



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Máster Biotecnoloxía Avanzada

Julio 2013

**DETERMINACIÓN DE FTALATOS
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE
GASES ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN
TÁNDEM (GC/MSMS)**

**(PHTHALATES DETERMINATION BY
GC/MSMS)**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
M^a LUCÍA MENÉNDEZ GARCÍA**

Tutorizado por: Pablo Pérez López/M^a Carmen Veiga Barbazán

Empresa: Applied Mass Spectrometry Laboratory S.L.

ÍNDICE:

1. Introducción	
1.1. Ftalatos: Usos y Riesgos.....	3
1.2. Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en tándem.....	4
2. Objetivos.....	8
3. Materiales y métodos:	
3.1 Reactivos.....	10
3.2 Extracción ftalatos en textil.....	12
3.3 Extracción ftalatos en goma plástica.....	13
3.4 Extracción ftalatos en aceite	13
3.5 Análisis Instrumental.....	13
3.6 Validación métodos.....	16
3.7 Aplicación muestras reales.....	16
4. Resultados y discusión.....	
4.1 Optimización del método.....	20
4.2 Validación.....	20
4.3 Aplicación muestras reales.....	21
5. Conclusiones.....	23
6. Referencias bibliográficas.....	24

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ftalatos: Usos y Riesgos

Los ftalatos son los plastificadores más comúnmente utilizados en una serie de plásticos (principalmente el policloruro de vinilo, PVC) y otros materiales que se encuentran en muchos productos de consumo. Se trata de ésteres del ácido 1,2-benzenodicarboxílico con alcoholes alifáticos lineales o ramificados de cadena moderadamente larga. Estos plastificadores trabajan incrustándose entre las cadenas de polímeros, espaciándolas e incrementando el volumen libre, descendiendo así de forma significativa la temperatura de transición vítrea para el plástico, haciéndolo más suave, blando y flexible. Debido a que se trata de aditivos y no de reactivos, no se encuentran químicamente unidos a los plásticos, de forma que pueden desprenderse de los productos de consumo y llegar al medio ambiente. Existe preocupación sobre los ftalatos debido a su uso generalizado, su presencia en el medio ambiente y sus posibles repercusiones sobre la salud.

Estas sustancias han sido reconocidas como *sustancias extremadamente preocupantes* (Substances of Very High Concern, SVHC) por el reglamento europeo sobre sustancias químicas (Registro, Evaluación y Autorización de Productos Químicos, REACH) debido a su potencial efecto como disruptor endocrino -provocando alteraciones hormonales en las personas expuestas- y a los efectos reproductivos observados en estudios con animales; se encuentran clasificados dentro de la categoría 1B de agentes tóxicos para la reproducción. Por esta razón, no pueden ser utilizados como sustancias o constituyentes de preparados en concentraciones superiores al 0,1% en masa del material plastificado en juguetes y artículos de puericultura que puedan ser introducidos en la boca por niños menores de tres años (Directiva Europea 2005/84/EC), ni en aplicaciones cosméticas (Directiva Europea 2004/93/EC). Su uso también está regulado (Reglamento de la comisión europea 10/2001) en envases, embalajes y procesamiento de alimentos.

Los ftalatos de interés en este estudio se dividen en dos sub-grupos principales con propiedades y aplicaciones diferentes:

- Ftalatos con **alto peso molecular**:

DINP: Di-isononil Ftalato. Se encuentra en jardines, zapatos, juguetes y materiales de construcción.

DIDP: Di-isodecil Ftalato. Usado para aislamiento de cables, salpicaderos de coche, zapatos o alfombras.

En Bruselas, el 24 de Abril de 2006, la Unión Europea (UE) ha confirmado que estos dos plastificantes no están clasificados como peligrosos y que su uso actual no plantea ningún tipo de riesgo para la salud humana ni para el medio ambiente, aunque en la directiva europea se sigue restringiendo su uso.

- Ftalatos con **bajo peso molecular:**

DBP: Di-butil Ftalato, dañino para la fertilidad. Ftalato de menor utilización. Usado en los plásticos de celulosa, film alimentario, adhesivos, perfumes y también en cosméticos como esmaltes de uñas, champú ó protectores solares.

BBP: Butil Bencil Ftalato, dañino para la fertilidad. Se encuentra en los suelos de vinilo, conos de tráfico, cintas transportadoras, cuero artificial.

DnOP: Di-n-octil Ftalato, perjudicial para el hígado. Se usa en suelos, alfombras, tapas de libretas y explosivos potentes. Junto con el DEHP es uno de los plastificadores más comunes, pero se sospecha que causa cáncer.

DEHP: Di-(2-etilhexil) Ftalato, dañino para la fertilidad. Es el más comúnmente utilizado debido a su bajo coste. Usado en materiales de construcción, envases alimentarios, juguetes, instrumental médico y film plástico.

En el marco del reglamento REACH, los ftalatos bajos están sujetos a autorización. Después de Agosto de 2015 sólo podrán ser producidos o utilizados si se concede una autorización específica para una determinada aplicación y/o su utilización en la cadena de suministro de dichos productos.

1.2. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem

La cromatografía de gases (GC) se define como una técnica separativa basada en las diferencias de volatilidad de la mezcla de los solutos cromatografiados y en su capacidad para ser adsorbidos sobre una fase sólida empaquetada en una columna. La volatilidad y la estabilidad térmica suficientes son los requisitos que un soluto debe cumplir para poder llevar a cabo su análisis con este tipo de cromatografía. El primer paso en el proceso de GC es suministrar uno o varios gases de elevada pureza al GC. Uno de estos gases (denominado gas portador) entra por el inyector, a través de la columna y hacia

el detector. A continuación, se introduce la muestra en el inyector, que se encuentra generalmente a una temperatura de entre 150 y 250 °C, lo cual provoca que los solutos de muestra volátiles se vaporicen. Estos solutos vaporizados son transportados a la columna por medio del gas portador, mientras la columna permanece en un horno a temperatura controlada. Los solutos recorren la columna a diversas velocidades, que vienen determinadas principalmente por las propiedades físicas de estos solutos, así como por la temperatura y composición de la propia columna. El soluto más rápido es el primero en salir (eluir) de la columna, seguido por el resto de solutos en el orden correspondiente. A medida que cada soluto eluye, entra en el detector, donde se genera una señal electrónica en función de la interacción del soluto con el detector. Un sistema de datos almacena el nivel de la señal y la dibuja en función del tiempo transcurrido para generar un cromatograma.

La espectrometría de masas (MS) acoplada a la GC ha sido una de las técnicas que más se ha extendido en las últimas décadas en el campo de la química analítica aplicada al medio ambiente, alimentos y salud pública. El éxito de su aplicación es una consecuencia de la combinación de una técnica de separación (GC) que presenta una gran versatilidad y las buenas y únicas capacidades de la MS. La MS se ha presentado como la posibilidad analítica de alcanzar una elevadísima sensibilidad debido a su altísima especificidad. Además, presenta la habilidad única de medir los iones con masa exacta, proporcionando información de la composición elemental, permitiendo establecer las rutas de fragmentación. De forma muy básica se puede definir el funcionamiento de la MS en los siguientes pasos:

a. Ionización. Las moléculas de los analitos pasan a estado gaseoso ionizándose, adicionándose o eliminándose un electrón o un protón. El exceso de energía proporcionado en este paso también puede transformarse en una fragmentación de la molécula, generando iones fragmento.

b. Separación y Análisis de la masa de los iones moleculares y sus fragmentos cargados, basándose en su relación masa carga (m/z). En este paso es necesario trabajar a alto vacío, permitiendo el movimiento libre de los iones en el espacio, sin la interferencia de otras especies con las que pueda colisionar. La colisión puede generar la fragmentación de los iones moleculares y/o producir

nuevas especies por reacciones ión-molécula, efecto que le llevaría a una reducción de la sensibilidad y resolución del análisis.

c. Medida. Amplificación y creación de espectros de masas.

La posibilidad de poder acoplar dos analizadores de espectrometría de masa aumenta considerablemente el potencial y las posibilidades que ofrece esta técnica. La adquisición en tándem MS (MSMS) ofrece una gran selectividad, ya que permite la posibilidad de aislar un ión en la celda de colisión, eliminando otros iones o fragmentos que puedan interferir. La fragmentación en este caso se produce por la colisión del ión seleccionado con moléculas de un gas inerte, recibiendo el nombre de disociación inducida por colisión (Collision Induced Dissociation, CID). Estas fragmentaciones están ligadas directamente con la composición química y la estructura de la molécula. La MSMS se ha desarrollado en analizadores de tipo cuadrupolo (Figura 1), donde se han acoplado dos cuadrupolos (Q1 y Q3) mediante uno intermedio que hace de celda de colisión (Q2). En el primer cuadrupolo (Q1) se selecciona la relación m/z de interés, que se suele denominar ión precursor, éste pasa a través de la celda de colisión (Q2) donde se fragmenta, los iones producto son separados por el segundo cuadrupolo (Q3). Este tipo de instrumentos se han denominado de triple cuadrupolo (QQQ).

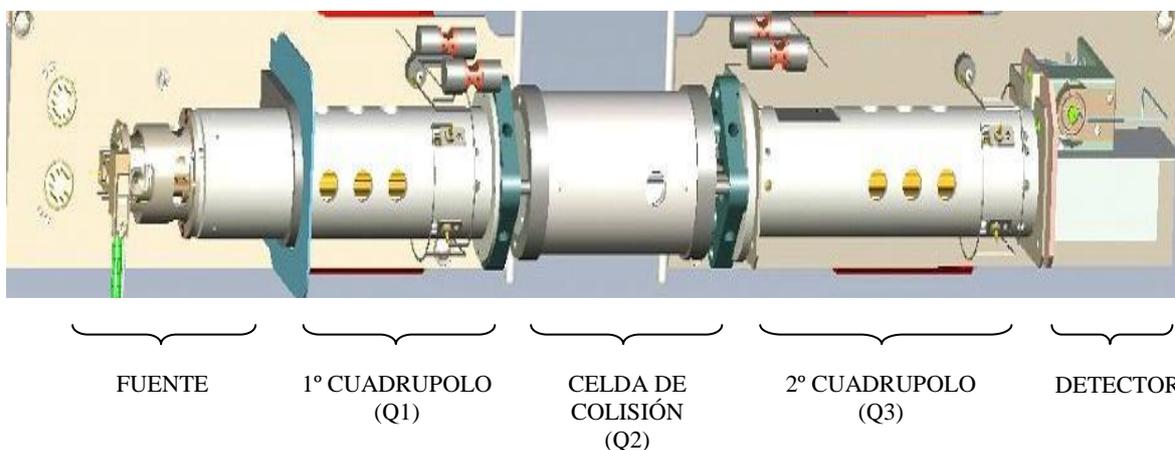


Figura 1. Esquema de un triple cuadrupolo (QQQ)

La MS en tándem presenta grandes ventajas prácticas frente a MS simple, ya que la calidad y la cantidad de información proporcionada por MSMS, aumenta la selectividad y la capacidad de la técnica para la elucidación estructural. El uso de GC-MSMS aumenta considerablemente la sensibilidad, especialmente en matrices complejas, permitiendo la

eliminación de interferentes de la matriz -donde es virtualmente eliminada- o interferencias coeluidas.

La adquisición mediante un QQQ ofrece una gran versatilidad, dependiendo del modo en que opera cada uno de los dos cuadrupolos (Q1 y Q3). Algunos de los modos de adquisición que se pueden aplicar son:

a. **Barrido de todos los iones** (*full scan*). Todas las moléculas que se ionizan en la interfase llegan al detector. En el QQQ, ni la celda de colisión ni el segundo cuadrupolo actúan en el proceso de selección, realizándose el barrido de iones con el primer cuadrupolo y obteniendo un espectro de full scan.

b. **Adquisición de un ión seleccionado** (*Single Ion Monitoring, SIM*). La adquisición SIM está dirigida a la medida de un solo ión, que es seleccionado en el primer cuadrupolo, donde la celda de colisión y el segundo cuadrupolo no actúan en la medida. Este tipo de adquisición deriva del uso de Q simple, y su aplicación en instrumentos QQQ no suele ser muy frecuente.

c. **Barrido de iones producto** (*Product Ion Scan*). Se lleva a cabo seleccionando en el primer cuadrupolo una m/z concreta denominado ión precursor, que se fragmenta con una energía de colisión adecuada en la celda de colisión; el segundo cuadrupolo adquiere en modo full scan de forma que se obtiene la medida de todos los fragmentos del ión precursor, denominados iones producto. Este modo de adquisición es ideal para la obtención de la máxima información estructural posible del ión precursor.

d. **Adquisición de la reacción seleccionada** (*Selected Reaction Monitoring, SRM*) o de **múltiple reacción seleccionada** (*Multiple Reaction Monitoring, MRM*). En este modo de adquisición, se selecciona un ión en el primer cuadrupolo denominado ión precursor; éste se fragmenta en la celda de colisión en presencia de gas inerte aplicando una energía de colisión óptima; uno de los iones fragmento obtenido se selecciona en el segundo cuadrupolo etiquetándose como ión producto. La adquisición en MRM es la más utilizada en las aplicaciones analíticas cuantitativas mediante QQQ, ya que minimiza al máximo la presencia de otros interferentes y se presenta como una herramienta de alta sensibilidad y selectividad.

e. **Barrido de iones precursor** (*Precursor Ion Scan*). El primer cuadrupolo hace un barrido de todos los iones que provienen de la interfase, fragmentándose en la celda de colisión a una energía concreta; de todos los fragmentos obtenidos sólo se selecciona uno por el segundo cuadrupolo. La aplicación a la que viene asociado este modo de adquisición es a un grupo de compuestos de la misma familia o a metabolitos provenientes de un mismo analito, pues el barrido de iones precursores a un ión producto común está directamente ligado a una estructura química común

2. OBJETIVO

El objetivo principal del presente trabajo fin de máster es la puesta a punto de la determinación de ftalatos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem en un GC/MSMS triple Quad según la norma UNE-EN 15777:2009 (Textiles. Métodos de ensayos para ftalatos), utilizando una apropiada combinación de métodos de extracción y análisis para llegar a la determinación de seis ftalatos regulados en tres tipos de matrices diferentes: muestras textiles, plásticas y aceite.

El trabajo se divide en cuatro partes principales:

- 1) Extracción de los ftalatos de las diferentes muestras mediante baño de ultrasonidos y posterior purificación.
- 2) Escalado de las condiciones de análisis descritas en la norma a un cromatógrafo acoplado a un analizador de masas cuadrupolo triple, y posterior optimización de las condiciones de determinación y medida. El gran potencial que el analizador QQQ ofrece, por su gran sensibilidad y selectividad, es idóneo para la determinación de este tipo de analitos en las matrices complejas propuestas, permitiendo minimizar el tratamiento de muestra.
- 3) Validación de los métodos analíticos optimizados, estableciendo los parámetros de linealidad, especificidad, exactitud y precisión mediante ensayos de recuperación a varios niveles. Se ha establecido el límite de cuantificación (limit of quantitation, LOQ) y se ha estimado el límite de detección (limit of detection, LOD).
- 4) Aplicación de la metodología analítica desarrollada a muestras reales y discusión de los resultados obtenidos. Para evaluar la robustez del método, se

hace uso de un control de calidad (Quality Control, QC), una muestra blanco fortificada a un nivel conocido, que se extrae junto con la secuencia de muestras objeto de análisis.

El **plan de trabajo** seguido para la obtención de los objetivos citados anteriormente es el que se expone a continuación:

- 1) Revisión bibliográfica de la situación actual de la determinación de ftalatos mediante GC/MS y su extracción de muestras.
- 2) Selección de los diferentes tipos de matrices objeto de estudio.
- 3) Optimización de la extracción y posterior purificación de los seis ftalatos en las muestras complejas propuestas.
- 4) Selección de los ftalatos objeto de estudio y del patrón interno adecuado a su posterior determinación y cuantificación mediante GC/MSMS.
- 5) Optimización de la separación cromatográfica mediante la inyección de patrones a las concentraciones adecuadas. Creación de un gradiente cromatográfico capaz de obtener picos cromatográficos y tiempos de retención adecuados.
- 6) Estudio de las condiciones óptimas en la adquisición por MSMS mediante el uso de patrones: selección del ion precursor y optimización de la fragmentación del mismo, búsqueda de las energías de colisión más adecuadas para la obtención de iones productos específicos del analito. Selección de las transiciones específicas a cada analito (target) y de las transiciones para el análisis confirmativo de la identidad de los analitos (qualifiers).
- 7) Estudio de patrones en solvente y en extractos de muestra para evaluar el efecto matriz y la sensibilidad del método de acuerdo con el tratamiento de muestra aplicado. Construcción de rectas de calibrado.
- 8) Validación de los métodos analíticos optimizados y aplicación de la metodología a muestras reales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material y Reactivos

Se analizaron seis de los ftalatos regulados por la unión europea, cuatro de bajo peso molecular: Di-(2-etilhexilo) Ftalato (DEHP), Butil Bencil Ftalato (BBP), Di-butil Ftalato (DBP) y Di-n-octil Ftalato (DnOP), y dos de alto peso molecular: Di-isononil Ftalato (DINP) y Di-isodecil Ftalato (DIDP); así mismo se utilizó el Bencil Benzoato (BB) como patrón Interno. Se compraron puros de la marca Sigma Aldrich, distribuidos por Cienytech. Los disolventes utilizados, Tetrahidrofurano (THF), n-Hexano 98% y ciclohexano, son de la marca Scharlau también distribuidos por Cienytech.

Compuesto	Mr (g/mol)	Formula Molecular	CAS N°	Punto Ebullición
DBP	278,34	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	84-74-2	340 °C
BBP	312,36	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	85-68-7	370 °C
DEHP	390,56	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	117-81-7	385 °C
DnOP	390,56	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	117-84-0	380°C
DINP	418,61	C ₂₆ H ₄₂ O ₄	28553-12-0	
DIDP	446,66	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	26761-40-0	
BB*	212,24	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	120-51-4	323-324°C

Tabla 1. Propiedades físico químicas de los 6 ftalatos y el patrón interno (*) utilizado

El material necesario para llevar a cabo los ensayos se compone por: Matraces Erlenmeyer, Vasos de precipitados, Filtros de Jeringa de 0,45 µm, Pipetas Pasteur, Jeringas de 20 mL, Puntas de pipeta, Cronómetro, Tijeras, Espátulas, Pesasustancias, Guantes, Viales de inyección de GC ámbar y tapas, estufa, probetas de 25 mL, pipetas de vidrio de 10 y 20 mL, matraces aforados ámbar de 10, 20 y 50 mL, Micropipetas de 10-100 µL y 100-1000 µL, Baño de ultrasonidos, Balanza analítica y granatario.

Preparación del material usado: se evita el contacto con cualquier tipo de material de plástico en el transcurso del proceso. El material en contacto con la muestra y los extractos obtenidos se mantiene perfectamente lavado y seco para evitar cualquier interferencia o problema de contaminación cruzada. El material de vidrio se lava en primer lugar con agua y un detergente libre de fosfatos (Extran MA de Merck) y posteriormente se aclara con agua MilliQ. Después del lavado normal, se somete a un lavado extra con ácido nítrico 0,1 N y finalmente se enjuaga con acetona o con una mezcla acetona/metanol. Se

seca en estufa a 110 °C (1 hora) y se deja enfriar antes de su uso. El material aforado sigue el mismo proceso de lavado pero se seca al aire.

Soluciones limpieza:

- **Solución Ácido Nítrico 0,1 N.** Se vierten 900 mL de agua Milli-Q en un matraz aforado de 1 L. Se toman 70 mL de la disolución comercial de Ác. Nítrico de 65 % (d=1.395 g/ml) en una probeta y se vierten en el matraz aforado con agua. Se enrasa a 1000 mL con agua Milli-Q.

- **Disolución mezcla Acetona/Metanol.**

Soluciones patrón:

- **Solución de patrón interno.** Se prepara una *solución madre* de 200 µg/mL en ciclohexano. Partiendo de esta solución madre se prepara la *solución de trabajo* de patrón interno de 0,75 µg/mL en ciclohexano. Se guarda en refrigeración en oscuridad.

- **Solución patrón.** Se prepara una serie de *soluciones madre* de los ftalatos individuales en ciclohexano según se muestra en la tabla 2. Se guardan en refrigeración en oscuridad.

Ftalato	DIDP	DINP	DBP	BBP	DnOP	DEHP
Concentración, µg/mL	600	600	200	200	200	200

Tabla 2. Soluciones madre

Partiendo de las soluciones madre patrones, se prepara una *solución de trabajo mix* de todos los ftalatos en ciclohexano, DIDP 4,5 µg/mL, DINP 4,5 µg/mL, DBP 0,75 µg/mL, BBP 0,75 µg/mL, DnOP 0,75 µg/mL y DEHP 0,75 µg/mL, a partir de la que se preparan soluciones de calibración adecuadas de ftalato en ciclohexano. Se proponen 6 niveles de calibración, que se describen a continuación:

Nivel 0: blanco de calibración, 100 µL de patrón interno (solución de trabajo BB, 0,75 µg/mL) y 650 µL de ciclohexano.

Nivel 1: 0,18 µg/mL DIDP, DINP; 0,03 µg/mL DBP, BBP, DnOP, DEHP

Nivel 2: 0,36 µg/mL DIDP, DINP; 0,06 µg/mL DBP, BBP, DnOP, DEHP

Nivel 3: 0,60 µg/mL DIDP, DINP; 0,10 µg/mL DBP, BBP, DnOP, DEHP

Nivel 4: 1,20 µg/mL DIDP, DINP; 0,20 µg/mL DBP, BBP, DnOP, DEHP

Nivel 5: 1,80 µg/mL DIDP, DINP; 0,30 µg/mL DBP, BBP, DnOP, DEHP

Añadiendo en todos los niveles 100 µL de solución de trabajo de patrón interno y llevándolos a 750 µL con ciclohexano en un vial GC.

Independientemente de la composición de la muestra, la ausencia de contaminación (en el material, reactivos y sistema de determinación en general) se evalúa mediante el análisis de un blanco control. Con cada lote de muestras se prepara un **Blanco del método**. Para ello se añaden 10 mL de THF en un matraz erlenmeyer de 50 mL con tapa. El matraz se introduce en un baño de ultrasonidos y se sonica durante 30 minutos. Se añaden 10 mL de n-Hexano y se agita a 180 rpm durante 5 minutos. La mezcla THF/n-hexano se filtra a través de un filtro de 0,45µm de diámetro de poro. Se combinan 0,3 mL del extracto purificado con 0,2 mL de patrón interno (solución de trabajo BB, 0,75 µg/mL) en un vial GC, y se diluye a 1,5 mL con ciclohexano.

3.2. Extracción de Ftalatos en textil

Se optimiza el método para un estampado en plastisol multicolor (printed pasted) de una camiseta de algodón. Para la obtención de una probeta representativa de la misma, se corta únicamente la parte estampada de la prenda en pequeños cuadros de dimensiones no superiores a 2 mm. Un perfecto homogenizado se garantiza mezclando toda la muestra obtenida, de la que se pesan con precisión ($0,2 \pm 0,005$) g. Se lleva a un frasco de boca ancha esmerilada ámbar de 100 mL con tapa y se añaden 10 mL de THF. La norma describe una proporción de 0,1 g de muestra por cada 10 mL de disolvente; en este caso se pesa el doble, asumiendo que la mitad de esa cantidad es algodón y no plástico, asegurando así el mantenimiento de una correcta proporción.

La extracción con solvente es la aproximación más usual como primer paso en el tratamiento de muestra, especialmente para muestras sólidas. Se hace uso de un sistema de agitación y homogeneización entre solvente y muestra para aumentar la efectividad de la misma, en este ensayo un baño de ultrasonidos. El frasco se introduce en el baño y se sonica durante 30 minutos. En el caso de que el estampado no se disuelva completamente, se deja 2 horas extra. Para eliminar el posible PVC presente, se añaden 10 mL de n-Hexano y se agita a 180 rpm durante 5 minutos, permitiendo la precipitación del polímero. La mezcla THF/n-hexano se filtra a través de un filtro de 0,45µm de diámetro de poro. Se combinan 0,3 mL del extracto purificado con 0,2 mL de patrón interno (solución de trabajo BB, 0,75 µg/mL) en un vial GC, y se diluye a 1,5 mL con ciclohexano.

3.3. Extracción de Ftalatos en goma plástica

Se optimiza el método para la suela de goma de una zapatilla deportiva. Para la obtención de una probeta representativa de la misma, se corta toda la suela de la zapatilla en pequeños cuadros de dimensiones no superiores a 2 mm. Un perfecto homogenizado se garantiza mezclando

toda la muestra obtenida, de la que se pesan con precisión ($0,1 \pm 0,005$) g. Se lleva a un frasco de boca ancha esmerilada ámbar de 100 mL con tapa y se añaden 10 mL de THF. En este punto se procede de la misma forma a la descrita en el punto 3.3.

3.4. Extracción de Ftalatos en aceite

Se optimiza el método para un aceite de uso cosmético. En este caso se hace uso de un sistema de extracción líquido-líquido, más común para muestras líquidas. Se pesan con precisión ($0,25 \pm 0,005$) g de la muestra en un matraz aforado de 25 mL, y se enrasa con n-Hexano. Se agita bien, y se filtra a través de un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro. Se combinan 0,3 mL del extracto con 0,2 mL de patrón interno (solución de trabajo BB, $0,75 \mu\text{g/mL}$) en un vial GC, y se diluye a 1,5 mL con ciclohexano.

3.5. Análisis Instrumental

Los análisis se llevaron a cabo utilizando un autoinyector automático (automatic liquid sampler, ALS) Agilent GC sampler 120, un Cromatógrafo de gases Agilent 7890A con un inlet Split/Splitless, una columna cromatográfica capilar DB-5MS 30 m, 0.25 mm, $0,25 \mu\text{m}$, y un espectrómetro de masas con detector selectivo de masas (MSD) de ionización química por impacto electrónico (EI), analizador de triple cuadrupolo y detector dínodo de alta energía Agilent (7000 GC/MS Triple Quad). Las inyecciones se realizaron utilizando una jeringa de 10 μL . Todos los datos obtenidos se trataron con el programa Agilent MassHunter Quantitative/Qualitative Analysis.

Fue necesario realizar diferentes inyecciones de los patrones a una concentración de $5 \mu\text{g/mL}$ para los ftalatos de bajo peso molecular, de 5 y $20 \mu\text{g/mL}$ para los ftalatos de alto peso molecular y de $6 \mu\text{g/mL}$ para el patrón interno con distintos Modos de Adquisición para la optimización del modo de adquisición final por MRM. En todas las inyecciones se mantuvieron las mismas condiciones en el cromatógrafo de gases (descritas más abajo), variando únicamente las condiciones del MSMS.

3.5.1. Condiciones del cromatógrafo de gases:

Gas portador: Helio

Velocidad de flujo: constante de $1,0 \text{ mL/min}$.

T^a inyector: $290 \text{ }^\circ\text{C}$.

Volumen de inyección: $1 \mu\text{L}$.

Inyección: Splitless

Tª interfase MSMS: 280 °C.

Modo MSD: Impacto electrónico, 70 eV.

Programa de Temperatura: 50 °C (1minuto)

Rampa de 30°C/min hasta 280°C (0 min)

Rampa de 15°C/min hasta 310°C

Isoterma a 310°C durante 4 minutos

Lavado solvente A (Hexano) Pre-Inyección: 2, Post-Inyección: 4

Volumen solvente A: 2 µL

Lavado solvente B (Acetona) Pre-Inyección: 2, Post-Inyección: 4

Volumen solvente B: 2 µL

Lavado con muestra: 1

Volumen lavado con muestra: 5 µL

3.5.2. Condiciones del MSMS:

Selección tiempos de retención (t_R)

Modo de adquisición: Full Scan

Rango de masas: 50-450 m/z

Selección Ión Precursor.

Modo de adquisición: Full Scan

Rango de masas: asociados a cada analito (tabla 3)

Tiempo de análisis: sectorizado en ventanas

	Tiempo Ventana	Rango de masas (m/z)	Analito
Grupo 1, Scan	5-9,5 min	80-220	BB
		130-290	DBP
Grupo 2, Scan	9,5-10,8 min	80-320	BBP
		130-400	DEHP
Grupo 3, Scan	10,8-final	130-400	DnOP
		130-430	DINP
		130-460	DIDP

Tabla 3. MS Scan

Fragmentación Ión Precursor.

Modo de adquisición: Product Ion Scan (PI).

Resolución MS1: wide

Tiempo Ventana	Analito	Ión Precursor	MS inicial	MS final	EC
5-9,5 min	BB	105	50	105	20/40
	DBP	223	50	223	20/40
9,5-10,8 min	BBP	206	50	206	20/40
	DEHP	279	50	279	20/40
10,8-final	DnOP	279	50	279	20
	DINP	293	50	293	20
	DIDP	307	50	307	20

Tabla 4. Condiciones PI

Selección Transiciones Específicas.

Modo de adquisición: Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Resolución MS1: wide

Resolución MS2: wide

Tiempo de Dwell: 50

EC: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40

Analito	Ión Precursor	Iones Producto						
BB	105	51, 77	212	105	194	165		
DBP	149	65, 93, 121	223	149	205	149		
BBP	149	65, 93, 121	206	149	91	65		
DEHP	149	65, 93, 121	167	149	279	149		
DnOP	149	65, 93, 121	279	149	167	149	261	149
DINP	149	65, 93, 121	167	149	293	149	127	57
DIDP	149	65, 93, 121	307	149	141	57		

Tabla 5. Transiciones específicas MRM

3.6. Validación método

Se realiza la validación del método analítico en una de las matrices, textil, con ensayos de recuperación a distintos niveles. Para estudiar la *repetitibilidad* del método se fortifica la misma muestra a tres niveles diferentes (ver tabla 6) y se realiza el ensayo por sextuplicado. De la misma forma se estudia la *reproducibilidad*, fortificándose tres diferentes muestras a los mismos tres niveles y realizando el ensayo por duplicado.

	DIDP	DINP	DBP	BBP	DEHP	DnOP
Nivel 1	90 ppm	90 ppm	30 ppm	30 ppm	30 ppm	30 ppm
Nivel 2	180 ppm	180 ppm	60 ppm	60 ppm	60 ppm	60 ppm
Nivel 3	360 ppm	360 ppm	120 ppm	120 ppm	120 ppm	120 ppm

Tabla 6. Niveles de ensayo de recuperación, referidos a concentración final en muestra

Las muestras se trataron de la misma forma a la descrita en el punto 3.3., dopando las muestras a la vez que se añadía el THF para la extracción. Se añadieron 30 μ L para el Nivel 1, 60 μ L para el Nivel 2 y 120 μ L para el nivel 3 de cada una de las soluciones madre de los patrones de ftalatos, corrigiéndose el volumen de n-Hexano a añadir en cada caso, manteniendo siempre los 30 mL finales de mezcla de solventes.

3.7. Aplicación muestras reales

El método analítico ya validado se aplicó a muestras reales procedentes de un cliente de la empresa donde se desarrolló el trabajo durante un periodo de 2 meses. En el análisis de las muestras se realizó un control de calidad para asegurar la fiabilidad de los resultados mediante el uso de un QC en cada una de las secuencias, fortificado al nivel intermedio de la recta de calibrado. Se analizaron entre 8 y 10 muestras en cada secuencia, a las que se sumaba el QC y el blanco de método.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización del método

El cromatograma total de los iones generados (total ion chromatogram, TIC) de los seis ftalatos (DBP, BBP, DEHP, DnOP, DINP, DIDP) y del patrón interno (BB) adquirido en modo Scan se muestra en la figura 2. Mientras que los 4 ftalatos de bajo peso molecular y el BB aparecen como picos individuales en el cromatograma, tanto el DINP como el DIDP aparecen como picos de sierra debido a una serie de posibles isómeros presentes.

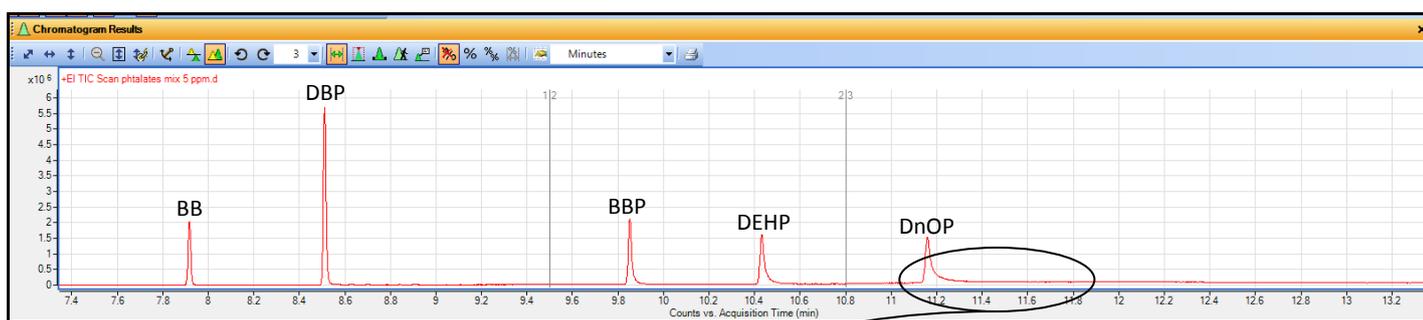
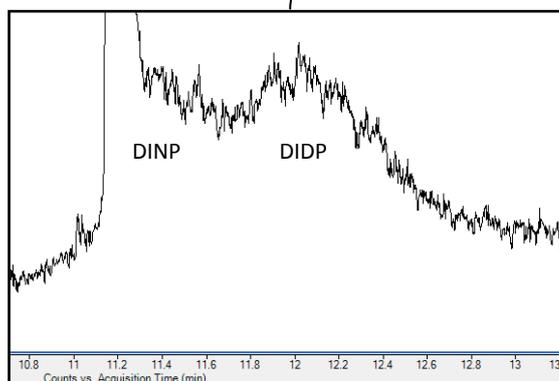


Figura 2. TIC modo Scan, 5 µg/mL



De las inyecciones realizadas con un barrido de todos los iones de los ftalatos y su patrón interno, se obtuvo el **tiempo de retención (t_R)** de todos los analitos:

BB, t_R : 7,9 min

DBP, t_R : 8,5 min

BBP, t_R : 9,8 min

DEHP, t_R : 10,4 min

DnOP, t_R : 11,1 min

DINP, t_R : 11,5 min

DIDP, t_R : 12,1 min

Conocido el tiempo de retención de cada uno, se realiza otra inyección en modo Scan sectorizado en 3 ventanas (indicadas en la tabla 3) para, de los picos más intensos

observados en el experimento, seleccionar el **ión precursor** de cada analito (marcados en color azul en la tabla 7).

analito	Pico	Abundancia (%)	Pico	Abundancia (%)	Pico	Abundancia (%)	Pico	Abundancia (%)
BB	105	100	91	45,3	212	15,69	194	8,94
DBP	149	100	223	3,3	205	2,95	167	0,34
BBP	149	100	91	59,46	206	17,82		
DEHP	149	100	167	31,22	279	5,39		
DnOP	149	100	279	3,12	206	2,42	167	1,81
DINP	149	100	167	9,08	293	4,29	261	1,87
DIDP	149	100	167	9,85	307	4,08		

Tabla 7. Picos más intensos, resultados modo Scan.

El pico más intenso para la espectroscopia de masas por ionización EI a 70eV de los ftalatos analizados corresponde a 149 m/z (figura 3), con una relación señal ruido de 10 a 100 veces mayor que los otros iones del espectro.

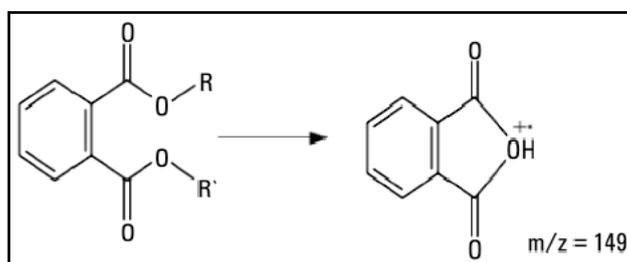


Figura 3. Estructura primaria de ftalatos y fragmentación mayoritaria con ionización EI.

Se seleccionaron picos mucho menos intensos en alguno de los ftalatos estudiado para así eliminar las interferencias de matriz de otros posibles ftalatos presentes no objeto de estudio. Por otro lado, en el caso de DIDP y DINP, la baja abundancia de los iones seleccionados obligó a la utilización de un patrón de mayor concentración (20 µg/mL) a la utilizada para los otros ftalatos, y a la optimización por separado de los mismos mediante la inyección de patrones individuales.

Conocido el ión precursor, se buscan las **fragmentaciones específicas** de cada uno de ellos mediante una inyección con un barrido de todos los iones producto; de entre los iones productos obtenidos para cada uno de los iones precursores, se seleccionan los picos

más intensos con el fin de definir las **transiciones específicas** que se usarán en el método de adquisición por MRM (indicado en la tabla 5). Es necesaria una última inyección para optimizar las energías de colisión (EC) que nos llevan a las fragmentaciones más intensas de los iones precursores, para tener, finalmente, tener todos los parámetros optimizados en el método de adquisición de múltiple reacción seleccionada, MRM, buscado (tabla 8).

Analito	Target	EC	Qualifier	EC	Qualifier	EC	Qualifier	EC	Qualifier	EC
BB	105→77	15	105→51	30	212→105	10	194→165	30		
DBP	149→65	25	149→93	20	149→121	15	223→149	5	205→149	5
BBP	149→65	30	149→93	10	149→121	15	206→149	5	91→65	15
DEHP	149→65	30	149→93	20	149→121	15	167→149	5	279→149	10
DnOP	279→149	5	149→65	25	149→93	20	149→121	15	261→149	10
DINP	293→149	10	149→65	30	149→93	20	149→121	15	127→57	10
DIDP	307→149	10	149→65	30	149→93	20	149→121	15	141→57	5

Tabla 8. MRM final

De entre las transiciones optimizadas, se selecciona una para cada analito (target), que será la utilizada para la cuantificación, y que suele ser la más intensa. El resto de las transiciones servirán para el análisis confirmativo de la identidad de los analitos (qualifiers) –ver ejemplo en figura 4-. Todos los ftalatos estudiados presentan como transición más intensa la correspondiente a la fragmentación del ión precursor 149, pero debido a que los tres ftalatos que aparecen en la última ventana (DnOP, DINP, DIDP) tienden a eluir solapando sus picos, se escogen como transición target la primera más intensa característica exclusivamente de cada uno de ellos.

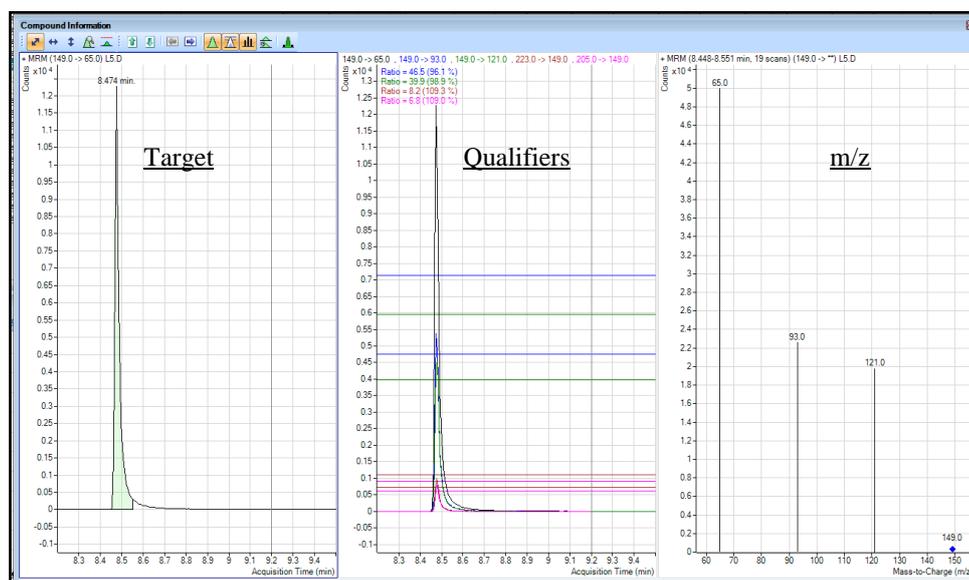


Figura 4. Información DBP 0,3 µg/mL

En la figura 5 se muestra el TIC obtenido en MRM con el método final optimizado de los seis ftalatos, mientras que en la figura 6 se muestra el TIC obtenido en MRM de los dos ftalatos de alto peso molecular; fue necesaria la integración del área total del pico obtenido para la cuantificación de estos compuestos.

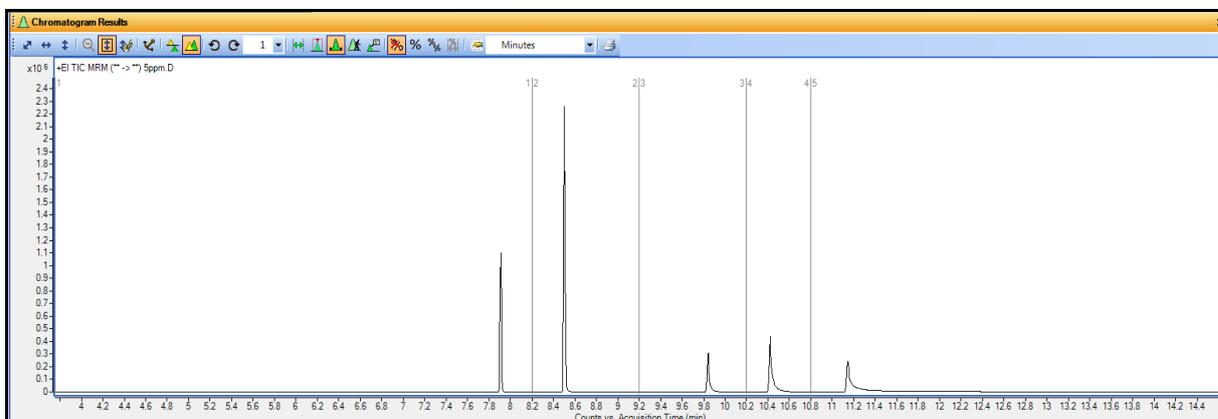


Figura 5. TIC MRM, 5µg/mL

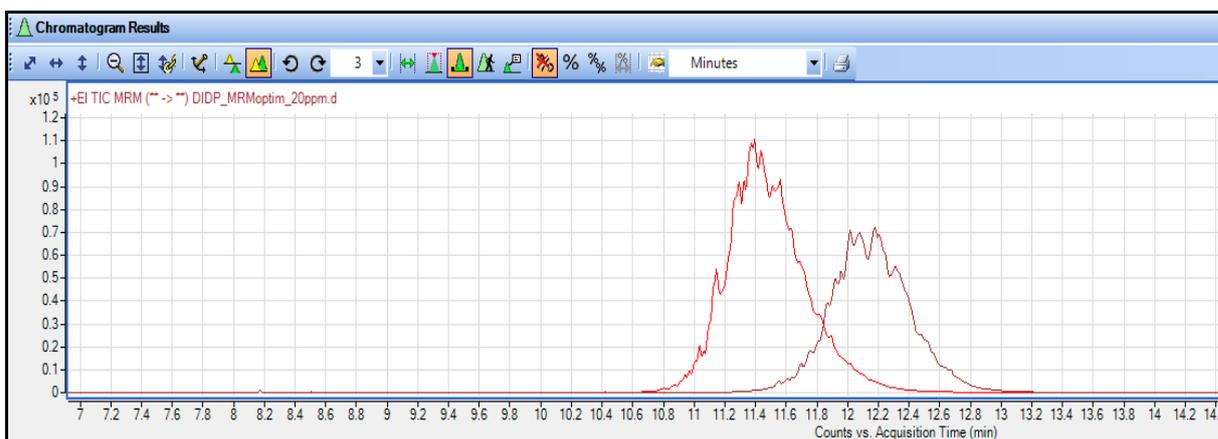


Figura 6. TIC MRM, DINP y DIDP 20 µg/mL

Todos los ftalatos presentan excelentes coeficientes de **calibración** a los niveles anteriormente propuestos, como se indica en la tabla 9

Analito	Rango de linealidad (µg/mL)	Coefficiente de correlación (r ²)
DBP	0,01-0,5	0,99599
BBP	0,01-0,5	0,99740
DEHP	0,01-0,5	0,99859
DnOP	0,01-0,5	0,99638
DINP	0,05-2,0	0,99688
DIDP	0,05-2,0	0,99746

Tabla 9. Calibración Ftalatos

A partir del punto más bajo del calibrado se estimó el LOQ de los ftalatos de bajo peso molecular en las diferentes muestras en 22,5 µg/g, y en 85,0 µg/g para los ftalatos de alto peso molecular, llegando a estimar LODs de 7,5 µg/g para DBP, BBP, DnOP y DEHP, y de 37,5 µg/g para DINP y DIDP. Se obtuvo un método analítico sensible, y con buena precisión y exactitud utilizando la dilución por 5 del extracto crudo junto con la adición del BB como patrón interno y la cuantificación con calibrado.

4.2. Validación

Estudio de la reproducibilidad. Se obtuvieron valores satisfactorios de recuperación a los tres niveles de concentración, así como una excelente precisión (con desviación estándar relativa, RSD, siempre inferior al 5%), en las tres muestras utilizadas para el estudio. En la tabla 10 se muestra los resultados obtenidos para una de las muestras en el segundo nivel de concentración (punto medio del rango de linealidad del calibrado).

Analito	Nº Réplicas	% Recuperación	% RSD
DBP	2	87,19	2,28
BBP	2	87,58	1,40
DEHP	2	85,02	1,00
DIDP	2	90,63	3,96
DINP	2	84,55	0,54
DnOP	2	95,45	2,62

Tabla 10. Recuperación, RSD estudio reproducibilidad

Estudio de la repetitibilidad. Se obtuvieron valores satisfactorios de recuperación a los tres niveles de concentración, así como una excelente precisión (con RSD siempre inferior al 7%), en las dos muestras utilizadas para el estudio. En la tabla 11 se muestra los resultados obtenidos para una de las muestras en el tercer nivel de concentración.

Analito	Nº Réplicas	% Recuperación	% RSD
DBP	6	112,11	2,65

BBP	6	112,94	1,46
DEHP	6	103,89	5,69
DIDP	6	102,07	6,05
DINP	6	88,84	6,49
DnOP	6	104,95	3,54

Tabla 11. Recuperación, RSD estudio repetitibilidad

4.3. Aplicación muestras reales

El análisis de muestras reales (tanto textiles, como plásticos o aceites) fue satisfactorio, confirmándose la robustez del método mediante el uso de QCs. En cada secuencia de análisis se incluyó un QC al nivel de 60 µg/g para los ftalatos de bajo peso molecular, y al nivel de 180 µg/g para los ftalatos de alto peso molecular, en tandas de 8 a 10 muestras por secuencia. Del total de los QCs que se llegaron a analizar, sus valores de recuperación siempre estuvieron entre un 80% y un 110%.

El principal problema encontrado en el desarrollo del presente trabajo ha sido lograr un rango de linealidad satisfactorio para ser utilizado en la calibración y posterior aplicación en la determinación de ftalatos en muestras reales. Debido a la alta sensibilidad del detector utilizado, la tendencia observada en las curvas de calibrado de los analitos a mayores concentraciones de las indicadas, es seguir una regresión de tipo cuadrático, debido principalmente a la saturación del detector (como puede observarse en una recta realizada con concentraciones de 0,05 a 5 µg/mL de DnOP, en la figura 7).

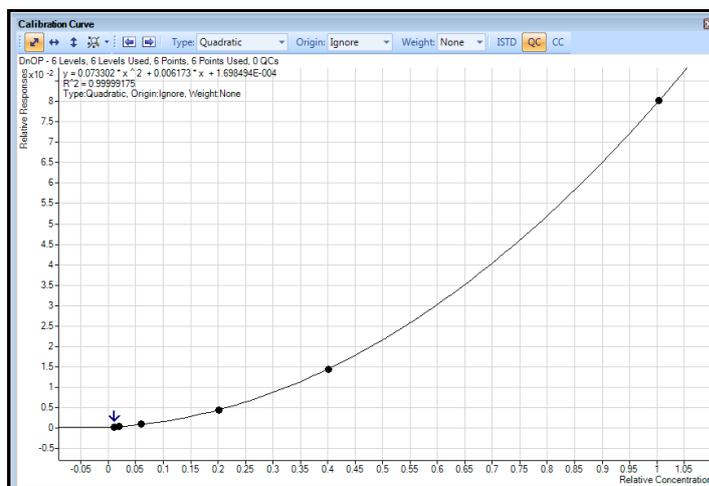


Figura 7. Regresión cuadrática, DnOP

Debido a que en las muestras analizadas, principalmente textil, no está prohibido el uso de los ftalatos, sino que se recomienda su no utilización, cuando aparece un positivo a alguno de los ftalatos estudiados lo hace en elevada proporción, haciendo necesaria una dilución extra del vial GC para su correcta cuantificación, puesto que la muestra no solo satura al detector, sino que sale del rango de linealidad del método, como ocurrió con una de las muestras reales analizada que resultó ser positiva a DINP (figura 8, pre-dilución, y figura 9, post-dilución).

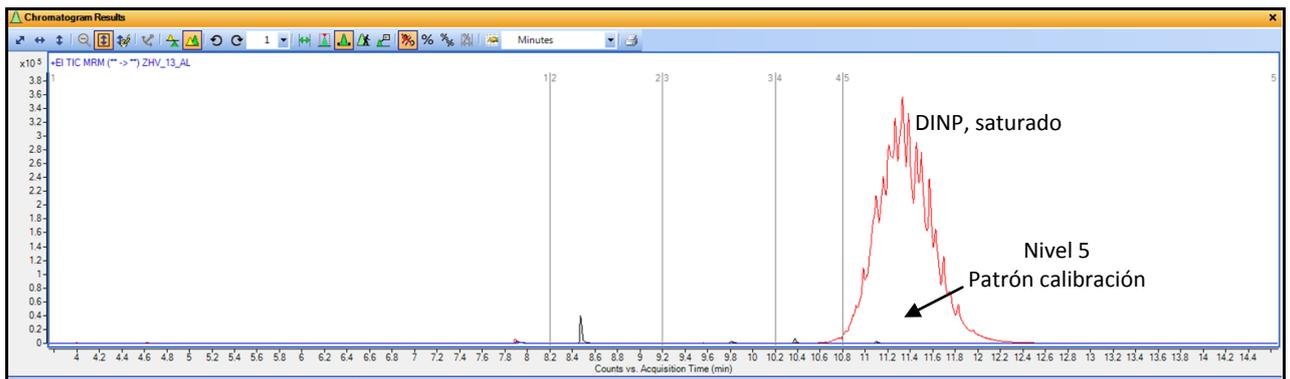


Figura 8. Muestra positiva a DINP

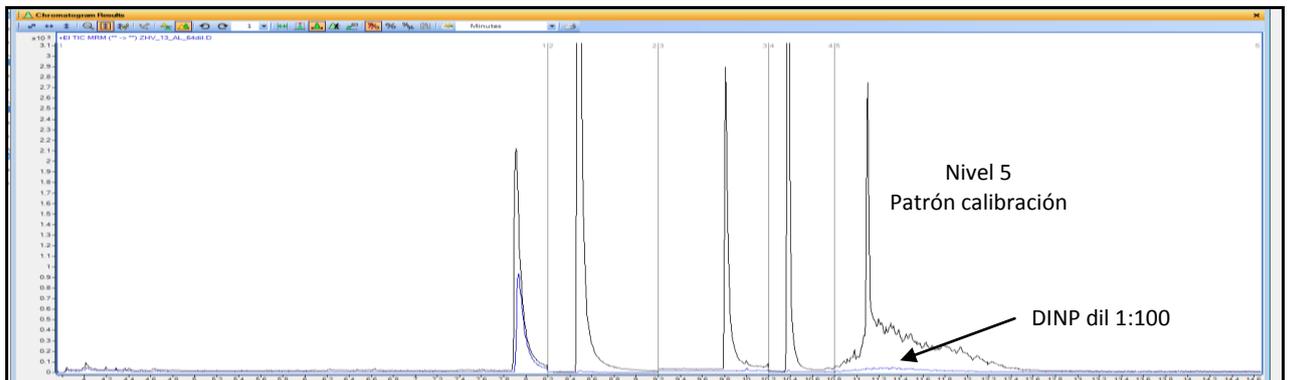


Figura 9. Muestra positiva a DINP diluida 1:100 en ciclohexano

5. CONCLUSIONES

La conclusión general que se puede extraer del presente Trabajo Fin de Máster es la gran versatilidad y excelente potencial que ofrece la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem mediante el uso de un analizador MS triple cuadrupolo (QQQ). De acuerdo con la norma europea UNE-EN 15777:2009, se ha desarrollado un método para la determinación de seis ftalatos en muestras textiles, plásticas y aceite, que cumple con los requisitos de linealidad, repetitibilidad, reproducibilidad, robustez y recuperación exigidos.

El uso de patrón interno y/o la dilución del extracto de las muestras permiten contrarrestar el efecto matriz, obteniendo una alta sensibilidad y selectividad que ha permitido la determinación de niveles de $\mu\text{g/g}$ por debajo del límite establecido por la directiva europea 2005/84/EC (0,1% en masa).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Norma UNE-EN 15777. Textiles. Método de ensayos para ftalatos.
- United States Consumer Product Safety Commission Directorate for Laboratory Sciences; Division of Chemistry; Test Method CPSC-CH-C1001-09.3
- Yun Zou, Min Cai. Agilent Technologies, Shangay. *Determination of Phthalate Concentration in Toys and Children's products*. Gas Chromatography/ Mass Spectrometry
- Yassin A. Jeilani¹, Beatriz H. Cardelino Victor M. Ibeanusi. *Positive chemical ionization triple-quadrupole mass spectrometry and ab initio computational studies of the multi-pathway fragmentation of phthalates*. Journal of Mass Spectrometry, Volume 45, Issue 6, pages 678–685, June 2010
- Yassin A. Jeilani, Beatriz H. Cardelino, Victor M. Ibeanusi. *Density Functional Theory and Mass Spectrometry of Phthalate Fragmentations Mechanisms: Modeling Hyperconjugated Carbocation and Radical Cation Complexes with Neutral Molecules*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, Volume 22, Issue 11, pp 1999-2010, November 2011
- M. Valcárcel Cases, A. Gómez Hens. Departamento de Química Analítica Universidad de Córdoba. *Técnicas Analíticas de Separación*. Editorial Reverté, S.A.

- Skoog, Leary. *Análisis Instrumental*. McGraw Hill. Cuarta Edición
- Aplicación Agilent Technologies. *La mejor tecnología GC-MS para cada aplicación: Cuadrupolo Simple, Trampa de Iones y Triple Cuadrupolo*.
- Directivas europeas: 2005/84/EC, 2004/93/EC.
- Reglamento de la comisión europea 10/2001