

OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE  
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y  
PLAGUICIDAS ORCANOCLORADOS EN AGUAS DE  
CONSUMO POR GC-MS



**Maria Isabel Escribano Català**

**Trabajo de final de grado**

**Grado de Química**

**Dirigido por Marcel Van Brenk**

**2017**

## Abstract

---

This work talks about the optimization and development of a method for the simultaneous analysis of organochlorine pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons by gas chromatography-mass spectrometry.

The aim of this study resides in the injection port due to it was used a multimode injector. The objective was work with large volume injections (LVI) mode. This mode gave the possibility of inject larger volumes of sample than conventional split/splitless mode. So with the injection of up than 1 $\mu$ L could be achieved better sensitivity and lower limits of quantification.

# Índice de contenidos

---

Abstract .....	1
Índice de contenidos .....	2
1. Planteamiento del problema .....	4
1. Objetivo.....	6
2. Introducción .....	7
2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos .....	7
2.1.1. Estructura química y características .....	7
2.1.2. Toxicidad .....	8
2.1.3. Fuentes de PHA .....	8
2.2. Plaguicidas organoclorados .....	8
2.2.1. Estructura química y características .....	9
2.2.2. Toxicidad .....	10
2.2.3. Fuentes de exposición.....	11
2.3. Legislación .....	11
3. Material e Instrumentación.....	13
3.1. Instrumentación.....	13
3.2. Materiales y patrones .....	13
4. Fundamentos .....	14
4.1. Cromatografía de gases.....	14
4.2. Espectrometría de masas .....	14
4.3. Inyección de grandes volúmenes (LVI) .....	14
4.3.1. Inyección con división de muestra .....	15
4.3.2. Modo de inyección: Splitless caliente .....	15
4.3.3. Modo de inyección: Splitless en frío .....	16
4.3.4. Modo de inyección: Purga de disolvente .....	16
4.3.5. Solvent Elimination Calculator .....	17
4.4. Modelos de calibrado .....	18
5. Parte experimental.....	21
5.1. Elección del tipo de liner .....	21

5.1.1.	Liner hélice .....	22
5.1.2.	Liner de surcos .....	22
5.1.3.	Experimentación .....	23
5.2.	Volúmenes de inyección .....	24
5.3.	Condiciones de inyección.....	26
5.3.1.	Flujo de venteo (Vent flow) .....	26
5.3.2.	Presión de venteo (Vent pressure) .....	27
5.3.3.	Temperatura inicial del inyector .....	28
5.3.4.	Tiempo de venteo (Vent time).....	30
5.4.	Optimización de las masas .....	32
5.5.	Elección del patrón interno.....	34
5.6.	Creación de las curvas de calibrado .....	39
5.6.1.	Hidrocarburos aromáticos policíclicos .....	39
5.6.1.2.	Evaluación de los resultados .....	39
5.6.2.	Plaguicidas organoclorados.....	41
5.7.	Preparativa de muestra .....	44
5.7.1.	Procedimiento de extracción .....	44
5.7.2.	Elección del solvente de extracción.....	45
5.7.2.1.	Hidrocarburos aromáticos policíclicos .....	45
5.7.2.2.	Plaguicidas .....	46
6.	Conclusiones .....	49
7.	Bibliografía.....	50

# 1. Planteamiento del problema

---

En los últimos siglos, se ha producido una evolución hacia la industrialización y las nuevas tecnologías. En términos generales, esto ha supuesto un avance en muchos sentidos ya que ha permitido mejorar la calidad de vida de las personas, pero por contrapartida se ha visto incrementado el riesgo medioambiental.

Esto significa, que el medio ambiente y la salud humana, se han visto afectados de forma negativa. La industrialización, el incremento de vehículos, la mala gestión de residuos, el incremento de productos tóxicos, etc. han contribuido al aumento de la contaminación. Esto ha derivado en problemáticas conocidas como el cambio climático, contaminaciones de ríos por residuos tóxicos, polución del aire, etc.

Estos hechos han provocado una alerta en la sociedad y han conllevado al aumento del control de diversos parámetros de contaminación ambiental. Se han desarrollado normativas a nivel internacional y nacional que obligan al control de determinados contaminantes. Usualmente los valores permitidos de estos contaminantes son a niveles traza. Esto significa que es necesario el uso de métodos analíticos muy sensibles que permitan la detección y cuantificación de analitos a niveles traza.

En la actualidad existen detectores que permiten aumentar la sensibilidad, un ejemplo es el detector de masas triple cuadrupolo, o el análisis por espectrometría de masas en tándem.

Por desgracia, hay situaciones en las que no es posible trabajar con este tipo de sistemas debido a su elevado coste, por lo que hay muchos laboratorios que no poseen instrumentos como estos. Esto conlleva a la búsqueda de metodologías de trabajo alternativas para la mejora de sensibilidad en los análisis.

Una de las alternativas que podemos plantearnos frente a la problemática de no disponer de un detector más sensible, es centrarnos en mejorar el proceso de tratamiento de muestra, a fin de preconcentrarla.

Esta alternativa supone una inversión más de tiempo durante el proceso de tratamiento de muestra, ya que se deben llevar a cabo etapas alternativas como la evaporación para conseguir dicho objetivo.

Desde el punto de vista de un laboratorio analítico que se encarga de analizar muchas muestras diarias, las etapas de preconcentración suponen un problema ya que alarga el tiempo de análisis y por tanto disminuye el número de muestras que pueden prepararse. Por este motivo deben contemplarse otras opciones que nos conduzcan en la misma dirección, es decir a la preconcentración de la muestra, pero que permita evitar el problema de la inversión de tiempo.

En este trabajo, se ha planteado la posibilidad de trabajar con un inyector multimodo, para solucionar este tipo de problemas ya que permite la inyección de grandes volúmenes de muestra<sup>1</sup>.

Con la inyección de volúmenes más grandes a 1 $\mu$ L, se consigue introducir una mayor cantidad de analito, cosa que permite aumentar la sensibilidad del análisis.

# 1. Objetivo

---

De forma general, el objetivo de este trabajo es la optimización de un método cromatográfico que permita el análisis de dos tipos de contaminantes de forma simultánea (plaguicidas organoclorados e hidrocarburos aromáticos policíclicos) en muestras de agua potable, por medio de cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas (GC-MS).

De forma más específica, este trabajo se centra en el puerto de inyección, es decir, el principal objetivo es optimizar las condiciones de inyección de un inyector multimodo, que permite la inyección de grandes volúmenes. Dicha optimización se lleva a cabo con la finalidad de aumentar la sensibilidad del método.

## 2. Introducció

---

Las familias de compuestos que se pretenden tratar en este trabajo provienen de orígenes muy distintos y poseen características diversas. A continuación se hace hincapié en ambas familias.

### 2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son usualmente conocidos como PHA's. Este grupo de compuestos son derivados poliméricos del benceno y poseen un olor característico a este. Por este motivo se denominan como aromáticos, por extensión del característico aroma del benceno<sup>2</sup>.

#### 2.1.1. Estructura química y características

Se trata de una familia de compuestos que se caracteriza por contener dos o más anillos de benceno unidos entre sí, donde la entidad química de base es el núcleo bencénico hexagonal<sup>3</sup>.

**Tabla 1: Muestra la estructura de algunos de los PHA más conocidos.**

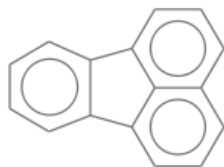
---



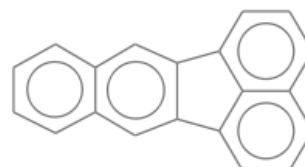
Naftaleno



Antraceno



Fluoranteno



Benzo[k]fluoranteno

---

Algunos de ellos tienen características semivolátiles, es decir, se encuentran en forma gaseosa a temperatura ambiente, mientras que otros poseen puntos de ebullición elevados.

Son sustancias lipófilas e inestables fotoquímicamente, por lo que se degradan con la luz mediante un proceso de fotooxidación<sup>2</sup>.

### 2.1.2. Toxicidad

Por el momento se ha demostrado que algunos compuestos de esta familia presentan una actividad carcinogénica, mutagénica e inmunosupresora<sup>4</sup>.

Entre los compuestos más peligrosos destacan los derivados del antraceno, como ahora el benzo[a]pireno y el dibenzo[a,h]antraceno. La OMS recomienda un valor de referencia de 0,7 µg/L para el benzo(a)pireno, que corresponde a un riesgo adicional de un cáncer por cada 10<sup>5</sup> individuos<sup>3</sup>.

### 2.1.3. Fuentes de PHA

Estos compuestos se forman básicamente cuando la materia orgánica se somete a una temperatura alta durante un tiempo suficiente<sup>4</sup>.

Existen fuentes naturales como las erupciones volcánicas o los incendios forestales que provocan la formación de dichos compuestos. Aun así, son mucho más importantes las fuentes de contaminación humana como ahora el tráfico intenso, calefacciones domésticas, y plantas industriales que dependen de la combustión de derivados del petróleo y del carbón, por lo que resultan mucho más importantes<sup>3</sup>.

## 2.2. Plaguicidas organoclorados

Un plaguicida se define según el *Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas de la Food and Agriculture Organization (FAO) de las Naciones Unidas*<sup>5</sup>, como «cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo

los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos ».

Los plaguicidas pueden clasificarse de diversas maneras y una de ellas es por medio de su naturaleza, ya que existen plaguicidas orgánicos e inorgánicos. Dentro de la familia de plaguicidas orgánicos existen los sintéticos y los naturales.

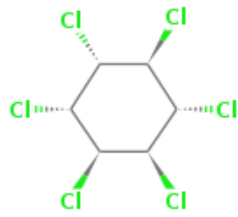
Este estudio se centra en la familia de plaguicidas orgánicos sintéticos, la cual puede subdividirse en diversas familias como ahora los plaguicidas organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides<sup>6</sup>. Más concretamente, hace alusión a los plaguicidas organoclorados.

Los plaguicidas organoclorados son conocidos como POC's y de entre la familia de plaguicidas, estos han sido los más ampliamente utilizados. Actualmente está prohibido su uso dada su elevada toxicidad<sup>7</sup>.

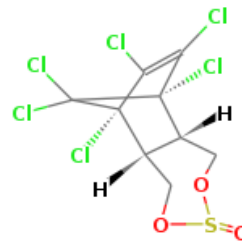
### 2.2.1. Estructura química y características

La estructura química de estos compuestos corresponde a una amplia variedad de hidrocarburos clorados. Dicha estructura aporta una alta estabilidad física y química, haciéndolos prácticamente insolubles en agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos<sup>7</sup>.

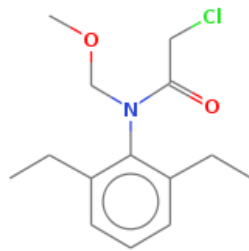
Tabla 2: Se muestra la estructura de algunos plaguicidas organoclorados.



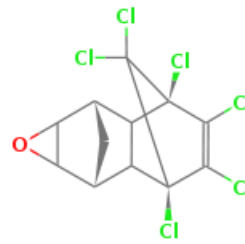
$\alpha$ -BHC



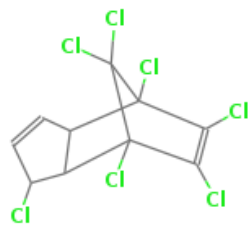
$\alpha$ -Endosulfan



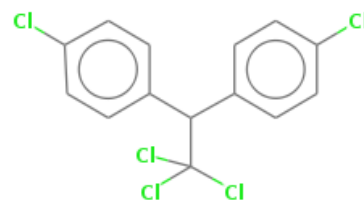
Alachlor



Endrin



Heptachlor



p,p-DDT

### 2.2.2. Toxicidad

Los pesticidas son compuestos muy persistentes en el ambiente debido a su alta estabilidad química, esto conlleva a su lenta biodegradabilidad. Los pesticidas pueden acumularse en el organismo humano ya que su gran carácter lipofílico le permite acumularse principalmente en el tejido subcutáneo, en el componente graso de la leche materna y en la sangre<sup>8</sup>.

Los distintos productos de esta familia presentan estructuras muy diversas, esto hace que presenten una actividad biológica y tóxica diferente<sup>3</sup>. Por este motivo a pesar de que la mayoría de ellos no poseen una actividad mutágena hay algunos que sí, y por lo tanto deben de ser controlados.

### 2.2.3. Fuentes de exposición

#### Exposición ambiental

Aunque actualmente el uso de pesticidas organoclorados está prohibido en el mundo, su presencia aún es persistente debido a la bioacumulación ocasionada por la lenta degradación de estos compuestos.

El uso de pesticidas para el uso agrícola durante años ha comportado la deposición de estos compuestos sobre los suelos y aguas cercanas a los lugares de exposición. En consecuencia, las diversas condiciones climáticas como ahora la lluvia, vientos fuertes y las altas temperaturas han favorecido la diseminación ambiental. Otros factores influyentes destacables también son la fotodegradación, la volatilización, la lixiviación<sup>1</sup> y el lavado superficial del suelo.

#### Exposición alimentaria

Los alimentos de origen vegetal y animal son actualmente los productos industrializados de uso cotidiano que suponen una mayor exposición tóxica por plaguicidas en los seres humanos<sup>9</sup>.

## **2.3. Legislación**

Según el REAL DECRETO<sup>10</sup> 140/2003, del 7 de febrero por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo, obliga al cumplimiento de los siguientes parámetros en referencia a los hidrocarburos aromáticos policíclicos y plaguicidas (Tabla 3).

---

<sup>1</sup> Es un proceso en el que un disolvente líquido pasa a través de un sólido pulverizado para que se produzca la disolución de uno o más de los componentes solubles del sólido.

**Tabla 3: Se muestran los valores paramétricos y la exactitud y precisión aceptables para este valor paramétrico según el Real Decreto.**

Compuesto	Valor paramétrico	Exactitud (% del VP)	Precisión (% del VP)
Benzo(a)pirene	0,01 µg/L	25	25
Suma de PHA: Benzo(b)fluoranthene Benzo(ghi)perilene Benzo(k)fluoranthene Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0,10 µg/L	25	25
Plaguicidas individuales	0,10 µg/L	25	25
Aldrín	0,03 µg/L	25	25
Dieldrin	0,03 µg/L	25	25
Heptaclor	0,03 µg/L	25	25
Heptacloro epoxide	0,03 µg/L	25	25

Valor paramétrico<sup>10</sup>: Se entiende como el nivel máximo o mínimo fijado para cada uno de los parámetros a controlar. En el caso de nuestros contaminantes, el valor paramétrico es el valor límite de concentración, es decir, en el caso de analizar una muestra dónde está supere el valor máximo del valor paramétrico se encontraría fuera de la legislación.

Exactitud<sup>10</sup>: Se entiende como el error sistemático y representa la diferencia entre el valor medio del gran número de mediciones reiteradas y el valor exacto.

Precisión<sup>10</sup>: Se entiende como el error aleatorio y se expresa habitualmente como la desviación típica (dentro de cada lote y entre lotes) de la dispersión de resultados en torno a la media. Se considera una precisión aceptable el doble de la desviación típica relativa.

## 3. Material e Instrumentación

---

### 3.1. Instrumentación

- Cromatógrafo de gases 7890A de Agilent Technologies.
- Espectrómetro de masas 5975C, con detector triple-axis de Agilent Technologies.
- Muestreador multimodo 7693 de Agilent Technologies.
- Columna cromatográfica: DB5MS-UI, 30m\*0.250mm\*0.25µm.
- Liners (Ref: 5190-2296 de Agilent Technologies); (5188-5398 de Agilent Technologies)
- O-rings (non-stick liner o-ring ref: 5188-5365)
- Septums (bleed/Temp Optimized Non-stick 11 mm Septa ref: 5183-4757)
- Ferrule 0,4 mm VG 0.1- 0.25 col ref: 5181-3323 (para inyector).
- Ferrule ultimate Plus ref: G3188-27501 (para conexión T).
- Viales y tapones para el muestreador.
- Jeringas, dosificadores y EVOL.
- Material de vidrio de uso corriente en el laboratorio (matraces aforados, botellas de vidrio, pipetas Pasteur, etc.)

### 3.2. Materiales y patrones

- Helio como gas portador.
- Hexano, calidad pestinorm, obtenido comercialmente por VWR.
- Etanol, calidad pestinorm, obtenido comercialmente por VWR.
- Diclorometano, calidad pestinorm, obtenido comercialmente por VWR.
- Sulfato de sodio anhidro, calidad pestinorm, obtenido comercialmente por VWR.
- Patrón comercial (Pesticide Mix). Concentración: 100 mg/L. Solvente: MeCl<sub>2</sub>:Hexano 60:40. Proveedor LabKings.

## 4. Fundamentos

---

### 4.1. Cromatografía de gases

La cromatografía es un método físico de separación que permite el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos volátiles y semivolátiles<sup>11</sup>. Esta técnica está limitada por la por la estabilidad térmica de los compuestos a separar, ya que la separación de la mezcla se produce en fases gaseosa.

### 4.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica en la que los iones obtenidos de una sustancia (generalmente orgánica) se separan según su relación de masa/carga iónica, dando lugar a un espectro de masas característico de la sustancia.

El proceso de espectrometría de masas se basa en cuatro etapas:

- Ionización de la muestra

- Aceleración de los iones por un campo eléctrico

- Dispersión de los iones en función de su masa/carga

- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica

### 4.3. Inyección de grandes volúmenes (LVI)

La finalidad de trabajar con un inyector de este tipo, es la mejora de análisis trazas por medio la de preconcentración in situ de la muestra.

Los inyectores tradicionales, tienen una capacidad de carga de muestra muy baja, lo que conlleva a la limitación del volumen de muestra a 1 ó 2  $\mu\text{L}$ . En el caso de aumentar el volumen de inyección, se obtiene como resultado picos anchos, distorsionados, con grandes colas e incluso con disminución de la respuesta, debido a que se produce la saturación de inyector, cosa que conlleva la pérdida de analito.

El uso de un inyector multimodo , permite trabajar con el método LVI el cual hace posible inyectar desde unos pocos microlitros hasta un mililitro o más<sup>12</sup>.

Según el método de inyección con el que se trabaja en la inyección de grandes volúmenes (split, splitless o purga de disolvente) se puede conseguir una mejor evaporación del disolvente de la muestra y así este puede ser eliminado del sistema de inyección antes de transferir los analitos a la columna. Esto supone una ventaja, ya que la preconcentración de muestra se produce dentro del propio sistema, cosa que permite evitar la evaporación del analito, y por tanto su pérdida y al mismo tiempo, se evita tener que adicionar una etapa adicional al tratamiento de muestra para preconcentrar los analitos.

#### 4.3.1. Inyección con división de muestra

Esta inyección es usualmente conocida como “Split”. En este modo de inyección el flujo de gas portador que pasa a través del inyector, se divide en dos; una parte es introducida a la columna y la otra se elimina fuera del sistema a través de una válvula que permite regular la proporción de gas que es introducido a la columna<sup>11</sup>.

#### 4.3.2. Modo de inyección: Splitless caliente

Este método puede suponer en algunos casos un problema para la integridad de la muestra.

Fundamentalmente, el inyector debe encontrarse a una temperatura suficiente alta para poder vaporizar de forma instantánea el disolvente y los analitos, con la finalidad de transportar la nube de vapor resultante a la columna.

Una consideración importante a tener en cuenta es el volumen del liner del inyector, ya que debe ser lo suficientemente grande para poder contener la nube de vapor formada. De no ser así, podría producirse pérdida de analitos debido a la incapacidad del liner de contener todo del volumen de muestra inyectado.

En el caso de compuestos térmicamente inestables, este modo de trabajo supone un problema, ya que al trabajar a temperaturas de inyección altas, el

proceso de descomposición de los analitos se ve acelerado y por tanto aumenta la degradación de los analitos.

Otro punto importante a destacar es, que al tratarse de un modo en el cual el inyector trabaja a temperaturas altas de forma constante, conlleva a la reducción de la vida útil de los liners.

#### 4.3.3. Modo de inyección: Splitless en frío

En este modo de trabajo, el inyector se encuentra a una temperatura por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente en el cual se encuentran los analitos. De esta forma, al realizarse la inyección no se produce la vaporización de los analitos y el disolvente. Una vez la jeringa se ha retirado del inyector, este aumenta su temperatura, produciéndose así en primer lugar la vaporización del disolvente, cosa que permite la concentración de los analitos. Dichos analitos son a su misma vez vaporizados y transportados a la columna.

Este modo de trabajo supone una ventaja frente al modo splitless en caliente, ya que los analitos se encuentran expuestos a temperaturas más bajas en lugar de a una temperatura alta constante, cosa que ayuda a minimizar la degradación térmica. Adicionalmente y por el mismo motivo de trabajar a temperaturas más bajas, esto permite alargar la vida del liner.

#### 4.3.4. Modo de inyección: Purga de disolvente

Este modo de trabajo es muy efectivo y es el que suele recomendarse para trabajar con largos volúmenes de inyección ya que combina el uso de la inyección en modo "*Split/Splitless*"<sup>12</sup>.

Inicialmente el inyector se encuentra de forma permanente a una temperatura baja mientras se lleva a cabo la inyección de la muestra. En estos momentos el inyector está funcionando en modo split. Al realizarse la inyección de la muestra, el líquido se va depositando en las paredes del liner mientras el disolvente se evapora a un ritmo constante. Una vez la muestra se ha inyectado

completamente, el inyector pasa a trabajar en modo splitless y se lleva a cabo la transferencia de analitos a la columna. En este momento, el inyector empieza a calentarse y vaporiza tanto analitos como disolvente, de forma que estos empiezan a entrar en la columna cromatográfica. Una vez pasado un tiempo considerable en el que se garantiza que toda la muestra ha sido transferida, el inyector empieza a trabajar en modo de purga, con la finalidad de eliminar posibles restos que puedan quedar en el liner del inyector.

#### 4.3.5. Solvent Elimination Calculator

El Solvent Elimination Calculator, es una herramienta que se encuentra incluida en el software del equipo con el que se ha trabajado (Software Agilent).

Dicha herramienta te permite calcular de forma aproximada algunos de los parámetros de inyección en el modo de trabajo de inyección de grandes volúmenes (LVI, *large volume injections*)<sup>12</sup>.

La calculadora se basa en unos datos iniciales que se deben fijar para poder realizar la aproximación de los parámetros de inyección. Estos datos iniciales corresponden al tipo de solvente para la muestra, el volumen de inyección y finalmente el punto de ebullición del primer compuesto en eluir. A partir de estos datos iniciales se calcula de forma aproximada los parámetros que afectan a la eliminación del solvente como ahora los parámetros que se mencionan a continuación:

- Tiempo de venteo (vent time)
- Presión de venteo (vent pressure)
- Ratio del flujo de venteo (vent flow rate)
- Tiempo de purga (purge time)
- Ratio del flujo de purga (purge flow rate)
- Temperatura inicial del inyector

#### 4.4. Modelos de calibrado

Se define como curva de calibración a la representación de la concentración de una solución estándar en el eje x, versus la respuesta del instrumento en el eje y<sup>13</sup>.

En cromatografía se realiza la calibración mediante la preparación de soluciones estándar de concentración conocida y midiendo la respuesta del pico cromatográfico como respuesta instrumental. La representación de diferentes niveles de concentración frente a la respuesta obtenida, genera una recta de calibrado. Esta recta se usa para determinar la concentración presente en muestras donde la concentración del analito es desconocida.

Existen diversas expresiones matemáticas que permiten generar un modelo de línea recta para la creación de una curva de calibrado. El método universalmente más usado y conocido suele ser el modelo por mínimos cuadrados el cual se expresa por medio de la Ecuación 1.

$y = ax + b$       Ecuación 1: Expresión matemática de la regresión lineal. La pendiente es (a) mientras que la ordenada en el origen es (b).

$y = ax$       Ecuación 2: Expresión matemática de la regresión lineal forzada al (0,0). La pendiente corresponde al término (a).

De forma habitual se usa el factor de determinación ( $r^2$ ) para garantizar el buen ajuste de los puntos experimentales a la recta de calibrado<sup>14</sup>. Normalmente se considera una buena recta de calibrado aquella que tiene un valor de  $r^2$  superior a 0,99.

Este criterio se emplea normalmente en métodos perfectamente establecidos y que proporcionan resultados muy controlados. Sin embargo, para evaluar la buena linealidad de la recta de calibrado, no es suficiente con evaluar el coeficiente de determinación. Por esta razón, debería realizarse un examen visual de los residuales, ya que proporciona una visión conjunta mucho más completa de la validez de la recta de calibrado obtenida.

Por otro lado, cabe destacar que se está empezando a usar en diversos laboratorios la calibración mediante el factor respuesta.

El factor respuesta es una relación entre la concentración del analito y la respuesta obtenida.

Mediante la calibración de soluciones estándar de concentración conocida, puede calcularse un promedio entre los factores respuesta relativos obtenidos.

El resultado de dicho promedio permite calcular posteriormente la concentración presente de un analito en una muestra desconocida Ecuación 7.

$$RRF_A = \frac{ResponseFactor_A}{ResponseFactor_{IS}}$$

**Ecuación 3: Expresión del factor respuesta relativo.**

$$ResponseFactor_A = \frac{PeakArea_A}{C_A}$$

**Ecuación 4: Expresión del factor respuesta.**

$$RRF_A = \frac{\frac{PeakArea_A}{C_A}}{\frac{PeakArea_{IS}}{C_{IS}}}$$

**Ecuación 5: Substitución de la ecuación 4, en la ecuación 3.**

$$\frac{PeakArea_A}{PeakArea_{IS}} = RRF_A \cdot \frac{C_A}{C_{IS}}$$

**Ecuación 6: Desarrollo de la ecuación 5.**

$$y = RRF_A \cdot C$$

**Ecuación 7: Expresión del modelo de calibrado mediante factor respuesta relativo.**

En este modelo de calibración se hace uso de la desviación estándar relativa (%RSD) para evaluar la precisión existe entre los factores respuesta relativos calculados.

El porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD): Es una expresión de medida de la precisión relativa del método analítico para un conjunto de resultados. Se calcula mediante la división de la desviación estándar de una serie

de mediciones, entre la mediana del mismo conjunto de mediciones y multiplicado por cien (Ecuación 8). Obtener grandes valores de %RSD como resultado, significa que existe una desviación y falta de precisión en las medidas y por tanto en la técnica de análisis<sup>13</sup>.

$$\frac{\sigma_{n-1}}{x} \cdot 100 = \%RSD \quad \text{Ecuación 8: Expresión de la desviación estándar relativa.}$$

## 5. Parte experimental

---

Para obtener un buen método analítico que sea robusto y que permita obtener buena sensibilidad para todos los compuestos, deben optimizarse una serie de parámetros como puede ser la inyección cromatográfica, la elección de las masas para cuantificar cada analito, el rango de linealidad, etc.

En esta parte, se desarrolla el procedimiento experimental seguido para la optimización de cada una de estas variables que afectan al conjunto del proceso cromatográfico.

### 5.1. Elección del tipo de liner

El tipo de liner es una de las diversas variables que afecta a la inyección cromatográfica, por este motivo tuvo que ser estudiada.

Cuando se trabaja con un inyector multimodo, con la inyección de grandes volúmenes, usualmente es recomendable trabajar con liners empaquetados por dos razones. En primer lugar, si se trabaja con matrices complicadas, como por ejemplo muestras de alimentos, este tipo de liner permite reducir las interferencias y disminuye el riesgo de acumulación en la columna por parte de estas. Esto supone un mejor mantenimiento y una menor deterioración de la columna y la fuente de ionización. En segundo lugar, puede impedir que el solvente llegue al final del puerto del inyector y así evitar que se produzca una sobresaturación.

Por contrapartida para el análisis de compuestos que son susceptibles a la degradación térmica o que tienden a ser adsorbidos en puntos activos del liner, es recomendable el uso de liners que no contienen empaquetamiento y que habitualmente son conocidos como “empty liners”<sup>15</sup>.

En este trabajo se ha evaluado la eficacia de dos liners no empaquetados, que debido a su diseño permiten aumentar la superficie de contacto entre el liner y la muestra, cosa que permite eliminar con más facilidad el solvente.

### 5.1.1. Liner hélice

El liner de hélice proporciona ventajas similares a los liners con lana de vidrio. La espiral de vidrio desactivada proporciona una mayor área de superficie pero sin la presencia de superficies activadas como es el caso de la lana de vidrio. Este aumento de la superficie permite que sea posible una mejor vaporización y mezcla de la muestra antes de su entrada en columna<sup>16</sup>. Dichos liners son especialmente recomendados para velocidades de inyección lentas y para inyecciones en modo split en las que no es posible trabajar con liners empaquetados debido a que causan un efecto negativo sobre los analitos como por ejemplo, degradación y absorción de los analitos. Una de las limitaciones de este liner es su baja capacidad de carga.



Imagen 1: Se muestra como es un liner hélice convencional

### 5.1.2. Liner de surcos

Este liner, contiene en su estructura pequeños hoyuelos conocidos como surcos. Su función es incrementar la superficie del liner permitiendo así una mayor adherencia y una mejor transferencia del calor desde la pared del liner hacia la muestra a medida que esta pasa a través<sup>16</sup>.

La desactivación del liner permite evitar la problemática causada por la presencia de puntos activos, ya que provocan la degradación o adherencia de algunos compuestos. A diferencia del liner hélix, este posee una capacidad de carga mayor.

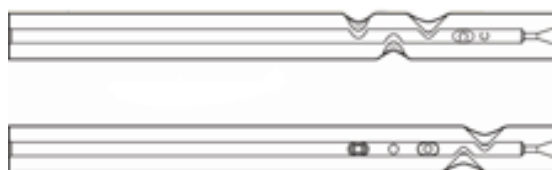


Imagen 2: Se ve una representación de la estructura de un liner de surcos

### 5.1.3. Experimentación

Se quiso evaluar como afectaba el uso de dos tipos de liners con características muy similares, donde la ergonómica de ambos estaba diseñada con la finalidad de aumentar la capacidad de carga del liner. Dicha evaluación se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se inyectó un patrón de concentración conocida, y en las mismas condiciones de inyección para ambos liners.

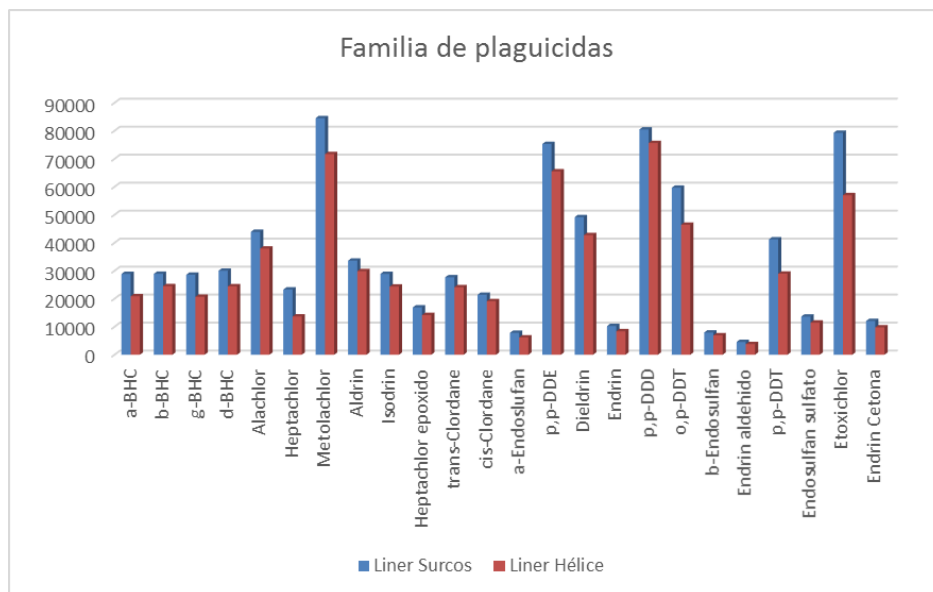


Gráfico 1: Se muestran los resultados en términos de área para la inyección con dos tipos de liners diferentes

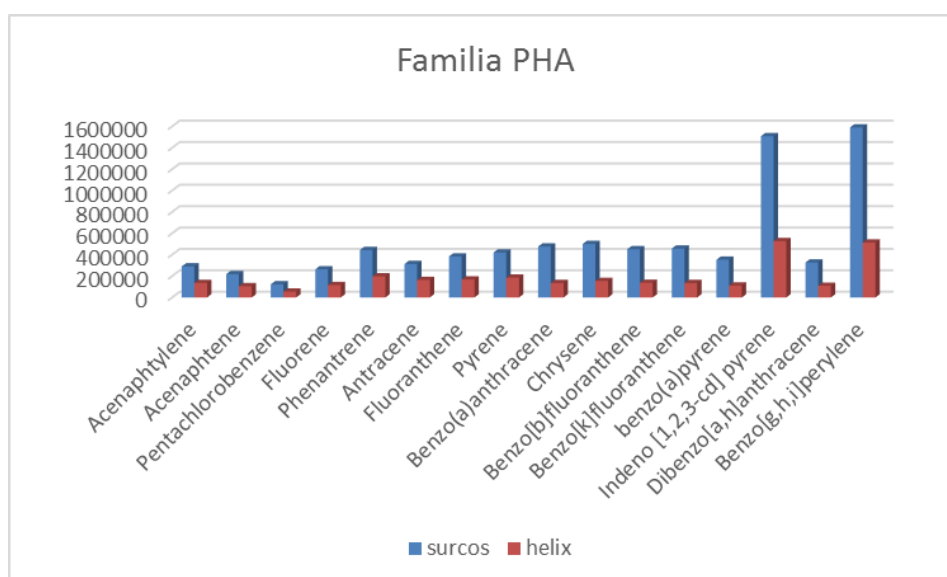


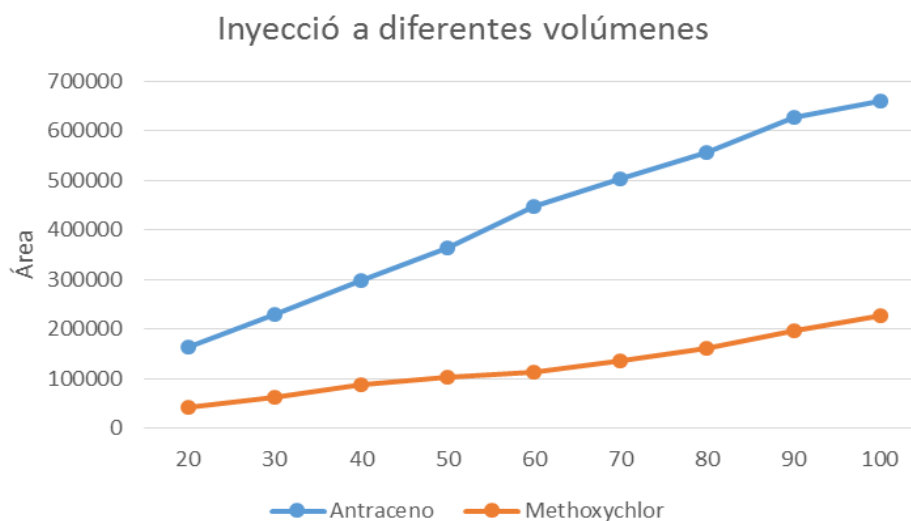
Gráfico 2: Se muestran los resultados en términos de área para la inyección con dos tipos de liner diferentes

Como se observa en el Gráfico 1 y Gráfico 2, se obtienen áreas más grandes con la inyección realizada con el liner de surcos. Esto indica que en función del liner con el que se está trabajando puede aumentarse la respuesta cromatográfica y por tanto la sensibilidad. Los resultados, podrían estar mostrando que se está superando la capacidad de carga del liner hélix. Por este motivo se escogió el liner de surcos para continuar con el proceso de optimización del método.

## 5.2. Volúmenes de inyección

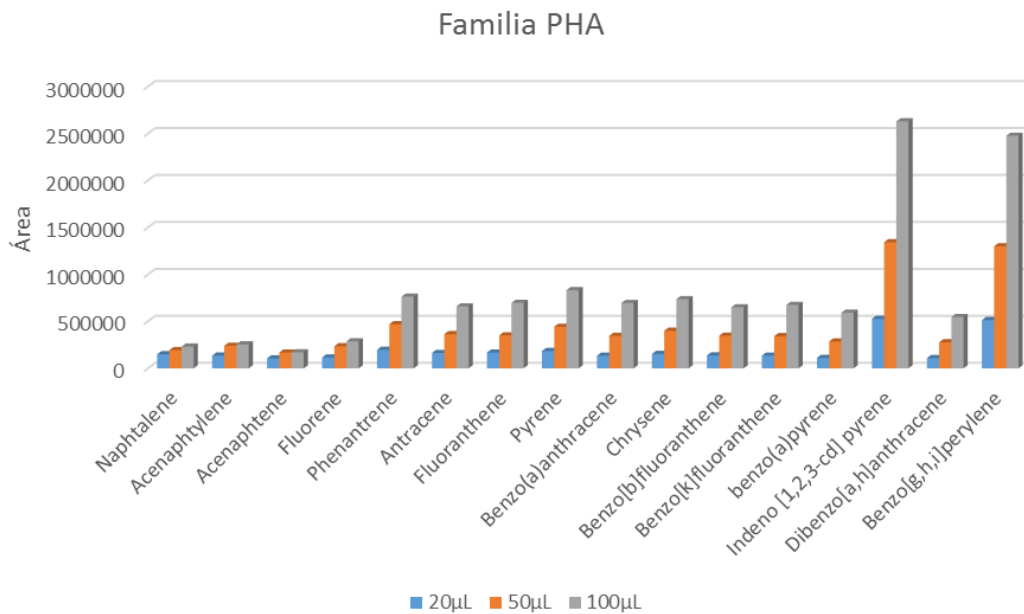
Trabajar con un inyector multimodo permite la inyección de grandes volúmenes. El volumen de muestra a inyectar es un parámetro importante, ya que la introducción de un mayor volumen de muestra en el sistema cromatográfico, permite que la cantidad de analito que llega al detector se incremente proporcionalmente, dando como resultado final un incremento de la señal del pico.

Uno de los factores más importantes a tener en cuenta para la elección de un volumen óptimo de inyección, es la capacidad máxima del liner con el que se está trabajando. Para poder analizar este parámetro, se realizaron inyecciones desde 20  $\mu\text{L}$  hasta 100  $\mu\text{L}$  con el liner de surcos y se evaluó la respuesta obtenida.

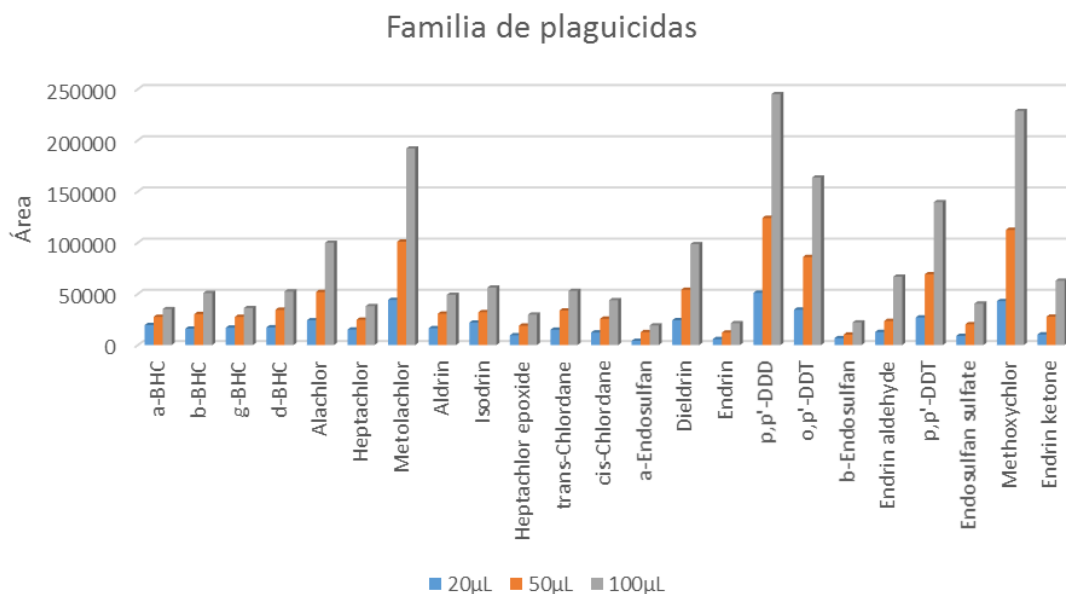


**Gráfico 3: Muestra el resultado de las inyecciones de varios volúmenes para un PHA y un plaguicida organoclorado**

Como puede observarse en el Gráfico 3, a medida que aumenta el volumen de inyección, también aumenta la respuesta y por tanto la sensibilidad. Esto indica que no se ha sobrepasado la capacidad máxima del liner y por tanto que no se produjeron pérdidas de analito.



**Gráfico 4:** Respuesta del área obtenida para la familia de PHAs a diferentes volúmenes de inyección.



**Gráfico 5:** Respuesta del área obtenida para la familia de plaguicidas a diferentes volúmenes de inyección.

Como se observa en el Gráfico 4 y Gráfico 5, podemos ver que para todos los compuestos en ambas familias, existe una tendencia creciente de la respuesta y se comporta de forma proporcional para prácticamente todos los compuestos (excepto para los menos sensibles). Esto significa que puede conseguirse un aumento de sensibilidad del método mediante el aumento del volumen de inyección.

Dados estos resultados, se fijó un volumen de inyección de 100  $\mu$ L para seguir con el proceso de optimización del método. Se fijó este volumen ya que como se ha visto anteriormente en el Gráfico 3, no supera la capacidad máxima del liner.

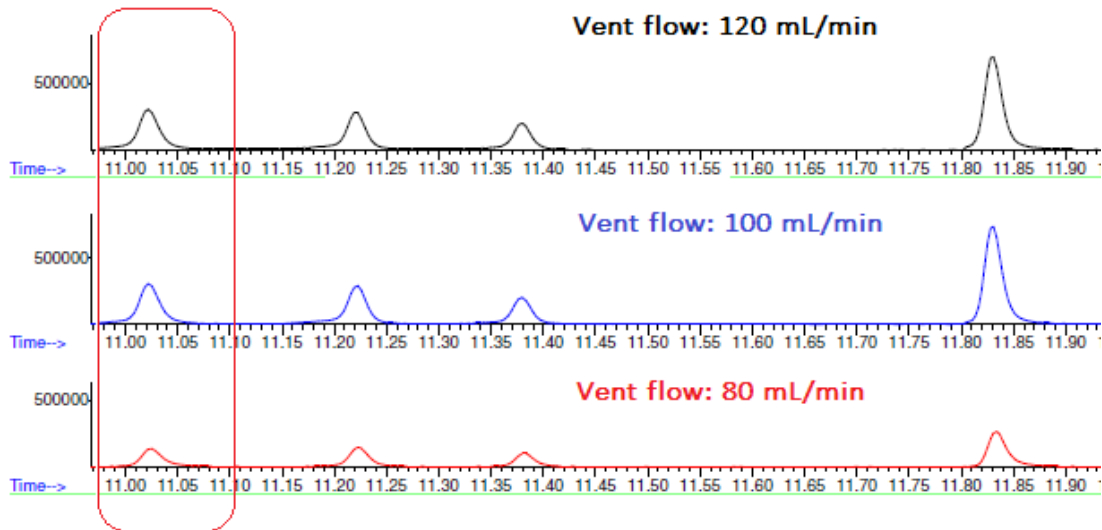
### **5.3. Condiciones de inyección**

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes parámetros que deben tenerse en cuenta para conseguir una inyección óptima. Dichos parámetros deben ser ajustados para obtener en conjunto unas buenas condiciones de inyección. A continuación se muestran dichos parámetros y sus resultados.

Hay que tener en cuenta que para la realización de estas pruebas se hizo uso de la aplicación solvent elimination calculator

#### **5.3.1. Flujo de venteo (Vent flow)**

El flujo de venteo es un parámetro que permite controlar la eliminación del solvente. Para comprobar cuál podía ser un buen flujo de venteo se hicieron pruebas a tres niveles. Se comprobó a velocidades de 120,100 y 80 mL/min.



**Imagen 3: Optimización del flujo de venteo para la inyección de 100  $\mu$ L para un patrón de 2 ppb.**

En la Imagen 3 puede observarse como los resultados para 120 y 100 mL/min son similares. En cambio para un vent flow de 80 mL/min, se observa una disminución en la respuesta. Esto puede ser debido a una velocidad de venteo demasiado lenta que provoque la pérdida de analito.

Si nos fijamos en el primer compuesto en eluir, puede observarse como disminuye un poco la cola del pico a medida que se disminuye el flujo de venteo. Por este motivo se fijó un flujo de venteo de 100 mL/min ya que se obtuvo un resultado similar al de 120 mL/min en términos de área pero mejora la forma del pico, ya que desaparece la cola. También se eligió el flujo de 100 mL/min ya que así se puede asegurarse que no se produce pérdida de analito, como es el caso de 80 mL/min.

### 5.3.2. Presión de venteo (Vent pressure)

La presión de venteo permite controlar la cantidad de solvente que puede llegar a la columna durante el tiempo de venteo. Una disminución en la presión conlleva un aumento en la eliminación y la evaporación del solvente. De forma contraria, el aumento de la presión permite la entrada de más solvente en la columna antes de que los analitos sean transferidos.

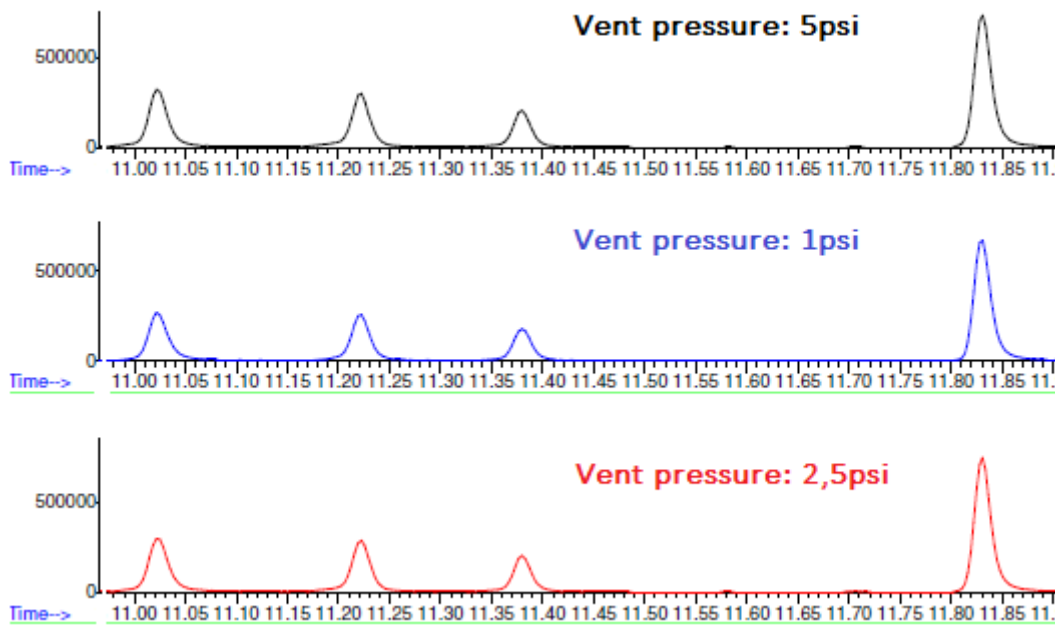


Imagen 4: Optimización de la presión de venteo para la inyección 100  $\mu$ L de un patrón de 2 ppb.

En este caso, se comprobó la presión de venteo a tres presiones diferentes (5, 2.5 y 1 psi). Como puede observarse en la Imagen 4, para presiones más pequeñas, es decir 1 psi, la forma del pico se ve más compacta y se reduce ligeramente la aparición de colas. Posiblemente esto se deba a la disminución de solvente que puede alcanzar a la columna. Por el contrario, para esta presión la respuesta se ve un poco afectada ya que disminuye ligeramente.

En el caso de 2.5 y 5 psi los resultados son muy similares y no se observan diferencias significativas. Debido a esto se eligió una presión de 5 psi y se abordó la eliminación del solvente por medio de otros parámetros.

### 5.3.3. Temperatura inicial del inyector

En el modo de trabajo solvent vent, es habitual trabajar a una temperatura inicial del inyector que se encuentre ligeramente por debajo del punto de ebullición del disolvente de trabajo.

La temperatura del inyector es un parámetro crítico ya que suele causar un gran impacto sobre el porcentaje de eliminación del solvente. Esto se debe a que un

gran cambio de temperatura hace variar mucho el comportamiento de evaporación y eliminación del disolvente.

Una buena y rápida eliminación del disolvente permite obtener buenos resultados en la forma de los picos ya que aparecen estrechos y sin cola. También se debe tener en cuenta, que una eliminación demasiado rápida puede causar la pérdida de los compuestos más volátiles, o lo que es lo mismo, de los primeros compuestos en eluir.

Para realizar la optimización de este parámetro se comprobaron tres temperaturas de inyección. Usualmente recomiendan para la inyección en modo *Purga de disolvente* una temperatura inicial 5°C por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente <sup>12</sup>.

En este caso el disolvente era hexano con una temperatura de ebullición de 68°C, así que se eligió 63°C como temperatura de partida y se probaron dos temperaturas más por debajo de ésta (60 y 58 °C).

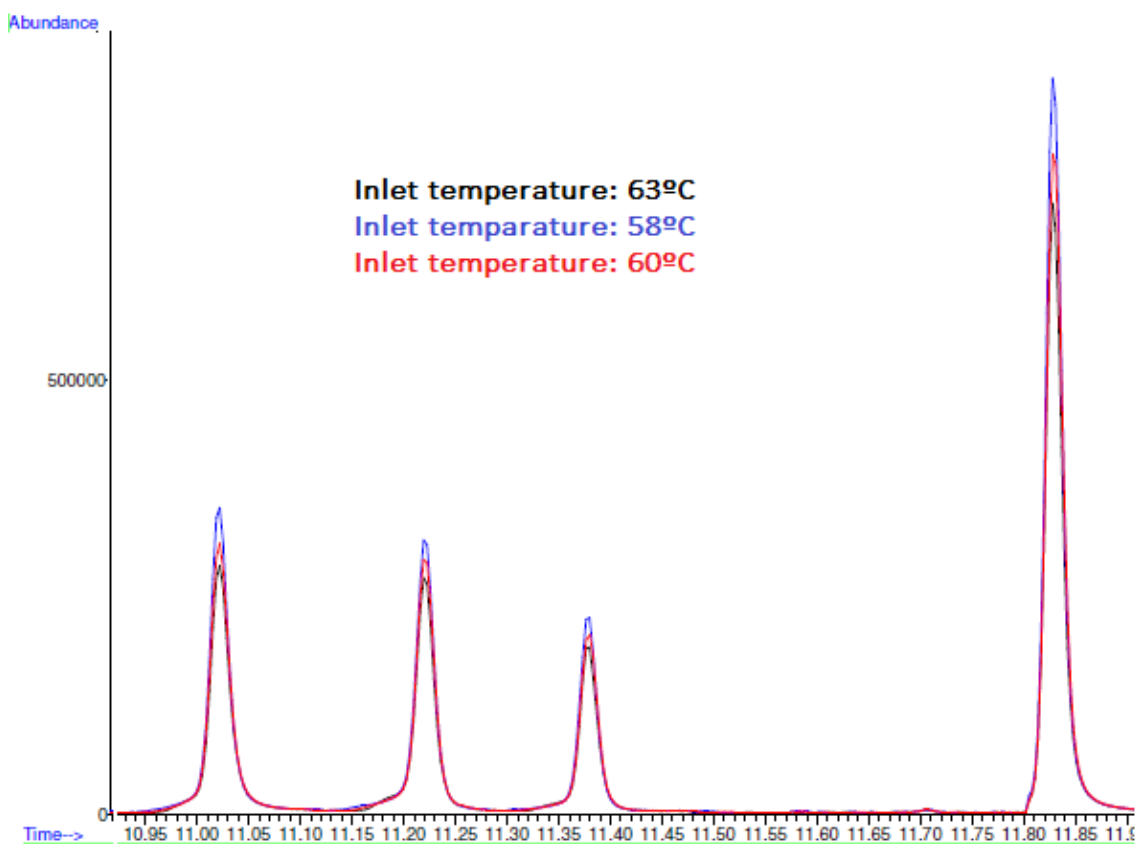


Imagen 5: Optimización de la temperatura inicial del inyector para una inyección de 100  $\mu\text{L}$  para un patrón de 2 ppb.

En la Imagen 5, puede verse como afecta la temperatura a la respuesta cromatográfica. Se comprueba como al aumentar la temperatura se ven disminuidas ligeramente las áreas de los compuestos. Este efecto se debe al aumento de la eliminación del solvente. Esta afecta de la misma forma a los analitos, produciendo así una pequeña pérdida de estos.

No obstante, se elige la temperatura de 63°C, siendo conscientes de que la decisión tomada sacrifica ligeramente la sensibilidad obtenida.

Se toma esta decisión ya que al final de cada análisis, el inyector debe enfriarse y volver a la temperatura inicial. Cuanto más baja es la temperatura inicial, mayor es el tiempo que tarde el inyector en poder enfriarse, y por tanto más tarda en iniciar el siguiente análisis. Este problema podría solucionarse mediante el uso de un agente refrigerante como podría ser el CO<sub>2</sub>, ya que ayuda a enfriar el inyector más rápidamente. (En este trabajo no se pudo hacer uso del CO<sub>2</sub> debido a las limitaciones del laboratorio).

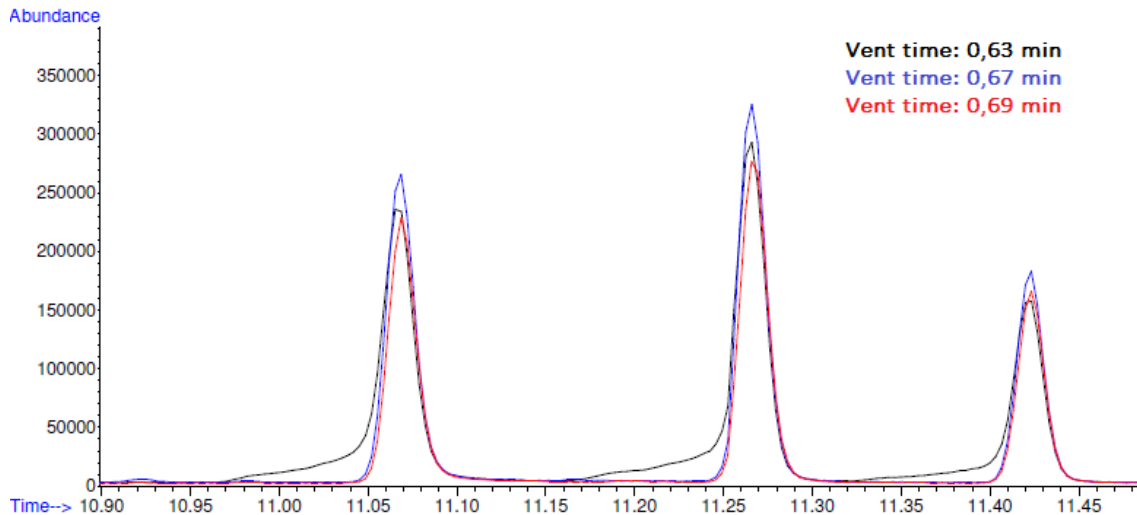
#### 5.3.4. Tiempo de venteo (Vent time)

Una vez se optimizaron los parámetros iniciales que hay que fijar en la aplicación *Solvent elimination calculator*, se usaron los parámetros que se encuentran en la Tabla 4 para obtener el resto de variables por medio de la aplicación.

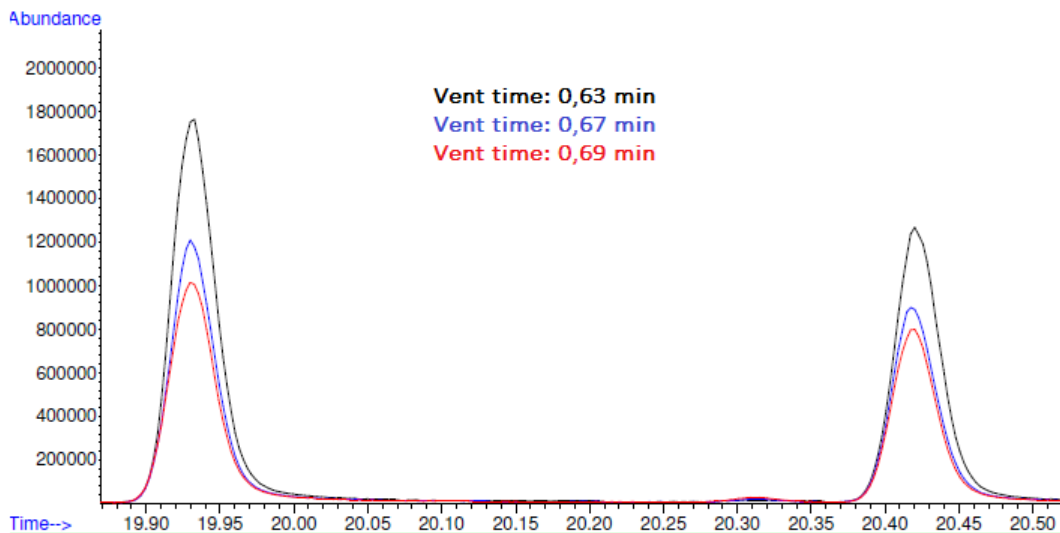
**Tabla 4: Muestra cuales fueron los parámetros iniciales fijados para la inyección de 100 µL.**

Flujo de venteo	100 mL/min
Presión de venteo	5 psi
Temperatura inicial del inyector	63°C

De los parámetros obtenidos por la calculadora, únicamente se optimizó el tiempo de venteo a fin de mejorar la forma de los picos. La calculadora sugirió un tiempo de venteo de 0,63 minutos.



**Imagen 6: Optimización del tiempo de venteo para la inyección de 100  $\mu$ L para los primeros compuestos en eluir.**



**Imagen 7: Optimización del tiempo de venteo para la inyección de 100  $\mu$ L para los últimos compuestos en eluir.**

En la Imagen 6 e Imagen 7, se muestran los resultados obtenidos para los diferentes tiempos de venteo. En la primera imagen (Imagen 6) se representan los primeros compuestos en eluir, donde observamos que para tiempos de venteo mayores, se reducen las colas de pico y la diferencia de respuesta no es muy significativa.

Por el contrario en la segunda imagen (Imagen 7) se representan los últimos compuestos que aparecen en el cromatograma, donde estos no tienen problemas en la forma de pico, y a medida que aumenta el tiempo de venteo se produce una disminución de la respuesta.

Estos resultados obligan a crear un compromiso, ya que es necesario mejorar la forma de pico para los primeros compuestos en eluir, pero no interesa disminuir la respuesta en el resto de compuestos. Por este motivo se fijó un valor de 0,67 minutos como tiempo de venteo.

#### 5.4. Optimización de las masas

La elección de las masas es un parámetro crítico cuando se trata de trabajar con cromatografía acoplada a un detector de masas. La elección de una masa como target<sup>2</sup> es muy importante, ya que dicha masa es la que permitirá la posterior cuantificación del analito. La elección de qualifiers adecuados también es importante ya que son las masas que te permiten verificar que el compuesto que estas cuantificando es realmente el analito de interés.

Para la determinación de las masas se fijaron los siguientes criterios:

- Documentación bibliográfica (uso de diversas fuentes para comparar las masas escogidas)<sup>17-19</sup>.
- Uso de las masas más características para cada compuestos con relación (m/z) más grandes, ya que las fragmentaciones con relación (m/z) pequeñas, son menos específicas.
- Uso de las fragmentaciones más características del espectro de masas para cada compuesto.
- Los qualifiers deben representar una abundancia relativa respecto al target superior al 10 %.

En la Tabla 5 y Tabla 6 se encuentran las masas cuantificadoras (targets) y los qualifiers para cada compuesto analizado mediante el método que se ha desarrollado a lo largo este trabajo

---

<sup>2</sup> Una masa target es aquel ion con relación (m/z) que se usa para cuantificar el ananalito de interés. También es conocida como masa cuantificadora.

**Tabla 5: Masas establecidas para la familia de PHA.**

Compuestos	Tiempo retención (min)	Target (m/z)	Qualifiers (m/z)	
Naphtalene	9.181	128	127	129
Acenaphtylene	11.069	152	151	153
Acenaphthene	11.267	153	154	152
Fluorene	11.873	165	166	167
Phenanthrene	13.017	178	176	179
Anthracene	13.078	178	176	179
Fluoranthene	14.431	202	203	101
Pyrene	14.707	202	203	101
Benzo(a)anthracene	16.137	228	226	229
Chrysene	16.137	228	226	229
Benzo[b]fluoranthene	17.661	252	250	253
Benzo[k]fluoranthene	17.698	252	250	253
Benzo[a]pyrene	18.156	252	250	253
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	19.915	276	274	277
Dibenzo[a,h]anthracene	19.919	278	279	139
Benzo[g,h,i]perylene	20.401	276	274	277

**Tabla 6: Masas establecidas para la familia de plaguicidas.**

Compuesto	Tiempo retención (min)	Target (m/z)	Qualifiers (m/z)	
a-BHC	12.46	183	181	109
b-BHC	12.746	181	183	109
g-BHC	12.817	183	181	109
d-BHC	13.115	183	181	109
Alachlor	13.403	45	160	237
Heptachlor	13.565	100	272	274
Metolachlor	13.788	162	238	146
Aldrin	13.939	66	263	220
Isodrin	14.237	193	195	263
Heptachlor epoxide	14.309	353	355	351
Trans-Chlordane	14.532	373	375	377
Cis-Chlordane	15.656	373	375	377
a-Endosulfan	14.676	195	241	239
p,p-DDE	14.783	246	248	318
Dieldrin	14.932	79	279	263
Endrin	15.151	263	82	81
p,p-DDD	15.188	235	237	165
o,p-DDT	15.228	235	237	165
b-Endosulfan	15.246	195	341	337
Endrin aldehyde	15.375	345	347	250
p,p-DDT	15.538	235	237	165
Endosulfan sulfate	15.594	272	387	274
Methoxychlor	16.017	227	228	152
Endrin ketone	16.09	317	319	67

## 5.5. Elección del patrón interno

La calibración mediante un patrón o estándar interno, se utiliza habitualmente para compensar errores aleatorios y sistemáticos como por ejemplo fluctuaciones debido al método y errores instrumentales<sup>11</sup>.

En cromatografía de gases, la inyección de la muestra es una de las etapas menos reproducibles del proceso cromatográfico. Esta baja reproducibilidad puede conllevar problemas a la hora de elaborar rectas o en la cuantificación de muestras. Por este motivo, el uso del método por patrón interno permite corregir esta variabilidad en los compuestos que van a analizarse.

La calibración por patrón interno, consiste en la adición en muestras y patrones una cantidad constante<sup>3</sup> de un compuesto comúnmente conocido como patrón o estándar interno (PI o EI). La recta de calibrado se construye en base a la relación entre la señal del compuesto y la del patrón interno<sup>20</sup>.

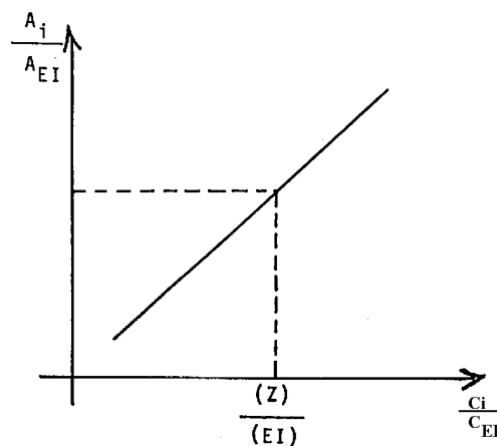


Imagen 8: Curva de calibración por patrón interno.

$$A_i = k_i \cdot C_i$$

Ecuación 9: Muestra la relación entre la señal (A) y la concentración (C) en la muestra.

$$A_{EI} = k_{EI} \cdot C_{EI}$$

Ecuación 10: Muestra la relación entre la señal (A) y la concentración (C) en el estándar interno.

---

<sup>3</sup> Usualmente se usa una concentración elevada para que se mantenga constante a lo largo del tiempo.

$$\frac{Señal_i}{Señal_{EI}} = f \frac{C_i}{C_{EI}}$$

Ecuación 11: Surge de la división de la ecuación 1 entre la ecuación 2.

Como podemos ver en la Ecuación 11, el término “*f*” corresponde al factor respuesta ( $\frac{k_i}{k_{EI}}$ ). Este factor debe ser constante en un intervalo de concentración determinado. Dicho factor corresponde a la pendiente de la recta de calibrado si se representa la relación entre señales versus la relación entre concentraciones.

Existen diversas consideraciones a tener en cuenta para hacer una buena elección del patrón interno.

- El pico cromatográfico del patrón interno no debe coeluir con ninguno de los picos del resto de compuestos a analizar.
- El pico del patrón interno debe tener un tiempo de retención similar al resto de compuestos que corrige.
- A lo largo de todo el proceso de análisis se debe de comportar de forma similar al resto de analitos<sup>4</sup>.
- En ningún caso debe de encontrarse en presente en la muestra a analizar.
- Debe de ser químicamente estable frente a los compuestos presentes en la muestra y frente a los compuestos (como ahora disolventes) que se usan a lo largo del análisis.

Este trabajo se ha basado en las EPA 525 y 8270d para la elección de los patrones internos. Sin embargo, se fijó como criterio usar como patrón interno aquel compuesto que se encuentra más próximo en términos de tiempo de retención al grupo de analitos que corrige.

---

<sup>4</sup> Por este motivo, es usual el uso de compuestos que están en el análisis pero deuterados. De esta forma el compuesto se comporta de forma muy similar al resto de analitos, pero no puede estar presente en la muestra bajo ningún concepto.

**Tabla 7: Estándares internos usados para la cuantificación de PHA y plaguicidas en la EPA 525.**

Acenaphthene-D10	Chrysene-D12	Phenanthrene-D10
Acenaphthylene	Aalachlor	Benzo[a]anthracene
a-BHC	Aldrin	Benzo[b]fluoranthene
	Anthracene	Benzo[k]fluoranthene
	p,p-DDD	Benzo[g,h,i]perylene
	p,p-DDE	Benzo[a]pyrene
	p,p-DDT	Chrysene
	Dieldrin	Metoxichlor
	a-Endosulfan	Indeno[1,2,3-cd]pyrene
	b-Endosulfan	
	Endosulfan	
	Sulfate	
	Endrin	
	Endrin aldehyde	
	b-BHC	
	d-BHC	
	g-BHC	
	Heptachlor	
	Heptachlor	
	epoxide	
	Metolachlor	

Como puede observarse en la Tabla 7, estos métodos EPA cuantifican tanto plaguicidas como PHA, usando hidrocarburos aromáticos policíclicos deuterados como patrones internos para corregir al resto de compuestos. Dado que para elegir un estándar interno debe buscarse un compuesto que posea una estructura y se comporte de forma similar, se evaluó la influencia sobre la cuantificación para los plaguicidas organoclorados en función del patrón interno. La evaluación se llevó a cabo cuantificando los plaguicidas mediante un patrón interno correspondiente a un PHA deuterado y mediante un plaguicida deuterado. Posteriormente se comparó con que patrón interno se cuantificaba mejor.

**Tabla 8: Se muestran los resultados obtenidos en función del patrón interno que se usa para cuantificar.**

Estándar Interno	a-BHC-D6	Phenanthrene-D10	a-BHC-D6	Phenanthrene-D10
Compuestos	%RSD	%RSD	[ ]=µg/L	[ ]=µg/L
a-BHC	7,1	13	2,71	1,74
b-BHC	7,1	9,6	2,67	2,25
g-BHC	8,5	12,4	2,71	1,75
d-BHC	8	14,2	2,73	2,21
Alachlor	7,6	7,6	2,69	2,55
Heptachlor	18,7	14,7	2,63	1,54
Metolachlor	12,3	20	2,74	2,33
Aldrin	12,4	12,8	2,66	1,47
Isodrin	12,5	14,8	2,60	1,57
Heptachlor epoxido	8,7	14,4	2,73	1,92
trans-Chlordane	8,9	18,4	2,68	1,97
cis-Chlordane	8,3	15,3	2,70	2,05
a-Endosulfan	11	11,8	2,84	2,06
p,p-DDE	11,5	11,03	2,86	2,45
Dieldrin	5,7	9,82	2,72	2,02
Endrin	10,2	9,05	2,71	2,29
p,p-DDD	16,8	19,02	2,83	2,44
o,p-DDT	18,5	21,14	2,83	2,53
b-Endosulfan	13,4	6,77	2,77	2,28
Endrin aldehyde	14,9	11,43	2,77	2,72
p,p-DDT	21,4	22,6	2,59	3,38
Endosulfan sulfate	14,1	20,36	2,62	2,30
Metoxichlor	21,4	23,3	2,76	3,14
Endrin ketona	14,5	16,04	2,76	2,32

Como puede observarse en la Tabla 8, los resultados muestran que para la mayoría de los plaguicidas se obtuvieron mejores porcentajes de RSD para la evaluación de las rectas con el uso del a-BHC como patrón interno.

En algunos casos la diferencia entre el %RSD obtenido por el a-BHC-D6 comparado con el Phenanthrene-D10 o el Chrysene-D12 no es significativa. En cambio, a la hora de cuantificar un patrón de concentración conocida (3 µg/L), los resultados son notablemente más satisfactorios para el a-BHC-D6, ya que se obtuvieron resultados reales más cercanos al valor teórico.

Dados los resultados y su evaluación, se decidió usar el a-BHC-D6 como estándar interno para la corrección de todos los plaguicidas. Para la familia de hidrocarburos aromáticos policíclicos, se decidió usar los PHA's deuterados.

**Tabla 9: Perfil de hidrocarburos aromáticos policíclicos y plaguicidas, junto con los respectivos patrones internos.**

a-BHC-D6	Naphtalene-D8	Phenantrene-D10	Chrysene-D12
a-BHC	Naphtalene	Fluorene	Pyrene
b-BHC	Acenaphtylene	Phenantrene	Benzo[a]anthracene
g-BHC	Acenaphtene	Antracene	Chrysene
d-BHC		Fluoranthene	Benzo[b]fluoranthene
Alachlor			Benzo[k]fluoranthene
Heptachlor			Benzo[a]pyrene
Metolachlor			Indeno[1,2,3-cd]pyrene
Aldrin			Dibenzo[a,h]anthracene
Isodrin			Benzo[g,h,y]perylene
Heptachlor epoxido			
trans-Chlordane			
cis-Chlordane			
a-Endosulfan			
p,p-DDE			
Dieldrin			
Endrin			
p,p-DDD			
o,p-DDT			
b-Endosulfan			
Endrin aldehyde			
p,p-DDT			
Endosulfan sulfate			
Metoxichlor			
Endrin ketona			

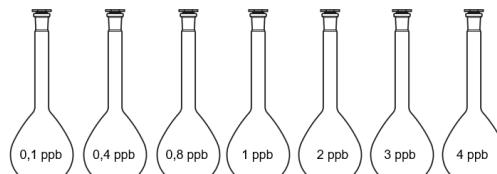
En la Tabla 9 se muestra el perfil de los compuestos que se quieren analizar mediante este método y se indica cuál es el patón interno que corrige cada uno de ellos.

## 5.6. Creación de las curvas de calibrado

Como se ha mencionado anteriormente, la creación de una curva de calibrado permite calcular la concentración presente de un componente en una muestra desconocida. Por este motivo es importante obtener una buena curva de calibrado que se ajuste correctamente a la expresión matemática mediante la que se quiere cuantificar. A continuación se encuentra detallado el proceso que se siguió para la obtención de dichas rectas de calibrado.

### 5.6.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Se planteó la construcción de una recta a siete niveles de concentración. Por este motivo la recta se construyó en un intervalo de 0,1 a 4  $\mu\text{g/L}$ . Se eligió este intervalo de concentraciones ya que el objetivo de este análisis es la cuantificación a niveles muy bajos de concentración. Dentro de este intervalo, si se tiene en cuenta el factor de preconcentración de la preparativa de la muestra, se encuentra el valor paramétrico definido por el Real Decreto (Tabla 3).



**Imagen 9: Niveles de concentración de la curva de calibrado para los PHA.**

### 6.8.1.2. Evaluación de los resultados

Se prepararon 4 rectas durante diferentes días y fueron evaluadas mediante los modelos matemáticos mencionados anteriormente (Apartado 4.4).

Para el modelo de regresión lineal forzada al (0,0), se evaluó la linealidad de las rectas mediante la evaluación del coeficiente de determinación  $r^2$ , considerándose a partir de 0,996 un buen resultado.

Para la evaluación de las rectas de calibrado construidas mediante el modelo de factores respuesta relativos, se evaluó el porcentaje de RSD cara cada uno de

los compuestos. El criterio se extrajo de la normativa EPA 870 <sup>17</sup>, donde fija un valor máximo del 20 %RSD, para dar por buena la curva de calibrado.

**Tabla 10: Muestra la media de los resultados obtenidos durante la preparación de 4 curvas de calibrado.**

	%RSD	r <sup>2</sup>
Acenaphtene	6	0,9977
Antracene	13	0,9980
Chrysene	5	0,9998
Fluoranthene	12	0,9987
Fluorene	4	0,9993
Pyrene	9	0,9984
Benzo[b]fluoranthene	11	0,9987
Benzo[k]fluoranthene	7	0,9972
Benzo(a)pyrene	12	0,9927
Benzo(g,h,i)perylene	7	0,9980
Indeno(1,2,3-cd)	13	0,9948
Naphtalene	4	0,9997
Acenaphtylene	8	0,9963
Phenantrene	5	0,9996
Benzo(a)anthracene	7	0,9984
Dibenzo [a,h]antharece	14	0,9962

Los resultados obtenidos (Tabla 10) durante estos 4 días confirmaron que las rectas presentan una buena linealidad y correlación entre los diferentes puntos. Dichos resultados demostraron que se puede cumplir con los criterios fijados tanto para la evaluación del coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>), como para la desviación estándar relativa (%RSD).

**Tabla 11: Criterios establecidos para la evaluación de las curvas de calibrado.**

Modelo de calibrado	Parámetro que se evalúa	Criterio
Regresión lineal forzada al (0,0)	Coeficiente de determinación	r <sup>2</sup> > 0,996
Factores respuesta relativos	Desviación estándar relativa	%RSD<20%

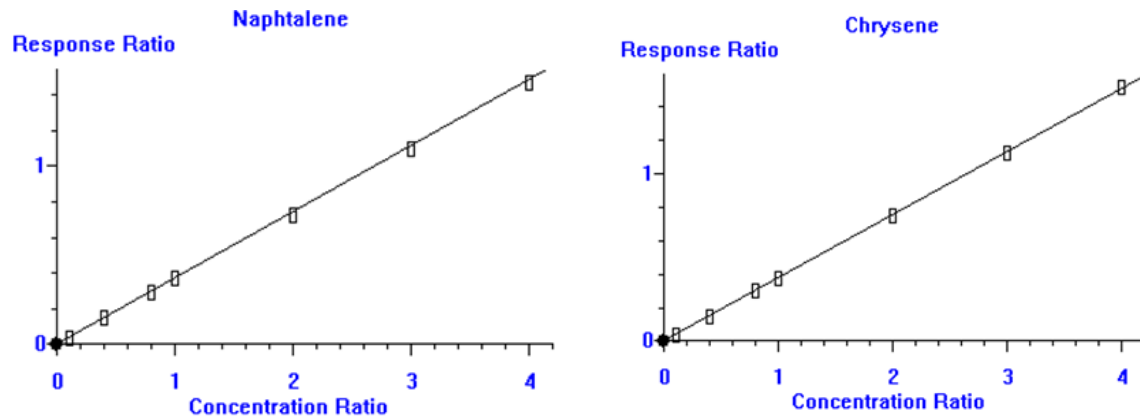


Imagen 10: Se muestran las curvas obtenidas para el Naphtalene (3%RSD) el Chrysene (7%RSD).

Finalmente para comprobar el buen ajuste de los puntos a la recta, se hizo un análisis de los residuales de forma aleatoria para cada compuesto, entre las 4 rectas preparadas.

El resultado de dicho análisis, mostró un buen ajuste en la mayoría de los casos. A continuación el Gráfico 6 muestra un ejemplo de uno de los gráficos de residuales obtenidos para el Chrysene.

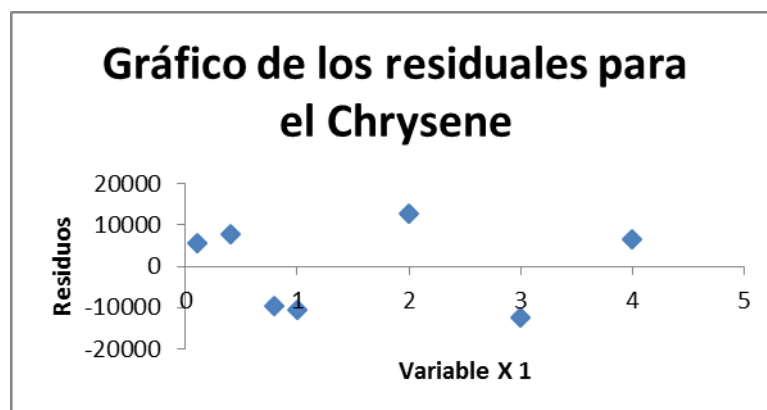


Gráfico 6: Muestra la gráfica de los residuales obtenida para la curva de calibrado del Chrysene que aparece en la Imagen 11.

### 5.6.2. Plaguicidas organoclorados

En primer lugar se construyó una recta a seis niveles de concentración en el rango de concentración de 0,4 a 6  $\mu\text{g/L}$ . Se eligió este como intervalo ya que abarca el rango de trabajo en el cual se quieren cuantificar las muestras, y en

este intervalo se ve comprendido del valor paramétrico de un 0,1 µg/L para los plaguicidas individuales al que hace referencia el Real Decreto (Tabla 3).

Al evaluar los resultados obtenidos para la construcción de las curvas de calibrado, se observó una tendencia cuadrática sólo para algunos compuestos como ahora el endrin aldehído, o el DDD. Dicho efecto se ve mostrado en la Imagen 11.

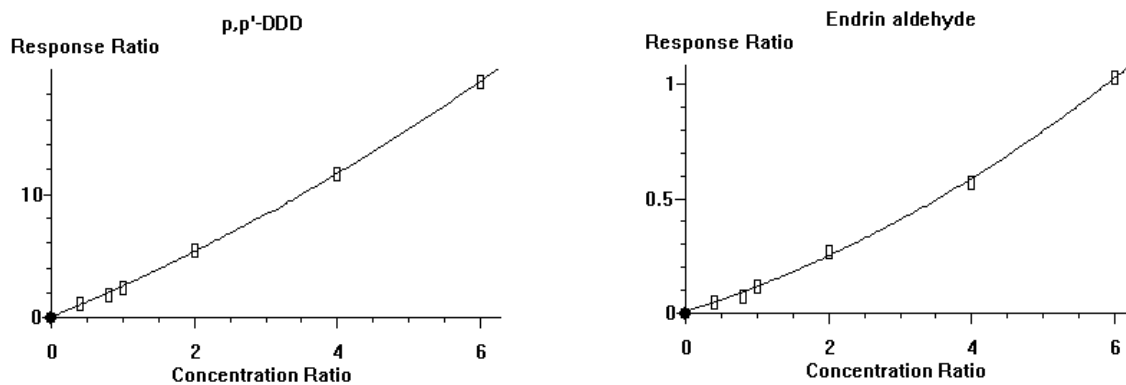


Imagen 11: Rectas de calibrado obtenidas con la inyección de 100 µL para el p,p,-DDD y el endrin aldehído.

No se puede explicar con seguridad, cuál fue la razón por la que solamente unos pocos compuestos (DDD, Endrin aldehyde, Metoxychlor y Endrin ketone) mostraron tendencias cuadráticas con el método optimizado para la inyección de 100 µL.

Una de las posibles hipótesis es el efecto que produce un volumen de inyección tan alto sobre la vida del liner, ya que a medida que este se va usando, se desgasta y se generan puntos activos que provocan el aumento de la degradación de algunos analitos<sup>21</sup>. (Es solamente una hipótesis y debería haberse hecho un estudio más riguroso antes de atribuir este problema alguna explicación).

A fin de solucionar este problema, se planteó modificar el volumen de inyección del método a 20 µL, con el objetivo de disminuir la cantidad de muestra introducida y así reducir la degradación y alargar su vida.

También se acortó el intervalo de la recta de 0,4 a 4 ppb ya que no era necesario un intervalo tan amplio, así que se substituyó el nivel de concentración de 6 ppb por 3 ppb con la finalidad de continuar teniendo una recta construida por 6 puntos.

Otra razón por la que se eliminó el punto más alto de la recta (6ppb), fue porqué éste es el que parecía tener una tendencia más acusada a desviarse de la recta lineal.

A continuación en la Tabla 12 se muestran los resultados que se obtuvieron con las condiciones modificadas (Inyección de 20µL y recta de 0,4 a 4 ppb).

**Tabla 12: Muestra la media de los resultados obtenidos durante la preparación de 4 curvas de calibrado (n=4), con la inyección de 20µL.**

	%RSD	r <sup>2</sup>
a-BHC	3	0,9988
b-BHC	5	0,9974
g-BHC	6	0,9986
d-BHC	6	0,9973
Alchlor	5	0,9966
Heptachlor	8	0,9989
Metolachlor	6	0,9967
Aldrin	5	0,9980
Isodrin	5	0,9985
Heptachlor epoxide	6	0,9973
trans-chlordane	9	0,9928
cis-chlordane	5	0,9968
a-endosulfan	7	0,9938
p,p-DDE	6	0,9961
Dieldrin	6	0,9974
Endrin	5	0,9970
p,p-DDD	7	0,9934
o,p-DDT	10	0,9958
b-Endosulfan	7	0,9934
Endrin aldehyde	10	0,9947
p,p-DDT	13	0,9946
Endosulfan sulfate	8	0,9944
Metoxychlor	11	0,9913
Endrin ketone	9	0,9927

Como se muestra en la Tabla 12, todos los compuestos cumplieron con el criterio que se ha mencionado anteriormente, donde un %RSD inferior al 20% es considerado una recta aceptable. Respecto a los coeficientes de determinación, también mostraron valores cercanos a la unidad. Esto parece garantizar la bondad del ajuste de los puntos experimentales a la recta de calibrado.

## 5.7. Preparativa de muestra

El tratamiento de muestra es un proceso realmente importante, ya que debe asegurarse que no hay pérdida de analitos durante el proceso, y por tanto que se están obteniendo una buena recuperación de estos.

La preparativa de muestra incluye la etapa de extracción de los analitos de interés presentes en la muestra a analizar. En la actualidad hay una gran variedad de técnicas analíticas que permiten realizar extracciones en una muestra líquida como por ejemplo SPE, SPME, extracción líquido-líquido, etc.

En este trabajo se ha llevado a cabo una extracción líquido-líquido debido a que es una técnica rápida, que no supone unos costes excesivos y proporciona buenos resultados.

### 5.7.1. Procedimiento de extracción

Según la normativa ISO 6468:1996<sup>22</sup>, la propia extracción de la muestra puede llevarse a cabo en el recipiente de muestreo con ayuda de un agitador magnético y una posterior separación con un microseparador.

En este caso, desde el punto de vista de un laboratorio analítico donde se realiza la preparativa de muchas muestras diarias, interesa que el tiempo que se invierte en esta etapa sea el menor posible. Por este motivo la extracción se realizó de la siguiente manera:

- Pesar 120 ml de la muestra en una botella de vidrio.
- Adicionar 4 ml del solvente de extracción.
- Agitación magnética durante 30 minutos a 700-800 rpm.
- Después de la agitación dejar separar las fases.
- Adicionar 2 gramos de sulfato sódico en un vial topacio de 5 mL.
- Separación de la fase orgánica mediante una pipeta Pasteur y adicionar el extracto sobre el sulfato.
- Agitación mediante un vortex, a fin de poner en contacto todo el extracto con el sulfato sódico.

## 5.7.2. Elección del solvente de extracción

En la extracción líquido-líquido es muy importante la elección del disolvente y las proporciones entre este y la muestra. Por este motivo se realizaron pruebas modificando ambos parámetros.

El estudio se realizó por separado entre las dos familias de compuestos.

### 5.7.2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Para la familia de PHA's únicamente se realizó la extracción con hexano, ya que son compuestos con estructuras muy apolares que tienen muy poca tendencia a quedarse retenidos en el agua. Por tanto con un disolvente apolar como el hexano tienden a pasar a la fase orgánica con facilidad. Sumándole a todo esto, es un método muy estandarizado y se encuentra en diferentes fuentes bibliográficas<sup>3,23</sup>.

### Resultados de recuperación

Se prepararon muestras spikadas<sup>5</sup> con un patrón de referencia a una concentración de 0,02 µg/L. Se eligió esta concentración ya que es cercana al valor paramétrico de la suma de PHA según el Real Decreto (Tabla 3).

**Tabla 13: Muestra los resultados de la evaluación del porcentaje de recuperación (%Recovery) en cinco muestras preparadas a una concentración de 0,02 µg/L.**

Compuesto	%Recovery (n=5)
Naphtalene	98
Acenaphtylene	105
Acenaphtene	97
Fluorene	91
Phenantrene	90
Antracene	89
Fluoranthene	90
Pyrene	91
Benzo(a)anthracene	90

<sup>5</sup> Adición de una cantidad conocida de un compuesto conocido sobre una muestra o un standard con la finalidad de comprobar el método analítico o la calibración<sup>13</sup>.

---

Chrysene	89
Benzo[b]fluoranthene	92
Benzo[k]fluoranthene	92
benzo(a)pyrene	95
Indeno [1,2,3-cd] pyrene	91
Dibenzo[a,h]anthracene	93
Benzo[g,h,i]perylene	91

---

Se estableció como criterio, un buena recuperación entre el 75-125 %. Como puede observarse en la Tabla 13 los resultados de recuperación fueron generalmente buenos para todos los compuestos. Por este motivo no se realizaron más pruebas con diferentes solventes y se definió el hexano como un ben disolvente de extracción.

#### 5.7.2.2. Plaguicidas

Como se ha mencionado anteriormente, un plaguicida se define como un compuesto insoluble en agua (Apartado 2.2.1), por tanto sería de esperar que un disolvente con características apolares fuera capaz de retener los analitos. Sin embargo, entre las diversas fuentes bibliográficas, usan disolventes de diferente polaridad, como ahora hexano o éter de petróleo. Por este motivo, se decidió realizar la extracción mediante hexano, y mediante una mezcla de Hexano/Diclorometano<sup>6</sup>.

Se prepararon muestras spikadas con un patrón de referencia a una concentración de 0,1 µg/L. Esta concentración corresponde al valor paramétrico de los plaguicidas individuales según el Real Decreto.

---

<sup>6</sup> El Diclorometano tiene un punto de ebullición por debajo del hexano. Esto hace que disminuya ligeramente el punto de ebullición de la mezcla. Por este motivo para las inyecciones don hex/DCM, se bajó la temperatura de inyección a 58 °C.

Tabla 14: Muestra las recuperaciones (Recovery) obtenidas para cada compuesto en función del tipo de solvente de extracción usado y la proporción entre muestra y solvente.

Compuesto	HEXANO (n=5)		Hex:DCM (75:25) (n=5)	Día 1 Hex: DCM (90:10) (n=5)		Día 2 Hex:DCM (90:10) (n=5)	
	120:4 (ml:ml)	60:4 (ml:ml)	120:4 (ml:ml)	120:4 (ml:ml)	60:4 (ml:ml)	120:4 (ml:ml)	60:4 (ml:ml)
	%Recovery	%Recovery	%Recovery	%Recovery	%Recovery	%Recovery	%Recovery
a-BHC	81	80	92	86	88	105	102
b-BHC	74	75	79	85	87	82	81
g-BHC	81	80	83	90	90	92	89
d-BHC	74	73	79	85	83	82	78
Alachlor	71	74	84	87	88	84	82
Heptachlor	83	80	92	92	88	110	112
Metolachlor	69	71	90	86	86	90	87
Aldrin	83	78	88	93	86	86	81
Isodrin	82	78	90	93	87	87	82
Heptachlor epoxide	82	80	88	89	85	89	83
trans-Chlordane	80	77	91	91	86	89	84
cis-Chlordane	79	76	92	89	85	89	84
a-Endosulfan	72	67	81	76	71	69	67
p,p'-DDE	78	75	92	91	85	86	83
Dieldrin	82	80	89	89	85	81	79
Endrin	79	78	88	92	89	84	83
p,p'-DDD	79	74	91	88	82	87	79
o,p'-DDT	81	75	92	98	91	88	82
b-Endosulfan	75	69	83	86	83	80	75
Endrin aldehyde	75	74	64	67	81	80	83
p,p'-DDT	77	73	97	102	92	92	87
Endosulfan sulfate	76	72	94	86	81	89	81
Methoxychlor	79	78	98	104	94	99	93
Endrin ketone	82	81	94	94	89	91	84

Como se muestra en la Tabla 14, la variación en la proporción entre muestra y disolvente, no muestra una mejora significativa en la recuperación para ninguno de los casos.

Esto hace pensar que disminuir la proporción de agua respecto la del disolvente (60 mL muestra/ 4 mL disolvente) no ayuda a obtener mejores recuperaciones para este método.

Por el contrario, se apreciaron mejoras en la recuperación en la mayoría de plaguicidas cuando se usó un disolvente con cierto carácter polar.

La presencia de diclorometano, favoreció la recuperación de los compuestos ya que los valores de recuperación con la extracción mediante la mezcla de hexano/diclorometano fueron más elevados que la extracción con hexano.

Estos resultados indican que los plaguicidas, aunque son definidos como compuestos apolares, se extraen con más facilidad en un disolvente con cierta polaridad.

## 6. Conclusiones

---

- Working with a multimode injector in mode large volumes injection give us the possibility of increase the signal for all target compounds, so you can improve the method sensitivity.
- Large volumes injections seems to decrease liner life. Continuous use degrades liner deactivation and produces active sites that could cause degradation compounds.
- Liquid-Liquid extraction with hexane does not work well for both organochlorine pesticides and PHA's. Good recoveries were obtained for PHA but in contrast, some chlorine pesticides such as metolachlor, metoxychlor and endosulfan sulfate, give low recoveries values. These values were improved using a mix of hexane/dichloromethane as extraction solvent.
- Making a method for the simultaneous analysis of these compounds mentioned in this work is difficult, so they have different characteristics like sensitivity and structure.

It is difficult to achieve a method with optimum parameters that benefits both. For this reason, the best solution might be the separation of the method, and analyse each one separately.

## 7. Bibliografía

---

- (1) Agilent Technologies. *Agilent Multimode Inlet for Gas*.
- (2) Secretaria de salud laboral y medio ambiente. Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP). Acercameiento a Su Problematica Como Riesgo Laboral. MCA-UGT Federación de Industria 2009.
- (3) Rodier, J. (Jean); Legube, B.; Merlet, N. *Análisis Del Agua*; Omega: Barcelona :, 2011.
- (4) Vives, Í.; Grimalt, J. O.; Guitart, R. Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos Y La Salud Humana. *Apunt. Cienc. y Tecnol.* **2001**, 3, 45–47.
- (5) (FAO), F. and A. O. of the U. N. (FAO), *Food and Agriculture Organization of the United Nations*; Roma, 1986.
- (6) Ferrer, A. Intoxicación Por Plaguicidas. *An. Sist. Sanit. Navar.* **2003**, 26 (SUPPL. 1), 155–171.
- (7) Ramírez, J. a; Lacasaña, M. Plaguicidas: Clasificación, Uso, Toxicología Y Medición De La Exposición. *Arch Prev Riesgos Labor* **2001**, 4 (2), 67–75.
- (8) Calva, Laura Georgina; Torres, M. D. R. Plaguicidas Organoclorados. *ContactoS* **1998**, 30, 35–46.
- (9) Asela, D.; Puerto, M.; Susana, D.; Tamayo, S.; Daniel, L.; Estrada, E. P. Effects of Pesticides on Health and the Environment. **2014**, 52 (3), 372–387.
- (10) BOE. Real Decreto 140/2003, de 7 de Febrero, Por El Que Se Establecen Los Criterios Sanitarios de La Calidad Del Agua de Consumo Humano. *Boe* **2013**, 1–38.
- (11) Dabrio Bañuls, M. V. *Cromatografía de Gases*; Alhambra: Madrid :, 1971.
- (12) Technologies, A. Inyección de Grandes Volúmenes Tutorial Para El Inyector Multimodo de Agilent ( MMI ). No. Mmi, 1–22.
- (13) Bliesner, D. M. *Validating Chromatographic Methods : A Practical Guide*; Wiley: Hoboken, N.J. :, 2006.
- (14) Riu, J.; Boqué, R. CALIBRACIÓN LINEAL.
- (15) Godula, M.; Hajđlovu, J.; Mađtouska, K. Optimization and Application of the PTV Injector for the Analysis of Pesticide Residues. **2001**, 355–366.
- (16) Adams, S. (Restek). How to Choose a GC Inlet Liner : Simplify Selection

Based on Injection Type. **2014**, No. Figure 1, 1–4.

- (17) USEPA. Method 8270D. **2014**, 71.
- (18) Spectrometry, C. M. Liquid-Solid Extraction and Capillary Column Gas. **1995**, 0.
- (19) Arrubla, J. Evaluación Del Grado De Contaminación Por Pesticidas. **2008**, No. 40, 234–239.
- (20) Sánchez Palacios, M. A. Métodos de Calibrado. **2008**, 2–16.
- (21) Mao, D.; Vickers, A. Evaluation of the Ultra Inert Liner Deactivation for Active Compounds Analysis by GC Technical Overview Authors.
- (22) Iso, U. Española. **1997**, 0 (91).
- (23) Rice, E. W.; Bridgewater, L.; American Public Health Association.; American Water Works Association.; Water Environment Federation. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.*; American Public Health Association: Washington, D.C. :, 2012.