

## C6

# UN EJEMPLO DE CONTRIBUCIÓN DE LA QUÍMICA ANALÍTICA A LA HIGIENE INDUSTRIAL: DETERMINACIÓN DE PERFLUORADOS EN LECHE MATERNA

Martín Bueno, J. (jbueno@us.es), Santos Morcillo, J.L. (jlsantos@us.es), Aparicio Gómez, I. (iaparicio@us.es), Alonso Álvarez, E. (ealonso@us.es).  
FQM344: Análisis Químico Industrial y Medioambiental

## RESUMEN

Los contaminantes orgánicos perfluorados, presentes en numerosos objetos de nuestra vida cotidiana, forman parte de los llamados contaminantes emergentes, que empiezan a ser regulados por ley y cuyos efectos sobre los organismos y el medio ambiente aún no están bien evaluados. Estos compuestos se aplican en muchos productos industriales y domésticos por su resistencia al calor y su capacidad de repeler el agua y el aceite.

La leche materna se ha utilizado como marcador biológico de la contaminación ambiental ya que, por los procesos de bioacumulación en tejido graso, muchos compuestos químicos alcanzan concentraciones fácilmente medibles en esta matriz. Dada la complejidad de la misma, y las dificultades que ofrece para su estudio desde un punto de vista analítico, este trabajo se ha centrado en la optimización y validación de una nueva y sencilla metodología analítica para la determinación de cinco compuestos perfluorados (cuatro ácidos perfluoroalquílicos (de C5 a C8) y el sulfonato de perfluorooctano) en leche materna mediante extracción por sorción sobre barras agitadoras, previa precipitación química de grasas y proteínas, y posterior análisis mediante cromatografía de líquidos de ultra-resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem.

**Palabras clave:** *Compuestos orgánicos perfluorados; Leche materna; Extracción con barras agitadoras, Cromatografía de líquidos de ultra-resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem.*

## ABSTRACT

Perfluoroalkyl compounds, present in several products of our everyday life, are part of the so-called emerging contaminants. Although they are starting to be regulated, their effects over organisms and the environment have not been well evaluated yet. Their widespread use on industrial and domestic products is due to their thermal stability and their unique ability to repel both water and oil.

Breast milk has been used as biomarker of environmental pollution because several chemical compounds are bioaccumulated at quantifiable concentration levels in this fatty tissue. Due to the analytical challenge that involves this complex matrix, this work has been focused on the optimization and validation of a novel and simply

analytical methodology for the determination of five perfluoroalkyl compounds (four perfluoroalkyl carboxylic acids (from C5 to C8) and perfluorooctane sulfonate) in breast milk. The analytical method involves a stir-bar sorptive extraction and analysis by UHPLC-MS/MS.

**Keywords:** *Perfluoroalkyl compounds, Human milk, Stir-bar sorptive extraction, Ultra-High Performance Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry*

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los compuestos perfluorados (PFCs, perfluoroalkyl compounds) constituyen una amplia familia de contaminantes de origen antrópico. Estas sustancias son muy estables, tienen una gran resistencia térmica, química y biológica. Están compuestos por una cadena perfluorocarbonada con propiedades hidrofóbicas y oleofílicas, y en un extremo poseen un grupo funcional con carga (carboxilo o sulfonato), el cual es hidrofílico. Esta combinación única de carácter hidrófobo y oleófobo permite que estas sustancias puedan repeler el agua y la grasa. Por estas propiedades, se utilizan en multitud de productos industriales, como cosméticos, productos textiles, revestimientos antiadherentes e impermeabilizantes, productos quitamanchas, productos de limpieza, fitosanitarios, etc (Corsini et al., 2014).

En el centro de las investigaciones y de la polémica que rodea a estos compuestos se sitúan el sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA). Ambos compuestos, según estudios recientes, son tóxicos, persistentes y se absorben casi por completo. Se acumulan principalmente en el hígado y en la sangre y se excretan muy lentamente por los riñones. Pueden atravesar la placenta y acumularse en el hígado del feto. El tiempo de vida medio de estos dos compuestos es aproximadamente de 5 y 4 años en humanos.

Los estudios de toxicidad realizados en animales catalogan a estos compuestos como potentes disruptores endocrinos. Los principales efectos adversos se han observado sobre el hígado, la reproducción, el desarrollo, el sistema inmunitario, el sistema hormonal y el metabolismo lipídico. Aunque no son genotóxicos, también causan neoplasias por mecanismos indirectos, principalmente de hígado y de glándula tiroideas (Liu et al., 2007).

A partir de la inclusión del PFOS en el listado B del Convenio de Estocolmo (Conferencia de las Partes, mayo 2009), las grandes empresas productoras de este compuesto, tales como 3M y Dupont cesaron su producción. Este compuesto ha sido sustituido por otros PFCs con cadena más corta como el sulfonato de perfluorobutano.

En 2008, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) estableció una ingesta diaria tolerable para el PFOS de 150 ng por kilogramo de peso corporal y día en base a los efectos adversos sobre la síntesis de hormonas tiroideas y la concentración de HDL en la sangre en animales de experimentación. También estableció una ingesta diaria tolerable para el PFOA de 1500 ng por kilogramo de peso corporal y día en

base a estudios sobre los efectos adversos en el desarrollo de las crías de animales de experimentación (Domingo, 2011).

Uno de los aspectos más preocupantes es la vulnerabilidad de los niños, especialmente la de los recién nacidos, a la exposición a este tipo de compuestos durante las primeras etapas del desarrollo (Fei et al., 2009). Las madres lactantes pueden, sin saberlo, exponer a sus hijos a niveles peligrosos de estos compuestos pudiendo provocar efectos irreversibles que sólo se harán evidentes a lo largo de su vida (Karrman et al., 2009).

Puesto que la leche materna es la principal vía de exposición para los bebés lactante, su análisis es de especial interés científico. En los últimos años, esta matriz se ha utilizado como un potente bioindicador de la contaminación ambiental ya que, por los procesos de bioacumulación en tejido graso, muchos compuestos químicos alcanzan concentraciones fácilmente medibles. Además, el muestreo es no invasivo y los volúmenes disponibles de muestra son relativamente grandes (Smolders et al., 2009).

Dada la complejidad de la matriz (leche materna), y las dificultades que ofrece para su estudio desde un punto de vista analítico, este trabajo se ha centrado en la optimización y validación de una nueva y sencilla metodología analítica para la determinación de compuestos perfluorados (cuatro ácidos perfluoroalquílicos (de C5 a C8) y el PFOS) basada en la extracción por sorción sobre barras agitadoras (SBSE, stir-bar sorptive extraction), previa precipitación química de grasas y proteínas, y posterior análisis mediante cromatografía líquida de ultraresolución (UHPLC, Ultra-High Performance Liquid Chromatography) acoplada a espectrometría de masas en tandem (MS/MS).

## METODOLOGÍA

La optimización de la metodología se realizó sobre las dos etapas fundamentales en las que se divide el procedimiento analítico: la determinación cromatográfica y el tratamiento de la muestra.

### *Determinación cromatográfica*

La determinación de los PFCs se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de líquidos de ultraresolución de la marca Waters con bomba binaria de alta presión, inyector automático y compartimento termostatzado para la columna.

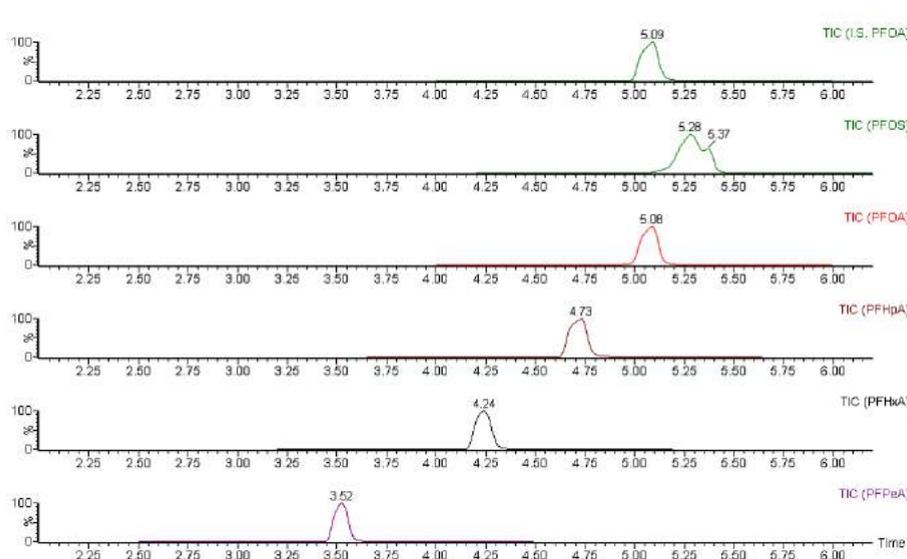
Para la separación de los compuestos, se optó por una columna de octadecilsilano CORTECS UPLC C18 (Waters) (50 mm × 2.1 mm; 1.6 µm de tamaño de partículas) y una disolución acuosa de acetato amónico (10 mM) y metanol como fase móvil. Se siguió un programa de elución en gradiente, comenzando con una pequeña proporción de metanol (20 %) junto con la fase acuosa, aumentando, posteriormente, la proporción de fase orgánica hasta el 100 % en 5 minutos.

El cromatógrafo de líquidos está acoplado a un detector de espectrometría de masas triple cuadrupolo equipado con una fuente de ionización por electrospray trabajando en modo negativo. Para cada analito se seleccionan las dos transiciones más abundantes tras la rotura del ion precursor. En la Tabla 1 se muestran los parámetros optimizados empleados en el espectrómetro de masas. En la Figura 1 se muestra un cromatograma para una mezcla patrón de 50 ng mL<sup>-1</sup> de los PFCs objeto de estudio en las condiciones descritas.

**Tabla 1.** Parámetros UHPLC-MS/MS.

Nombre	Sigla	Tiempo de retención (min)	Ion Precursor (m/z)	MRM 1 (m/z)	MRM 2 (m/z)
Ácido perfluoropentanoico	PFPeA	3.17	263	219	89.7
Ácido perfluorohexanoico	PFHxA	3.98	313	269	119
Ácido perfluoroheptanoico	PFHpA	4.49	363	319	333
Ácido perfluorooctanoico	PFOA	4.87	413	369	194
Sulfonato de perfluorooctano	PFOS	4.18	499	80	51
Ácido perfluoro-n-[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ]octanoico	I.S PFOA	5.09	417	371	168

MRM 1: Transición utilizada para la cuantificación; MRM 2: Transición utilizada para la confirmación.



**Figura 1.** Separación cromatográfica de los compuestos objeto de estudio por UHPLC-MS/MS.

## *Tratamiento de la muestra*

### ***Precipitación de grasas y proteínas***

La leche materna es una matriz biológica de elevada complejidad, compuesta fundamentalmente por proteínas y lípidos, los principales interferentes que dificultan el análisis, afectando gravemente a la sensibilidad de la técnica.

En este trabajo se lleva a cabo un efectivo pre-tratamiento para la eliminación de estas grasas y proteínas, mediante precipitación química, consistente en la adición de una disolución mezcla de sales de zinc y tungsteno en medio ácido junto con acetonitrilo.

La relación solución de precipitación/acetonitrilo/leche fue optimizada para conseguir las mejores eficacias de extracción de nuestros analitos. Para 5 mL de leche, volúmenes desde 2,0 a 10,0 mL de solución de precipitación y acetonitrilo fueron ensayados; siendo 4 mL de ambos componentes el valor óptimo.

### ***Extracción por sorción con barras agitadoras***

La técnica que se propone en este trabajo para la extracción de los PFCs de la leche es la SBSE. Es un sistema de extracción libre de disolventes introducido por Baltussen et al. (1999), ampliamente empleada en la preparación, extracción y preconcentración de compuestos orgánicos en matrices acuosas. Se basa en los principios de la microextracción en fase sólida (SPME), aunque el volumen de fase extractante empleada en la SBSE es entre 50 y 250 veces mayor que el empleado en SPME, lo que provoca que la sensibilidad de esta técnica se multiplique por un factor de entre 100 y 1000 veces. Los analitos son extraídos por la fase estacionaria en función de sus coeficientes de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) y del ratio de volúmenes muestra-adsorbente.

La barra agitadora tiene el mismo aspecto que una barra magnética agitadora usual, mientras agita la muestra, ésta adsorbe y concentra los analitos de interés sobre la capa de sorbente con que está recubierta. Una vez se ha alcanzado el tiempo de equilibrio, se retira de la muestra, se seca y se desorbe en un volumen determinado de disolvente.

Las primeras barras agitadoras estaban recubiertas con polidimetilsiloxano (PDMS) y fueron comercializadas por Gerstel bajo el nombre de "twisters". Sin embargo, PDMS es un material hidrofóbico, idóneo para la extracción de compuestos no polares. Actualmente también hay comercialmente disponible el polímero polietilenglicol (PEG) modificado con silicona, que permite una mejor extracción de algunos compuestos polares a la vez que aumenta la sorción de compuestos apolares.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Optimización de la técnica extracción

Se optimizaron las principales variables que afectan a la SBSE: material de recubrimiento, adición de cloruro de sodio, pH de la muestra, tiempo de extracción y condiciones de desorción (disolvente y tiempo). Para ello, se emplearon porciones de 5 mL de leche previamente dopadas con una disolución patrón de los compuestos seleccionados a una concentración de  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ . Antes de la extracción se eliminan las proteínas y grasas tal y como se ha comentado previamente.

En primer lugar, se evaluaron los dos materiales de recubrimiento disponibles comercialmente: PDMS y PEG. La Figura muestra los resultados obtenidos con cada material. En general, PEG presentó mejor sensibilidad (50 veces mayor), especialmente para los compuestos perfluoroalquílicos de corta cadena carbonada, lo que está de acuerdo con la afinidad de este material y los coeficientes  $K_{ow}$  de estos compuestos ( $\text{Log } K_{ow} = 3.4\text{-}4.3$ ).

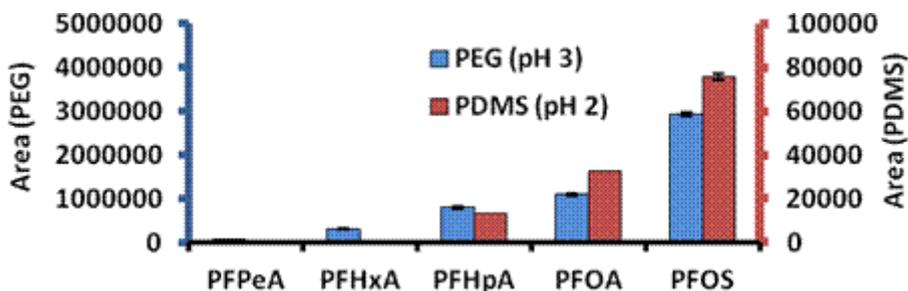


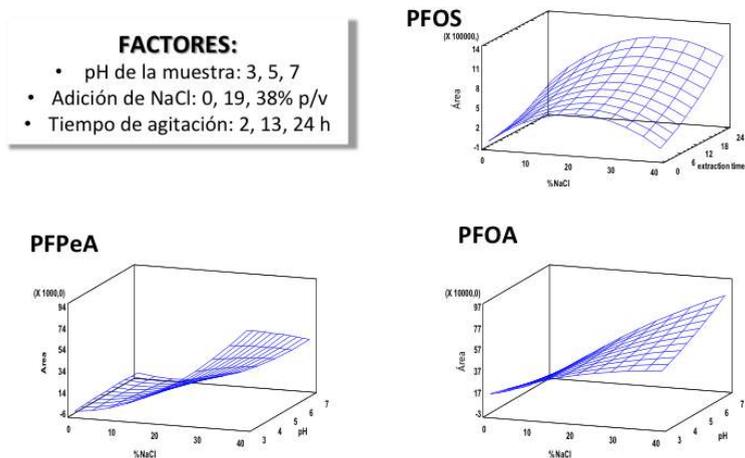
Figura 2. Influencia del material de recubrimiento (PDMS y PEG) sobre la eficacia de extracción (n=3).

Con el fin de optimizar el resto de los parámetros de extracción y determinar posibles interacciones entre ellos, se realizó un diseño experimental de superficie de respuesta siguiendo el modelo de Box- Behnken. Se optimizaron tres factores a tres niveles tres niveles cada uno. El diseño incluye tres repeticiones del punto central. Los factores a optimizar fueron: Tiempo de extracción de 2, 13 y 24 h; porcentaje de NaCl de 0, 19 y 38 % (p/v) y pH de la muestra entre 3, 5 y 7. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.

Dichas variables y algunas de sus interacciones resultaron significativas. Se observó que la adición de NaCl fue el parámetro más importante, seguido del pH, mientras que el tiempo de extracción resultó significativo para los PFCs de larga cadena alquílica (PFOA y PFOS).

Finalmente, tras la optimización del procedimiento para la extracción de PFCs de la leche se introduce la barra agitadora de PEG, previa precipitación de grasas y proteínas, en un vial conteniendo 5 ml de leche y NaCl (38% p/v). La muestra se mantiene en agitación durante 24 horas. Pasado dicho tiempo, se retira el twister de

la muestra y se seca con papel. Los analitos retenidos se desorben en un volumen de 1 mL de acetonitrilo durante media hora, se evapora a sequedad y se reconstituyen con 50  $\mu\text{L}$  de fase móvil para su posterior inyección en el cromatógrafo de líquidos.



**Figura 3.** Optimización de las variables influyentes en la eficacia de extracción con SBSE. Superficies de respuesta para los PFCs según el diseño experimental.

### Validación del método

Tras la optimización, se procedió a la validación para verificar que el método satisface los requisitos para la aplicación destinada. Para ello, se calcularon los parámetros: linealidad, sensibilidad, veracidad y precisión (Tabla 2).

En primer lugar se procedió a detectar la presencia de efecto matriz en la leche comparando el calibrado en fase móvil con el calibrado en muestras. Se utiliza el parámetro estadístico “ $t_{\text{student}}$ ” para la comparación de ambas pendientes. Si ambas pendientes son prácticamente iguales, su cociente no debe ser significativamente distinto de 1. Este procedimiento nos confirma la presencia de efecto matriz con valores de  $t$  superiores a 8 para todos los PFCs estudiados.

La linealidad se evaluó por el coeficiente de determinación de la recta de calibrado en matriz. Se alcanzaron valores  $> 0.990$  para todos los analitos. Por su parte, los límites de detección y cuantificación metodológicos fueron estimados a partir de la relación señal ruido multiplicada por 3 y 10, respectivamente. Los límites de detección fueron del orden de las pocas partes por billón para todos los analitos (entre  $0.05$  y  $0.2 \text{ ng mL}^{-1}$ ).

**Tabla 2.** Parámetros de validación de la metodología optimizada.

Compuesto	Concentración añadida (ng mL <sup>-1</sup> )	Concentración encontrada (SD) (ng mL <sup>-1</sup> )	DER %	R %	LD (ng mL <sup>-1</sup> )	LC (ng mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
PFPeA	1	0.9 (0.1)	12	89	0.05	0.2	0.999
	50	48.9 (6.3)	13	98			
	100	99.4 (4.1)	4	99			
PFHxA	1	1.0 (0.1)	10	96	0.1	0.4	0.996
	50	50.5 (5.1)	10	101			
	100	100.1 (9.4)	9	100			
PFHpA	1	0.8 (0.1)	9	81	0.2	0.7	0.990
	50	52.7 (6.6)	13	105			
	100	98.5 (8.3)	8	98			
PFOA	1	0.8 (0.2)	13	83	0.07	0.2	0.997
	50	52.1 (3.7)	7	104			
	100	98.5 (1.3)	1	99			
PFOS	1	0.9 (0.1)	6	100	0.06	0.2	0.995
	50	51.6 (3.4)	7	106			
	100	100.4 (4.2)	4	98			

R: Recuperación; DER: Desviación Estándar Relativa; LD: Límite de detección; LC: Límite de cuantificación.

Para la estimación de la exactitud (veracidad y precisión) se han empleado ensayos de recuperación sobre muestras libres de los analitos, dopadas con los compuestos objeto de estudio a un mínimo de tres niveles de concentración. El porcentaje de recuperación (% R), se calculó dividiendo la cantidad de analito encontrada mediante la interpolación en la función de calibración entre la concentración añadida al blanco de muestra. Las recuperaciones se situaron cercanas al 100% en todos los casos. Los valores de Desviación Estándar Relativa (DER) que se muestran en la Tabla, inferiores al 13% en todos los casos, indican que el método es suficientemente preciso para cada nivel de concentración medido.

### *Aplicación de la metodología*

Esta nueva metodología propuesta, se aplicó sobre leche materna de cinco mujeres embarazadas de la provincia de Granada, durante los 40 días posteriores al parto, de manera totalmente voluntaria y confidencial. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos.

Todas las madres fueron positivas para al menos uno de los compuestos de interés con concentraciones que oscilan entre 0.8 y 6.6 ng mL<sup>-1</sup>, siendo el PFOS el más abundante.

**Tabla 3.** Niveles de contaminantes perfluorados medidos en cinco madres (n=3).

Muestra	Concentración (ng.mL <sup>-1</sup> )				
	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFOS
Madre 1	0.8	<LC	<LC	0.8	1.5
Madre 2	3.0	1.6	2.3	1.4	2.0
Madre 3	0.9	0.8	1.5	1.7	6.6
Madre 4	1.5	<LC	ND	ND	ND
Madre 5	1.1	<LC	<LC	1.4	ND

## CONCLUSIONES

- Se propone el uso de la leche materna como posible biomarcador de la contaminación ambiental a compuestos perfluorados.
- Se ha desarrollado una nueva metodología analítica basada en la extracción sobre barras agitadoras, previa precipitación química de grasas y proteínas, y posterior análisis mediante cromatografía líquida de ultraresolución acoplada a espectrometría de masas en tandem.
- La combinación de unas óptimas propiedades analíticas principales (en términos de precisión y exactitud) y complementarias (manipulación reducida, simplicidad del procedimiento, costes de análisis no demasiado elevados y empleo de disolventes de baja toxicidad) avalan el potencial del método desarrollado para tareas de biomonitorización.
- Aunque la técnica tiene un amplio espectro de ventajas, nunca antes se ha utilizado para la determinación de compuestos perfluorados en leche.

## BIBLIOGRAFÍA

Baltussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C. (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*. 11. 737–747.

Corsini, E., Luebke, R.W., Germolec, D.R., DeWitt, J.C. (2014). Perfluorinated compounds: emerging POPs with potential immunotoxicity. *Toxicology Letter*. 230. 263–270.

Domingo, J.L. (2011). Health risks of dietary exposure to perfluorinated compounds. *Environment International*. 40. 187–195.

Fei, C., McLaughlin, J.K., Lipworth, L., Olsen, J. (2009). Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Human Reproduction*. 24. 1200–1205.

Kärrman, A., Lindström, G. (2013). Trends, analytical methods and precision in the determination of perfluoroalkyl acids in human milk. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 46. 118–128.

Liu, C., Du, Y., Zhou, B. (2007). Evaluation of estrogenic activities and mechanism of action of perfluorinated chemicals determined by vitellogenin induction in primary cultured tilapia hepatocytes. *Aquatic Toxicology*. 85. 267–277.

Smolders, R., Schramm, K.W., Nickmilder, M., Schoeters, G. (2009). Applicability of non-invasively collected matrices for human biomonitoring. *Environmental Health*. 8. 8.