3) Lacey, C.; McMahon, G.; Bones, J.; Barron, L.; Morrissey, A.; Tobin, J. M. An LC–MS Method for the Determination of Pharmaceutical Compounds in Wastewater Treatment Plant Influent and Effluent Samples. *Talanta* 2008, *75* (4), 1089–1097. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2008.01.011>.
- (4) Sammani, M. S.; Clavijo, S.; Cerdà, V. Recent, Advanced Sample Pretreatments and Analytical Methods for Flavonoids Determination in Different Samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2021, *138*, 116220. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2021.116220>.
- (5) Gilart, N.; Miralles, N.; Marcé, R. M.; Borrull, F.; Fontanals, N. Novel Coatings for Stir Bar Sorptive Extraction to Determine Pharmaceuticals and Personal Care Products in Environmental Waters by Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chim Acta* 2013, *774*, 51–60. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2013.03.010>.
- (6) Fontanals, N.; Borrull, F.; Marcé, R. M. Overview of Mixed-Mode Ion-Exchange Materials in the Extraction of Organic Compounds. *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V. June 22, 2020, pp 89–107. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.053>.
- (7) Douša, M.; Sikač, Z.; Halama, M.; Lemr, K. HPLC Determination of Lincomycin in Premixes and Feedstuffs with Solid-Phase Extraction on HLB OASIS and LC–MS/MS Confirmation. *J Pharm Biomed Anal* 2006, *40* (4), 981–986. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2005.07.041>.
- (8) Moral, A.; Borrull, F.; Furton, K. G.; Kabir, A.; Fontanals, N.; Marcé, R. M. Development of Sol-Gel Silica-Based Mixed-Mode Zwitterionic Sorbents for Determining Drugs in Environmental Water Samples. *J Chromatogr A* 2022, *1676*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463237>.

- (9) Moore, M. A.; Counce, R. M.; Watson, J. S.; Hall, H. The Performance of Two Silica Based Ion Exchange Resins in the Separation of <sup>213</sup>Bi from Its Parent Solution of <sup>225</sup>Ac. *Applied Radiation and Isotopes* 2018, *141*, 68–72. <https://doi.org/10.1016/J.APRADISO.2018.08.020>.
- (10) Irlam, R. C.; Parkin, M. C.; Brabazon, D. P.; Beardah, M. S.; O'Donnell, M.; Barron, L. P. Improved Determination of Femtogram-Level Organic Explosives in Multiple Matrices Using Dual-Sorbent Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography-High Resolution Accurate Mass Spectrometry. *Talanta* 2019, *203*, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.047>.
- (11) Jin, S.; Qiao, Y.; Xing, J. Ternary Mixed-Mode Silica Sorbent of Solid-Phase Extraction for Determination of Basic, Neutral and Acidic Drugs in Human Serum. *Anal Bioanal Chem* 2018, *410* (16), 3731–3742. <https://doi.org/10.1007/S00216-018-1037-3/METRICS>.
- (12) Fontanals, N.; Borrull, F.; Marcé, R. M. Mixed-Mode Ion-Exchange Polymeric Sorbents in Environmental Analysis. *J Chromatogr A* 2020, *1609*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460531>.
- (13) Pedrouzo, M.; Reverté, S.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marcé, R. M. Pharmaceutical Determination in Surface and Wastewaters Using High-Performance Liquid Chromatography-(Electrospray)-Mass Spectrometry. *J Sep Sci* 2007, *30* (3), 297–303. <https://doi.org/10.1002/JSSC.200600269>.
- (14) Salas, D.; Borrull, F.; Fontanals, N.; Marcé, R. M. Combining Cationic and Anionic Mixed-Mode Sorbents in a Single Cartridge to Extract Basic and Acidic Pharmaceuticals Simultaneously from Environmental Waters. *Anal Bioanal Chem* 2018, *410* (2), 459–469. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0736-5>.