



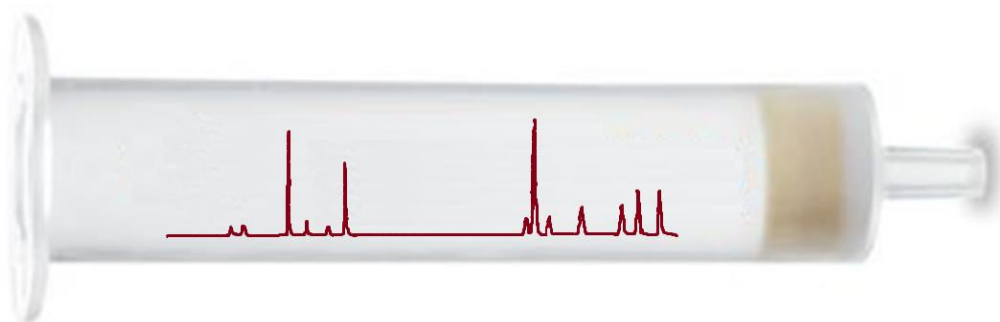
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



Facultat de
Química
Tarragona

Avaluació dels sorbents d'extracció en fase sòlida de mode mixt de base sílice en la determinació de fàrmacs mitjançant cromatografia líquida

Treball de fi de grau



Autor: Pol Clivillé Cabré

Tutora: Rosa Maria Marcé Recasens

Grup: CROMA, Departament Química Analítica i Química Orgànica

Curs: 2020-2021

Agraïments

M'agradaria començar el treball donant les gràcies a aquelles persones que han estat al meu costat durant la realització d'aquest treball. Primerament, agrair a tots els companys del grup, els quals han resolt tots els meus dubtes des del primer dia i m'han acollit al grup fent-me sentir un més. En especial, vull donar les gràcies a l'Alberto per haver-me ajudat a solucionar qualsevol dubte o problema que m'ha sorgit. També, donar les gràcies a la Dra. Rosa Maria Marcé i a la Dra. Núria Fontanals Torroja; la seva ajuda i els seus consells han estat essencials per dur a terme aquest treball.

Resum

La presència de fàrmacs en aigües de rius és un dels problemes d'actualitat en el camp mediambiental. Degut a la baixa concentració amb què es troben aquests compostos en aigua és necessari desenvolupar mètodes sensibles basats en la cromatografia líquida, precedida del tractament de les mostres amb l'objectiu de concentrar-les i/o netejar-ne la matriu.

En aquest treball, s'han avaluat uns sorbents comercials d'extracció en fase sòlida (SPE) de mode mixt amb base sílice per a desenvolupar un mètode per a la determinació d'un conjunt de fàrmacs d'ús habitual en aigües de riu basat en l'extracció SPE i la cromatografia de líquids acoblada a un detector UV. Els nous sorbents s'han avaluat i comparat amb sorbents comercials de mode mixt amb base polimèrica.

Com a resultat principal cal destacar que, tot i la funcionalitat d'alguns dels sorbents de mode mixt amb base sílice per a l'extracció de fàrmacs en mostres d'aigua de riu, el sorbents de mode mixt amb base polimèrica permeten obtenir millors resultats.

Abstract

Nowadays one of the environmental concerns are the presence of some pharmaceutical as contaminants in rivers. As consequence of the lower concentration of this pharmaceuticals in river water it's necessary to develop sensible methods based on the liquid chromatography and the pre-treatment of the samples to concentrate or cleaned up them.

In this project some commercial mixed mode solid phase extraction (SPE) silica sorbents have been evaluated for the development of a method to determine some of the most common pharmaceutical products in river water based on SPE and liquid chromatography coupled with a UV detector. The new sorbents have been evaluated and compared with some mixed mode polymeric sorbents.

The main result of this project is that despite the good results obtained with some silica sorbents, the polymeric sorbents are a better option for the extraction.

Abreviatures

ACN: Acetonitril

ATE: Atenolol

BEZ: Bezafibrat

CLO: Àcid Clofibric

DICLO: Diclofenac

FEN: Fenoprofè

FLB: Flurbiprofè

MTO: Metoprolol

NPX: Naproxè

PRO: Propranolol

P-SAX: Sorbent mode mixt aniònic de base polimèrica

P-SCX: Sorbent mode mixt catiònic de base polimèrica

RAN: Ranitidina

SAX: Strong Anion Exchange

SCX: Strong Cation Exchange

S-SAX: Sorbent mode mixt aniònic de base sílice

S-SCX: Sorbent mode mixt catiònic de base sílice

SPE: Extracció en fase sòlida

TRI: Trimetoprim

VAL: Valsartan

VEN: Venlafaxina

Índex

1.Introducció.....	3
2.Objectius.....	5
3.Fonament teòric.....	6
3.1.Cromatografia.....	6
3.2.Extracció amb fase sòlida.....	6
4.Part Experimental.....	10
4.1.Compostos d'estudi.....	10
4.2.Materials i reactius.....	13
4.3.Instruments i equips.....	16
5.Resultats i discussió.....	17
5.1.Optimització condicions cromatogràfiques.....	17
5.1.1.Separació cromatogràfica.....	17
5.1.2.Condicions del detector.....	18
5.1.3.Validació del mètode cromatogràfic i rectes de calibratge.....	19
5.2.Optimització de l'extracció amb fase sòlida.....	20
5.2.1.Sorbents S-SCX i S-SAX.....	20
5.2.1.1.Selecció condicions de càrrega i elució.....	20
5.2.1.2.Evaporació.....	22
5.2.1.3.Optimització etapa de neteja.....	23
5.2.1.4.Optimització volum de càrrega aigua ultrapura.....	23
5.2.1.5.Selecció filtre extractes.....	25
5.2.1.6.Selecció del volum de càrrega amb aigua de riu.....	26
5.2.2.Comparació amb sorbents polimèrics.....	28
5.2.2.1.Comparació volum de càrrega amb aigua ultrapura.....	28
5.2.2.2.Comparació volum de càrrega amb aigua de riu.....	30

5.2.2.3.Comparació dissolucions de metanol.....	32
5.3.Limitacions.....	34
6.Conclusions.....	35
7.Bibliografia.....	36

1. Introducció

El treball de fi de grau s'ha dut a terme al grup de recerca de Cromatografia i Aplicacions Mediambientals (CROMA) del Departament de Química Analítica i Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili, grup especialitzat en el desenvolupament de nous mètodes cromatogràfics d'anàlisi per donar resposta als reptes relacionats amb la qualitat del medi ambient.

Actualment, una de les problemàtiques més importants en el camp mediambiental és la presència de contaminants emergents en mostres ambientals. Dins el grup de compostos considerats contaminants emergents, es troben els retardants de flama, els pesticides, els fàrmacs, les drogues d'abús, productes d'higiene personal, entre altres.¹ En el grup dels fàrmacs, s'inclouen medicaments d'ús humà, medicaments d'ús veterinari i també drogues d'abús i suplementos nutricionals.²

La principal problemàtica de la presència d'aquests compostos al medi és que aquests compostos són dissenyats perquè siguin bioactius amb un gran ventall d'efectes, nivells d'activitat, dosis i modes d'acció i se'n desconeixen els seus efectes sobre els organismes exposats permanentment i dels efectes dels seus metabòlits.³

Entre les mostres ambientals una de les utilitzades per l'estudi és l'aigua de riu, ja que d'ella s'obté l'aigua potable després del seu tractament en les plantes potabilitzadores.

Els fàrmacs, tal com es pot observar en la Figura 1 poden arribar per moltes vies a les aigües dels rius.

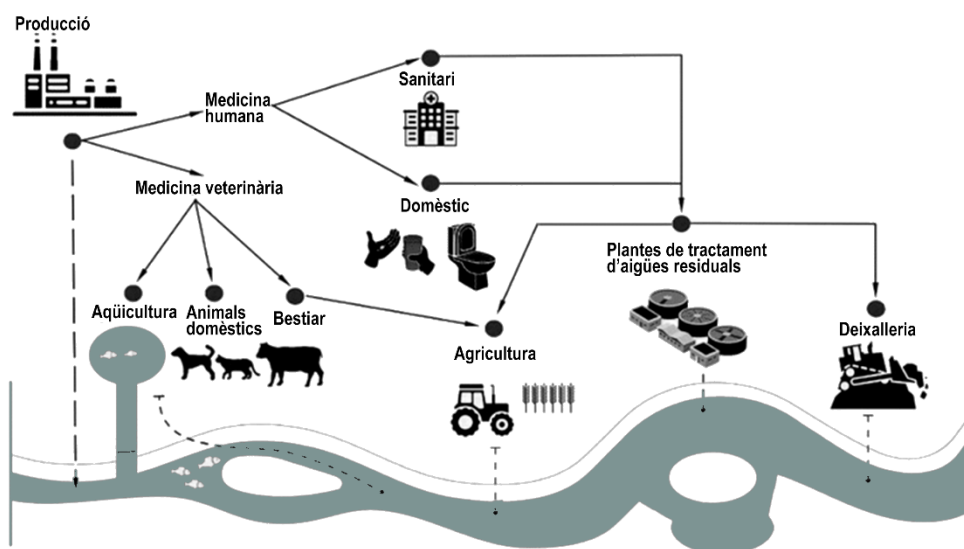


Figura 1. Vies seguides pels fàrmacs per a arribar a les aigües dels rius.⁴

Una de les vies més habituals que segueixen els fàrmacs per arribar a les aigües de riu s'inicia després de ser administrats. Els fàrmacs són adsorbits i metabolitzats per l'organisme, però una part d'aquests no es metabolitza completament i és excretat sense patir cap modificació a través de l'orina, d'aquesta manera arriben a les aigües residuals així com també els seus metabòlits, els quals també poden ser considerats contaminants emergents. Posteriorment, a les aigües residuals, els fàrmacs i alguns dels seus metabòlits no són eliminats completament en les plantes de tractament d'aigües residuals i d'aquesta manera arriben a les aigües de rius⁴⁻⁶. D'altra banda, els fàrmacs també poden arribar a les aigües de rius provinents de la indústria, de l'agricultura i de la ramaderia, com mostra la Figura 1.

Diversos estudis han determinat que les concentracions de fàrmacs en aigües són molt baixes, ja que es troben en concentracions de l'ordre de ng/l o µg/l⁵⁻¹². Tot i les baixes concentracions amb què es troben, alguns autors determinen que aquestes baixes concentracions poden ser suficients per provocar alteracions en el medi aquàtic¹³. Per aquest motiu, són necessaris anàlisis sensibles per a determinar els fàrmacs en les aigües de rius i determinar-ne la concentració.

Degut a les característiques dels fàrmacs, els mètodes analítics més utilitzats per realitzar aquestes determinacions es basen en la cromatografia de líquids acoblada a un detector d'espectrometria de masses (LC-MS o LC-MS/MS)^{9,12}. D'altra banda, tenint en compte les baixes concentracions amb què es troben aquests compostos, és necessari fer un pretractament de les mostres amb l'objectiu de concentrar-les i/o netejar-ne la matriu. La tècnica de tractament de mostra que s'utilitza és l'extracció amb fase sòlida (SPE).^{9,10,12} A part de l'extracció amb fase sòlida, també es pot utilitzar la microextracció amb fase sòlida (SPME)¹⁴, *Stir bar sorptive extraction* (SBSE)¹⁵, *Rotating disk sorptive extraction* (RDSE)¹⁶ o *Capillary microextraction* (CME)¹⁷ com a tècniques de tractament de la mostra, però aquestes s'utilitzen menys que l'extracció amb fase sòlida.

2. Objectius

L'objectiu d'aquest treball és avaluar nous sorbents comercials d'extracció en fase sòlida de mode mixt amb base de sílice en l'extracció d'un conjunt de fàrmacs i la seva posterior determinació mitjançant cromatografia líquida.

Per assolir aquest objectiu, s'optimitzaran les condicions experimentals dels sorbents i els resultats obtinguts es compararan amb els obtinguts per uns sorbents comercials de mode mixt de base polimèrica.

3. Fonament teòric

A continuació s'explica breument el fonament de la cromatografia i de la tècnica d'extracció amb fase sòlida, ja que són les tècniques utilitzades en aquest treball.

3.1 Cromatografia

La cromatografia és la tècnica de separació de compostos químics més utilitzada. Aquesta tècnica es basa en la separació dels compostos mitjançant la distribució dels compostos entre dues fases: la fase estacionària, la qual es troba fixa; i la fase mòbil, la qual passa a través de la fase estacionària. Els compostos presents en la fase mòbil, són separats mitjançant la retenció d'aquests sobre la fase estacionària provocada per forces intramoleculares. En funció de l'estat físic amb què es troba la fase mòbil, es diferencien diferents tipus de cromatografia: cromatografia de líquids i cromatografia de gasos.¹⁸

Pel que fa a la cromatografia de líquids, es poden diferenciar diferents tipus segons l'equilibri que s'estableix. Es pot classificar en cromatografia de partició (LLC)¹⁹, cromatografia iònica (IEC)²⁰, cromatografia d'exclusió per mida (SEC)²¹, cromatografia d'adsorció (LSC), cromatografia d'afinitat (AC)²². La cromatografia de fase invertida, és la més utilitzada. D'altra banda, les parts principals dels equips de cromatografia de líquids són: la columna cromatogràfica, el sistema d'injecció i el detector. Els detectors d'elevada sensibilitat més utilitzats en cromatografia de líquids són espectròmetres de masses²³ o detectors d'absorbància ultraviolada-visible²⁴.

La cromatografia de líquids és una tècnica molt utilitzada per al desenvolupament de mètodes sensibles per a la detecció de diferents compostos en mostres d'aigua^{5,10,12,15,25,26}.

3.2 Extracció amb fase sòlida

La tècnica d'extracció amb fase sòlida és una tècnica de tractament de mostra, utilitzada per a concentrar els analits de les mostres líquides²⁷ i al mateix temps, per netejar la mostra i eliminar les possibles interferències presents en la matriu. El principal avantatge d'aquesta tècnica respecte a altres tècniques d'extracció com SPME, RDSE o SBSE és l'ampli ventall de sorbents comercials amb diferents característiques que permeten fer extraccions molt específiques. A part d'aquest avantatge, l'extracció SPE és molt simple d'utilitzar, permet obtenir molt bons valors de recuperació i requereix poca quantitat de solvents orgànics. Aquests avantatges han fet que aquesta tècnica de tractament de mostra esdevingui una de les més utilitzades.²⁷

Aquesta tècnica es fonamenta en la capacitat dels analits, dissolts en una mostra, d'establir interaccions de tipus hidrofòbic (Van de Walls), polars (pont d'hidrogen) i/o iòniques, amb una fase estacionària anomenada sorbent, depenen del tipus de sorbent i dels analits a determinar.²⁷

Els paràmetres a optimitzar d'aquesta tècnica són: tipus de sorbent, el pH de la mostra, el volum de mostra, el solvent de neteja i el volum de neteja, el solvent d'elució i el seu volum d'elució.

Els sorbents es poden classificar en 3 grans grups: Fase normal; Fase invertida; Intercanvi iònic.²⁷

Els sorbents de fase normal estan formats per grups funcionals polars, per exemple, grups ciano, amino i diols. Aquest sorbents s'utilitzen per a retenir compostos polars.²⁷

Els sorbents de fase invertida, contenen grups funcionals no polars, com per exemple, octadecil, octè i metils, els quals permeten retenir compostos apolars²⁷. D'altra banda, també existeixen sorbents amb característiques lleugerament polars.

Els sorbents d'intercanvi iònic retenen els compostos mitjançant interaccions iòniques. Aquests es poden classificar en sorbents catiónics i aniònics. Els sorbents catiónics, s'utilitzen per retenir compostos carregats positivament, mentre que els sorbents aniònics permeten retenir compostos carregats negativament.²⁷

D'altra banda, recentment s'han desenvolupat els sorbents de mode mixt. Aquests sorbents tenen la capacitat de retenir els compostos mitjançant interaccions de fase invertida i mitjançant interaccions iòniques. Els sorbents de mode mixt es poden classificar en 4 grans grups, en funció del grup d'intercanvi iònic que funcionalitzi el sorbent. Els 4 grans grups són: intercanvi catiónic fort (SCX), intercanvi aniòníc fort (SAX), intercanvi catiónic feble (WCX) i intercanvi aniòníc feble (WAX).^{28,29}

Els sorbents de mode mixt també es poden classificar en funció del material sobre el qual es troben units els grups d'intercanvi iònic. Els més habituals són els sorbents amb base polimèrica tot i que també n'existeixen alguns amb base de sílice.²⁹

Els sorbents de mode mixt amb base polimèrica estan formats per un copolímer que actua de superfície sobre la qual es disposen els grups d'intercanvi iònic, el grup més habitual utilitzat per la preparació dels sorbents SCX són àcids sulfònics, en canvi en els sorbents SAX el grup més habitual són amines quaternàries (Figura 2).

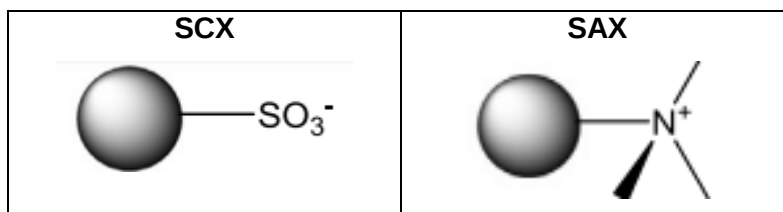


Figura 2. Estructura sorbents polimèrics.²⁸

Aquests sorbents permeten retenir els compostos mitjançant interaccions iòniques i/o mitjançant interaccions fase invertida. Per aquest motiu, tenen una elevada aplicació en el tractament de mostres ambientals i biològiques, ja que permeten fer una extracció molt selectiva de mostres amb una matriu complexa.⁶

D'altra banda, els sorbents de mode mixt amb base sílice combinen grups d'intercanvi iònic i cadenes de C₈ o C₁₈, els quals estableixen simultàniament interaccions iòniques i interaccions de fase invertida. Gràcies a la seva rigidesa, la facilitat de modificació i la seva no reactivitat i expansió enfront dels dissolvents orgànics. En els sorbents SCX, es combinen cadenes de C₈ o C₁₈ (no polars) amb grups SO₃⁻, mentre que en els sorbents SAX, es combinen cadenes de C₈ o C₁₈ amb grups NR₄⁺.²⁹

Mètode d'utilització SPE

La tècnica d'extracció mitjançant SPE consta de varies etapes, representades en la Figura 3^{27,28}. Les etapes són les següents:

- 1) Condicionament del cartutx SPE.** En aquesta etapa, primer es fa passar un dissolvent orgànic pur a través del cartutx i després, es fa passar una dissolució aquosa amb les mateixes condicions de pH amb què s'aplicarà la mostra. La finalitat d'aquesta etapa és activar el sorbent i els seus grups funcionals.
- 2) Càrrega de la mostra.** Aquesta etapa consisteix a aplicar la mostra, el volum del qual s'ha optimitzat prèviament a través del cartutx per tal que els anàlits d'estudi en quedin retinguts. El flux de mostra que passa a través del cartutx acostuma està entorn dels 10 ml/min.
- 3) Neteja.** En aquesta etapa s'utilitza un solvent orgànic, el qual permet eliminar interferències que han quedat retingudes en l'etapa de càrrega. Aquesta etapa és opcional i depèn del tipus de sorbent que s'utilitza.
- 4) Elució.** En aquesta etapa, s'alliberen els compostos retinguts en el sorbent mitjançant un solvent amb una elevada força d'elució.

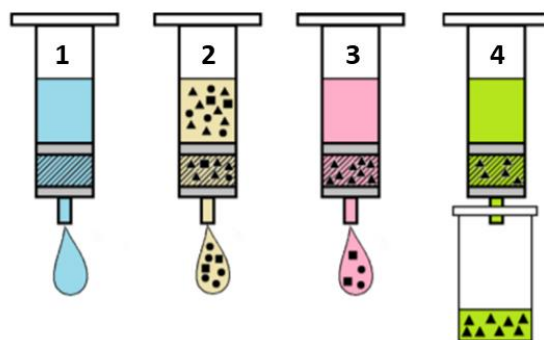


Figura 3. Representació etapes extracció SPE.

En treballar amb sorbents de mode mixt, l'etapa de condicionament dels sorbents es realitza fent passar inicialment metanol pel sorbent i posteriorment una solució aquosa amb el mateix pH que es carregarà la mostra. Per la càrrega dels sorbents SCX la mostra tindrà un pH de 3 perquè els compostos bàsics es trobin en la seva forma protonada i interaccionin amb els grups iònics dels sorbents i en quedin retinguts mitjançant interaccions d'intercanvi catiónic, en canvi, la càrrega dels sorbents SAX es farà amb la mostra a pH 7, perquè els compostos àcids estiguin desprotonats i interaccionin amb els grups iònics dels sorbents perquè quedin retinguts mitjançant interaccions d'intercanvi aniònic. En l'etapa de neteja s'utilitza metanol, el qual permet netejar i eluir els compostos que queden retinguts en el sorbent mitjançant interaccions no iòniques. Finalment l'elució dels compostos retinguts en els sorbents SCX es realitzarà utilitzant un 5% de NH_4OH en metanol. D'altra banda, l'elució dels compostos retinguts en els sorbents SAX es farà utilitzant un 5% d'àcid acètic en metanol ^{28,29}. És treballa amb aquestes condicions per a poder trencar les interaccions iòniques establertes entre els sorbents i els compostos.

4. Part experimental

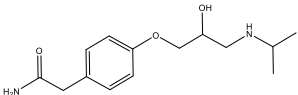
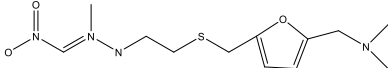
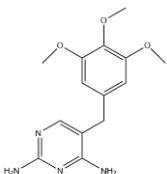
4.1 Compostos d'estudi

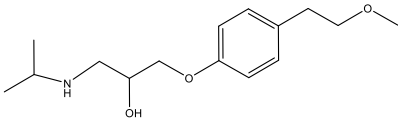
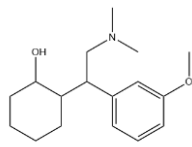
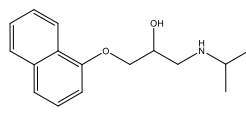
En aquest treball, tal com s'ha comentat anteriorment es determinaran un conjunt de fàrmacs d'ús habitual que es troben presents en l'aigua. Concretament s'optimitzarà el mètode per a un conjunt de 13 fàrmacs, els quals es classificaran en 2 grans grups. Es classificaran en compostos àcids i compostos bàsics.

Compostos bàsics

Els compostos bàsics que es determinaran són: Atenolol (ATE), Ranitidina (RAN), Trimetoprim (TRI), Metoprolol (MTO), Venlafaxina (VEN), Propranolol (PRO). A la Taula 1 s'exposa la informació principal de cadascun d'aquests compostos.

Taula 1. Informació dels compostos bàsics estudiats.

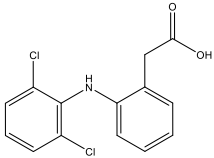
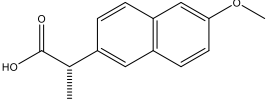
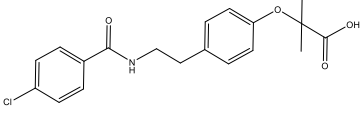
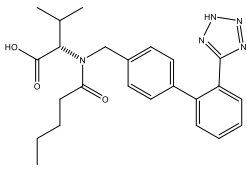
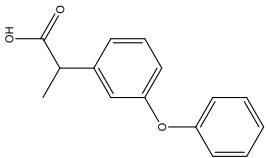
Atenolol (ATE)  	Pes molecular: 266,34 g/mol CAS: 29122-68-7 pKa: 9,6 Tractament: - Hipertensió arterial - Angina de pit - Arrítmia cardíaca - Post-infart
Ranitidina (RAN)  	Pes molecular: 314,41 g/mol CAS: 82530-72-1 pKa: 7,8 Tractament: - Síndrome de Zollinger-Ellison - Úlceres duodenals i gàstriques - Esofagitis pèptica
Trimetoprim (TRI)  	Pes molecular: 290,32 g/mol CAS: 738-70-5 pKa: 7,12 Antibiòtic contra: - Cocs Gram positius - Cocs i Bacils Gram negatius

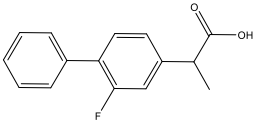
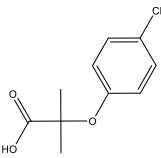
Metoprolol (MTO)  	Pes molecular: 267,36 g/mol CAS: 51384-51-1 pKa: 9,7 Tractament: - Hipertensió - Angina de pit - Arrítmies cardíques - Tirocoxocosi - Migranya - Insuficiència renal i hepàtica - Prevenció de reinfarts
Venlafaxina (VEN)  	Pes molecular: 277,24 g/mol CAS: 93413-69-5 pKa: 10,09 Tractament i prevenció de : - Depressions - Pànic
Propranolol (PRO)  	Pes molecular: 259,34 g/mol CAS: 525-66-6 pKa: 9,42 Tractament: - Angina de pit - Hipertensió - Cardiomiopatia obstructiva hipertròfica - Arrítmia - Migranya

Compostos àcids:

Els compostos àcids que es determinaran són: Diclofenac (DICLO), Naproxè (NPX), Bezafibrat (BEZ), Valsartan (VAL), Fenopropè (FEN), Flurbiprofè (FLB), i Àcid clofíbric (CLO). A la Taula 2 s'exposa la informació principal de cadascun d'aquests compostos.

Taula 2. Informació dels compostos àcids estudiats.

Diclofenac (DICLO)  	Pes molecular: 296,1 g/mol CAS: 15307-86-5 pKa: 4,15 Tractament: - Malalties reumàtiques cròniques - Gota - Dismenorrea - Inflamacions posttraumàtiques
Naproxè (NPX)  	Pes Molecular: 230,26 g/mol CAS: 22204-53-1 pKa: 4,15 Tractament: - Artritis reumatoide - Migranya - Menorràgia primària i secundària
Bezafibrat (BEZ)  	Pes molecular: 361,8 g/mol CAS: 41859-67-0 pKa: 3,83 Tractament: - Hiperlipidèmia - Colesterol
Valsartan (VAL)  	Pes molecular: 435,5 g/mol CAS: 137862-53-4 pKa: 4,73 Tractament: - Hipertensió - Insuficiència cardíaca - Posterior a un infart de miocardi
Fenoprofè (FEN)  	Pes molecular: 242,27 g/mol CAS: 29679-58-1 pKa: 4,5 Tractament: - Artritis reumatoide - Osteoartritis

Flurbiprofè (FLB)  	Pes molecular: 244,26 g/mol CAS: 5104-49-4 pKa: 4,42 Tractament: - Mal de gola
Àcid clofíbric (CLO)  	Pes molecular: 214,64 g/mol CAS: 882-09-7 pKa: 3,18 Metabòlit de Clofibrat, Etofibrat i Teofibrat: Fàrmacs reguladors de lípids

4.2 Materials i reactius

Els reactius que s'han utilitzat en aquest treball s'indiquen a la Taula 3, conjuntament amb la seva informació de toxicitat i manipulació.

Taula 3. Informació reactius utilitzats.

Patrons compostos àcids i bàsics	Tots els patrons utilitzats s'han obtingut Sigma Aldrich. Tots tenen una puresa $\geq 98\%$. La seva manipulació s'ha realitzat utilitzant guants i treballant sota la campana extractora.
Metanol³⁰ CAS: 67-56-1 Puresa: $\geq 99\%$ 	Toxicitat: - Tòxic per inhalació - Tòxic per ingestió - Tòxic per contacte amb la pell - Inflamable Manipulació: - Ús de guants

Acetonitril³¹ CAS: 75-05-8 Puresa: ≥ 99,9% 	Toxicitat: - Nociu per inhalació - Molt tòxic per contacte amb la pell - Tòxic per ingestió - Inflamable Manipulació: - Treballar sota campana extractora - Ús de guants
Àcid acètic³² CAS: 64-19-7 Puresa: ≥99,8% 	Toxicitat: - Corrosiu - Inflamable Manipulació: - Treballar sota campana extractora - Ús de guants - Ús d'ulleres de seguretat
Hidròxid d'amoni³³ CAS: 1336-21-6 Puresa: 28-30% 	Toxicitat: - Corrosiu Manipulació: - Treballar sota campana extractora - Ús de guants - Ús d'ulleres de seguretat

La informació dels sorbents utilitzats en aquest treball es troba a la Taula 4.

Taula 4. Informació sorbents utilitzats.

	SCX		SAX	
	S-SCX	P-SCX	S-SAX	P-SAX
Nom comercial	SCX01G-06T, Scharlau	Oasis MCX Cartidge, Waters	Superclean LC-SAX, Supelco	Oasis MAX Cartidge, Waters
Mida partícula	60 µm	30 µm	40-45 µm	30 µm
Mida porus	60 Å	80 Å	60 Å	80 Å
Volum	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml
Quantitat	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg
Imatge cartutx				

Les mostres d'aigua de riu que s'han utilitzat en aquest treball són del Riu Ebre i han estat conservades a -20°C fins a la seva utilització. Durant els dies d'utilització s'han conservat a 4°C. Prèviament, abans de la SPE, les mostres d'aigua es filtren mitjançant un filtre de Nylon de 0,45 µm.

Els extractes de la SPE de mostres d'aigua de riu s'han de filtrar abans de la injecció al cromatògraf. Per aquest motiu s'han avaluat els diferents filtres exposats a la Taula 5.

Taula 5. Informació filtres extractes.

	Nylon	PTFE
Nom comercial	Clarify-Nylon, Syringe Filters	Clarify-PTFE, Syringe Filters
Mida porus	0,45 µm	0,45 µm
Mida filtre	13 mm	13 mm
Imatge filtres		

4.3 Instruments i equips

En aquest treball, s'ha utilitzat un cromatògraf Agilent 1260 Series (Waldbronn, Alemanya), amb una columna Luna Omega 3 μm Polar C₁₈ d'unes dimensions de 150 mm x 3,0 mm, que s'ha termostatitzat a 30°C, un sistema d'injecció manual de 20 μl i un detector d'Absorció UV de longitud d'ona variable. La Fase mòbil utilitzada ha estat aigua a pH 3 (ajustada amb HCl) i acetonitril (ACN) i es treballa a un flux de 0,4 ml/min.

Per a l'extracció en fase sòlida, s'ha utilitzat un *Manifold* per a treballar al buit, com el de la Figura 4.



Figura 4. *Manifold* utilitzat per a l'extracció en fase sòlida

Per a evaporar s'ha utilitzat un Genevac miVac Duo Concentrator (Warminster, USA) treballant a temperatura ambient i al buit, durant un temps mitjà de 60 min.

Tots els aspectes relacionats amb l'optimització del mètode es troben desenvolupats a l'apartat següent de resultats i discussió. S'ha cregut convenient perquè resulti més entenedor, ja que per a variar els paràmetres a optimitzar és necessari interpretar resultats.

5. Resultats i discussió

5.1 Optimització condicions cromatogràfiques

5.1.1 Separació cromatogràfica

La primera etapa de la part experimental va consistir a optimitzar la separació cromatogràfica. La finalitat d'aquesta etapa és separar els compostos en el menor temps d'anàlisi possible.

Per a poder optimitzar la separació cromatogràfica, es va preparar una solució patró de 10 ml amb una concentració de 10 mg/l de cadascun dels compostos a determinar. Un cop preparada la solució, es va optimitzar el gradient de concentració de fase mòbil, per tal de poder trobar la separació òptima. La fase mòbil utilitzada en aquest treball està composta per acetonitril (ACN) i aigua ajustada amb HCl a pH 3. S'utilitza ACN i s'ajusta l'aigua amb HCl, perquè aquests no absorbeixen a la λ del treball²³.

Inicialment es realitza una primera anàlisi utilitzant el gradient de concentració exposat a la Taula 6 i una λ de detecció fixe a 210 nm, una temperatura de 30°C i un flux de 0,4 ml/min.

Taula 6. Gradient concentració fase mòbil inicial

t (min)	%ACN
0	20
10	50
12	70
15	100
17	20
20	20

Amb aquest gradient s'obté el següent cromatograma (Figura 5)

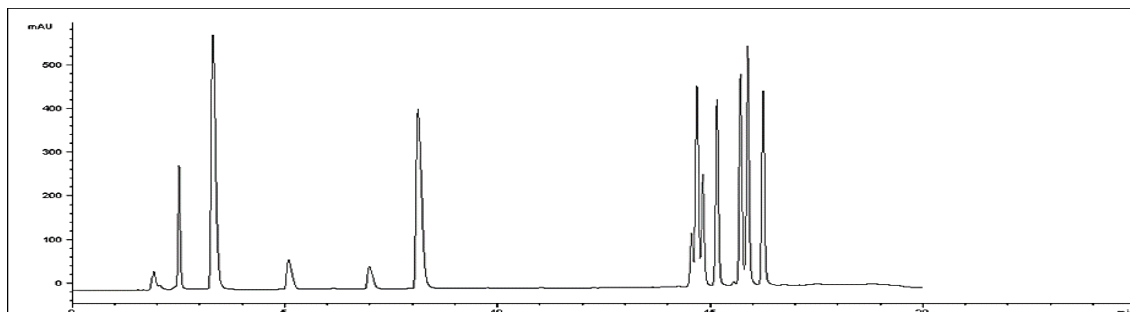


Figura 5. Cromatograma obtingut amb el gradient de concentració inicial.

Observant la Figura 5, s'aprecia que no hi ha una bona separació entre alguns dels pics que apareixen a temps de retenció més elevats. Per aquest motiu, es va modificar el

gradient de concentració fins a assolir el gradient òptim en el qual tots els pics estan ben separats.

En la Taula 7, es representa el gradient de concentració de fase mòbil optimitzat, el cromatograma obtingut (Figura 6). D'altra banda, per tal d'assignar tots els pics als compostos d'estudi s'han injectat patrons individuals de 10 mg/l.

Taula 7. Gradient de concentració de fase mòbil optimitzat.

t (min)	%ACN
0	10
3	30
10	45
17	50
18	60
22	80
25	100
29	100
30	10
35	10

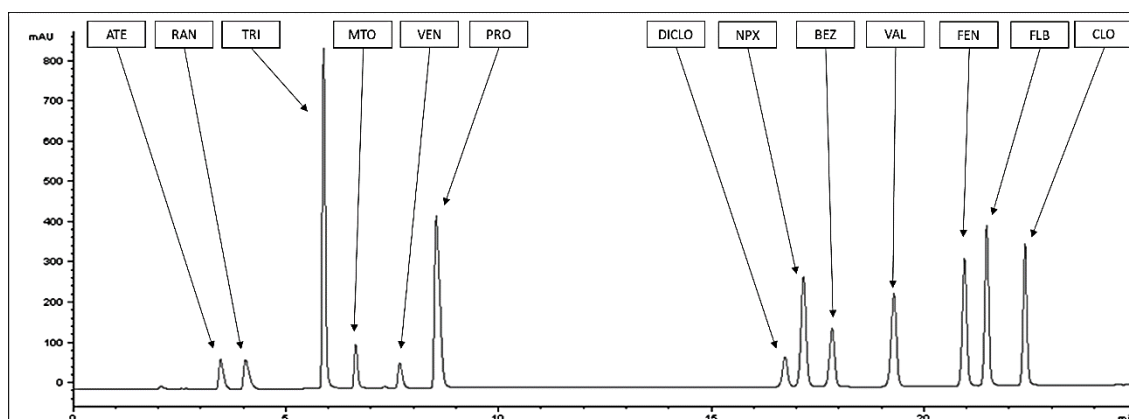


Figura 6. Cromatograma amb separació optimitzada i assignació dels pics.

5.1.2 Condicions del detector

Un cop optimitzat el gradient de concentració de la fase mòbil, es va optimitzar la longitud d'ona (λ) de detecció per tal d'obtenir la màxima sensibilitat de cada compost. Per aquesta optimització es van realitzar diferents anàlisis d'una solució de 10 mg/l a diferents longituds d'ona compreses entre 190 nm i 280 nm.

En treballar amb una λ de 225 nm, 240 nm, 254 nm i 280 nm s'obtenen senyals menys intensos que els obtinguts anteriorment a 210 nm o no s'obté cap senyal per alguns pics. En canvi, en treballar a 230 nm, s'ha observat, que el DICLO, el NPX i el BEZ donen un senyal més intens que a 210 nm. D'altra banda, els compostos bàsics i la resta d'àcids, donen un senyal superior quan es treballa a 210 nm. Tenint en compte aquests resultats, s'ha utilitzat un programa de λ en el qual es treballa a 210 nm durant tot els temps

d'anàlisi excepte entre els minuts 14 i 18 en què es treballa amb una λ de 230 nm. Al treballar amb aquest gradient, s'obté el cromatograma representat en la Figura 7.

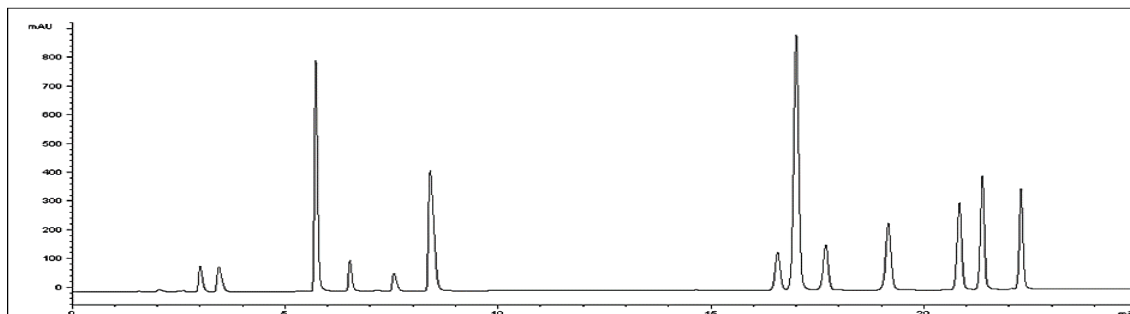


Figura 7. Cromatograma amb el gradient de λ optimitzat.

5.1.3. Validació del mètode cromatogràfic i rectes de calibratge

Després d'optimitzar la separació cromatogràfica i d'identificar els pics, es va procedir a l'elaboració de les corresponents rectes de calibratge.

A la Taula 8 s'exposen les rectes de calibratge de tots els compostos, l'interval de linealitat i la reproductibilitat de la separació cromatogràfica.

Taula 8. Informació rectes de calibratge dels compostos d'estudi.

Compost	Equació recta de calibratge	R ²	Interval de linealitat	Reproductibilitat (RSD % n=3)
ATE	$y=51,937x + 13,479$	0,9948	0,01-20 mg/l	12,0
RAN	$y=68,431x - 0,9323$	1	0,05-20 mg/l	1,8
TRI	$y=389,85x + 21,895$	0,9994	0,01-20 mg/l	2,1
MTO	$y=57,15x - 0,4396$	0,9998	0,05-20 mg/l	4,3
VEN	$y=44,342x - 5,2953$	0,9982	0,1-20 mg/l	2,9
PRO	$y=362,05x - 9,8898$	0,9994	0,05-20 mg/l	4,0
DICLO	$y=108,36x - 0,6076$	1	0,01-20 mg/l	2,7
NPX	$y=724,53x + 36,897$	0,9997	0,01-20 mg/l	2,6
BEZ	$y=130,4x - 6,254$	0,9997	0,05-20 mg/l	2,3
VAL	$y=199,67x - 8,4786$	0,9998	0,05-20 mg/l	0,5
FEN	$y=230,07x - 1,0679$	0,9997	0,01-20 mg/l	3,0
FLB	$y=254,52x + 3,6345$	0,9999	0,01-20 mg/l	3,0
CLO	$y=213,85x - 7,5717$	0,9998	0,05-20 mg/l	2,0

Seguint la Taula 8, s'observa que el %RSD de tots els compostos és inferior a 15. Aquest fet mostra la bona reproductibilitat de la separació cromatogràfica.

5.2 Optimització de l'extracció amb fase sòlida

En aquest treball s'han avaluat diferents tipus de sorbents comercials SPE de mode mixt SCX i SAX amb base sílice (S-SCX i S-SAX) i s'han comparat amb sorbents comercials SPE de mode mixt amb base polimèrica (P-SCX i P-SAX), per aquest motiu, se n'han determinat les seves condicions òptimes. Les condicions que s'han determinat, són les següents: selecció condicions de càrrega i elució de la mostra (pH de la mostra, solvent i volum d'elució); selecció del volum i el solvent de neteja; selecció del volum de càrrega amb aigua ultrapura i amb aigua de riu.

5.2.1 Sorbents S-SCX i S-SAX

5.2.1.1 Selecció condicions de càrrega i elució

El primer pas en l'optimització de l'extracció SPE va consistir en l'optimització de les condicions de càrrega i d'elució. En funció del sorbent (SCX o SAX), varien les condicions de càrrega de la mostra i de l'elució. L'optimització d'aquests paràmetres s'ha realitzat amb aigua ultrapura ajustada al pH indicat a la Taula 9. En la Taula 9 també s'exposen les condicions inicials de càrrega i d'elució.

Taula 9. Condicions de càrrega i elució de la mostra.

	SCX	SAX
Concentració inicial	5 mg/l	5 mg/l
Volum mostra	25 ml	25 ml
pH	3	7
Solvent elució	5% NH ₄ OH en metanol	5% CH ₃ COOH en metanol
Volum elució	10 ml (2 etapes de 5 ml)	10 ml (2 etapes de 5 ml)

A continuació s'exposen les recuperacions obtingudes al treballar amb aquestes condicions (Figura 8 i Figura 9).

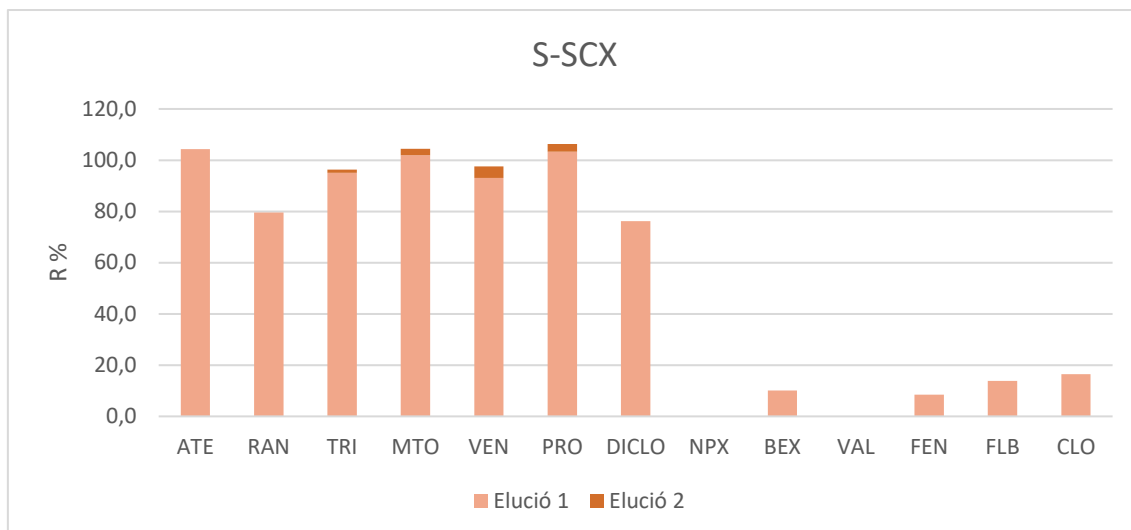


Figura 8. Recuperacions obtingudes amb 2 etapes d'elució de 5 ml cadascuna d'una solució patró de 25 ml i 5 mg/l amb el sorbent S-SCX.

A la Figura 8 s'observa que els compostos bàsics (ATE, RAN, TRI, MTO, VEN i PRO) queden retinguts en el sorbent S-SCX, tal com s'esperava, ja que els compostos bàsics quan estan protonats estableixen interaccions d'intercanvi catiònic amb els sorbents SCX i en queden retinguts. Posteriorment aquests són eluïts correctament, tal com mostren les recuperacions representades en la Figura 8. Aquests resultats indiquen que les condicions de càrrega de la mostra són ajustades, ja que no es produeixen pèrdues significatives d'aquests compostos. D'altra banda, el solvent d'elució utilitzat permet eluir completament els compostos retinguts. Per tant, es pot concloure que amb 5 ml de solvent d'elució és suficient per eluir majoritàriament els compostos.

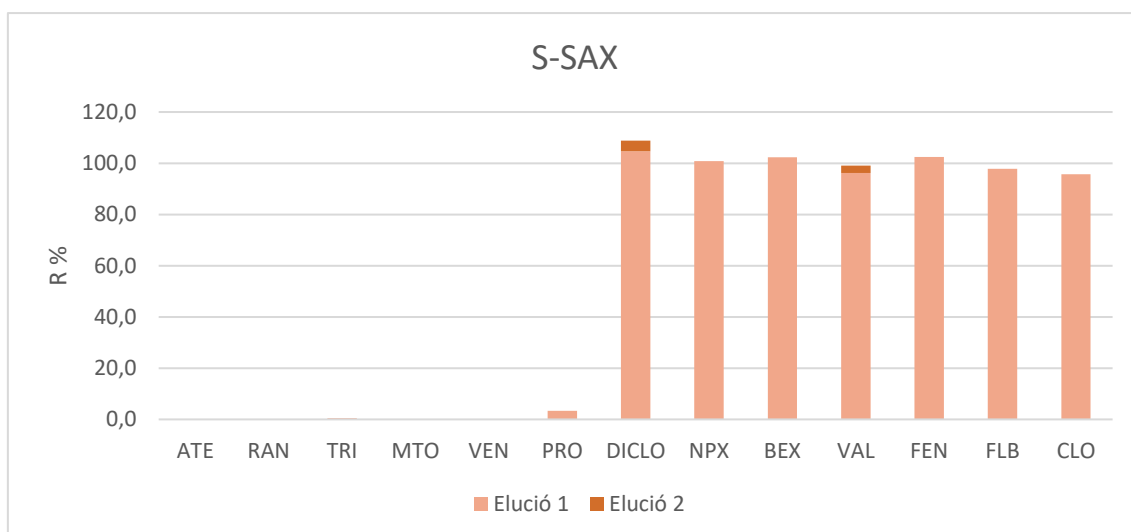


Figura 9. Recuperacions obtingudes amb 2 etapes d'elució de 5ml cadascuna d'una solució patró de 25 ml i 5 mg/l amb el sorbent S-SAX

A la Figura 9, s'observa que els compostos àcids (DICLO, NPX, BEZ, VAL, FEN, FLB i CLO) queden retinguts en el sorbent S-SAX, tal com s'esperava, ja que els compostos

àcids quan estan desprotonats queden retinguts mitjançant interaccions d'intercanvi aniónic en els sorbents SAX. Les bones recuperacions obtingudes indiquen que les condicions de càrrega i d'elució de la mostra per aquests compostos són les òptimes. Pel que fa al volum del solvent d'elució, tal com s'observa en la Figura 9, 5 ml són suficients per eluir completament tots els compostos retinguts.

5.2.1.2 Evaporació

La finalitat d'afegir una etapa d'evaporació, és augmentar el factor de concentració de la mostra i poder determinar concentracions més baixes. Per comprovar que no es produeixin pèrdues en l'etapa d'evaporació s'ha preparat una solució de 5 ml amb les condicions característiques de l'elució de cadascun dels compostos, amb una concentració de 0,2 mg/l. Després de l'evaporació a sequedat es reconstitueix la mostra a un 1 ml amb una solució 80% aigua ultrapura i 20% metanol per a obtenir una concentració final teòrica de 1 mg/l.

L'etapa d'evaporació a sequedat és dur a terme mitjançant l'equip Genevac MiVac Duo Concentrator que treballa a temperatura ambient i buit. El temps d'evaporació mitjà és de 60 min.

En la Taula 10 es representa la recuperació obtinguda per tots els compostos després del procés d'evaporació.

Taula 10. Recuperació obtingudes en l'etapa d'evaporació.

Compost	%R
ATE	79,6
RAN	62,7
TRI	88,8
MTO	92,3
VEN	110,5
PRO	90,9
DICLO	98,8
NPX	103,6
BEX	96,1
VAL	106,8
FEN	96,0
FLB	96,3
CLO	88,1

Tal com es pot veure en la Taula 10, en la majoria de compostos s'obtenen recuperacions molt elevades excepte per la RAN de la qual s'obté una recuperació lleugerament més baixa. No obstant això, aquesta pèrdua no es considera significativa.

5.2.1.3 Optimització etapa de neteja

Després de determinar les condicions de càrrega i elució de la mostra, s'ha afegit una etapa de neteja al procés. Per a la realització d'aquesta anàlisi s'ha treballat amb una solució patró de 25 ml d'una concentració de 0,02 mg/l i amb diferents volums de metanol com a neteja (1 ml, 2 ml, 5 ml, 7 ml i 10 ml).

La finalitat de l'etapa de neteja és eluir els compostos no desitjats i impureses retingudes en els sorbents per a fer l'extracció més selectiva. En aquesta etapa es busca treballar amb el volum de solvent de neteja més elevat possible, per tal de poder eliminar totes les possibles interferències que puguin haver-hi a la matriu de la mostra, sense que es produeixin pèrdues dels anàlits d'interès. Per aquest motiu és fan les anàlisis amb diferents volums de neteja.

Seguint els resultats obtinguts, amb els sorbents S-SCX no es produeixen pèrdues significatives per la majoria de compostos al treballar amb els diferents volums de neteja. Només es produeix una pèrdua del 13% quan es treballa amb un volum de 10 ml, però aquesta pèrdua no es considera significativa.

D'altra banda, amb els sorbents S-SAX només es produeixen petites pèrdues inferiors al 3% de VAL, FLB i FEN quan es treballa amb un volum de neteja de 2 i 5 ml. Les pèrdues que es produeixen no es consideren significatives.

Així, tenint en compte que les pèrdues que es produeixen no són significatives, s'estableix que el volum de neteja òptim tant pels sorbents S-SCX com pels S-SAX es de 10 ml de metanol.

5.2.1.4 Optimització volum de càrrega aigua ultrapura

L'optimització del volum de càrrega té com a finalitat determinar el volum màxim de mostra que es pot utilitzar, sense sobrepassar el volum de ruptura dels anàlits, ja que al sobrepassar aquest punt es produeixen pèrdues dels compostos. Al treballar amb volums més grans, s'aconsegueixen factors de concentració més grans i d'aquesta manera es poden detectar concentracions més baixes dels analits.

Per a l'optimització del volum de càrrega, s'han preparat dissolucions de 25 ml, 100 ml, 250 ml i 500 ml amb les condicions òptimes determinades anteriorment.

Aquest estudi es realitza inicialment sense etapa de neteja. Posteriorment es repeteix l'anàlisi amb les mateixes condicions afegint una etapa de neteja amb 10 ml de metanol (volum optimitzat anteriorment). Els resultats obtinguts sense l'etapa de neteja es representen a la Figura 10.

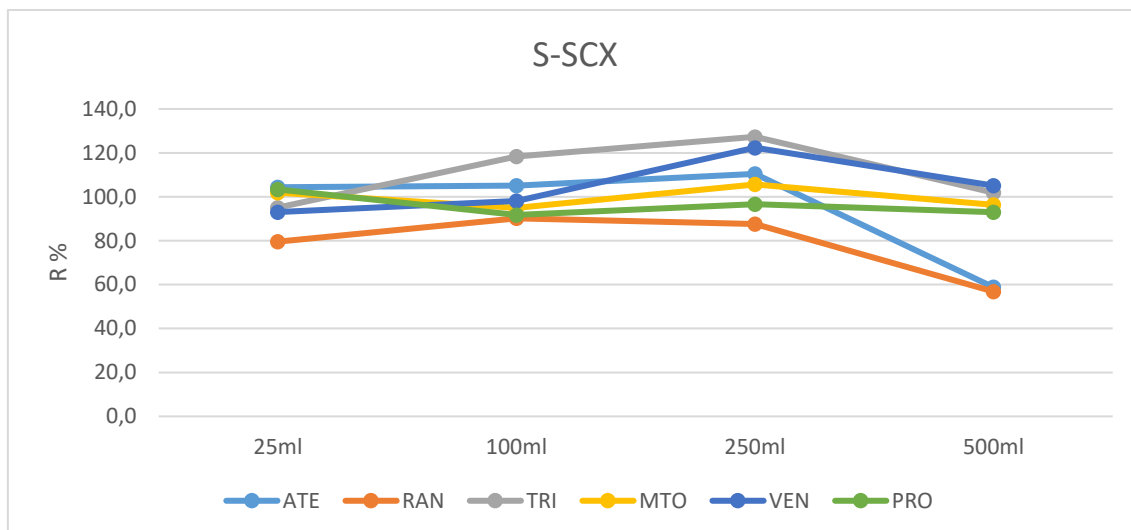


Figura 10. Recuperacions obtingudes pels compostos bàsics amb sorbents S-SCX amb diferents volums de càrrega sense etapa de neteja.

Observant la Figura 10, es pot veure que en els sorbents S-SCX les recuperacions són molt bones quan es treballa amb volums fins a 250 ml. Tot i això, quan es treballa amb un volum de 500 ml es produeixen petites pèrdues de ATE i RAN encara que les recuperacions es troben per sobre del 50%.

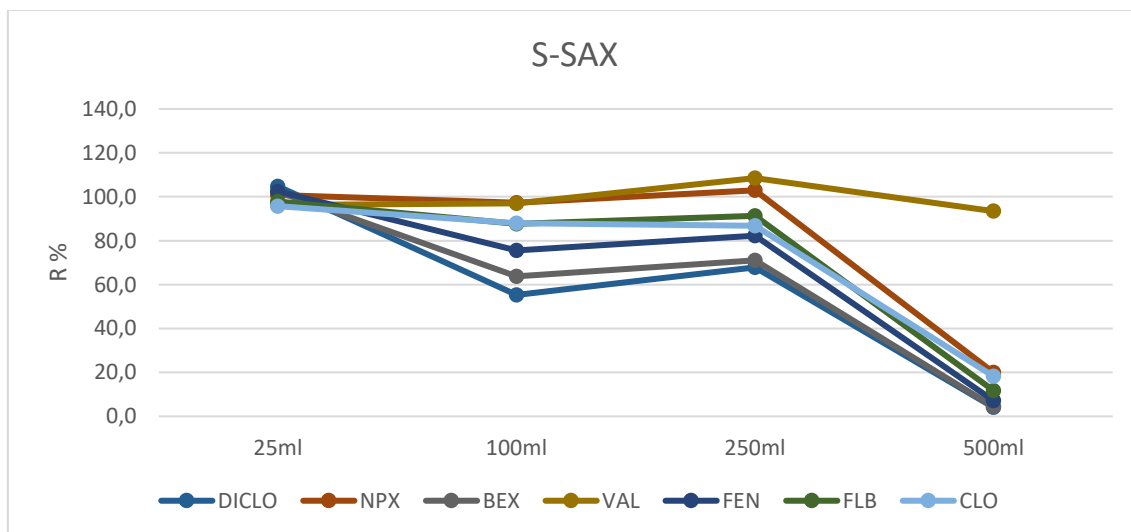


Figura 11. Recuperacions obtingudes pels compostos àcids amb sorbents S-SAX amb diferents volums de càrrega sense etapa de neteja.

Pel que fa als resultats obtinguts amb els sorbents S-SAX (Figura 11) s'observa que els valors de recuperació disminueixen bruscament quan es treballa amb un volum de mostra de 500 ml excepte pel VAL, pel qual s'obté una bona recuperació al treballar amb un volum de 500 ml.

Després d'analitzar els resultats obtinguts en les anàlisis sense l'etapa de neteja, s'ha repetit l'experiment afegint una etapa de neteja de 10 ml de metanol.

En afegir l'etapa de neteja en els sorbents S-SCX s'obtenen recuperacions molt semblants en l'elució a les observades anteriorment en treballar sense neteja (Figura 10), ja que s'obtenen molt bones recuperacions amb volums fins a 250 ml i en treballar amb 500 ml es produeixen pèrdues, però aquestes són inferiors al 50%.

Els resultats obtinguts amb els sorbents S-SAX es representen en la Figura 12.

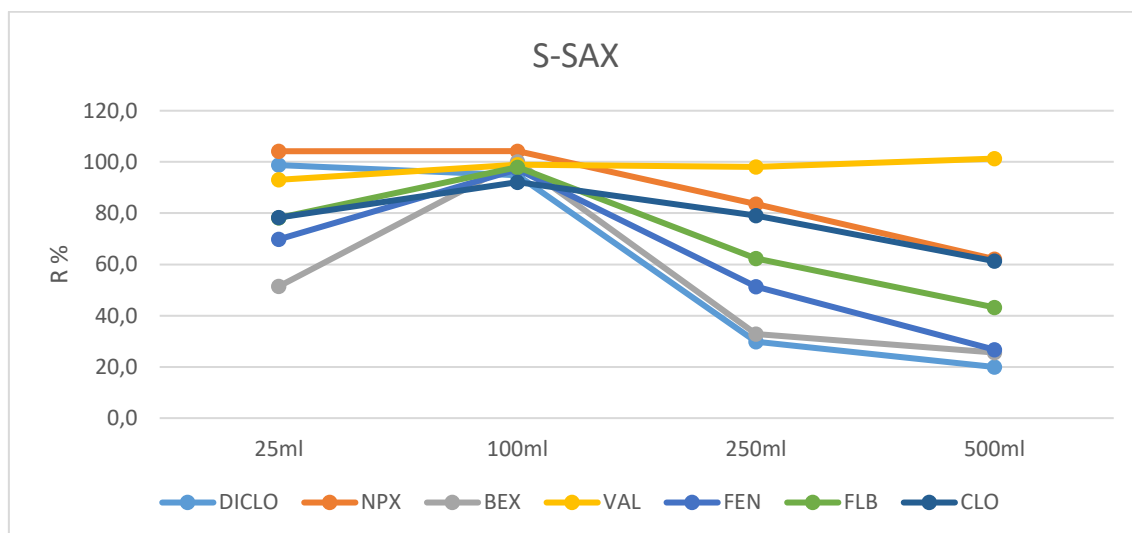


Figura 12. Recuperacions obtingudes en l'etapa d'elució dels compostos àcids amb sorbents S-SAX amb diferents volums de càrrega amb etapa de neteja.

En afegir l'etapa de neteja en els sorbents S-SAX (Figura 12), s'obtenen recuperacions molt semblants a les observades anteriorment al treballar sense l'etapa de neteja (Figura 11). A partir d'un volum de 250 ml es produeixen pèrdues de tots els compostos excepció del VAL amb el qual s'obtenen bones recuperacions inclús en treballar amb un volum de 500 ml.

Tenint en compte els resultats exposats anteriorment, el volum de càrrega amb aigua ultrapura dels sorbents S-SAX es fixa a 250 ml, mentre que pels sorbents S-SCX és fixa a 500 ml.

5.2.1.5 Selecció filtre extractes

Prèviament a treballar amb mostres reals, s'ha seleccionat el filtre per filtrar l'extracte prèviament a la injecció al cromatògraf per evitar la injecció d'impureses que puguin malmetre l'equip. S'han comparat 2 filtres diferents: filtre de 0,45 µm de Nylon i filtre de 0,45 µm de PTFE (Taula 5).

Per escollir quin filtre utilitzar, s'ha filtrat 1 ml d'una dissolució de 5 mg/l de cadascun dels compostos i s'ha injectat. En la Figura 13 s'indiquen els resultats obtinguts.

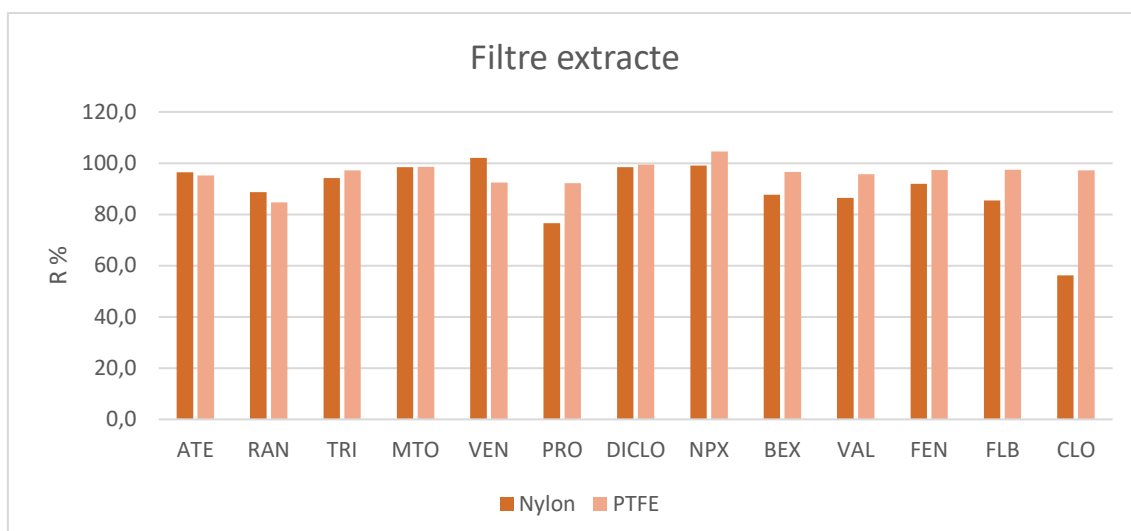


Figura 13. Recuperacions obtingudes de tots els compostos en passar a través del filtre de Nylon i del filtre de PTFE.

A partir dels resultats exposats en la Figura 13, s'observa que la majoria de compostos presenten millors recuperacions amb els filtres de PTFE. Per aquest motiu se seleccionen els filtres de PTFE.

5.2.1.6 Selecció del volum de càrrega amb aigua de riu

Per últim, s'ha optimitzat el volum de càrrega amb mostres reals d'aigua de riu, ja que al ser una matriu més complexa les recuperacions poden disminuir.

Per a la selecció del volum de càrrega de mostres de riu, s'han preparat varies dissolucions amb diferents volums entre 50 ml i 250 ml amb les condicions òptimes determinades anteriorment, per tal d'obtenir una concentració teòrica final dels compostos de 5 mg/L.

En treballar amb els sorbents S-SCX s'observa (Figura 14) que es produeix un descens de la recuperació a l'augmentar el volum de càrrega. Tanmateix, les recuperacions obtingudes al treballar amb 100 ml són bones en tots els compostos, ja que no n'hi ha cap que es trobi per sota del 60%. En canvi, en treballar amb un volum de 250 ml les recuperacions d'alguns compostos es troben per sota del 60%. Per aquest motiu, el volum de càrrega del sorbent S-SCX al treballar amb mostres de riu, que es selecciona és de 100 ml.

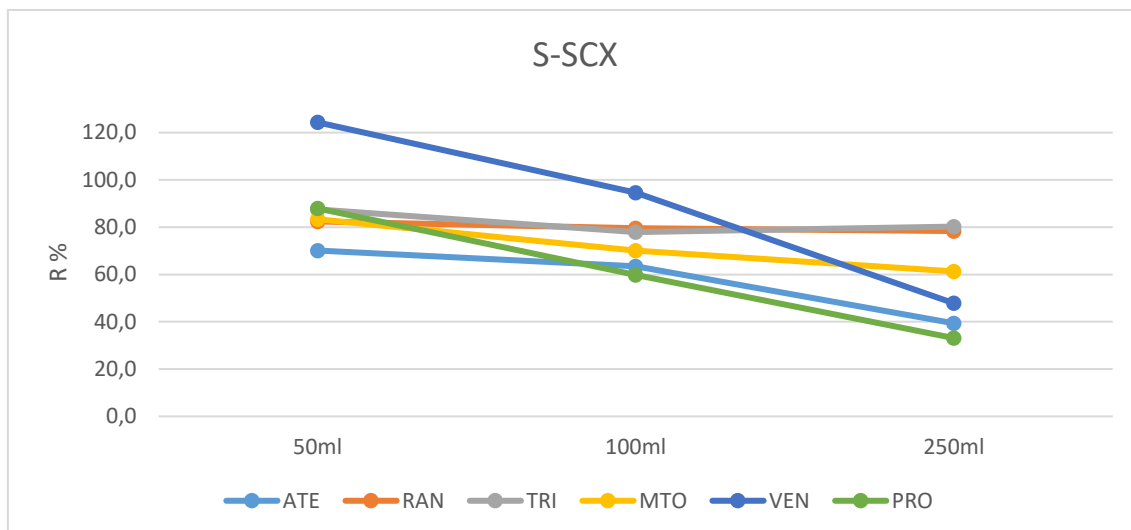


Figura 14. Recuperacions obtingudes en l'etapa d'elució dels compostos bàsics amb sorbents S-SCX amb diferents volums de mostra de riu.

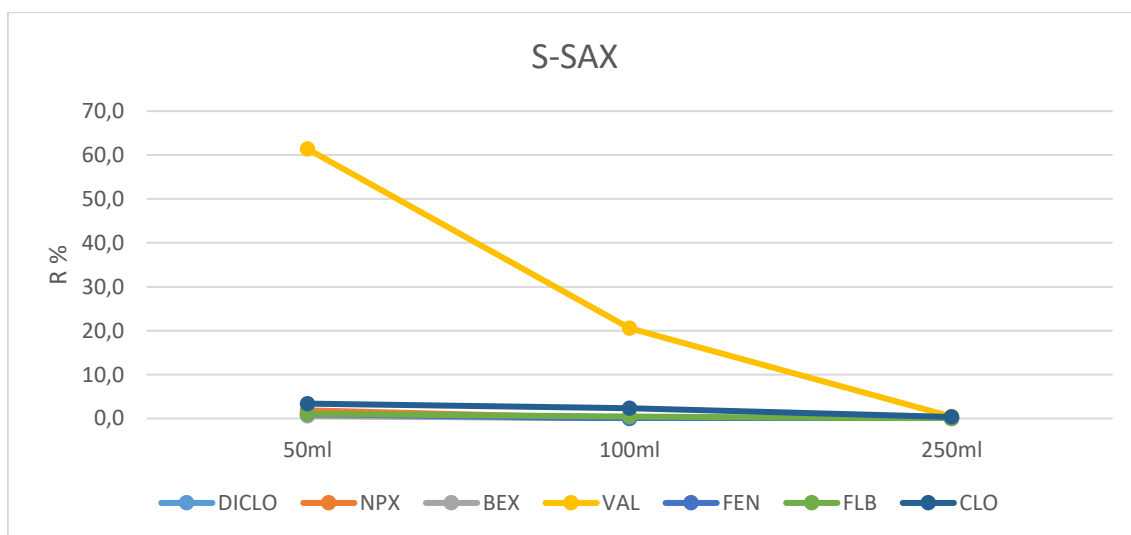


Figura 15. Recuperacions obtingudes en l'etapa d'elució amb sorbents S-SAX amb diferents volums de mostra de riu.

Pel que fa als resultats obtinguts amb els sorbents S-SAX (Figura 15) les recuperacions obtingudes en gairebé tots els compostos són molt baixes independentment del volum de mostra amb què es treballa. Cal destacar que l'únic compost que és capaç de ser retingut és el VAL, del qual s'obté una recuperació del 60% al treballar amb 50 ml de mostra, però en augmentar-ne el volum la seva recuperació disminueix bruscament.

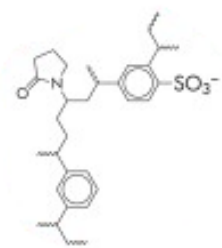
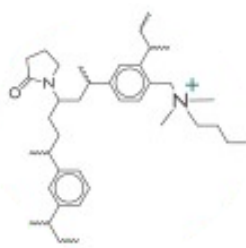
Comparant els resultats de volum de càrrega obtinguts amb aigua de riu i amb aigua ultrapura, s'observa que les recuperacions són inferiors quan es treballa amb aigua de riu. Els sorbents S-SCX si permeten treballar amb mostres d'aigua de riu amb un volum de càrrega de 100 ml. En canvi, els sorbents S-SAX, no permeten treballar amb mostres d'aigua de riu probablement degut a l'elevat contingut d'àcids húmics i fúlvics que queden retinguts en el sorbent.

Per tal de solucionar aquest fet i obtenir un bon mètode per a determinar els compostos d'estudi, es comparen els resultats amb els obtinguts mitjançant sorbents amb base polimèrica.

5.2.2 Comparació amb sorbents polimèrics

Atès que els sorbents amb base de sílice no permeten treballar amb mostres d'aigua de riu, s'han comparat amb els sorbents comercials de mode mixt amb base polimèrica Oasis MCX i Oasis MAX (Taula 11). Per comparar els resultats amb els obtinguts amb els sorbents S-SCX i S-SAX, s'utilitzen les condicions establertes anteriorment.

Taula 11. Sorbents polimèrics

Oasis MCX (P-SCX)	Oasis MAX (P-SAX)
	

5.2.2.1. Comparació volum de càrrega amb aigua ultrapura.

L'assaig per comparar el volum de càrrega de 500 ml, s'ha realitzat amb les mateixes condicions que amb els sorbents S-SCX i S-SAX. La comparativa d'aquests resultats amb els obtinguts amb els sorbents S-SCX i S-SAX es representa a les Figures 16 i 17.

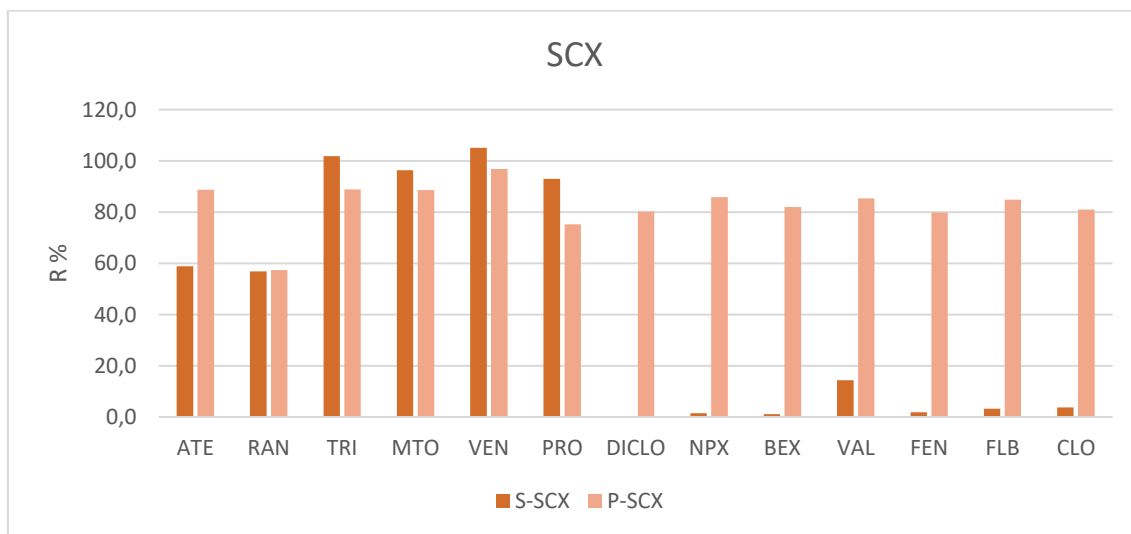


Figura 16. Comparació recuperacions obtingudes pels compostos d'estudi amb els sorbents S-SCX i P-SCX al treballar amb un volum de càrrega de 500 ml sense etapa de neteja.

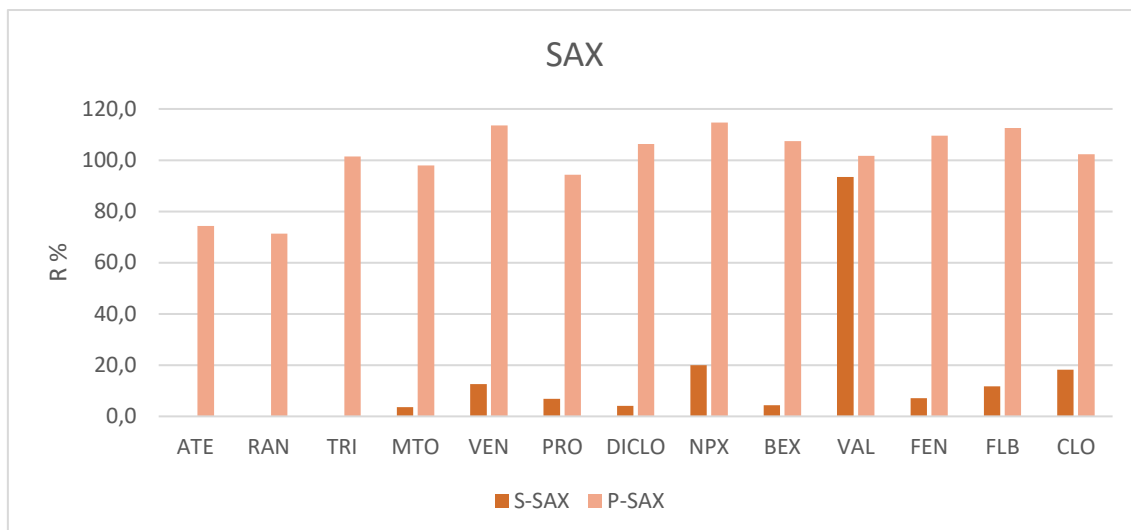


Figura 17. Comparació recuperacions obtingudes pels compostos d'estudi amb els sorbents S-SAX i P-SAX al treballar amb un volum de càrrega de 500 ml sense etapa de neteja.

A partir de les Figures 16 i 17, s'observa que tots els compostos queden retinguts en els sorbents P-SCX i P-SAX. D'altra banda, es pot concloure que els sorbents P-SCX i P-SAX, permeten treballar amb volums de mostra més elevats, ja que s'obtenen millors recuperacions en la majoria dels compostos.

Per tal d'augmentar la selectivitat de l'extracció s'afegeix una etapa de neteja que consisteix en 10 ml de metanol (volum optimitzat anteriorment). Els resultats obtinguts es representen en les Figures 18 i 19. Aquests resultats es comparen amb els resultats obtinguts anteriorment amb els sorbents S-SCX i S-SAX en treballar amb un volum de càrrega de 500 ml i amb una etapa de neteja.

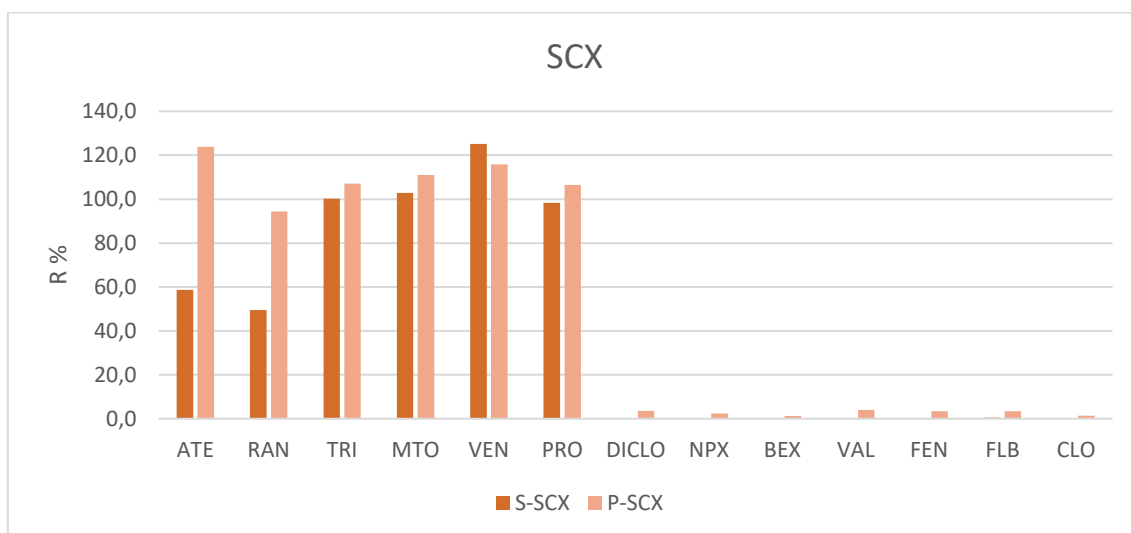


Figura 18. Comparació recuperacions obtingudes pels compostos d'estudi amb els sorbents S-SCX i P-SCX al treballar amb un volum de càrrega de 500 ml amb una etapa de neteja

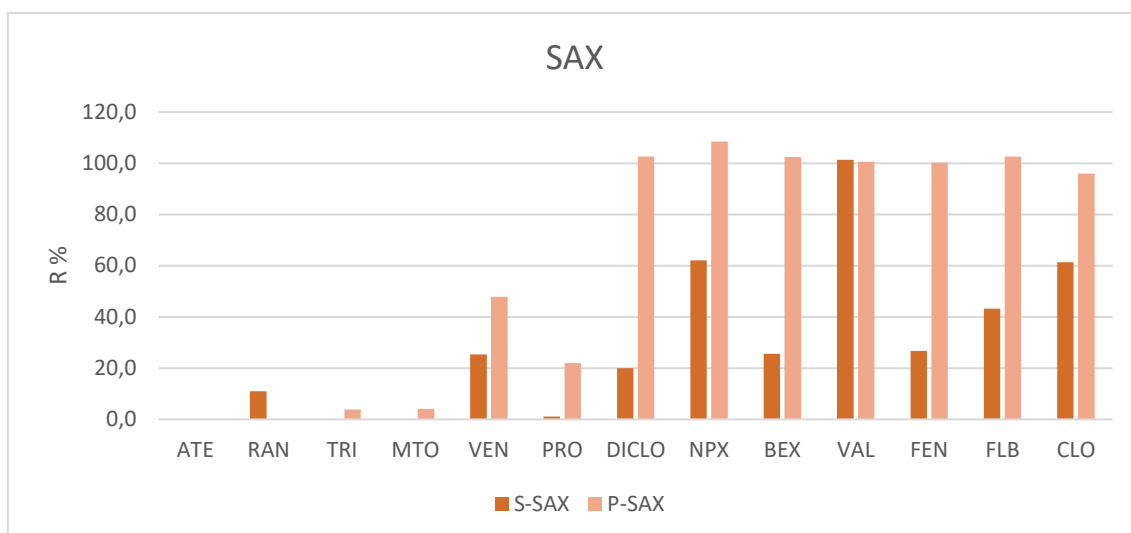


Figura 19. Comparació recuperacions obtingudes pels compostos d'estudi amb els sorbents S-SAX i P-SAX al treballar amb un volum de càrrega de 500 ml amb una etapa de neteja.

Tal com s'observa en les Figures 18 i 19, les recuperacions obtingudes amb els sorbents P-SCX i P-SAX són bones, i no es produeixen pèrdues dels compostos d'interès. D'altra banda, els compostos que quedaven retinguts mitjançant interaccions de fase invertida (els compostos àcids en els sorbents P-SCX i els compostos bàsics en els sorbents P-SAX) són majoritàriament eliminats en l'etapa de neteja.

Els sorbents P-SCX i S-SCX (Figura 18) obtenen recuperacions molt semblants en la majoria dels compostos, però l'ATE i la RAN queden menys retinguts en els sorbents S-SCX. Per aquest motiu i observant els resultats de la Figura 19 es pot afirmar que els sorbents P-SCX i P-SAX tenen un volum de càrrega superior al dels sorbents S-SCX i S-SAX.

5.2.2.2 Comparació volum de càrrega amb aigua de riu

Com s'ha vist anteriorment (apartat 5.2.1.6) les recuperacions obtingudes amb aigua de riu varien respecte a les obtingudes amb aigua ultrapura.

Tenint en compte que el volum de càrrega dels sorbents S-SCX és de 100 ml, s'han comparat els resultats obtinguts quan es treballa aquest volum. Així, per a fer aquesta anàlisi s'ha treballat amb dissolucions de 100 ml d'aigua de riu fortificades per obtenir una concentració final de 5 mg/l amb una etapa de neteja de 5 ml de metanol.

En les Figures 20 i 21 s'observa que amb els sorbents P-SCX s'obtenen millors recuperacions que amb els sorbents S-SCX. D'altra banda, entre els sorbents S-SAX i P-SAX hi ha una gran diferència, ja que els sorbents S-SAX no són capaços de retenir els compostos.

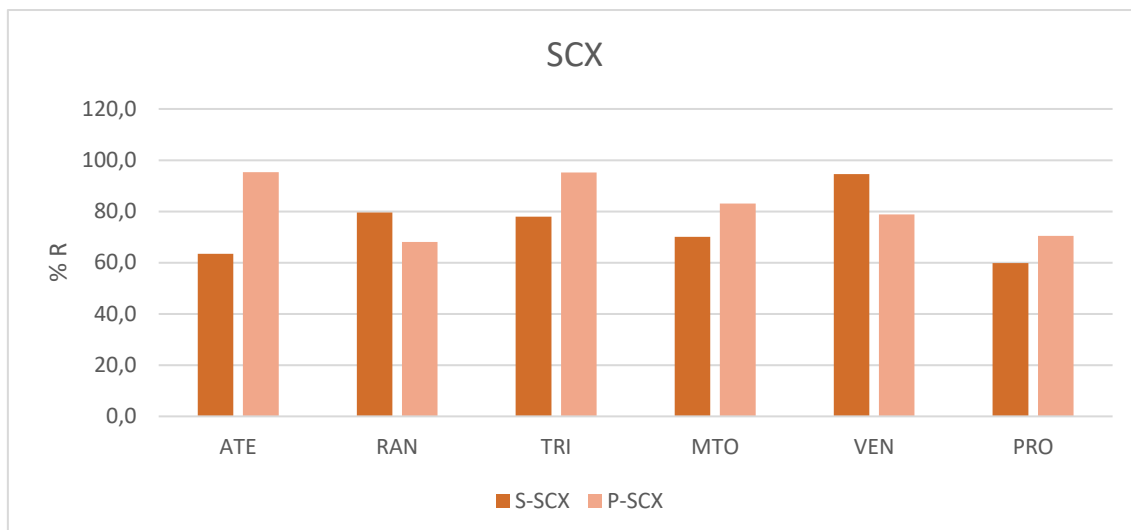


Figura 20. Comparació recuperacions obtingudes pels compostos d'estudi amb els sorbents S-SCX i P-SCX al treballar amb un volum de càrrega de 100 ml d'aigua de riu amb una etapa de neteja

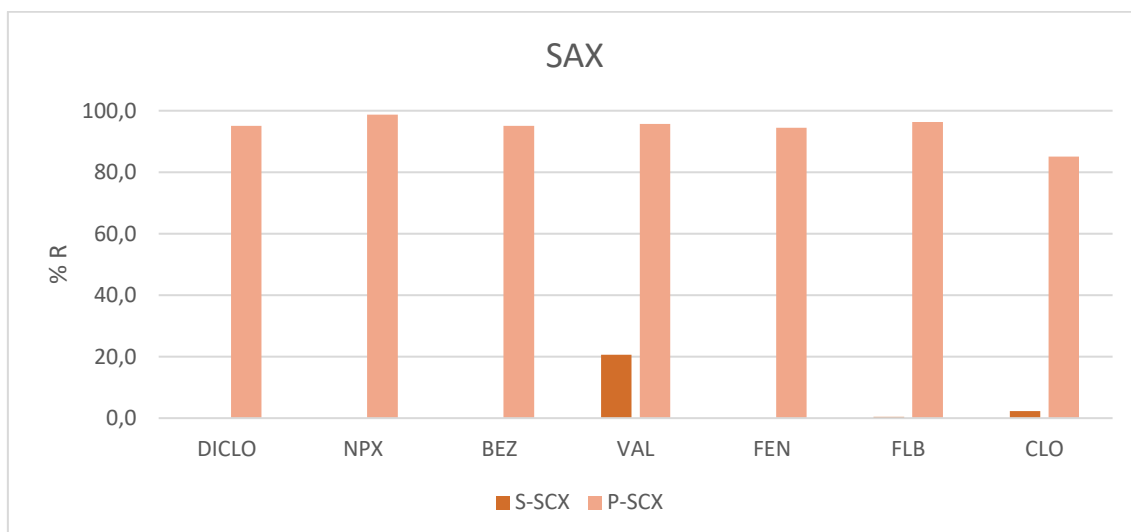


Figura 21. Comparació recuperacions obtingudes pels compostos d'estudi amb els sorbents S-SAX i P-SAX al treballar amb un volum de càrrega de 100 ml d'aigua de riu amb una etapa de neteja

Tenint en compte que els sorbents P-SCX i P-SAX permeten obtenir bons valors de recuperació al treballar amb un volum de 100 ml de mostra d'aigua de riu amb neteja i sense, s'ha augmentat el volum de càrrega a 250 ml. La Taula 12 mostra les recuperacions obtingudes al treballar amb un volum de càrrega de 250 ml amb una etapa de neteja de 5 ml de metanol al treballar amb els sorbents P-SCX i P-SAX.

Taula 12. Recuperacions obtingudes amb els sorbents P-SCX i P-SAX al treballar amb un volum de càrrega de 250 ml d'aigua de riu

	P-SCX	P-SAX
ATE	99,1	0
RAN	77,4	0
TRI	103,7	0
MTO	103,4	0
VEN	129,2	0
PRO	79,9	0
DICLO	5,9	94,7
NPX	4,9	96,3
BEZ	3,0	93,2
VAL	3,8	81,6
FEN	6,8	97,6
FLB	7,0	92,3
CLO	6,6	82,2

En la Taula 12, s'observa que al treballar amb un volum de càrrega de 250 ml de mostra d'aigua de riu amb els sorbents P-SCX i P-SAX s'obtenen recuperacions molt bones. Per aquest motiu es pot concloure que els sorbents P-SCX i P-SAX permeten treballar amb un volum de càrrega de 250 ml d'aigua de riu i per tant permeten treballar amb volums d'aigua de riu superiors als dels sorbents S-SCX i S-SAX. En conseqüència es pot afirmar que els sorbents polimèrics són més adequats per a l'extracció dels compostos d'estudi quan es treballa amb mostres d'aigua de riu.

5.2.2.3.Comparació dissolucions de metanol

Finalment, per acabar d'avaluar els sorbents S-SCX, S-SAX, P-SCX i P-SAX, s'ha preparat una dissolució de 10 ml amb metanol per obtenir una concentració final de 5 mg/l. Aquesta dissolució s'ha carregat en els sorbents i s'han eluït els compostos retinguts amb 5 ml del solvent d'elució de cada sorbent. Aquest estudi s'ha realitzat per a avaluar si aquests sorbents es poden utilitzar com a etapa de neteja després d'aplicar una tècnica de tractament de mostres sòlides com per exemple l'extracció de líquids pressuritzats (PLE) o l'extracció assistida per microones (MAE). Les Figures 22 i 23 mostren els resultats d'aquest estudi.

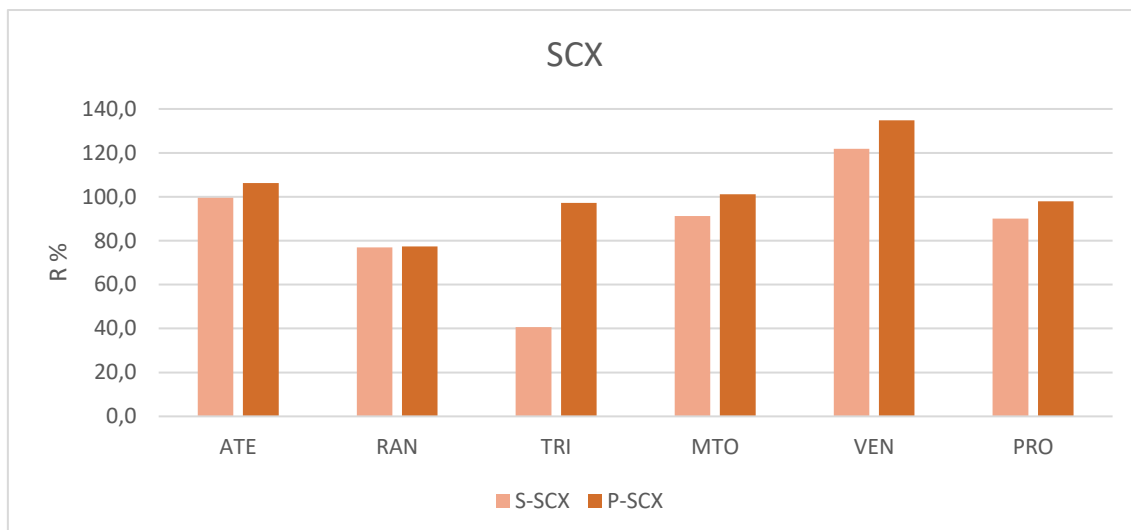


Figura 22. Comparació recuperacions obtingudes pels compostos d'estudi en la extracció amb sorbents S-SCX i P-SCX al treballar amb dissolucions de 10 ml amb metanol.

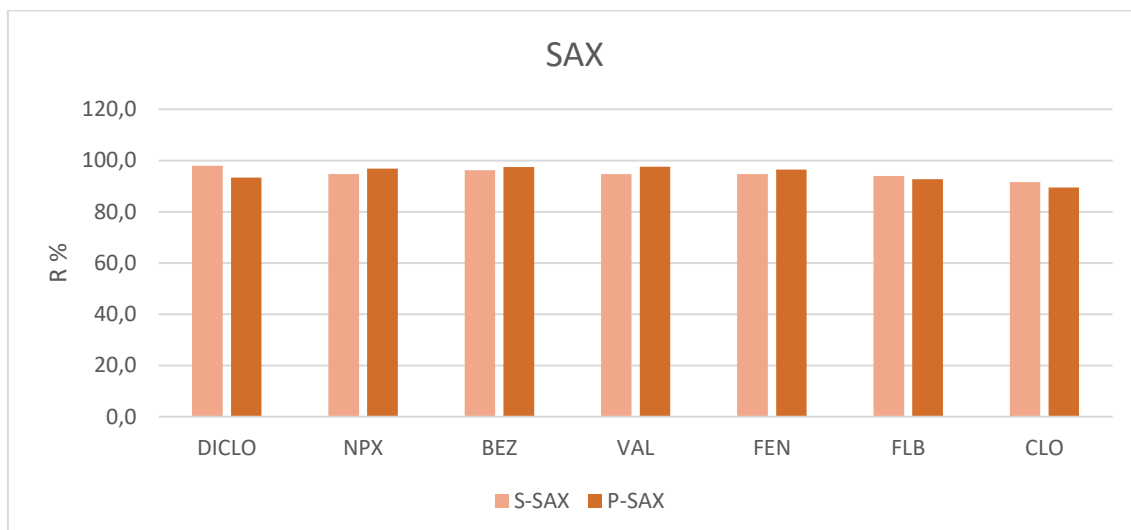


Figura 23. Comparació recuperacions obtingudes pels compostos d'estudi en la extracció amb sorbents S-SAX i P-SAX al treballar amb dissolucions de 10 ml amb metanol.

Observant la Figura 22, es pot determinar que les recuperacions obtingudes amb els sorbents S-SCX i P-SCX són bones. Les recuperacions obtingudes a la majoria de compostos amb els 2 sorbents són molt semblants, excepte el TRI el qual queda menys retingut amb el sorbent S-SCX.

D'altra banda, els resultats obtinguts amb els sorbents S-SAX i P-SAX (Figura 23) són bons i no presenten diferències evidents entre ells.

Els resultats demostren que aquests dos tipus de sorbents es podrien utilitzar com a etapa de neteja en l'extracció de mostres complexes mitjançant altres tècniques d'extracció que utilitzen el metanol com extraient. Tot i que s'hauria de tenir en compte

que al treballar mostres reals, en els extractes poden haver-hi interferències que podrien provocar un descens en les recuperacions.

5.3 Limitacions

Com que la LC-UV no permet assolir límits de detecció molt baixos, per tal de determinar les concentracions baixes en què aquests compostos estan presents en les mostres mediambientals, el mètode d'extracció s'acobla a una LC-MS, però per falta de temps no es va poder fer.

6. Conclusions

- S'ha desenvolupat i optimitzat un mètode basat en cromatografia de líquids amb un detector UV per a poder avaluar els sorbents.
- Els sorbents S-SCX permeten obtenir bons resultats en l'extracció dels compostos farmacèutics bàsics al treballar amb aigua de riu.
- Els sorbents S-SAX no permeten retenir els compostos farmacèutics àcids al treballar amb aigua de riu.
- Els sorbents S-SCX i S-SAX poden ser utilitzats com a etapa de neteja en l'extracció de mostres complexes mitjançant altres tècniques d'extracció que utilitzen un solvent orgànic com metanol com extraient.
- Els sorbents amb base polimèrica (P-SCX i P-SAX) permeten obtenir millors resultats que els sorbents amb base sílice (S-SCX i S-SAX).

Conclusions

- The method based on liquid chromatography and UV detection for the determination of a group of pharmaceuticals has been developed and optimized for the evaluation of the sorbents.
- The sorbent S-SCX obtain good results from the extraction of the basic pharmaceuticals from river water.
- The sorbents S-SAX can't retain the acid pharmaceuticals from the river water.
- All the sorbents (S-SCX, S-SAX, P-SCX and P-SAX) can be used as a cleaning step coupled with another extraction techniques that uses an organic solvent, like methanol for extract.
- The polymeric sorbents (P-SCX and P-SAX) can achieve better results than the silica sorbents (S-SCX and S-SAX).

7. Bibliografia

- (1) Taheran, M.; Naghdi, M.; Brar, S. K.; Verma, M.; Surampalli, R. Y. Emerging Contaminants: Here Today, There Tomorrow! *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.* **2018**, *10* (February), 122–126.
<https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.05.010>.
- (2) Ruhoy, I. S.; Daughton, C. G. Types and Quantities of Leftover Drugs Entering the Environment via Disposal to Sewage - Revealed by Coroner Records. *Sci. Total Environ.* **2007**, *388* (1–3), 137–148.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.08.013>.
- (3) Huerta, B.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D. Pharmaceuticals in Biota in the Aquatic Environment: Analytical Methods and Environmental Implications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404* (9), 2611–2624. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6144-y>.
- (4) O'Flynn, D.; Lawler, J.; Yusuf, A.; Parle-Mcdermott, A.; Harold, D.; Mc Cloughlin, T.; Holland, L.; Regan, F.; White, B. A Review of Pharmaceutical Occurrence and Pathways in the Aquatic Environment in the Context of a Changing Climate and the COVID-19 Pandemic. *Anal. Methods* **2021**, *13* (5), 575–594.
<https://doi.org/10.1039/d0ay02098b>.
- (5) Vallejo-Rodríguez, R.; Lopez-Lopez, A.; Saldarriaga-Noreña, H.; Murillo-Tovar, M.; Hernández-Mena, L. Optimization of Analytical Conditions to Determine Steroids and Pharmaceuticals Drugs in Water Samples Using Solid Phase-Extraction and HPLC. *Am. J. Anal. Chem.* **2011**, *02* (08), 863–870.
<https://doi.org/10.4236/ajac.2011.28099>.
- (6) Kallio, J. M.; Lahti, M.; Oikari, A.; Kronberg, L. Metabolites of the Aquatic Pollutant Diclofenac in Fish Bile. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (19), 7213–7219. <https://doi.org/10.1021/es903402c>.
- (7) 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>.
- (8) Richardson, S. D. Disinfection By-Products and Other Emerging Contaminants in Drinking Water. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2003**, *22* (10), 666–684.
[https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01003-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01003-3).

- (9) 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>.
- (10) Hernando, M. D.; Heath, E.; Petrovic, M.; Barceló, D. Trace-Level Determination of Pharmaceutical Residues by LC-MS/MS in Natural and Treated Waters. A Pilot-Survey Study. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385* (6), 985–991. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0394-5>.
- (11) Radjenović, J.; Petrović, M.; Ventura, F.; Barceló, D. Rejection of Pharmaceuticals in Nanofiltration and Reverse Osmosis Membrane Drinking Water Treatment. *Water Res.* **2008**, *42* (14), 3601–3610. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.05.020>.
- (12) 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>.
- (13) Cleuvers, M. Aquatic Ecotoxicity of Pharmaceuticals Including the Assessment of Combination Effects. *Toxicol. Lett.* **2003**, *142* (3), 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00068-7).
- (14) Basaglia, G.; Pietrogrande, M. C. Optimization of a SPME/GC/MS Method for the Simultaneous Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Waters. *Chromatographia* **2012**, *75* (7–8), 361–370. <https://doi.org/10.1007/s10337-012-2207-7>.
- (15) 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>.
- (16) Becerra-Herrera, M.; Honda, L.; Richter, P. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Time-of-Flight High Resolution Mass Spectrometry to Quantify Acidic Drugs in Wastewater. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1423*, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.071>.
- (17) Padrón, M. E. T.; Afonso-Olivares, C.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.

- J. Microextraction Techniques Coupled to Liquid Chromatography with Mass Spectrometry for the Determination of Organic Micropollutants in Environmental Water Samples. *Molecules* **2014**, *19* (7), 10320–10349.
<https://doi.org/10.3390/molecules190710320>.
- (18) Miller, J. M.; Thornburn Burns, D. Chromatography: Concepts and Contrasts: Wiley, New York, 1988 (ISBN 0-471-84821-2). Xii + 297 Pp. Price £34.50. *Anal. Chim. Acta* **1989**, *222* (1), 391–392.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)81916-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)81916-9).
- (19) Berrada, H.; Borrull, F.; Font, G.; Marcé, R. M. Determination of Macrolide Antibiotics in Meat and Fish Using Pressurized Liquid Extraction and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1208* (1–2), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.107>.
- (20) Jaffrezo, J. L.; Calas, N.; Bouchet, M. Technical Note Carboxylic Acids Measurements With Ionic Chromatography. *Science (80-.)*. **1998**, *32* (14), 0–3.
- (21) Gaborieau, M.; Castignolles, P. Size-Exclusion Chromatography (SEC) of Branched Polymers and Polysaccharides. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399* (4), 1413–1423. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4221-7>.
- (22) Ma, F.; Yang, Q.; Matthäus, B.; Li, P.; Zhang, Q.; Zhang, L. Simultaneous Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin for Vegetable Oil Adulteration by Immunoaffinity Chromatography Cleanup Coupled with LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2016**, *1021*, 137–144.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.017>.
- (23) Nadal, J. C.; Borrull, F.; Furton, K. G.; Kabir, A.; Fontanals, N.; Marcé, R. M. Selective Monitoring of Acidic and Basic Compounds in Environmental Water by Capsule Phase Microextraction Using Sol-Gel Mixed-Mode Sorbents Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Tandem. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1625*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461295>.
- (24) Russo, G.; Barbato, F.; Grumetto, L. A Validated LC/UV Method for the Determination of Four Adulterating Drugs in Herbal Slimming Capsules. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *117*, 436–445.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.09.027>.
- (25) Li, J.; Cai, Y.; Shi, Y.; Mou, S.; Jiang, G. Analysis of Phthalates via HPLC-UV in Environmental Water Samples after Concentration by Solid-Phase Extraction

Using Ionic Liquid Mixed Hemimicelles. *Talanta* **2008**, 74 (4), 498–504.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.06.008>.

- (26) Sturini, M.; Speltini, A.; Pretali, L.; Fasani, E.; Profumo, A. Solid-Phase Extraction and HPLC Determination of Fluoroquinolones in Surface Waters. *J. Sep. Sci.* **2009**, 32 (17), 3020–3028. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900135>.
- (27) Dean, J. R. *Extraction Techniques in Analytical Sciences*; J. Wiley: Hoboken, NJ :, **2009**. 49-84.
- (28) Fontanals, N.; Marcé, R. M.; Borrull, F.; Cormack, P. A. G. Mixed-Mode Ion-Exchange Polymeric Sorbents: Dual-Phase Materials That Improve Selectivity and Capacity. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2010**, 29 (7), 765–779.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.03.015>.
- (29) Fontanals, N.; Borrull, F.; Marcé, R. M. Overview of Mixed-Mode Ion-Exchange Materials in the Extraction of Organic Compounds. *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1117, 89–107. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.053>.
- (30) Karl, M.; Roti, F.; Cas, N. Ficha de Datos de Seguridad SECCIÓN 1 : Identificación de La Sustancia o La Mezcla y de La Sociedad o La Empresa SECCIÓN 2 : Identificación de Los Peligros. **2020**, 2006 (1907), 1–18.
- (31) ROTH. Ficha de Datos de Seguridad SECCIÓN 1 : Identificación de La Sustancia o La Mezcla y de La Sociedad o La Empresa. *Roth* **2019**, 2006 (1907), 1–18.
- (32) Cas, N. Ficha de Datos de Seguridad SECCIÓN 1 : Identificación de La Sustancia o La Mezcla y de La Sociedad o La Empresa SECCIÓN 2 : Identificación de Los Peligros. **2020**, 2006 (1907).
- (33) Chemicals, M.; Kgaa, M. Ficha de Datos de Seguridad. **2019**, No. 1907, 1–12.