

Universidad Santiago de Compostela

Máster Universitario en Química Industrial e Investigación Química

Facultad de Química

Applus Norcontrol (Sada, A Coruña)



**OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS:
DETERMINACIÓN DE FTALATOS, BUTIL
HIDROXITOLUENO Y 4-METOXICINAMATO DE
2-ETILHEXILO EN MUESTRAS DE AGUA MEDIANTE
SPE Y GC-MS/MS**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

PRESENTADO POR:

Beatriz Loeches Elvira

Bajo la dirección de los tutores:

Pilar Bermejo Barrera

José A. Martínez Pontevedra

Y de la co-tutora:

María Teresa Pena Sendón

Santiago de Compostela

Julio, 2019

D^a Pilar Bermejo Barrera, Catedrática de Química Analítica, del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela, como tutora interna, Dr D. José A. Martínez Pontevedra como tutor externo de la empresa Applus, y Dra. D^a María Teresa Pena Sendón, como co-tutora externa de la empresa Applus

INFORMAN QUE:

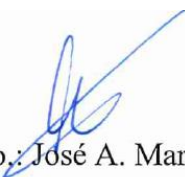
El trabajo presentado por Doña Beatriz Loeches Elvira titulado **“Optimización de Metodologías Analíticas: Determinación de ftalatos, Butil Hidroxitolueno y 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo en Muestras de Agua mediante SPE y GC-MS/MS”** ha sido desarrollado bajo nuestra dirección en los laboratorios de la empresa Applus, y **AUTORIZAN** la presentación de la memoria adjunta como Trabajo Fin de Máster.

Santiago de Compostela, 3 de julio de 2019

Firma de la tutora interna

Fdo.: Pilar Bermejo Barrera

Firma del tutor externo



Fdo.: José A. Martínez Pontevedra

Firma de la co-tutora externa



Fdo.: María Teresa Pena Sendón

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	1
3. Objetivos	2
4. Introducción	2
a. Compuestos a estudiar	2
i. Ftalatos.....	2
ii. 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol	5
iii. 4-metoxicamato de 2-etilhexilo	6
b. Fuentes y distribución medioambiental	7
c. Toxicidad y legislación	8
d. Métodos de análisis.....	10
i. Técnicas de preparación de muestra	10
ii. Métodos de determinación	15
5. Parte experimental.....	17
a. Reactivos.....	17
b. Material	17
c. Lavado material	18
d. Preparación de patrones.....	18
e. Método de análisis.....	19
i. Método de preparación de muestra.....	19
ii. Método de determinación GC-MS/MS	20
6. Resultados y discusión	22
a. Optimización del método cromatográfico (GC-MS/MS)	22
i. Blancos cromatográficos.....	23
b. Optimización del método de preparación de muestra	27

i. Blancos analíticos	27
c. Evaluación del método analítico	29
i. Efectos de matriz	29
ii. Rango lineal	33
iii. Límite de cuantificación (LOQ)	35
iv. Precisión y exactitud.....	35
7. Conclusiones.....	38
8. Bibliografía.....	40
ANEXO I	1
ANEXO II	18

1. Resumen

Los ftalatos son un grupo de productos químicos utilizados como plastificantes en adhesivos, recubrimientos, especialmente en la fabricación cloruro de polivinilo. El 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol es un antioxidante sintético procedente de la industria petrolífera utilizado como un aditivo alimentario. El 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo es un filtro ultravioleta empleado como ingrediente activo en la formulación de productos cosméticos para la protección solar. Estos analitos **a estudiar** migran fácilmente hacia el medio ambiente, siendo por ello de interés su determinación en muestras acuosas medioambientales.

Todos los compuestos **de interés** tienen varias aplicaciones, se añaden como aditivos a determinados productos, como adhesivos, como antioxidantes, son sintetizados a gran escala es por eso, por lo que se ha empezado a legislar su comercialización, fabricación y el uso de determinadas sustancias. La Unión Europea ha legislado los ftalatos fijando un límite restrictivo para el ftalato de di-2-etilhexilo en diferentes aguas continentales en la Directiva 2013/39/UE, mientras que el 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol y el 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo se han incluido en una lista de observación según la Decisión 2015/495/UE.

Se ha desarrollado un método simple, rápido y eficiente, basado en extracción en fase sólida y determinación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem, presentando este método recuperaciones satisfactorias para todos los compuestos estudiados.

Palabras Clave: Ftalatos, butil hidroxitolueno, 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo, extracción en fase sólida, cromatografía de gases, espectrometría de masas.

2. Abstract

Phthalates are a group of chemical products used as plasticizers in adhesives, coatings, especially in the manufacture of polyvinyl chloride. 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol this compounds is a synthetic antioxidant from the oil industry used as a food additive. The 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate is an ultraviolet filter used as an active ingredient in the formulation of cosmetic products for sun protection. These analytes to be studied

migrate easily to the environment, for this, it is important their determination in environmental aqueous samples.

All the compounds to study present different applications, can be added as additives to certain products, as adhesives, as antioxidants, among other applications. They are synthesized on a large scale, for this, new legislation about the marketing, manufacture and use these type of compounds has been developed. The European Union has legislated for phthalates since they had their greatest peak, setting a restrictive limit for di-2-ethylhexyl phthalate in different continental waters in Directive 2013/39/UE, while for 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol and 2-ethylhexyl-4-metoxicinnamate they have been included in an observation list according to Decision 2015/495/UE.

A simple, fast and efficient method based on solid phase extraction and determination by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry has been developed, allowing satisfactory recoveries of around 100% for all the compounds studied.

Keywords: Phthalates, butylated hydroxytoluene, 2-diethylhexyl-4-metoxicinnamate, solid phase extraction, gas chromatography, mass spectrometry.

3. Objetivos

El objetivo de este trabajo es la optimización de una metodología analítica para la determinación de tres familias diferentes como los ftalatos, el butil hidroxitolueno y el 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo en muestras de aguas continentales.

4. Introducción

a. Compuestos a estudiar

i. Ftalatos

Los plastificantes son aditivos que se mezclan con algunos plásticos para incrementar su elasticidad (Bustamante-Montes, Lizama-Soberanis, Olaíz-Fernández, & Vázquez-Moreno, 2001). Los plásticos se definen según el Reglamento (UE) N°10/2011 de la Comisión Europea como: “polímero al que pueden haberse añadido aditivos u otras sustancias y que es capaz de funcionar como principal componente estructural de

materiales y objetos finales” (Comisión Europea, 2011). Los plastificantes de uso más común son los derivados del ácido ftálico o ftalatos (Bustamante-Montes, Lizama-Soberanis, Olaíz-Fernández, & Vázquez-Moreno, 2001). Así, los ftalatos aportan flexibilidad y durabilidad en productos como adhesivos, recubrimientos, acetatos de polivinilo y especialmente en la fabricación de cloruro de polivinilo (PVC). Los ésteres de ácido ftálico son los ésteres dialquílicos o arílicos del ácido benceno-1,2-dicarboxílico (figura 1). De los plastificantes empleados en el mundo, los ftalatos suponen aproximadamente un 93% del volumen total, incluso sabiéndose que muchos de ellos son tóxicos (Pérez F., 2013) (Farahani, Norouzi, Dinarvand, & Reza Ganjali, 2007).

Hoy en día, todos los ftalatos utilizados como plastificantes están por todas partes del medio ambiente, debido a la ausencia de uniones químicas covalentes entre los ftalatos y la matriz polimérica que forma los plásticos, facilitando la migración de los mismos y su posterior liberación al medio o a los productos donde se envasan (Pérez Feás, 2012) (Balafas, Shaw, & Whitfield, 1999).

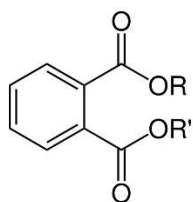


Figura 1. Estructura general de los ésteres de ácido ftálico: ftalatos.

El uso de los plásticos que contienen ftalatos se usan en materiales de construcción, ropas, cosméticos, perfumes, envases de alimentos, juguetes, productos de vinilo, también, en aplicaciones médicas como las bolsas y tubos de transfusión de sangre, bolsas de fluidos intravenosas u otros dispositivos médicos. También se han encontrado ftalatos en aceites lubricantes, disolventes y detergentes (EPA, 2007). Por otro lado, los ftalatos se pueden utilizar como portadores o disolventes para fragancias de almizcle sintético en muchos productos para el cuidado personal (Regueiro, Llompart, Garcia-Jares, Garcia-Montequado, & Cela, 2008). Los efectos de la exposición humana a los ftalatos están en constante discusión, encontrándose clasificados y legislados por la Unión Europea.

Ciertos ftalatos, así como sus metabolitos y sus productos de degradación, pueden causar efectos adversos en la salud humana. Están reconocidos y catalogados como tóxicos, ya que una alta exposición puede generar fallos en el sistema endocrino, cambiando la

actividad hormonal, así como generar daños en órganos como el hígado o el riñón (Psillakis & Kalogerakis, 2003) (Arcadi, y otros, 1998), por eso, los ftalatos se clasifican como disruptores endocrinos o agentes hormonales activos (HAA) debido a la capacidad que tienen para interferir con el sistema endocrino en el cuerpo (EPA, 2007) (Petrovic, Eljarrat, López de Alda, & Barceló, 2001).

En la figura 2 se presentan las estructuras de los compuestos de interés.

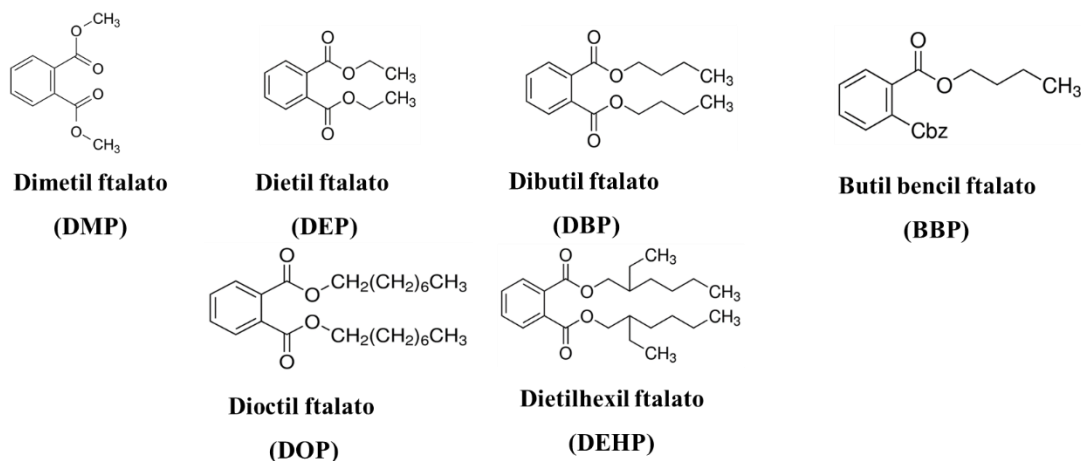


Figura 2. Estructura molecular de los ftalatos de interés en el proyecto.

En la tabla 1 se recogen las propiedades físico-químicas de los ftalatos incluidos en este estudio, ya que son un factor clave a la hora de entender su comportamiento medioambiental. Se puede observar que hay dos rangos de valores en los compuestos estudiados, por un lado tenemos el DOP y el DEHP, son compuestos insolubles en agua y con un valor de log K_{ow} entre 7 y 8, lo que nos indica que son compuestos hidrofóbicos, favoreciendo la toxicidad de las sustancias y la adsorción en tejidos grasos, suelos y sedimentos. Mientras que para los otros ftalatos como el DMP, DEP, DBP Y BBP, son compuestos solubles en agua con bajos log K_{ow} , lo que indica una probable movilidad, esperando que los compuestos miguen fácilmente y se bioacumulen en las matrices acuosas.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de los ftalatos (National Center for Biotechnology Information, s.f.).

Compuesto	n° CAS	Fórmula molecular	PM	log K _{ow}	S (mg L ⁻¹)
DMP	131-11-3	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.19	1.60	4.0
DEP	84-66-2	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222.24	2.47	0
DBP	84-74-2	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	278.35	4.50	11.2
BBP	85-68-7	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	312.37	4.73	2.69
DOP	117-84-0	C ₂₆ H ₃₈ O ₄	390.56	8.10	0.022
DEHP	117-81-7	C ₂₆ H ₃₈ O ₄	390.56	7.60	0.27

K_{ow}, coeficiente de partición octanol-agua; S, solubilidad en agua a 25 °C.

ii. 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol

El 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol, más conocido como butil hidroxitolueno (BHT) (figura 3), es un antioxidante sintético procedente de la industria petrolífera. Es una de los antioxidantes más utilizados en los alimentos y productos relacionados con la comida como un aditivo alimentario (Babich, 1982), aunque también se emplea como antioxidante en cosméticos y productos farmacéuticos (M. Tiziana Baratta, 1998). El BHT reacciona con radicales libres haciendo disminuir la tasa de autooxidación que puede llevar a cabo cambios en el color y en el sabor de los alimentos. El BHT es ampliamente utilizado como un aditivo para aumentar la capacidad de alimentos y plásticos (Fries & Püttmann, 2002).

El BHT se encuentra en el agua potable debido a su liberación desde el envase que la contiene (Tombesi & Freije, 2002) (Schwope, y otros, 1987).

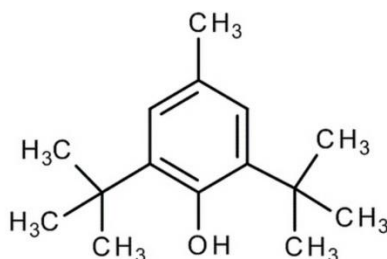


Figura 3. Estructura del BHT.

En la tabla 2 se recogen las propiedades físico-químicas del BHT, ya que son un factor clave a la hora de entender su comportamiento medioambiental. Se puede observar que el valor de $\log K_{ow}$ es 5.10, es un compuesto insoluble en agua, favoreciendo la toxicidad de las sustancias y la adsorción en tejidos grasos, suelos y sedimentos.

Tabla 2. Propiedades físico-químicas del BHT (National Center for Biotechnology Information, s.f.).

Compuesto	n° CAS	Fórmula molecular	PM	$\log K_{ow}$	S (mg L ⁻¹)
BHT	128-37-0	C ₁₅ H ₂₄ O	220.34	5.10	0.6

K_{ow} , coeficiente de partición octanol-agua; S, solubilidad en agua a 25°C.

iii. 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo

El 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo (2EH4MC) (figura 4) es un filtro ultravioleta (UV), que se emplea como ingrediente activo en la formulación de productos cosméticos para la protección solar, protegiendo la piel humana de los efectos perjudiciales de la radiación solar (Tarazona Teruel, 2015) (Zhang & Lee, 2012). Los filtros UV orgánicos son compuestos sintéticos con estructuras aromáticas (Ma, Wang, Zhen, Zhang, & Du, 2017). Los filtros UV se definen como “las sustancias cuya finalidad exclusiva o principal sea proteger la piel contra determinadas radiaciones ultravioletas absorbiendo, reflejando o dispersando esta radiación “según el Reglamento (CE) N°1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos (versión refundida) (Unión Europea, 2009). Los filtros UV son los nuevos tipos de contaminantes emergentes en el medio ambiente que han generado preocupaciones importantes en los últimos años debido a la amenaza potencial para el medio ambiente y para la salud humana (Huang, Xie, Yan, Mi, & Xu, 2016) (Kunz & Fent, 2006) (Zhang & Lee, 2012).

Los filtros UV legislados, junto con la concentración máxima permitida, se recogen en el ANEXO VI del Reglamento Europeo mencionado anteriormente, donde establecen para el filtro UV 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo, conocido como etilhexil metoxicinamato (EMC) permitiendo una concentración máxima de un 10% en productos cosméticos.

El compuesto 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo es el filtro solar usado con más frecuencia ya que se puede incorporar sin problemas en las materias primas empleadas para desarrollar los cosméticos (Capriotti, y otros, 2014).

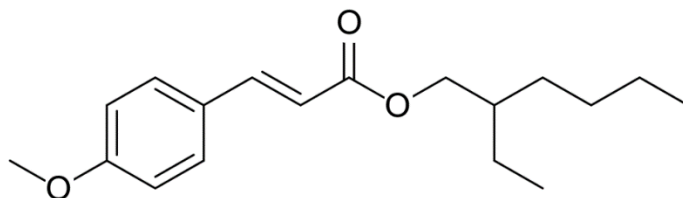


Figura 4. Estructura de compuesto 2EH4MC.

En la tabla 3 se recogen las propiedades físico-químicas del 2EH4MC, ya que son un factor clave a la hora de entender su comportamiento medioambiental. Se puede observar que el valor de $\log K_{ow}$ es 6.1, es un compuesto insoluble en agua, favoreciendo la toxicidad de las sustancias y la adsorción en tejidos grasos, suelos y sedimentos.

Tabla 3. Propiedades físico-químicas del 2EH4MC (National Center for Biotechnology Information, s.f.).

Compuesto	n° CAS	Fórmula molecular	PM	$\log K_{ow}$	S (mg L ⁻¹)
2EH4MC	5466-77-3	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	290.40	6.1	0.2

K_{ow} , coeficiente de partición octanol-agua; S, solubilidad en agua a 25°C.

b. Origen, fuentes y distribución medioambiental

Los ftalatos han sido empleados en la industria química desde que se empezaron a producir en 1920 aunque tuvieron su mayor auge a partir de los años 50, debido a su propiedad plastificante en el PVC. En 1926, Waldo Semon desarrolló el método de plastificación del PVC con ayuda de ciertos aditivos, haciendo que el material fuese más flexible y más fácil de fabricar. Este método es considerado como el punto de partida de la producción de PVC y por ello, del descubrimiento de los ftalatos (The Editors of Encyclopaedia Britannica See Article History, s.f.).

La actividad humana está cada vez más relacionada con la producción de plásticos, y su posterior emisión de compuestos al medioambiente, como los ftalatos ya que se añaden a

una matriz polimérica y migran fácilmente. De la misma manera, con el paso del tiempo se ha incrementado la producción de antioxidantes como el BHT para la protección de alimentos de forma más duradera. Pero también se ha notado un aumento de filtros UV presentes en los cosméticos para la protección solar. Debido al gran auge de estos compuestos se puede pensar que al ser capaces de migrar fácilmente de la matriz donde forman parte, estarán presentes en todas las matrices y también en los seres humanos. Como consecuencia del uso generalizado, la tasa de producción mundial de los ftalatos asciende a 4,0 millones de toneladas por año aproximadamente (Lin Z.P., 2003).

El rango de aplicación de ftalatos, BHT y 2EH4MC aumenta continuamente de modo que su consumo se incrementa, y una gran parte de estos compuestos químicos contaminan el medio ambiente (EPA, 2007).

El amplio uso de los compuestos a nivel mundial en diferentes prácticas, como fabricación de juguetes, el envasado de alimentos, bebidas, productos cosméticos, etc. ha originado que se encuentren residuos de estos contaminantes en agua, alimentos y en el medio ambiente en general (Jara, Lysebo, Greibrokk, & Lundanes, 2000) (Fierens, y otros, 2012) (Fromme, y otros, 2002). La distribución de los ftalatos en el medio ambiente, como del BHT y el 2EH4MC, así como efectos toxicológicos dependen en gran medida de sus propiedades físico-químicas. Los ftalatos están reconocidos como disruptores endocrinos (EPA, 2007), “sustancias químicas capaces de alterar el equilibrio hormonal, pudiendo provocar diferentes efectos adversos sobre la salud de las personas, animales o de sus descendientes. Estas sustancias pueden causar efectos nocivos en la salud, como cáncer, alteraciones del comportamiento, anomalías reproductivas, etc. (Risctox, s.f.).

c. Toxicidad y legislación

El agua es considerada un recurso natural que debe conservarse de una mala utilización o privatización por parte de colectivos o de individuales, es por este motivo por lo que en el 1879 se estableció una “Ley de Aguas” la cual fue derogada por la entrada en vigor de la Ley 29/1985 de 2 de Agosto, de Aguas (BOE núm. 189, de 8 de agosto de 1985), donde se pone de manifiesto que “el agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida y para el ejercicio de la inmensa mayoría de actividades económicas; es

irremplazable, no ampliable por la mera voluntad del hombre, irregular en su forma de presentarse en el tiempo y en el espacio, fácilmente vulnerable y susceptible de usos sucesivos” (Cortes Generales, 1985).

Como consecuencia del uso generalizado, la tasa de producción mundial de ftalatos asciende a 4,0 millones de toneladas por año aproximadamente (Lin Z.P., 2003). Debido a esa alta producción de ftalatos, la UE ha regulado la fabricación, comercialización y el uso de determinadas sustancias, preparados y artículos peligrosos, dentro del Reglamento (CE) nº1907/2006, en este caso, encontramos legislados los ftalatos siguientes:

- Di(2-etilhexil)ftalato (DEHP)
- Dibutilftalato (DBP)
- Butilbencilftalato (BBP)

Estos compuestos no se pueden utilizar como sustancias o constituyentes de preparados en concentraciones superiores al 0,1% en masa del material plastificado, en los juguetes y artículos de puericultura (Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea, 2006). En el ámbito de agua (Ley de Aguas) se ha legislado el DEHP según la Directiva 2013/39/UE siendo $1.3 \mu\text{g L}^{-1}$ la concentración máxima permitida para aguas continentales, como se muestra en la imagen siguiente (Boleín Oficial del Estado, 2013).

ANEXO II

ANEXO I

NORMAS DE CALIDAD AMBIENTAL PARA LAS SUSTANCIAS PRIORITARIAS Y ALGUNOS OTROS CONTAMINANTES

PARTE A: NORMAS DE CALIDAD AMBIENTAL (NCA)

MA: media anual

CMA: concentración máxima admisible

Unidad: $[\mu\text{g/l}]$ para las columnas (4) a (7)

$[\mu\text{g/kg de peso húmedo}]$ para la columna (8)

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
(12)	Ftalato de di(2-etilhexilo) (DEHP)	117-81-7	1,3	1,3	No aplicable	No aplicable	

Mientras que el BHT y el 2EH4MC se han incluido en la lista de observación según la Decisión 2015/495/UE (Comisión Europea, 2015), como se muestra en la imagen siguiente (Comisión Europea, 2015).

Lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión, de conformidad con el artículo 8 ter de la Directiva 2008/105/CE

Nombre de la sustancia/grupo de sustancias	Nº CAS ⁽¹⁾	Nº UE ⁽²⁾	Método analítico indicativo ⁽³⁾ ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾	Límite máximo aceptable de detección del método (mg/l)
17-alfa-Etinilestradiol (EE2)	57-63-6	200-342-2	SPE-LC-MS-MS en grandes volúmenes	0,035
17-beta-Estradiol (E2), estrona (E1)	50-28-2, 53-16-7	200-023-8	SPE-LC-MS-MS	0,4
Diclofenaco	15307-86-5	239-348-5	SPE-LC-MS-MS	10
2,6-di- <i>tert</i> -Butil-4-metilfenol	128-37-0	204-881-4	SPE-GC-MS	3 160
4-Metoxicinamato de 2-etilhexilo	5466-77-3	226-775-7	SPE-LC-MS-MS o GC-MS	6 000

d. Métodos de análisis

i. Técnicas de preparación de muestra

Para poder extraer los ftalatos de las matrices acuosas, hay que hacer una etapa previa de preparación de muestra, obteniendo los analitos concentrados y separados de otros compuestos que interfieran en su determinación.

Para la extracción de los ftalatos, BHT y 2EH4MC, se utilizan diferentes técnicas de preparación de la muestra: extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME), microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME), extracción líquido-líquido (LLE) y extracción por absorción con barras agitadoras (SBSE).

o Extracción en fase sólida

Es una técnica de preparación y tratamiento de muestras basada en la retención selectiva de los analitos sobre un adsorbente apropiado y su posterior elución (Cela, Lorenzo, & Casais, 2002). En su sentido más amplio, la SPE tiene dos opciones complementarias de extracción y limpieza:

- Extracción y concentración selectivas de los analitos objetivos desde una matriz líquida hasta una fase sólida adecuada que no absorba las interferencias de la matriz,

seguida de la elución de los analitos con un disolvente más fuerte. Esta estrategia, se elige generalmente cuando los analitos de interés están presentes en niveles bajos o cuando los analitos tienen polaridades de difracción amplias, proporcionando un medio eficaz de enriquecimiento de los analitos presentes en concentraciones muy bajas (Boyd , Basic, & Bethem, 2008).

- Elución selectiva de los analitos a través de la fase sólida, produciéndose una fuerte retención de impurezas en la fase sólida. Esto ocurre cuando los analitos se encuentran en concentraciones relativamente altas (Boyd , Basic, & Bethem, 2008).

Cuando la muestra es compleja, se utiliza una combinación de las dos estrategias de la SPE (Boyd , Basic, & Bethem, 2008). Por esto, la SPE permite la concentración y purificación de analitos (Camel, 2003). Las etapas necesarias para llevar a cabo la extracción en fase sólida son:

- Acondicionamiento del cartucho con los disolventes más afines a la muestra, produciendo la activación del adsorbente y de los grupos funcionales (Serna, 2011).
- Paso de la muestra por el cartucho (carga de muestra).
- Lavado del cartucho con el disolvente o la mezcla de estos apropiada.
- Secado en nitrógeno para evitar problemas de disolventes.
- Elución de los compuestos de interés.
- Concentración. Se concentran los compuestos de interés evaporando para ello parte del disolvente (Cela, Lorenzo, & Casais, 2002).

La SPE proporciona extractos limpios, reduce el uso de disolventes, los costes de disposición y el tiempo de extracción para la preparación de la muestra (Camel, 2003).

En la bibliografía podemos ver que la SPE es una buena opción para la determinación de ftalatos, BHT y filtros UV. Garrido y colaboradores emplearon la SPE para la extracción del DEHP en muestras ambientales, obteniendo buenos resultados para los cartuchos Oasis HLB con recuperaciones del 89% (Garrido, Barco, López, Martínez, & Romero-González, 2009). Fries y colaboradores utilizaron la SPE para la determinación de BHT en muestras de agua continentales obteniendo recuperaciones satisfactorias entorno al 80% (Fries & Püttmann, 2002). Por su parte, Capriotti y colaboradores utilizaron la SPE para la extracción de filtros UV de muestras de agua de grifo y lagos empleando grafito como material adsorbente (Capriotti, y otros, 2014).

○ Microextracción en fase sólida

Es una técnica de preparación de muestra desarrollada por Belardi y Pawliszyn en 1989 (Cámara, Fernández, Martín-Esteban, Pérez-Conde, & Vidal, 2002) (Pawliszyn, 1997). Es un método de preparación de muestras muy simple y eficaz, que no requiere disolventes. La SPME se ha utilizado ampliamente en diferentes campos de la química analítica desde sus primeras aplicaciones en el análisis medioambiental y alimentario (Boyd , Basic, & Bethem, 2008). Se basa en la utilización de una fibra de sílice fundida recubierta de una fase adsorbente de naturaleza polimérica (Boyd , Basic, & Bethem, 2008) . Los analitos presentes en la muestra no se extraen cuantitativamente en la fibra, sino que se establece un equilibrio entre las fases existentes en el vial en el que se lleva a cabo el proceso de extracción (Cela, Lorenzo, & Casais, 2002). Esta técnica de preparación de muestra no necesita disolventes orgánicos y requiere una manipulación mínima de la muestra, a diferencia de la SPE que sí necesita disolventes orgánicos y una mayor manipulación de la muestra.

El proceso de SPME se desarrolla en dos etapas:

- 1ª Etapa de extracción, se expone la fibra a la muestra contenida en un vial sellado para que se produzca la migración de los analitos de la muestra hasta la fibra durante un tiempo dado.
- 2ª Etapa de desorción de la fibra de SPME, se introduce la fibra en el inyector de un sistema analítico (cromatógrafo de líquidos o gases) donde los analitos son desorbidos térmicamente o por disolución en la fase móvil (Cela, Lorenzo, & Casais, 2002).

El muestreo se puede llevar a cabo de tres modos diferentes, según las características de los analitos y de la muestra, por extracción directa o por inmersión, por extracción en espacio de cabeza o por microextracción en fase sólida indirecta o a través de una membrana (Cela, Lorenzo, & Casais, 2002).

En la bibliografía podemos ver que la SPME es una técnica empleada para determinar los compuestos de interés. Según Psillakis y colaboradores la SPME es una técnica adecuada para la extracción de los ftalatos en muestras de agua (Psillakis & Kalogerakis, 2003). Tombesi & Freije realizaron un estudio acerca del BHT en aguas potables, agua mineral y embotellada, utilizando SPME llegando a la conclusión de que este compuesto está

presente en un total de 15 marcas comerciales (Tombesi & Freije, 2002). Ma y colaboradores utilizaron la SPME para determinar 2EH4MC en aguas ambientales obteniendo unas recuperaciones entre 86% y 113% (Ma, Wang, Zhen, Zhang , & Du, 2017).

- Microextracción líquido-líquido dispersiva

Fue introducida por Assadi y colaboradores (Assadi, y otros, 2006). Es una técnica basada en disolventes ternarios, utilizando una mezcla de un disolvente de alta densidad (extractante) y un disolvente polar, miscible en agua (dispersante). La mezcla apropiada de disolventes de extracción y dispersante se inyecta rápidamente en la muestra acuosa que contiene los analitos. Se produce una gran turbidez de la mezcla ternaria, debido fundamentalmente a la formación de gotas muy finas, dispersas a través de la muestra acuosa. El área superficial entre el disolvente de extracción y la muestra es muy elevada, por lo que el estado de equilibrio se alcanza rápidamente, en consecuencia, el tiempo de extracción es muy corto. Los analitos de interés se concentran desde la muestra acuosa, en el pequeño volumen de disolvente de extracción, por lo tanto, en una única etapa se produce la extracción y concentración de los mismos (Assadi, y otros, 2006).

Se trata de una técnica de microextracción que ofrece importantes ventajas respecto a los métodos de extracción convencionales ya que permite llevar a cabo la preparación de la muestra de una manera rápida y simple, con bajo coste, sin grandes cantidades de disolventes orgánicos y con posibilidad de combinarla con la mayoría de los métodos analíticos (Pena S., 2010) (Boyd , Basic, & Bethem, 2008).

Se observa en la bibliografía consultada, que la DLLME es una técnica que ofrece grandes ventajas para la determinación de los compuestos de interés. Martín y colaboradores determinaron los ftalatos por la DLLME en aguas de grifo y aguas residuales, obteniendo unas recuperaciones entre 57-80% UV (Martín, Camacho-Muñoz, Santos, Aparicio, & Alonso, 2013). Para determinar el BHT mediante DLLME Biparva y colaboradores desarrollaron un método donde obtuvieron unas recuperaciones entorno al 100% en diferentes muestras de zumos (Biparva, Ehsani, & Hadjmohammadi, 2012).. En el estudio que llevaron a cabo Tarazona y su grupo de investigación, determinaron filtros UV para muestras de agua de mar, obteniendo buenas repetibilidades (6%) (Tarazona, Chisvert, León, & Salvador, 2010).

- Extracción líquido-líquido

Se basa en la transferencia de los analitos desde la muestra acuosa hacia un disolvente inmisible en agua y se emplea habitualmente en la preparación de muestras acuosas (Pena S., 2010).

La extracción se realiza en un embudo, donde se mezcla la muestra acuosa con un disolvente orgánico, posteriormente la fase orgánica se seca y se concentra para así obtener mayor sensibilidad y poder inyectar el extracto o en el cromatógrafo de líquidos o de gases.

La LLE presenta ciertos inconvenientes, ya que es una técnica lenta y laboriosa, tiene un elevado consumo de disolventes, se pueden formar emulsiones o la necesidad de etapas adicionales de evaporación de disolvente (Boyd , Basic, & Bethem, 2008).

La LLE no es una buena opción para la determinación de ftalatos, BHT y filtros UV, ya que genera más problemas de blancos que las otras técnicas descritas anteriormente. En el caso de los ftalatos según Kanchanamayoon se obtienen mejores resultados con la SPE que con LLE, ya que los LOQ son en torno a 1 mg L^{-1} para la SPE y de 7 mg L^{-1} para la LLE, por lo tanto, es una técnica menos selectiva, aunque las recuperaciones y la precisión son parecidas para las dos técnicas (Kanchanamayoon, Prapatpong, Chumwangwapee, & Chaithongrat, 2012).

- Extracción por absorción con barras agitadora

Esta técnica fue introducida por Baltussen y colaboradores (Baltussen, Sandra, David, & Cramers, 1999) en 1999, fue desarrollada para solucionar los problemas de la SPME como los largos tiempos de extracción (Boyd , Basic, & Bethem, 2008). La fase de absorción está recubierta en la envoltura de vidrio de una barra de agitación magnética con volúmenes que son 50-250 veces mayores que los de una fibra SPME típica, proporcionando una mayor sensibilidad (Boyd , Basic, & Bethem, 2008). La barra agitadora que está recubierta de un polímero, se pone en contacto con la muestra que contiene los analitos de interés, bien por inmersión directa o mediante muestra en espacio de cabeza y se agita bajo condiciones controladas (Prieto, y otros, 2010). Después de la etapa de extracción, la barra agitadora se retira, y se enjuaga con agua destilada para eliminar otros componentes de la muestra, se seca con un papel limpio para eliminar el agua y pasar a la etapa de desorción. La etapa de lavado no origina una pérdida de analitos,

ya que están adsorbidos por la fase polimérica (Prieto, y otros, 2010) (Kawaguchi, y otros, 2006).

En la bibliografía podemos observar que es una buena técnica para la determinación de los compuestos de interés. Tan y colaboradores, han determinado los ftalatos en muestras de agua y sólidos utilizando SBSE como técnica de extracción, obteniendo LOQ del orden de 5.0 ng L^{-1} y 0.06 ng g^{-1} para muestras de agua y sólidas, respectivamente (Tan, Hawker, Müller, Tremblay, & Chapman, 2008). Cacho y colaboradores han determinado BHT en muestras de bebidas sin alcohol obteniendo LOQ de entre 0.11 y 0.15 ng mL^{-1} , con recuperaciones entre el 80 y 117% (Cacho, Campillo, Viñas, & Hernández-Córdoba, 2015). Para la determinación de filtros UV en muestras de agua, Rodil y Moeder desarrollaron un método basado en SBSE, obteniendo una reproducibilidad menor de 16%, con LOD entre 0.2 y 63 ng L^{-1} (Rodil & Moeder, 2008).

ii. Determinación

Debido a que en la actualidad existen muchos compuestos contaminantes químicos, se necesitan identificar y estudiar sus efectos toxicológicos, por lo que se desarrollan nuevas metodologías analíticas para determinar y cuantificar los contaminantes en diferentes tipos de muestras. Para determinar los contaminantes químicos, se han elegido con más frecuencia las técnicas cromatográficas, tanto la cromatografía de líquidos (LC o de alta eficacia HPLC), como la cromatografía de gases (GC) (Pérez F., 2013).

Actualmente la cromatografía de líquidos se está empleando con mayor frecuencia para determinar ciertos contaminantes con baja volatilidad, reduciendo así problemas de blancos.

La cromatografía de líquidos se basa en la distribución de los analitos entre una fase estacionaria y una fase móvil líquida (Canosa R., 2008). Es una técnica ampliamente utilizada para metabolitos de ftalatos sin derivatizar o para la determinación de mezclas isoméricas (De Orsi, y otros, 2006). La detección mediante espectroscopia ultravioleta-visible se ha empleado para determinar ftalatos en muestras medioambientales y biológicas (Jara, Lysebo, Greibrokk, & Lundanes, 2000) (Cai, Jiang, & Liu, 2003) (Cai Y. , Jiang, Liu, & Zhou, 2003) (Li, Cai, Shi, Mou, & Jiang, 2008) , pero el uso de la espectrometría de masas se ha incrementado en los últimos años, tanto la espectrometría

simple, como la espectrometría de masas en tándem (Kato , Yamauchi, & Nakazawa, 2003) (Kato, y otros, 2003) (Rie, y otros, 2005) (Calafat, Slakman, Silva, Herbert, & Needham, 2004) con diferentes matrices de muestras.

La separación de los ftalatos mediante LC se suele realizar en fase inversa usando C18 (Mortensen , Main, Andersson, Leffers, & Skakkebaek, 2005) o C8 (Wu, y otros, 2008), aunque también se podrían utilizar otras columnas como, por ejemplo, las columnas fenil (Preuss, Koch, & Angerer, 2005) o poliestireno (Jara, Lysebo, Greibrokk, & Lundanes, 2000) según podemos ver en la bibliografía.

La cromatografía de líquidos ofrece grandes ventajas comparado con la cromatografía de gases, como por ejemplo, una alta selectividad, buenas cuantificaciones de las mezclas isoméricas y cortos tiempos de análisis.

La GC es una técnica de separación basada en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte. La muestra se volatiliza, se inyecta en la columna cromatográfica donde se encuentra la fase estacionaria y los analitos volatilizados se eluyen debido a que el gas inerte actúa como flujo de la fase móvil, este gas no interacciona con los analitos, sino que los arrastra hacia el detector, separándose entre sí según las afinidades de los mismos hacia la fase estacionaria (Pérez F., 2013).

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS), se basa en una configuración donde se combina más de un analizador de masas, pudiendo ser del mismo o de distinto tipo. En este tipo de espectrometría se aísla en el primer analizador el ion precursor (ion padre), después este ion pasa a una celda de colisión que contiene moléculas del gas inerte (He, N₂ o Ar), donde se fracciona y se forman los iones producto (iones hijos). Los iones producto obtenidos son los que se separan del segundo analizador y después se detectan, generando así el espectro MS² (Pérez F., 2013).

La espectrometría de masas en tándem proporciona:

- Mayor información estructural de los analitos, debido a la obtención del espectro de los iones producto.
- Incremento de la relación señal-ruido, eliminando posibles interferencias que pudiesen existir en el espectro de masas (Canosa R., 2008).

5. Parte experimental

a. Reactivos

- Disolventes: metanol y acetato de etilo, grado gradiente HPLC o similar.
- Ácido clorhídrico 37% PA.
- Óxido de aluminio 60, activo, básico (grado actividad I), tamaño de partícula 0.063-0.2mm (70-230 mesh).
- Patrones comerciales:
 - Individuales líquidos: dimetil ftalato, dietil ftalato, dibutil ftalato, bencilbutil ftalato, dioctil ftalato, dietilhexil ftalato, dietilhexil ftalato D₄ (DEHP D₄), 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo, etiltrans-cinamato D₅(fenil D₅) (cinamato D₅), dietil ftalato 3,4,5,6,-D₄ (DEP D₄) y dibutil ftalato 3,4,5,6-D₄ (DBP D₄).
 - Individuales sólidos: 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol, 2,6-di-(terc-butyl-D₉)-4-metilfenol-3,5-D₂-OD (BHT D₁₂), dimetil-D₆ ftalato (DMP D₆), di-n-octil ftalato-3,4,5,6-D₄ (DOP D₄), dihexil ftalato D₄ (DHP D₄), 2,4,6-tri-terc-butilfenol (2,4,6-TTBP) y benzofenona carbonil ¹³C.

b. Material

- Material de vidrio: vasos de precipitados, matraces aforados, probetas, etc.
- Pipetas automáticas variables de 10-100 µL, 100-1000 µL y de 1-5 mL.
- Matraces erlenmeyer de vidrio ámbar de 250 mL con tapón de rosca y septum recubiertos de politetrafluoroetileno (PTFE).
- Medidor de pH GLP 21 (Crison).
- Balanza analítica SARTORIUS CP225D (máx.220g)
- Bomba de vacío.
- Sistema de vacío múltiple Visiprep (Supelco).
- Cartuchos Oasis HLB 1cc (10mg) (Waters).
- Viales ámbar (2 mL) con cápsulas de aluminio y septa recubiertos de PTFE.
- Papel de aluminio.
- Cromatógrafo de gases 7890A (Agilent) acoplado a un detector de espectrometría de masas triple cuadrupolo MS Triple Quad 7000 (Agilent).

- Nitrógeno y Helio 99.9999%.
- Columna cromatográfica Agilent J&W HP-5MS, de dimensiones 30m x 0.25mm de diámetro interno, 0.25 µm de espesor de fase ((5%-fenil)-metilpolisiloxano).
- Software de adquisición y procesado de datos Agilent MassHunter.

c. Lavado del material

Debido a los problemas de blancos analíticos a los que están asociados los ftalatos, el BHT y el 2EH4MC es necesario extremar precauciones para la preparación de muestras. Por tanto, se ha establecido un protocolo de limpieza del material reutilizable que es necesario realizar cada vez que preparemos muestras, patrones o los niveles de calibración. Esta limpieza consiste en sucesivos lavados con agua de grifo y jabón libre de fosfatos. Después, el material se enjuaga varias veces con agua de grifo, agua mili-Q y metanol. Una vez que está enjuagado se guarda en el armario para evitar la adsorción de los compuestos desde el aire ambiente. Previo a la preparación de las muestras debe lavarse el material con acetona, acetato de etilo (conservado en óxido de aluminio) y hexano (conservado en óxido de aluminio) minimizando así los problemas de blancos.

El material empleado es de uso exclusivo para esta técnica, y durante la realización de la preparación de la muestra se debe evitar el uso del material de plástico.

d. Preparación de patrones

Las disoluciones estándar se preparan por pesada en balanza analítica, a partir de los patrones comerciales en metanol y acetato de etilo.

Se preparan mezclas de los compuestos de 10 µg mL⁻¹ que se usan para preparar los distintos niveles de calibración.

Las disoluciones preparadas tanto las individuales como las mezclas de ftalatos, BHT y 2EH4MC se conservan refrigeradas en ausencia de luz por un periodo máximo de un año.

Para la recta de calibrado, se preparan los patrones mediante adiciones sobre 200 mL de un agua matriz libre los analitos (pH 2.5), añadiendo un volumen determinado de la

mezcla de los estándares internos y de los subrogados internos, oscilando las concentraciones entre 1-30 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Se establecen dos rangos de calibración diferentes, que se utilizarán en función de las concentraciones de las muestras:

- Rango Bajo: 1-10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (P1-P6)
- Rango Alto: 10-30 $\mu\text{g L}^{-1}$ (P6-P11)

e. Método de análisis

i. Método de preparación de muestra

La preparación de las muestras para su análisis se lleva a cabo mediante SPE. Para llevar a cabo la extracción y la concentración de los analitos de interés, se utilizan cartuchos **Oasis HLB 1cc (10mg)** (Waters). Las etapas de la extracción en fase sólida son:

- Acondicionamiento del cartucho: se acondiciona el cartucho con 1 mL de acetato de etilo, 1 mL de metanol y 2 mL de agua matriz (libre de analitos de interés y pH 2.5) con ayuda de un sistema de vacío múltiple Visiprep (Supelco).
- Carga la muestra: la muestra (200 mL, pH 2.5 ajustado con HCl al 50%) se pasa a través del cartucho con ayuda de una bomba de vacío.
- Etapas de lavado: una vez que se ha cargado toda la muestra, el cartucho se lava con 3 mL de agua matriz (pH 2.5).
- Secado del cartucho: el cartucho se seca en el Visiprep con ayuda de la bomba de vacío durante 10-15 minutos. El tiempo de secado debe controlarse para minimizar problemas de blancos.
- Elución: la elución de los compuestos de interés se llevan a cabo con 1 mL de acetato de etilo.

Es muy importante que el cartucho no se seque en ninguna de las etapas previas a la etapa del secado de cartucho.

El extracto resultante de 1 mL se inyecta en el cromatógrafo de gases (GC-MS/MS).

ii. Método de determinación GC-MS/MS

La determinación de los compuestos de interés se lleva a cabo mediante una técnica altamente sensible y selectiva como es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem.

○ **Columna**

La columna cromatográfica es de Agilent J&W HP-5MS, de dimensiones 30m x 0.25mm de diámetro interno, 0.25µm de espesor de fase ((5% -fenil)-metilpolisiloxano).

○ **Inyector automático**

El volumen de inyección es de 1 µL.

Se utilizan dos disolventes de lavado entre cada inyección, ciclohexano conservado en óxido de aluminio en el vial de limpieza y acetato de etilo. Para minimizar los problemas de blancos instrumentales, se establecen seis etapas de lavado previas a la inyección de la muestra con cada disolvente, y seis etapas de lavado posteriores a la inyección, con cada disolvente de lavado.

○ **Inyector**

La temperatura del inyector es 280 °C y el modo de inyección es Splitless.

Se utiliza un programa de temperaturas en el inyector con el fin de reducir los problemas de blancos instrumentales. Una vez finalizado el tiempo de análisis de los compuestos de interés (28minutos) se incrementa la temperatura mediante una rampa de 40°C/min y se mantiene a 320°C durante 11 minutos.

○ **Horno**

Utiliza un programa de temperaturas: isoterma inicial a 50°C durante 2 minutos, rampa de 20°C/min hasta una temperatura de 190°C, rampa de 5°C hasta una temperatura de 270°C e isoterma a 270° durante 5 minutos; rampa de 20°C/min hasta una temperatura final de 320°C, e isoterma durante 7.5 minutos. El tiempo total de análisis es de 40 minutos.

○ **Línea de transferencia**

La temperatura de la línea de transferencia es de 320°C.

○ **Triple Cuadrupolo**

En la siguiente tabla se recoge la información de los iones precursores, iones producto y las condiciones de MS/MS del método cromatográfico.

En la tabla 5 se presentan las condiciones óptimas para el método de MS/MS.

Tabla 5. Transiciones utilizadas en el método de MS/MS para los compuestos estudiados.

Compuesto	Tiempo de retención (min) (Rt)	Ion Precursor	Ion Producto	Energía de colisión
DMP	8.914	165.8	78.0	20
		162.8	77	20
DEP	9.847	148.8	121.0	10
		148.8	93.0	15
DBP	13.231	148.8	121.1	10
		148.8	93.1	15
BBP	18.341	148.8	93.1	15
		148.8	65	20
DOP	23.668	148.8	121.1	10
		148.8	93.1	15
DEHP	21.093	148.8	121.0	10
		148.8	93.0	15
BHT	9.298	204.8	177.2	10
		204.8	57.1	15
2EH4MC	17.89	177.8	161.1	10
		177.8	132.1	10
DHP D₄	18.114	152.9	125.1	15
		152.9	97.1	15
2,4,6-TTBP	9.71	246.8	231.2	15
		246.8	57.1	15
Benzofenona carbonil ¹³C	9.962	105.9	77.0	15
		105.9	51.0	15
Cinamato D₅	8.972	135.9	108.1	15
		107.9	81.0	15
BHT D₁₂	9.204	240	222.2	15
		221.9	66.1	15
DMP D₆	8.634	165.8	138.1	10
		165.8	78.0	20
DOP D₄	23.777	152.8	125	10
		152.8	96.9	15
DBP D₄	13.058	152.9	125	10
		152.9	97	15
DEHP D₄	21.072	152.9	125.0	15
		152.9	97.1	20

6. Resultados y discusión

a. Optimización del método cromatográfico (GC-MS/MS)

Las condiciones del cromatógrafo de gases se obtuvieron del estudio publicado por Regueiro y colaboradores (Regueiro, Llompart, Garcia-Jares, Garcia-Monteaguado, & Cela, 2008), con ligeras modificaciones en el método.

En este estudio se han seleccionado seis ftalatos (DMP; DEP; DBP; BBP; DOP; DEHP), el BHT y el 2EH4MC, siete estándares internos (Cinamato D₅; BHT D₁₂; DMP D₆; DOP D₄; DBP D₄; DEHP D₄ y DEP D₄) y tres subrogados (DHP D₄; 2,4,6-TTBP; Benzofenona Carbonil ¹³C).

Para evaluar el patrón de fragmentación espectral de masas de cada compuesto y poder optimizar las condiciones del MS/MS, se analizó una disolución estándar de cada compuesto (1 µg mL⁻¹) mediante inyección directa en el cromatógrafo.

El barrido completo (Full Scan) se realizó de 50 a 500 m/z para todos los compuestos a estudiar, es decir, tanto para los analitos de interés como los estándares y subrogados internos, obteniendo de este modo el tiempo de retención y los iones precursores. En la figura 5 se muestra el espectro de masas del DMP obtenido en Full Scan (los espectros de masas de los demás compuestos se muestran en el Anexo I).

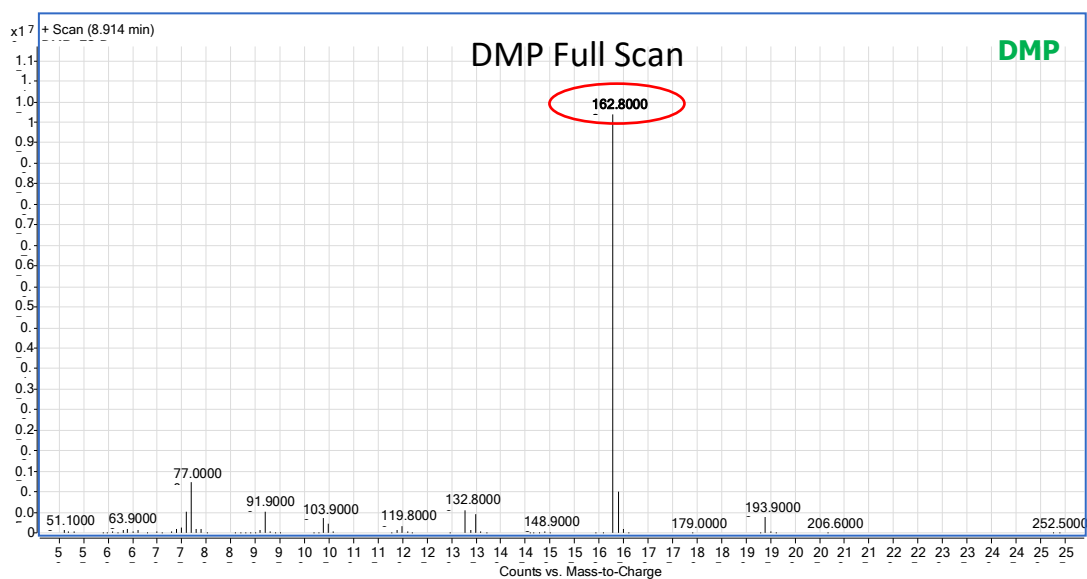


Figura 5. Espectro de masas del DMP obtenido en modo Full Scan.

En base al espectro de DMP obtenido en modo “Full Scan” obtenemos que el ion precursor es 162.80.

Una vez seleccionado el ion precursor, se determinan los iones productos mediante el modo “Product Ion”. En la siguiente figura se muestra el espectro de masas del DMP obtenido en el modo Product Ion (los espectros de masas de los demás compuestos se muestran en el Anexo I).

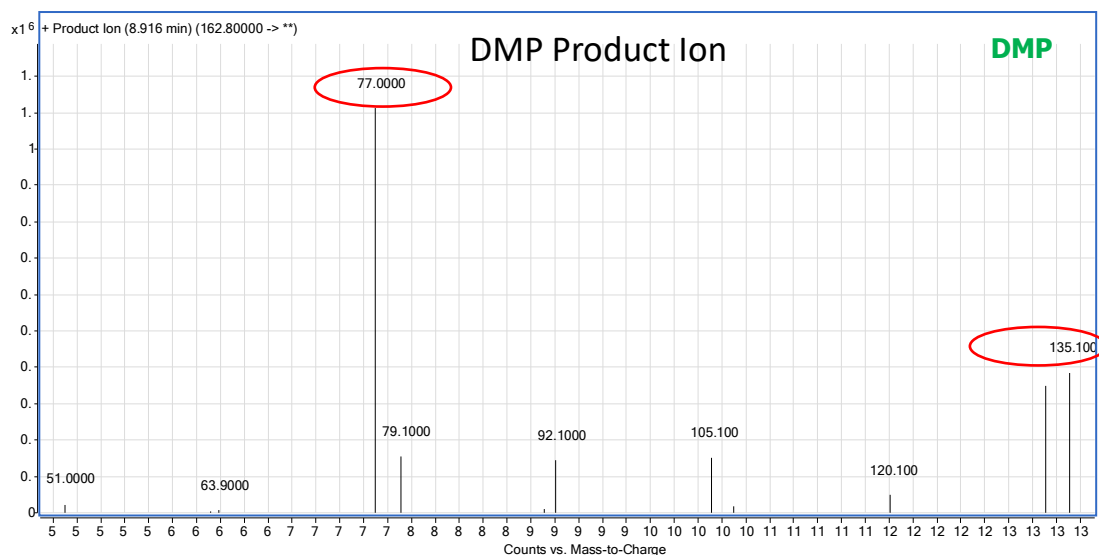


Figura 6. Espectro de masas del DMP obtenido en modo Product Ion.

Para el DMP obtenemos como ion producto m/z: 77.0; 135.1.

Una vez recopilados los iones precursores y los productos se optimizan las energías de colisión, utilizando el software Dynamic MRM Assistant (Agilent) y se crea el método Multiple Reaction Monitoring (MRM).

Los resultados obtenidos para estos compuestos están descritos en la tabla anterior (apartado 5.e.ii (Método de determinación GC-MS/MS)).

i. Blancos cromatográficos

En la bibliografía se encuentran una serie de recomendaciones y metodologías para minimizar los blancos instrumentales durante el análisis de este tipo de compuestos (Fankhauser-Noti & Grob, 2007) (Marega, Grob, Moret, & Conte, 2013). El gas portador puede purificarse instalando un filtro de carbón activo después del sistema de regulación. Otras fuentes de contaminación son los disolventes, el vial del inyector automático o el propio inyector. Por ejemplo el hexano comercial contiene DBP y DEHP en

concentraciones del orden de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Una posible solución para que no interfirieran estos compuestos en los ensayos es añadir óxido de aluminio en el recipiente del disolvente y agitarlo diariamente (Fankhauser-Noti & Grob, 2007). Otra fuente de contaminación de ftalatos está en el propio inyector del cromatógrafo, ya que una férula de granito nueva para sujetar el liner del inyector contra el cuerpo del inyector puede ser una importante contribución. Por otro lado, el liner en ningún caso debe sujetarse con los dedos sino con unas tenazas para evitar el contacto con los guantes. Para minimizar la contribución de la férula de grafito deben inyectarse varios disolventes hasta que la señal fondo disminuya. En el disolvente de limpieza del cromatógrafo debe añadirse el óxido de aluminio. La aguja de la jeringa también es una fuente de contaminación junto con los septum utilizados en los viales. Los septum pueden guardarse en un recipiente de vidrio que contenga hexano y óxido de aluminio (Fankhauser-Noti & Grob, 2007).

Teniendo en cuenta estas recomendaciones, se llevan a cabo una serie de pruebas que se detallan a continuación. Cabe mencionar que en todas las pruebas realizadas se añade óxido de aluminio a los disolventes de lavado de la aguja del inyector.

Una de las pruebas realizadas se centra en los disolventes de lavado de jeringa del inyector. Se inyecta un patrón y a continuación se realiza una inyección de acetato de etilo para evaluar la contaminación cruzada. Se observa que hay señal para todos los compuestos de interés, lo que indica que hay contaminación cruzada a pesar de incluir óxido de aluminio en el disolvente de lavado.

Por otro lado, se incrementaron el número de etapas de limpieza de la jeringa antes de inyectar la muestra, incluyendo una etapa adicional en el programa de temperaturas de horno con el fin de limpiar de una forma más eficaz la columna cromatográfica. Se evalúa la contaminación cruzada y se observa que el disolvente inyectado presenta señal para los compuestos de interés, aunque en este caso las respuestas son inferiores a las obtenidas en las pruebas anteriores. Los resultados indican que el lavado de la aguja del inyector y la etapa adicional en el programa de temperaturas reducen los blancos cromatográficos.

A continuación se sustituyeron el liner y el septum, por unos lavados previamente con hexano conservado en óxido de aluminio. Se inyectaron acetatos de etilo para comprobar la limpieza del equipo, observando que las respuestas disminuyen a medida que aumenta el número de inyecciones de disolventes. Se inyecta un patrón y después un acetato de etilo y se observa que sigue la problemática asociada a la contaminación cruzada.

Otro parámetro evaluado fue el número de etapas de limpieza de la jeringa antes y después de la inyección, añadiendo además una etapa adicional en el programa de temperaturas del horno. El disolvente inyectado tras el patrón presenta señales bajas para los compuestos de interés, lo que indica que se reduce la contaminación cruzada.

Finalmente, se incrementa la temperatura del programa del inyector y del horno a 320°C. Se inyecta un patrón y a continuación un ciclohexano. Las señales obtenidas son despreciables para todos los compuestos de interés, lo que indica que trabajando en estas condiciones se minimizan los problemas de contaminación cruzada. Las condiciones para cada prueba se recogen en el ANEXO II.

En las figuras 7 y 8 se muestran los cromatogramas obtenidos al principio del estudio y en las condiciones optimizadas respectivamente.

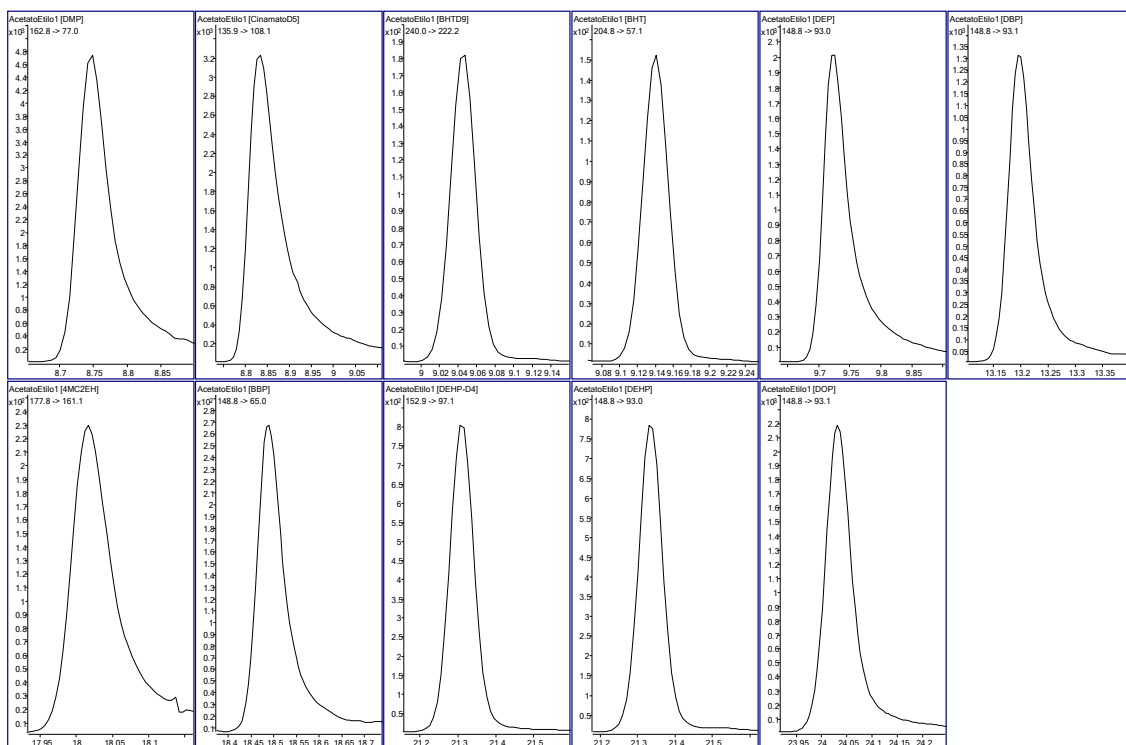


Figura 7. Cromatograma de un acetato de etilo obtenido mediante GC-MS/MS en las condiciones iniciales del método (prueba 1).

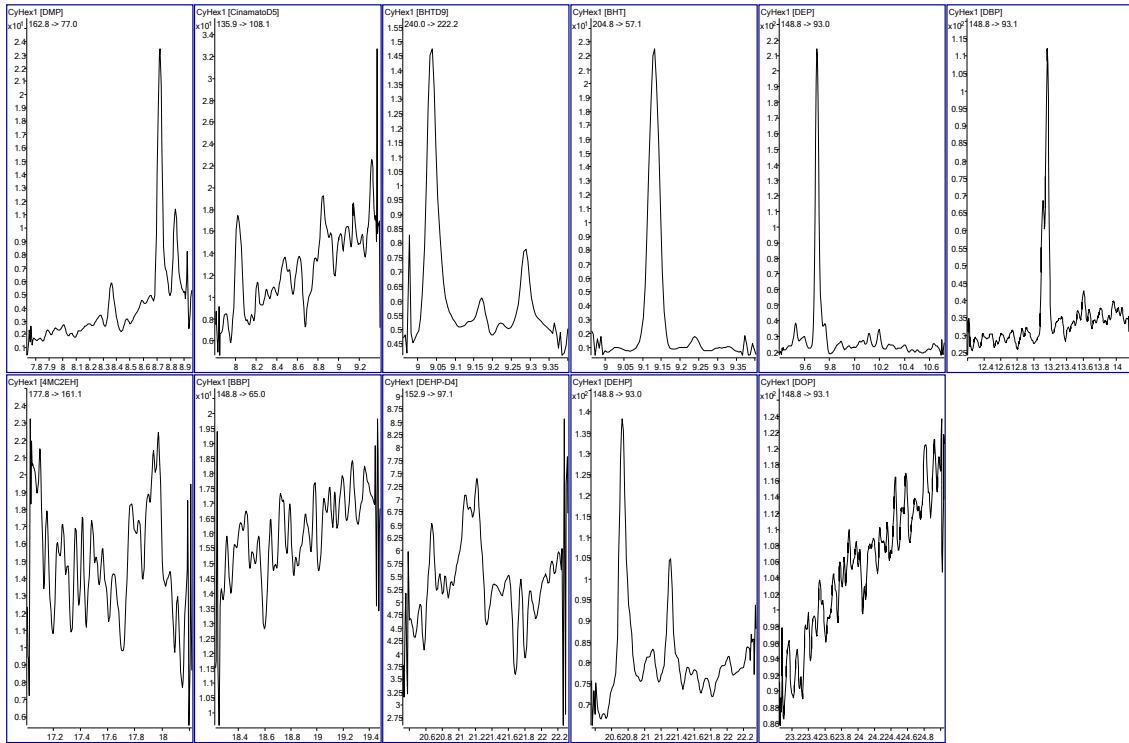


Figura 8. Cromatograma de un acetato de etilo obtenido mediante GC-MS/MS en las condiciones óptimas.

Por tanto, las condiciones óptimas para el método cromatográfico son las siguientes:

- **Disolventes de lavado de la aguja del inyector**

A: Ciclohexano (óxido de aluminio)

B: Acetato de etilo

- **Inyector automático**

Etapas de limpieza de la aguja del inyector

	Pre-inyección	Post-inyección
Lavado con disolvente A	6	6
Lavado con disolvente B	6	6
Lavado con la muestra	1	
Bombeo con la muestra	6	

Programas de temperaturas del inyector: 280°C (28min), 40°C/min 320°C (11 min)

- **Programa de temperaturas del horno**

50°C (2 min), 20°C/min 190 °C, 5°C/min 270 °C (5 min), 20°C/min 320 °C (7.5 min)

- **Línea de transferencia**

Temperatura de la línea de transferencia: 320°C

- **Disolvente de lavado del sistema**

Ciclohexano conservado en óxido de aluminio al menos 24 horas.

b. Optimización del método de preparación de muestra

Las condiciones para la preparación de la muestra se han obtenido del estudio de Rodil y colaboradores (Rodil, Quintana, Basaglia, Pietrogrande, & Cela, 2010). Este estudio fue diseñado para la obtención de determinados antioxidantes, entre ellos BHT y otros metabolitos en muestras de agua.

La preparación de muestra se basa en SPE utilizando un sistema de vacío múltiple Visiprep (Supelco) y cartuchos Oasis HLB 1 cc (10 mg) de Waters.

Se utiliza un volumen de muestra de 200 mL, ajustando el pH del agua a pH 2.5 añadiendo un volumen fijo para los estándares internos y para los subrogados internos de concentración de $10\mu\text{g L}^{-1}$. Los cartuchos Oasis HLB se acondicionan con 1 mL de acetato de etilo, 1 mL de metanol y 2 mL de agua libre de los analitos de interés (pH 2.5). A continuación, se carga la muestra en el cartucho y se lavan con 3 mL de agua libre de analitos (pH 2.5), posteriormente los cartuchos se secan en el Visiprep durante 15 minutos. Por último, se realiza la elución de los analitos con 1 mL de acetato de etilo, que se inyecta en el cromatógrafo de gases.

i. Blancos analíticos

Una vez solucionados los problemas de blancos instrumentales, se evaluó el proceso analítico completo. Se realizaron una serie de blancos analíticos en días diferentes, y varias réplicas de muestras con adición a distintos niveles de concentración. Tal y como

se observa en la tabla 6 los resultados obtenidos para los blancos realizados son poco reproducibles. Además si se comparan con las respuestas obtenidas para los niveles de concentración bajos se observa que los resultados son insatisfactorios.

Las respuestas obtenidas en los blancos son similares para algunos compuestos, como por ejemplo el DEHP, a las obtenidas en los patrones de 1 y 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla 6. Respuestas obtenidas en los blancos analíticos comparadas con los patrones bajos del calibrado.

	AREAS					
	Blancos analíticos				Patrones calibrado	
	Día 1		Día 2		$C_{\text{Muestra}} (\mu\text{g L}^{-1})$	
	R1	R2	R1	R2	1	2.5
4MC2EH	82.9	21.1	209.4	121.3	5653.2	19223.1
BBP	679.9	131.4	81.0	101.6	12982.1	44234.5
BHT	112908.0	117168.6	332015.7	583295.8	193372.5	210576.5
DBP	163313.2	5275.2	1334.5	1240.3	52115.8	258176.7
DEHP	58752.6	33941.4	39623.6	23672.0	39121.1	73222.2
DEP	32239.4	12097.5	8153.2	3566.1	87250.0	224856.1
DMP	2081.7	1932.8	1697.7	1222.1	180121.7	465278.0
DOP	82.9	59.3	35.6	20.6	4912.1	13066.9

En la bibliografía se encuentran una serie de recomendaciones y metodologías para minimizar los blancos analíticos siguiendo un protocolo de limpieza, (Fankhauser-Noti & Grob, 2007) (Marega, Grob, Moret, & Conte, 2013). Para minimizar los problemas de blancos, el material se debería introducir en una mufla a 400°C durante toda una noche, pero este sistema es poco operativo a nivel de trabajo en rutina empresarial.

Se llevaron a cabo una serie de pruebas con disolventes de lavado para minimizar los blancos analíticos.

En primer lugar, se limpia el material con agua, jabón libre de fosfatos, agua MiliQ y metanol. Este material se guarda en un armario hasta su utilización, y será un material exclusivo para esta técnica.

Cuando se lleva a cabo la preparación de muestras, el material se enjuaga con acetona, acetato de etilo conservado en óxido de aluminio al menos 24 horas y en hexano conservado también en óxido de aluminio (24horas).

Limpiando el material en estas condiciones, sin necesidad de poner el material en la mufla durante toda la noche, se obtienen blancos reproducibles.

Los blancos analíticos obtenidos presentan respuestas inferiores al 30% de las respuestas obtenidas en el rango bajo de concentración ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) en todos los casos.

c. Evaluación del método analítico

i. Efectos de matriz

La naturaleza de la matriz acuosa puede afectar al rendimiento del método analítico, ya que la presencia de otras sustancias procedentes de la muestra (ácidos húmicos, macromoléculas, etc) puede afectar a la eficacia de la extracción en SPE, así como a la señal obtenida mediante GC-MS/MS.

Los efectos de matriz pueden manifestarse en forma de interferencias causadas por componentes de la muestra que coeluyen y presentan iones similares a los analitos de interés. Este tipo de efecto matriz puede conducir a falsos positivos o negativos, y se puede resolver utilizando transiciones de MRM diferentes, etapas de limpieza exhaustivas o mejorando la separación cromatográfica. Por otro lado, pueden originar un fenómeno de incremento o supresión de la señal, si esta se compara con un patrón puro.

En el caso de la determinación mediante GC-MS/MS, puede producirse el incremento o disminución de la señal (respecto a un patrón puro), especialmente cuando se determina un número elevado de analitos, con diferentes propiedades físico-químicas en un mismo análisis. Esto se debe principalmente a que las condiciones de selectividad de la etapa de preparación de muestra se reducen con el fin de obtener buenas recuperaciones para la totalidad de los compuestos analizados, de modo que algunos residuos de la matriz inevitablemente coeluyen con los analitos de interés (Hajšlová & Čajka, Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Chapter 12, 2007) . Si el objetivo está en determinación a niveles traza de los compuestos de interés, pueden surgir varias dificultades como cuantificación inexacta, disminución de la robustez del método,

incremento de los límites de cuantificación, incluso falsos positivos (Hajšlová & Zrostlíková, 2003).

El incremento de la respuesta cromatográfica (GC-MS) causada por el efecto matriz fue descrito por primera vez por Erney y colaboradores (Erney, Gillespie, Dilvydis, & Poole, 1993). Se trata de uno de los efectos matriz más discutidos, que afecta negativamente a la exactitud de la cuantificación, particularmente para los analitos más polares. Durante la inyección de los patrones puros preparados en disolvente (calibración), los analitos son susceptibles a adsorberse en los sitios activos presentes en el portal de inyección y en la columna cromatográfica, por lo que, el número de moléculas que alcanza el detector es menor que el número de moléculas inyectadas originalmente. En el caso de una muestra real no ocurre exactamente lo mismo, puesto que los componentes de la matriz que se coextraen con los compuestos de interés, pueden bloquear los sitios activos del sistema cromatográfico, reduciendo las pérdidas de los analitos, por lo que puede verse incrementada la señal, obteniendo recuperaciones muy superiores al 100%.

Por otro lado, la inyección repetida (análisis rutinarios) de componentes no volátiles de la matriz, que se depositan gradualmente en el inyector del GC y en la parte inicial de la columna cromatográfica (inyección a altas temperaturas sin división de flujo), pueden incrementar sucesivamente el número de sitios activos, que podrían ser responsables del efecto de supresión inducida por la matriz de la muestra (Royal Society of Chemistry, 2000). La disminución gradual de la respuesta del analito asociada con este fenómeno, junto con la distorsión de la forma de pico, producen un impacto negativo en la robustez del método analítico (Maštovská, Lehotay, & Hajšlová, 2004).

Los efectos de matriz a nivel instrumental, se determinan utilizando la siguiente ecuación:

$$ME (\%) = \frac{A_{se} - A_{be}}{A_s} \times 100$$

donde A_{se} y A_{be} son las repuestas obtenidas para extractos de una misma muestra de agua continental con adición (A_{se}) y sin adición (A_{be}). La concentración adicionada sobre el extracto resultante de la SPE fue de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ y se lleva a 1 mL de acetato de etilo. A_s es la respuesta obtenida para una disolución patrón de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada en acetato de etilo.

Si el ME (%) sale entorno al 100% indica la ausencia de efectos de matriz, y que no se produce un incremento ni una disminución de la señal de los extractos frente a la

disolución de patrón. Los resultados obtenidos para 200 mL del extracto de agua continental al que se le han adicionado los compuestos al nivel de concentración de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (POST-SPE) se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 7. Efectos de matriz a nivel instrumental.

Analito	ME (%)
BBP	110.2
DEP	158.6
DEHP	102.9
DBP	119.6
DOP	116.4
DMP	119.7
4MC2EH	119.0
BHT	175.6

En la tabla 7 podemos observar que el DEP y el BHT presentan un efecto matriz muy elevado, esto indica un incremento de la respuesta cromatográfica originada por la matriz de la muestra.

Por otro lado se evaluaron las recuperaciones en la SPE comparando las respuestas cuando la adición se realiza sobre el agua (PRE-SPE) y cuando se adiciona sobre el extracto (POST-SPE), obteniendo estos resultados:

Tabla 8. Efectos de matriz a nivel de la extracción.

Analito	Recuperación (%) -SPE
BBP	84.5
DEP	43.1
DEHP	30.7
DBP	69.4
DOP	46.6
DMP	78.8
4MC2EH	51.0
BHT	20.3

Observando las recuperaciones de algunos compuestos como el 2EH4MC o el BHT, podemos afirmar que necesitamos utilizar estándares internos para corregir estos resultados.

Por último, comparamos las respuestas de los compuestos del patrón antes de la SPE (se adiciona el patrón a la muestra y se pasan por el cartucho hasta su posterior elución de 1 mL) con las respuestas de un patrón preparado en acetato de etilo, obteniendo los efectos matriz del proceso analítico y se recogen los datos en la siguiente tabla:

Tabla 9. Efectos de matriz a nivel del procedimiento analítico.

Analito	ME (%) -SPE+GC-MS/MS
BBP	93.0
DEP	112.4
DEHP	40.7
DBP	94.7
DOP	54.2
DMP	96.5
4MC2EH	60.8
BHT	53.8

El control de los sitios activos del sistema GC es difícilmente viable, no solamente debido a que comercialmente no existen materiales inertes que sean estables durante un largo periodo de tiempo de exposición a elevadas temperaturas del inyector, sino también debido a la imposibilidad de controlar la formación de nuevos sitios activos debido a la inyección repetida de componentes no volátiles de la matriz que acaban depositándose en el inyector. Aun así, hay varias posibilidades que permiten mejorar la calidad del análisis (Hajšlová & Čajka, 2007), como por ejemplo la selección del método de calibración más adecuado, o la optimización de los parámetros de la inyección y separación (técnica de inyección adecuada, temperatura y volumen de inyección, tamaño y diseño del liner, velocidad del flujo de la columna, dimensiones de la columna, etc).

Existen diferentes estrategias para que la calibración compense los efectos matriz producidos en el sistema, como por ejemplo, el uso de compuestos marcados isotópicamente como estándares internos. Otras alternativas son llevar a cabo la calibración mediante el método de adición estándar, calibración con ajuste matricial

(matriz-matched standards), o enmascaramiento de los sitios activos del sistema utilizando agentes enmascarantes (masking agents) (Erney, Pawlowski, & Poole, 1997).

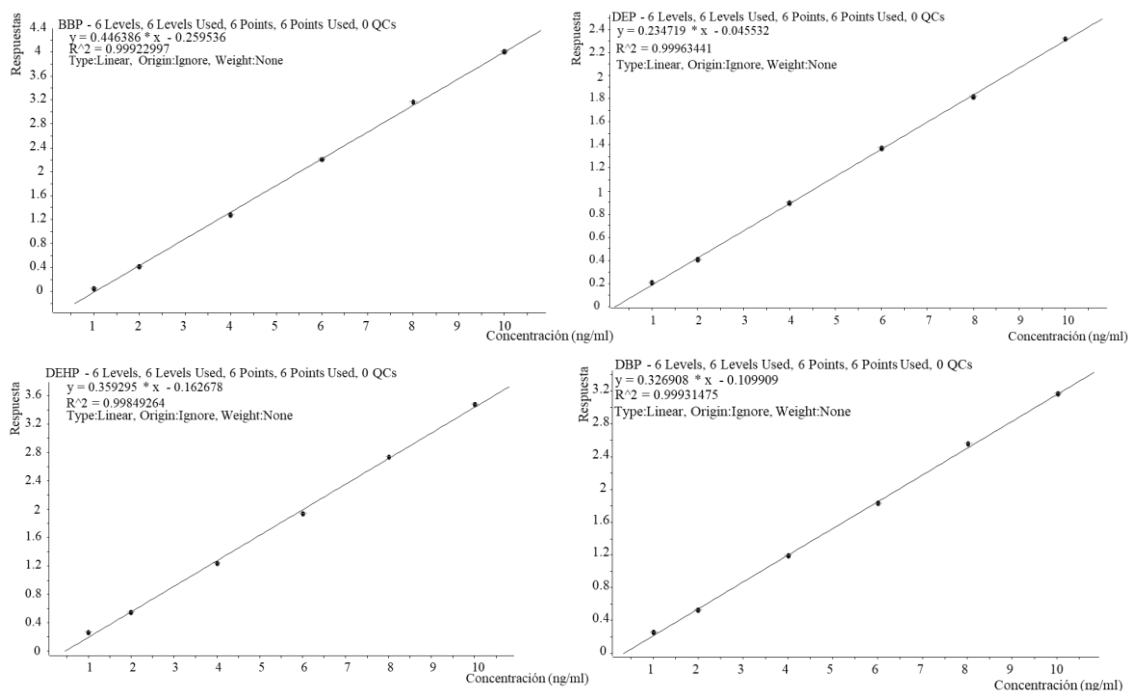
En este trabajo se ha seleccionado la calibración con estándar interno y ajuste matricial con el fin de corregir el efecto matriz encontrado para alguno de los compuestos estudiados.

ii. Rango lineal

Se evaluó el rango lineal a concentraciones entre 1-50 $\mu\text{g L}^{-1}$, fijando el rango de trabajo entre 1 y 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se establecen rectas de calibrado en rango bajo y rango alto a concentraciones entre 1-10 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 10-30 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

En las figuras 9 y 10 se presentan las rectas de calibrado obtenidos para los compuestos estudiados.

- Rango bajo: 1-10 $\mu\text{g L}^{-1}$



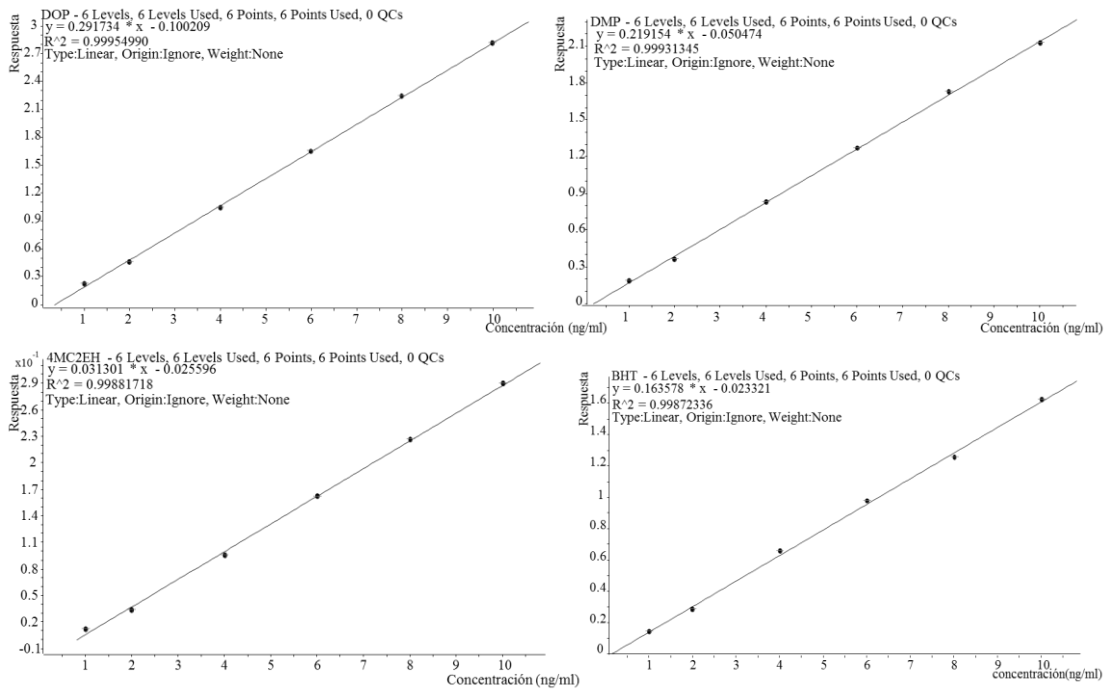
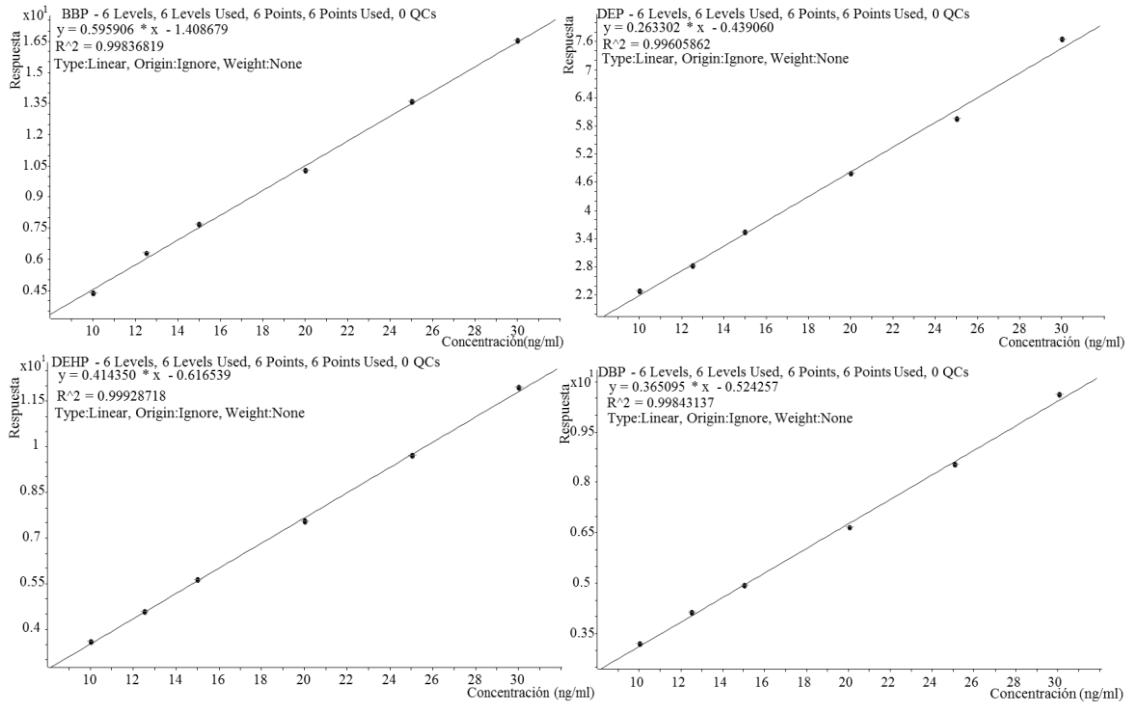


Figura 9. Curvas de calibrado en RB.

○ Rango alto: 10-30 $\mu\text{g L}^{-1}$



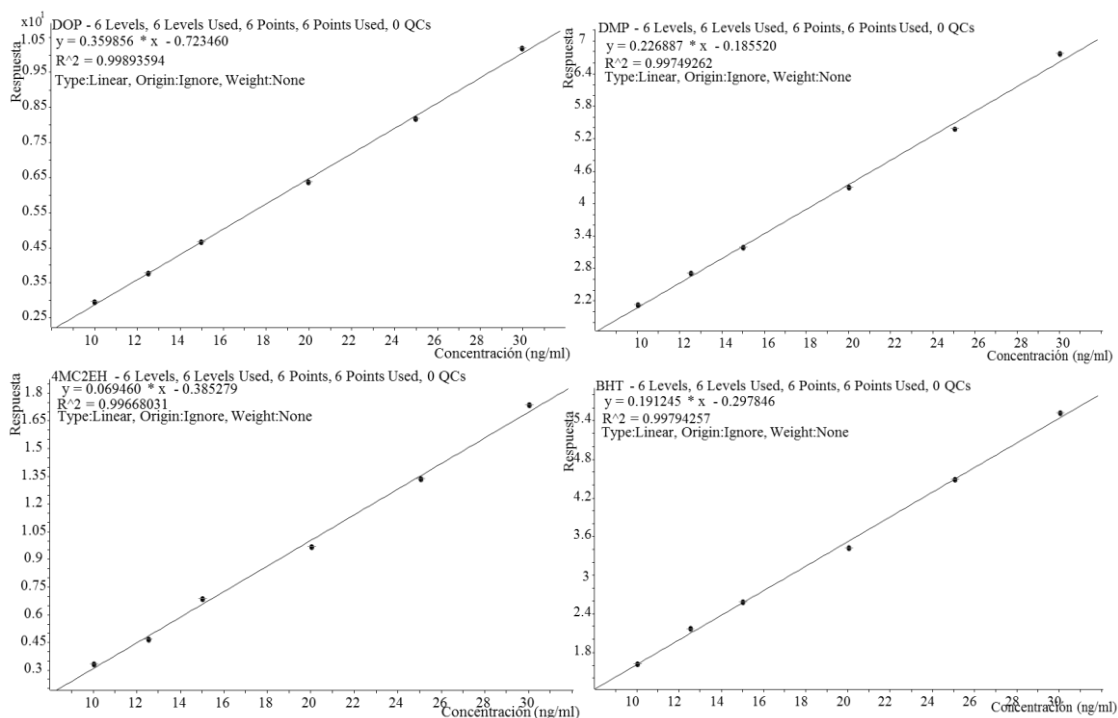


Figura 10. Curvas de calibrado en RA.

iii. Límite de cuantificación (LOQ)

El LOQ para el método SPE-GC-MS/MS es de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para todos los compuestos de interés, permitiéndonos llegar al límite legal legislado por la Unión Europea para el DEHP.

El LOD máximo permitido para el BHT es de $3.16 \mu\text{g L}^{-1}$ y para el 2EH4MC es de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ (Comisión Europea, 2015), por lo que la metodología desarrollada permite llegar a los límites legales según la lista de observación de la Decisión 2015/495/UE.

iv. Precisión y exactitud

La precisión, exactitud y recuperaciones obtenidas del método propuesto se han evaluado utilizando muestras de agua de fuente fortificadas con los analitos de interés a tres niveles de concentración diferentes. Se realizaron 15 réplicas de cada nivel de concentración, en tres fechas diferentes, utilizando las condiciones descritas en los procedimientos de análisis.

Tabla 10. Datos de precisión (%) para n=15.

Compuestos	Precisión (%)		
	RB (1µg L ⁻¹)	RM (10µg L ⁻¹)	RA (30µg L ⁻¹)
DMP	3.5	2.1	2.3
DEP	1.7	4.2	6.7
DBP	5.0	5.1	6.6
BBP	7.0	4.1	3.1
DEHP	3.5	2.5	3.7
DOP	2.5	3.9	1.4
2EH4MC	10.4	8.4	11.1
BHT	3.7	4.3	1.4

El método optimizado proporciona una adecuada precisión con valores de RSD comprendidas entre 2 y 11%.

En la siguiente tabla 11 se observa que el método proporciona recuperaciones satisfactorias para todos los compuestos estudiados.

Tabla 11. Datos de recuperación (%) para n=15.

Compuestos	Recuperación (%)		
	RB (1µg L ⁻¹)	RM (10µg L ⁻¹)	RA (30µg L ⁻¹)
DMP	103	100.9	102.4
DEP	103.7	102.3	102
DBP	109.3	101.6	100.7
BBP	112.4	103.4	103.7
DEHP	107.7	100.8	101.2
DOP	106.3	104.5	102.1
2EH4MC	101.8	103.4	94.8
BHT	107.4	101.2	102.7

Observamos que con este método estudiado obtenemos buenas recuperaciones para todos los compuestos de interés, es decir, tenemos recuperaciones en torno al 100%.

Finalmente en la figura 11 se presentan los cromatogramas de un blanco de agua de fuente (color negro) y un agua de fuente con adición de ftalatos, BHT y 2EH4MC (color rojo) en el límite de cuantificación (1µg L⁻¹).

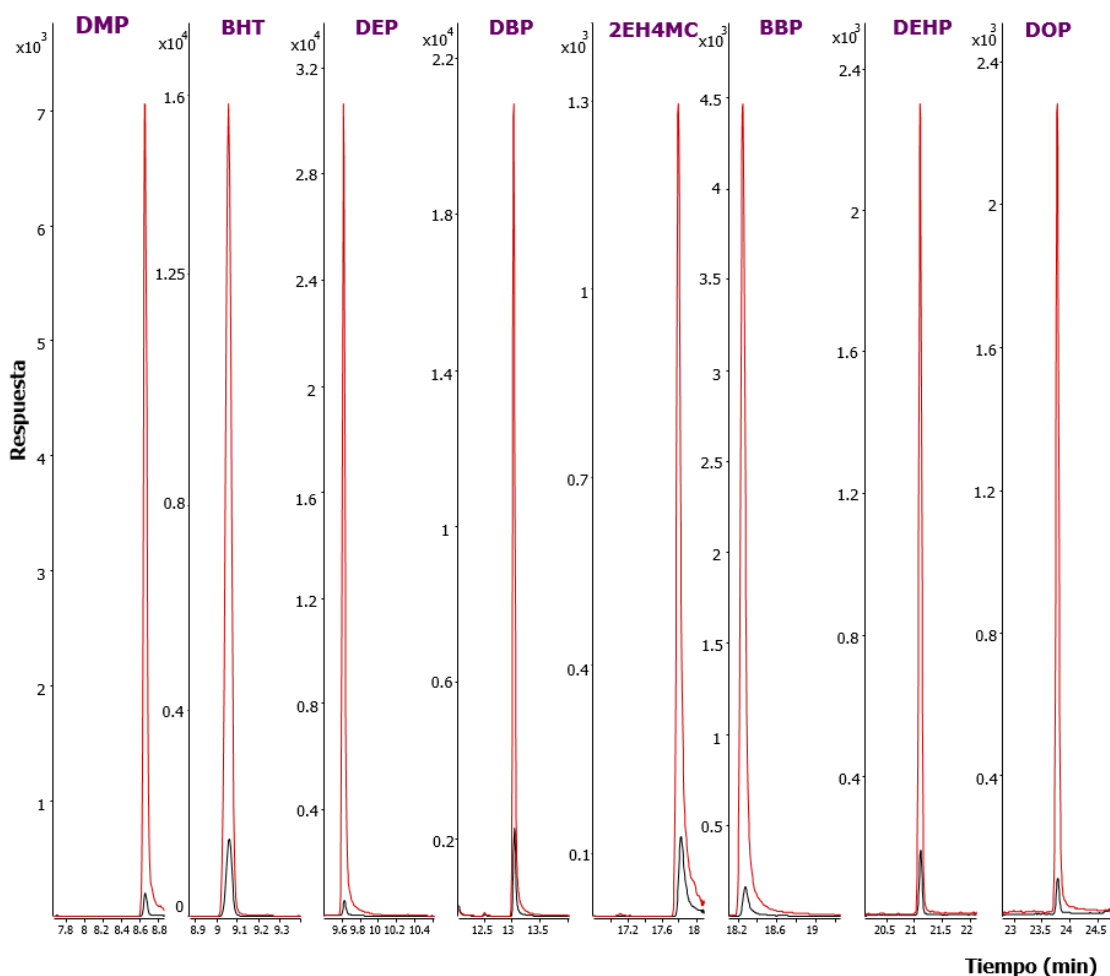


Figura 11. Cromatograma de un blanco de agua de fuente (línea negra) y de agua de fuente con adición (línea roja) a nivel de concentración de $1\mu\text{g L}^{-1}$, obtenidos mediante SPE-GC-MS/MS.

7. Conclusiones

El objetivo fundamental de este trabajo era la optimización de un método analítico de determinación de ftalatos, BHT y 2EH4MC en muestras de aguas continentales, utilizando SPE seguida de GC-MS/MS.

La alta producción de estos compuestos, y por tanto, su forma de estar presentes en todas las matrices, presentaban uno de los principales problemas. Encontrar una matriz acuosa libre de estos compuestos, se presentaba como una tarea realmente complicada.

La extracción de la muestra se realiza mediante SPE, con un cartucho Oasis HLB, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que es un proceso de extracción muy eficiente.

Los estudios de reproducibilidad y recuperación confirman que las extracciones llevadas a cabo con las condiciones experimentales optimizadas, conducen a resultados satisfactorios para los compuestos de interés, ya que trabajando en condiciones óptimas se consiguen recuperaciones entorno al 100%.

Los límites de cuantificación alcanzados ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) se encuentran por debajo del límite legislado para el DEHP en muestras de aguas. Mientras que para el BHT y el 2EH4MC se establece como un límite máximo aceptable de detección del método de 3.160 y 6.000 mg L^{-1} respectivamente, por lo que los LOQ de la metodología están por debajo de los límites legislados.

En este trabajo se ha desarrollado metodología analítica, que permite llevar a cabo la determinación de los ftalatos, el BHT y el 2EH4MC, obteniendo excelentes recuperaciones, precisión y límites de cuantificación para todos los compuestos estudiados, reduciendo el coste del proceso, los disolventes orgánicos empleados con un método analítico selectivo y sensible.

Conclusions

The main objective of this work is the optimization of an analytical method for the determination of phthalates, BHT and 2EH4MC in surface water samples by using SPE followed by GC-MS/MS.

The main problem associated with these compounds is their high production levels. As consequence, different environmental matrixes contains relatively large amounts of these pollutants, and it is very difficult to find clean surface water samples.

A very efficient extraction procedure based on SPE using Oasis HLB cartridges was developed.

The results showed good performance in terms of reproducibility and recoveries (around 100%).

Quantification limits achieved by the proposed method ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) allow the application of the procedure below the levels imposed by existing regulations (RD 817/2015 38/2013/EU).

A sensitive and selective methodology for the determination of phthalates, BHT and 2EH4MC was developed.

Excellent recoveries, precision levels and low LOQs were obtained for all studied compounds, minimizing the analysis cost and the organic solvent consumption.

8. Bibliografía

- Arcadi, F., Costa, C., Imperatore, C., Marchese, A., Rapisarda, A., Selemi, M., . . . Costa, G. (1998). Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the Long-Evans rat. *Food Chemical Toxicology*, 36(11), 963-970.
- Assadi, Y., Rezaee, M., Milani H., M., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 1-9.
- Babich, H. (1982). Butylated Hydroxytoluene (BHT): A review. *Environmental Research*, 29, 1-29.
- Balafas, D., Shaw, K., & Whitfield, F. (1999). Phthalate and adipate esters in Australian packaging material. *Food Chemistry*, 65(3), 279-416.
- 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(10), 737-747.
- Biparva, P., Ehsani, M., & Hadjmohammadi, M. (2012). Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27, 87-94.
- Boleín Oficial del Estado. (Agosto de 2013). *Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013*. Recuperado el 2 de Junio de 2019, de <https://www.boe.es/doue/2013/226/L00001-00017.pdf>
- Boyd, R., Basic, C., & Bethem, R. (2008). *Trace quantitative analysis by mass spectrometry*. Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.
- Bustamante-Montes, P., Lizama-Soberanis, B., Olaíz-Fernández, G., & Vázquez-Moreno, F. (2001). Ftalatos y efectos en la salud. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 17(4), 205-215.
- Cacho, J., Campillo, N., Viñas, P., & Hernández-Córdoba, M. (2015). Determination of synthetic phenolic antioxidants in soft drinks by stir-bar sorptive extraction

- coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(5), 665-673.
- Cai, Y., Jiang, G., & Liu, J. (2003). Solid-phase extraction of several phthalate esters from environmental water samples on a column packed with polytetrafluoroethylene turnings. *Analytical science*, 19(11), 1491-1494.
- Cai, Y., Jiang, G., Liu, J., & Zhou, Q. (2003). Multi-walled carbon nanotubes packed cartridge for the solid-phase extraction of several phthalate esters from water samples and their determination by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 494(1-2), 149-156.
- Calafat, A., Slakman, A., Silva, M., Herbert, A., & Needham, L. (2004). Automated solid phase extraction and quantitative analysis of huamn milk for 13 phthalate metabolites. *Journal of Chomatography B*, 805(1), 49-56.
- Cámara, C., Fernández, P., Martín-Esteban, A., Pérez-Conde, C., & Vidal, M. (2002). *Toma y tratamiento de muestras*. Síntesis.
- Camel, V. (26 de Marzo de 2003). Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B*, 58, 1177-1233. Recuperado el 03 de Abril de 2019, de <http://www.cnstn.rnrt.tn/raf7009/wp-content/themes/Savarona/documents/Scientific%20Documents/Scientific%20Articles%20Hg/Solid-phase%20extraction%20review.pdf>
- Canosa R., M. (2008). *Desarrollo de metodología analítica para la determinacion de triclosán y parabenes. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales*. Tesis doctoral, Universidad Santiago de Compostela, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Santiago de Compostela.
- Capriotti, A., Caveliere, C., Piovesana, S., Samperi, R., Stampachiachiere, S., Ventura, S., & Laganà, A. (2014). Multiresidue determination of UV filters in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Separation Science*, 37, 2882-2891.
- Castro, J. P. (2011). *Determinación de fragancias, conservantes y otros aditivos regulados en productos de uso cotidiano y atmósferas interiores*. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Santiago de Compostela.
- Cela, R., Lorenzo, R., & Casais, M. (2002). *Técnicas de separación en Química analítica*. Madrid: Sintesis.
- Comisión Europea. (2011). Reglamento (UE) N° 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. En C. Europea (Ed.), *Reglamento*, (págs. 1-89). Recuperado el 23 de Mayo de 2019, de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0010&from=ES>
- Comisión Europea. (2015). *Decisión de ejecución (UE) 2015/495 de la Comisión del 20 de marzo de 2015, Diario Oficial de la UE. L7/40*. Recuperado el 16 de Mayo de 2019, de European Commission: <https://www.boe.es/doue/2015/078/L00040-00042.pdf>

- Cortes Generales. (1985). *Ley 29/1985. de 2 de agosto, de Aguas. BOE núm 189*. BOE, Palma de Mallorca. Recuperado el 31 de Mayo de 2019, de <https://www.boe.es/boe/dias/1985/08/08/pdfs/A25123-25135.pdf>
- De Orsi, D., Gagliardi, L., Porrá, R., Berri, S., Climenti, P., Granese, A., . . . Tonelli, D. (January de 2006). A environmentally friendly reversed-phase liquid chromatography method for phthalates determination in nail cosmetics. *Analytical Chimica Acta*, 555(12), 238-241.
- EPA, U. (2007). *Phthalates*. Recuperado el 31 de Mayo de 2019, de https://archive.epa.gov/region5/teach/web/pdf/phthalates_summary.pdf
- Erney, D., Gillespie, A., Dilvydis, D., & Poole, C. (Febrero de 1993). Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *Journal of Chromatography*, 638(1), 57-63.
- Erney, D., Pawlowski, T., & Poole, C. (1997). Matrix-induced peak enhancement of pesticides in gas chromatography: Is there a solution? *Journal of High Resolution Chromatography*, 20(7), 375-378.
- Fankhauser-Noti, A., & Grob, K. (Enero de 2007). Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: Investigation of the sources, tips and tricks. *Analytica Chimica Acta*, 582(2), 353-360.
- Farahani, H., Norouzi, P., Dinarvand, R., & Reza Ganjali, M. (Noviembre de 2007). Development of dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1172(2), 105-112.
- Fierens, T., Servaes, K., Holderbeke, M., Geerts, L., Henauw, S., Sioen, I., & Vanermen, G. (2012). Analysis of phthalates in food products and packing materials sold on the Belgian market. *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 50(7), 2575-2583.
- Fries, E., & Püttmann, W. (2002). Analysis of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) in water by means of solid phase extraction combined with GC/MS. *Water Research*, 36, 2319-2327.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., & Wenzel, A. (2002). Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, 36(6), 1429-1438.
- Garrido, A., Barco, M., López, J., Martínez, J., & Romero-González, R. (2009). Determination of di-(2-ethylhexyl)phthalate in environmental samples by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 32(9), 1383-1389.
- Hajšlová, J., & Zrostlíková, J. (junio de 2003). Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography A*, 1000(1-2), 181-197.

- Hajšlová, J., & Čajka, T. (2007). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Chapter 12. En Y. Picó (Ed.), *Food Toxicants Analysis. Techniques, strategies and developments* (pág. 419). Praga, República Checa: Elsevier.
- Huang, W., Xie, Z., Yan, W., Mi, W., & Xu, W. (2016). Occurrence and distribution of synthetic musks and organics UV filters from riverine and coastal sediments in the Pearl River estuary of China. *Marine Pollution Bull*, *111*, 153-159.
- Jara, S., Lysebo, C., Greibrokk, T., & Lundanes, E. (2000). Determination of phthalates in water samples using polystyrene solid-phase extraction and liquid-chromatography quantification. *Analytica Chimica Acta*, *407*(1-2), 165-171.
- Kanchanamayoon, W., Prapatpong, P., Chumwangwapee, S., & Chaithongrat, S. (2012). Analysis of phthalate esters contamination in drinking water samples. *African Journal of Biotechnology*, *11*(96), 16263-16269.
- Kato, K., Yamauchi, K., & Nakazawa, H. (2003). High Throughput Analysis of Di-(2-Ethylhexyl) phthalate Metabolites in Urine for Exposure Assessment. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *26*, 2162.
- Kato, K., Shoda, S., Takahashi, M., Doi, N., Yoshimura, Y., & Nakazawa, H. (2003). Determination of three phthalate metabolites in human urine using on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, *788*, 407.
- Kawaguchi, M., Ito, R., Hayatsu, Y., Nakata, H., Sakui, N., Okanouchi, N., . . . Nakazawa, H. (2006). Stir bar sorptive extraction with in situ de-conjugation and thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry for measurement of 4-nonylphenol glucuronide in human urine sample. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *40*(1), 82-87.
- Kunz, P., & Fent, K. (2006). Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquatic Toxicology*, *79*, 305-324.
- Li, J., Cai, Y., Shi, Y., Mou, S., & Jiang, G. (2008). Analysis of phthalates via HPLC-UV in environmental water samples after concentration by solid-phase extraction using ionic liquid mixed hemimicelles. *Talanta*, *74*(4), 498-504.
- Lin Z.P., I. M. (2003). Determination of Phthalate Ester Congeners and Mixtures by LC/ESI-MS in Sediments and Biota of an Urbanized Marine Inlet. *Environmental Science & Technology*, *37*(10), 2100-2108.
- Liu, W. (2008). *Determination of Sub-ppb level of phthalates in water by autor-SPME and GC-MC*. Shanghai.
- M. Tiziana Baratta, H. D. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 235-244.
- Ma, M., Wang, H., Zhen, Q., Zhang, M., & Du, X. (2017). Development of nitrogen-enriched carbonaceous material coated titania nanotubes array as a fiber coating for solid-phase microextraction of ultraviolet filters in environmental water. *Talanta*, *167*, 118-125.

- Marega, M., Grob, K., Moret, S., & Conte, L. (Enero de 2013). Phthalate analysis by gas chromatography-mass spectrometry: Blank problems related to the syringe needle. *Journal of Chromatography A*, 1273, 105-110.
- Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J., Aparicio, I., & Alonso, E. (2013). Determination of priority pollutants in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 773, 60-67.
- Maštovská, K., Lehotay, S., & Hajšlová, J. (Octubre de 2004). Ruggedness and other performance characteristics of low-pressure gas chromatography-mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in food crops. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 335-349.
- Mortensen, G., Main, K., Andersson, A., Leffers, H., & Skakkebaek, N. (2005). Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(4), 1084-1092.
- National Center for Biotechnology Information. (s.f.). *PubChem*. Recuperado el 18 de Junio de 2019, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea. (2006). *Reglamento (CE) n°1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de diciembre de 2006 relativo al REACH, por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos*. . Diario Oficial de la Unión Europea, Unión Europea. Recuperado el 24 de Mayo de 2019, de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1907&from=es>
- Pawliszyn, J. (1997). *Solid phase microextraction: theory and practice*. Wiley-VCH.
- Pena S., M. (Marzo de 2010). Desarrollo de nuevas metodologías de preparación de muestra para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices medioambientales y alimentarias. Santiago de Compostela, A Coruña, España. Recuperado el 03 de Abril de 2019, de https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2824/9788498874280_content.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Pérez F., V. (2013). *Separación enantiomérica y/o determinación de compuestos de interés medio ambiental por metodologías analíticas electroforéticas y cromatográficas innovadoras*. Tesis doctoral, Universidad de Alcalá, Química Analítica, Química Física, Ingeniería Química, Alcalá de Henares.
- Pérez Feás, C. (01 de Marzo de 2012). *Estudio de la determinación de ftalatos en muestras de interés clínico y alimentario*. Tesis doctoral, Santiago de Compostela.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., López de Alda, M., & Barceló, D. (2001). Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. *Trends in Analytical Chemistry*, 20(11), 637-648.
- Preuss, R., Koch, H., & Angerer, J. (2005). Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 816(1-2), 269-280.

- Prieto, A., Basauri, O., Rodil, R., Usobiaga, A., Fernández, L., Etxebarria, N., & Zuloaga, O. (2010). Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2642-2666.
- Psillakis, E., & Kalogerakis, N. (2003). Hollow-fibre liquid-phase microextraction of phthalate esters from water. *Journal of Chromatography A*, 999, 145-153.
- Regueiro, J., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Garcia-Monteaguado, J., & Cela, R. (Marzo de 2008). Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, 1190, 27-38.
- Rie, I., Seshimo, F., Miura, N., Kawaguchi, M., Saito, K., & Nakazawa, H. (2005). High-throughput determination of mono- and di-(2-ethylhexyl)phthalate migration from PVC tubing to drugs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39(5), 1036-1041.
- Risctox. (s.f.). *Disruptores endocrinos*. Recuperado el 18 de Junio de 2019, de <https://risctox.istas.net/index.asp?idpagina=610>
- Rodil, R., & Moeder, M. (2008). Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1179(2), 81-881.
- Rodil, R., Quintana, J., Basaglia, G., Pietrogrande, M., & Cela, R. (August de 2010). Determination of synthetic phenolic antioxidants and their metabolites in water samples by downscaked solid-phase extraction, silylation and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6428-6435.
- Royal Society of Chemistry. (2000). *Principles and Practices of Method Validation*. (A. Fajgelj, & Á. Ambrus, Edits.) Cambridge, UK.
- Schwoppe, A., Till, D., Ehntholt, D., Sidman, K., Whelan, R., Schwartz, A., & Reid, R. (1987). Migration of BHT and Irganox 1010 from low-density polyethylene (LDPE) to foods and food-simulating liquids. *Food Chem. Toxicol.*, 25(4), 317-326.
- Serna, D. d. (22 de Febrero de 2011). *Agilent Technologies. Nuevas tendencias en Preparación de muestras*. Recuperado el 27 de Marzo de 2019, de [https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/1-Nuevas%20tendencias%20en%20Extraccion%20en%20Fase%20Solida%20\(SP%20E\)-8%20Marzo%20Almiral%20version%202.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/1-Nuevas%20tendencias%20en%20Extraccion%20en%20Fase%20Solida%20(SP%20E)-8%20Marzo%20Almiral%20version%202.pdf)
- Tan, B., Hawker, D., Müller, J., Tremblay, L., & Chapman, H. (2008). Stir bar sorptive extraction and trace analysis of selected endocrine disruptors in water, biosolids and sludge samples by thermal desorption with gas chromatography-mass spectrometry. *Water Research*, 42(1), 404-412.
- Tarazona Teruel, I. (2015). *Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de filtros UV: de los productos cosméticos al cuerpo humano y al medio ambiente*. Tesis doctoral, Universitat de Valencia, Química Analítica, Valencia.

- Tarazona, I., Chisvert, A., León, Z., & Salvador, A. (2010). Determination of hydroxylated benzophenona UV filters in sea water samples by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(29), 4771-4778.
- The Editors of Encyclopaedia Britannica See Article History. (s.f.). *Encyclopaedia Britannica, American Chemist*. (E. Gregersen, Editor) Recuperado el 12 de Abril de 2019, de <https://www.britannica.com/biography/Waldo-Semon>
- Tombesi, N., & Freije, H. (2002). Application of solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry to the determination of butylated hydroxytoluene in bottled drinking water. *Journal of Chromatography A*, 963, 179-183.
- Unión Europea. (2009). *Reglamento (CE) N° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo*. Reglamento Europeo. Recuperado el 22 de Mayo de 2019, de <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:es:PDF>
- Wu, T., Wang, C., Wang, X., Xiao, H., Ma, Q., & Zhang, Q. (2008). Comparison of UPLC and HPLC for analysis of 12 phthalates. (V. Verlag, Ed.) *Chromatographia*, 68(-10), 803-806.
- Zhang, H., & Lee, H. (2012). Simultaneous determination of ultraviolet filters in aqueous samples by plunger-in-needle solid-phase microextraction with graphene-based sol-gel coating as sorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chimical Acta*, 742, 67-73.
- Zhang, Y., & Lee, H. (2012). Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in environmental water samples. *Analytical Chimica Acta*, 750, 120-126.

ANEXOS

ANEXO I

Los espectros Full Scan y Product Ion para todos los compuestos de interés se muestran a continuación:

1. DMP

Full Scan

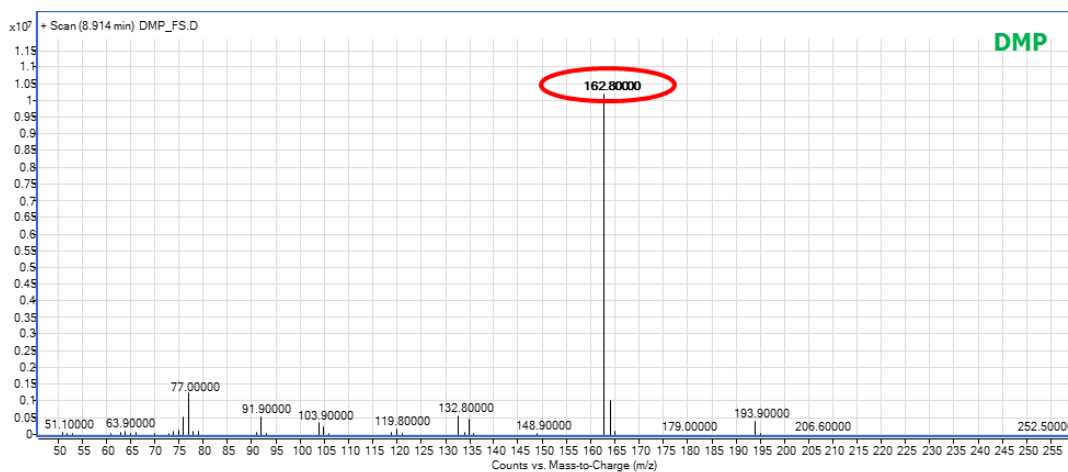


Figura 1. Espectro del DMP obtenido mediante GC-MS/MS en modo "Full Scan".

Product Ion

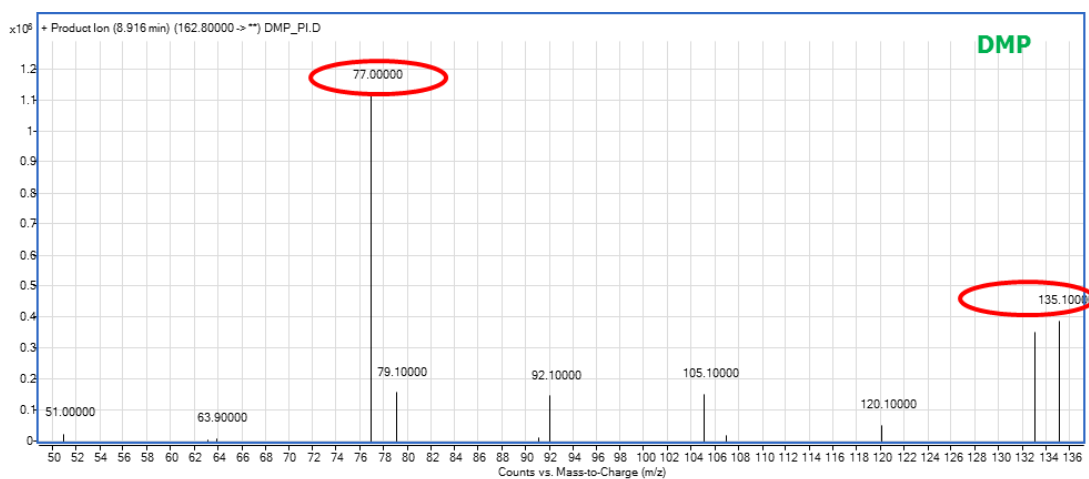


Figura 2. Espectro del DMP obtenido mediante GC-MS/MS en modo "Product Ion".

2. DEP

Full Scan

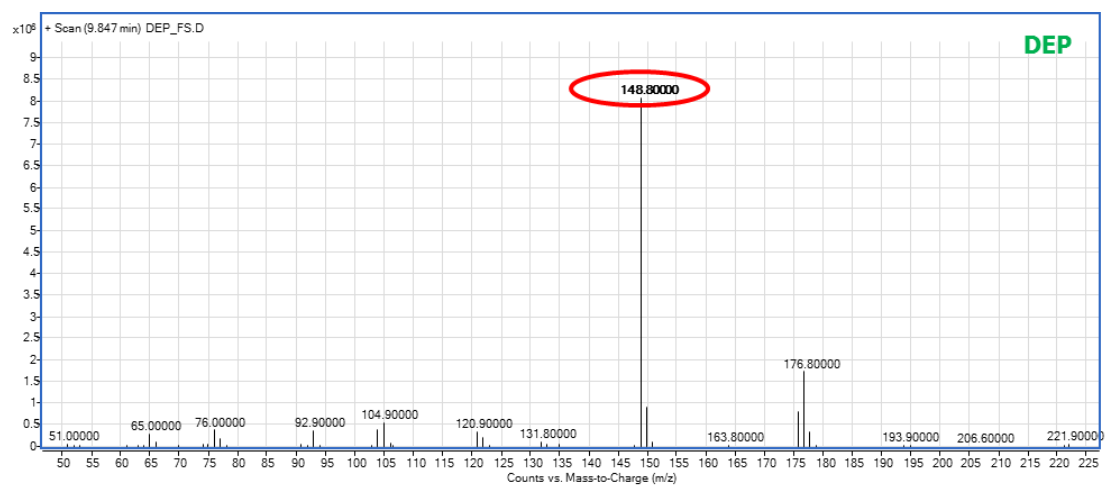


Figura 3. Espectro del DEP obtenido mediante GC-MS/MS en modo "Full Scan".

Product Ion

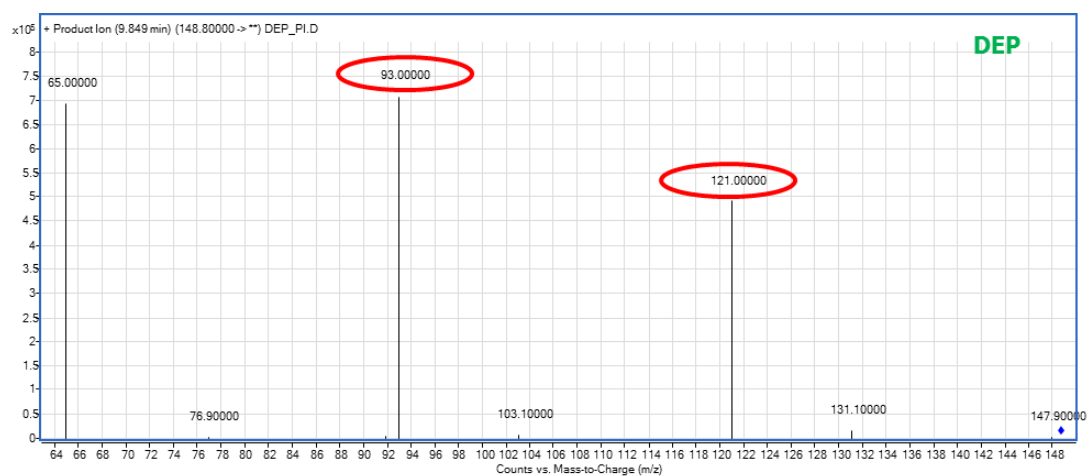


Figura 4. Espectro del DEP obtenido mediante GC-MS/MS en modo "Product Ion".

3. DBP

Full Scan

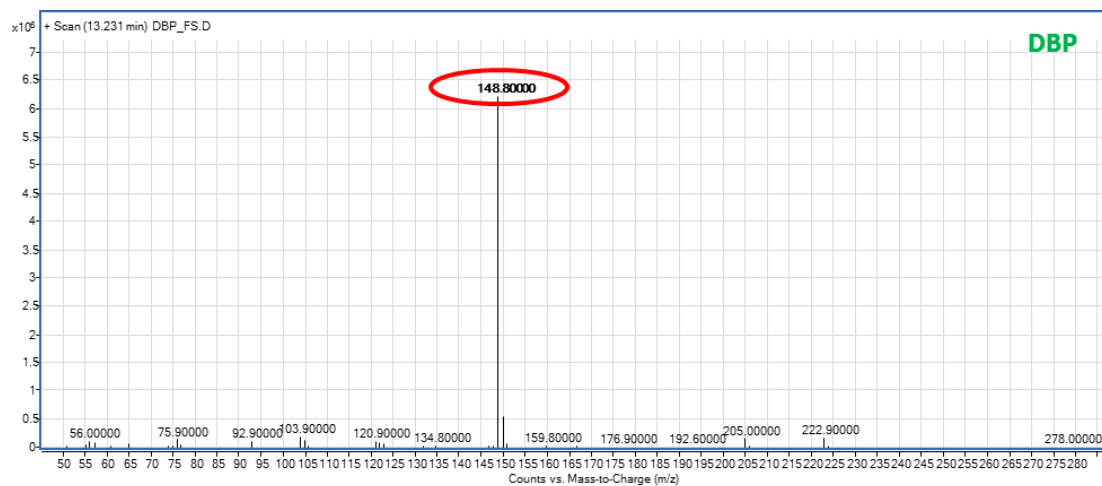


Figura 5. Espectro del DBP obtenido mediante GC-MS/MS en modo "Full Scan".

Product Ion

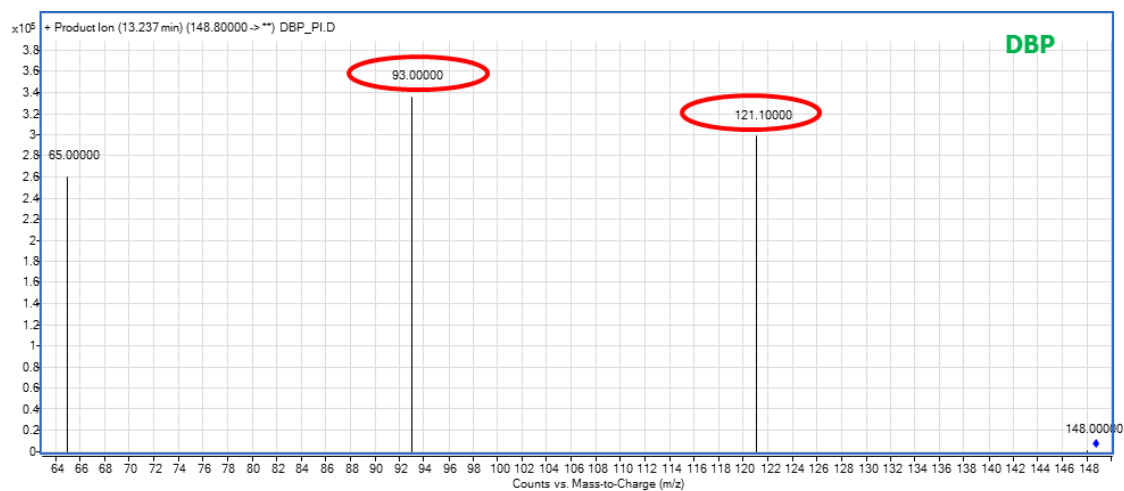


Figura 6. Espectro del DBP obtenido mediante GC-MS/MS en modo "Product Ion".

4. BBP

Full Scan

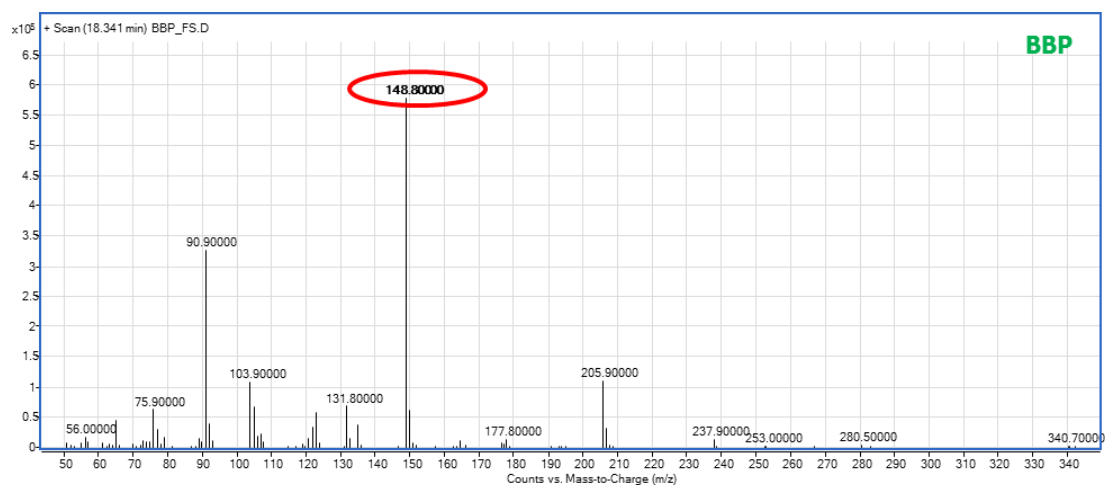


Figura 7. Espectro del BBP obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Full Scan”.

Product Ion

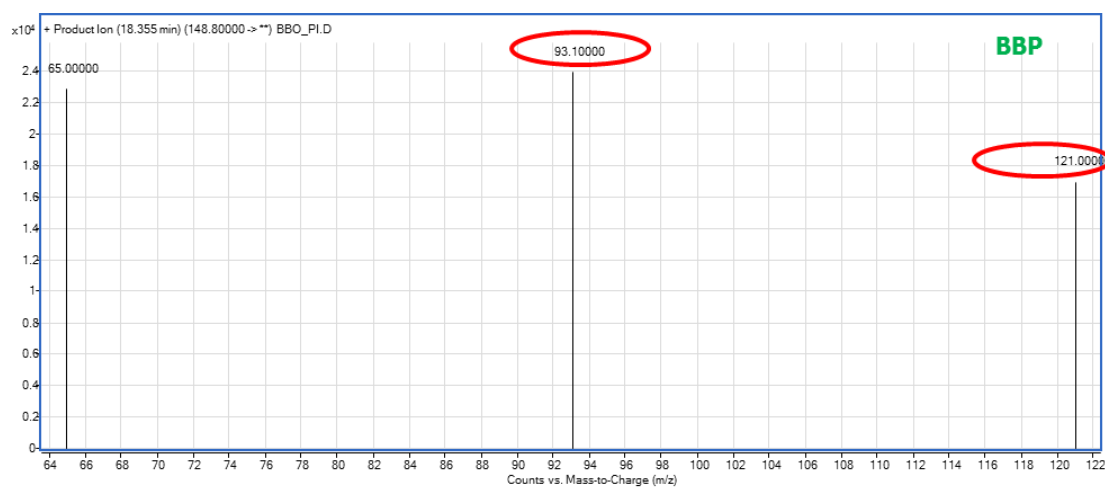


Figura 8. Espectro del BBP obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

5. DOP

Full Scan

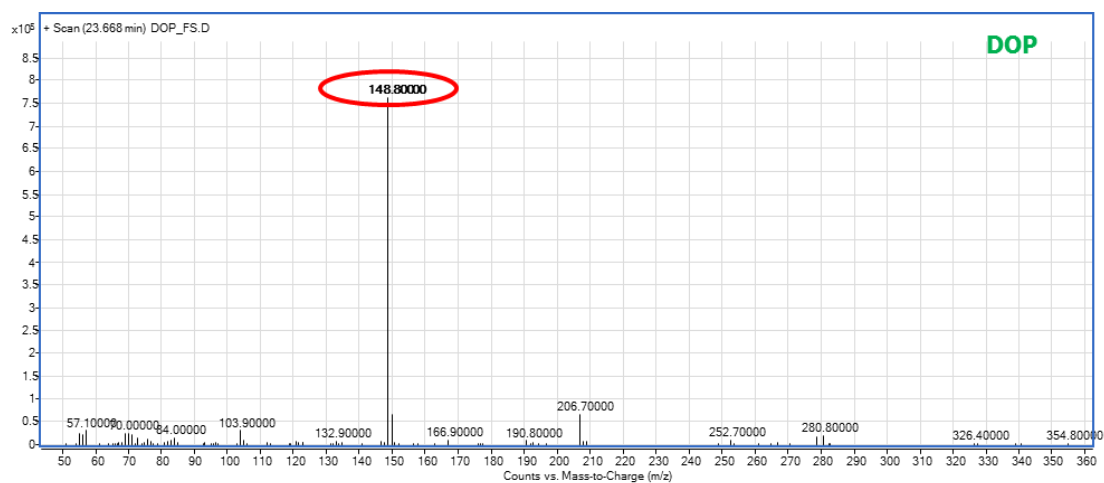


Figura 9. Espectro del DOP obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Full Scan”.

Product Ion

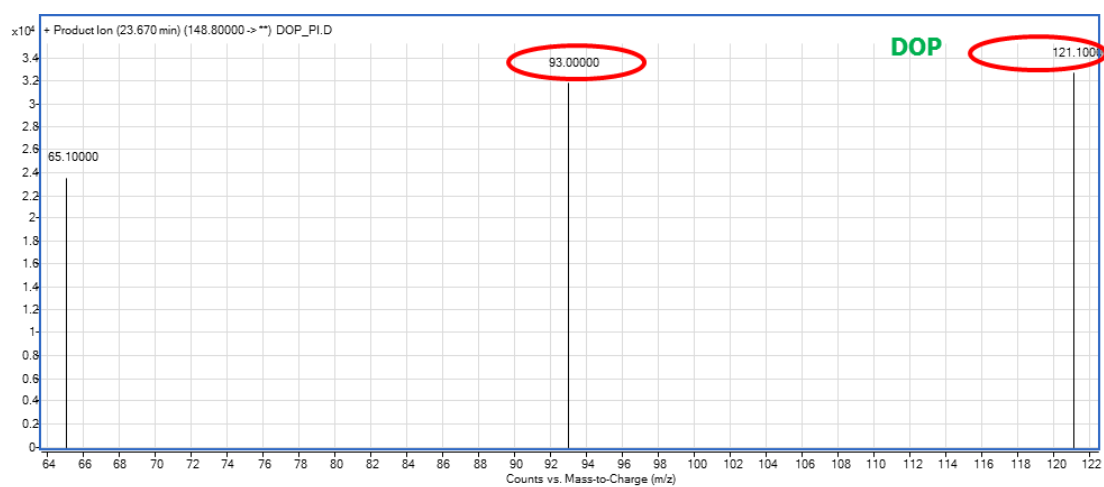


Figura 10. Espectro del DOP obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

6. DEHP

Full Scan

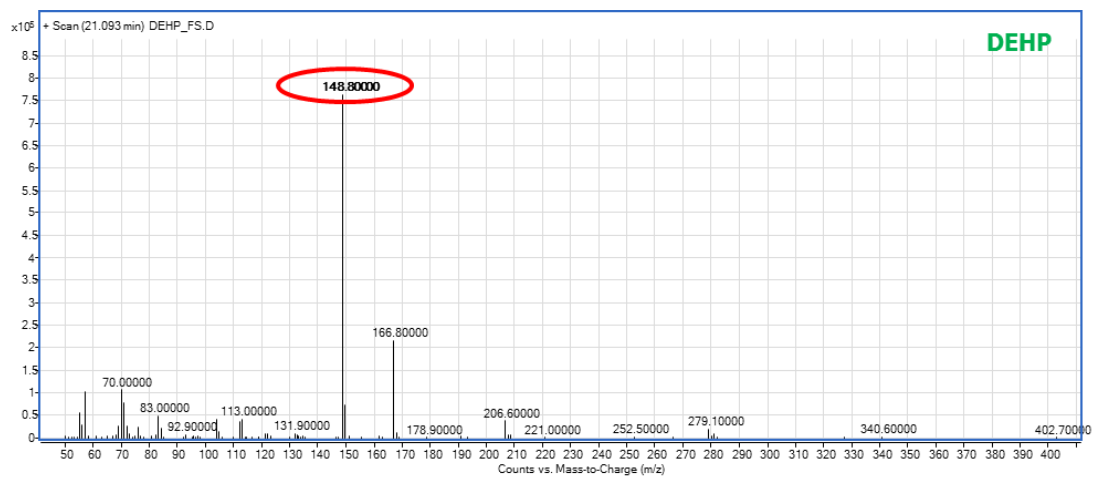


Figura 11. Espectro del DEHP obtenido mediante GC-MS/MS en modo "Full Scan".

Product Ion

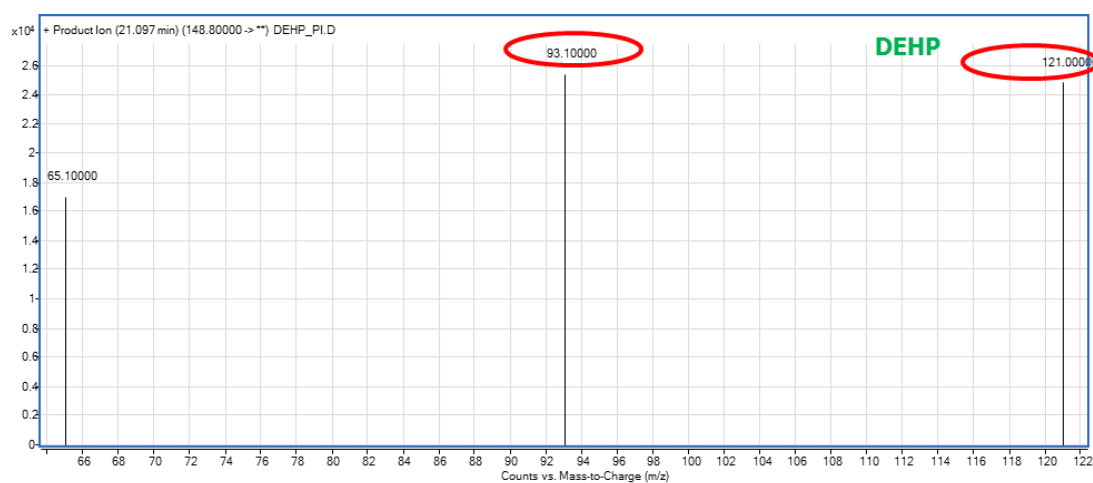


Figura 12. Espectro del DEHP obtenido mediante GC-MS/MS en modo "Product Ion".

7. BHT

Full Scan

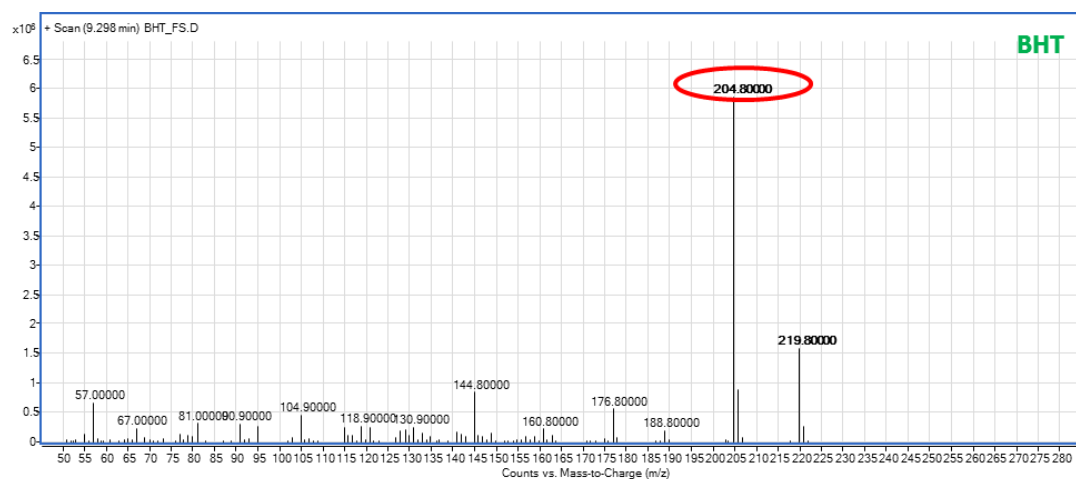


Figura 13. Espectro del BHP obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Full Scan”.

Product Ion

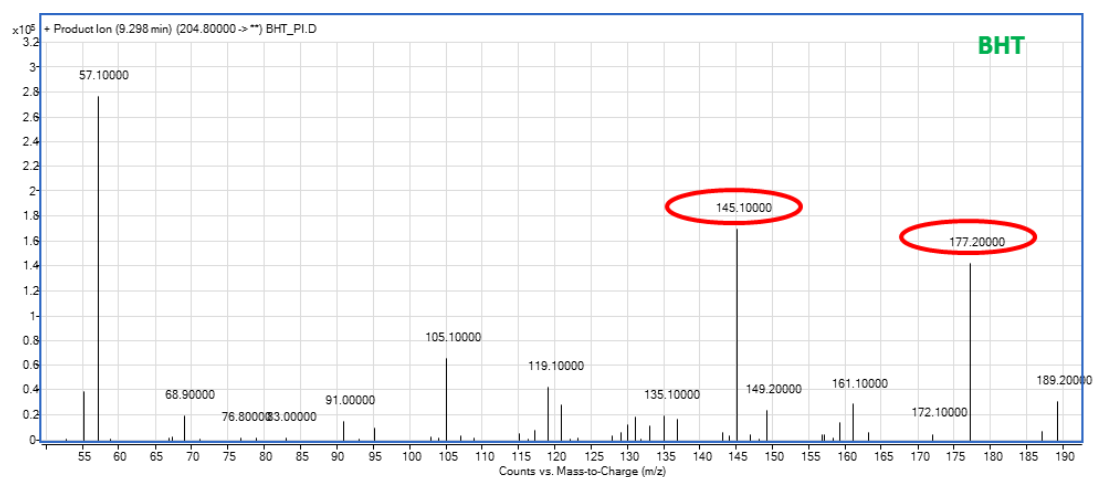


Figura 14. Espectro del BHT obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

8. 2EH4MC

Full Scan

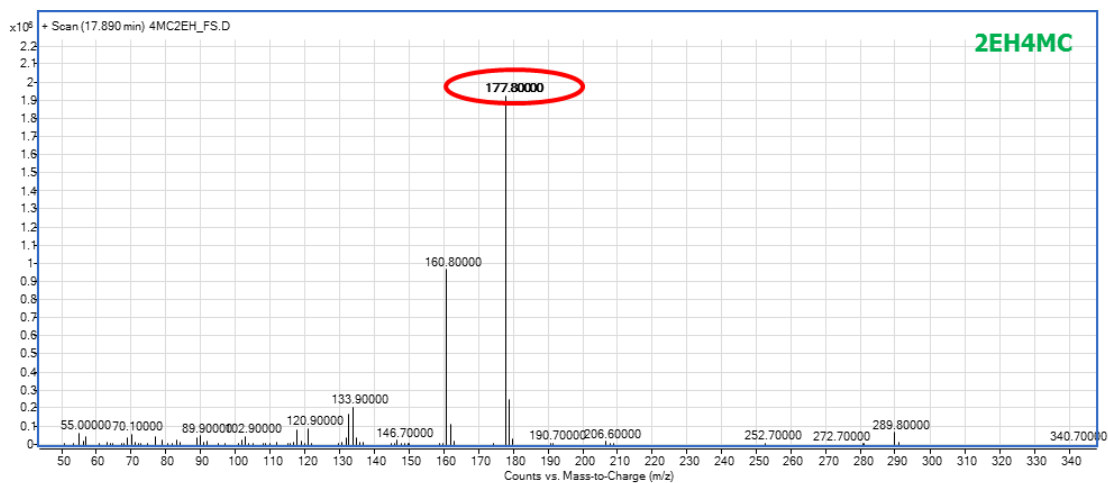


Figura 15. Espectro del 2EH4MC obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Full Scan”.

Product Ion

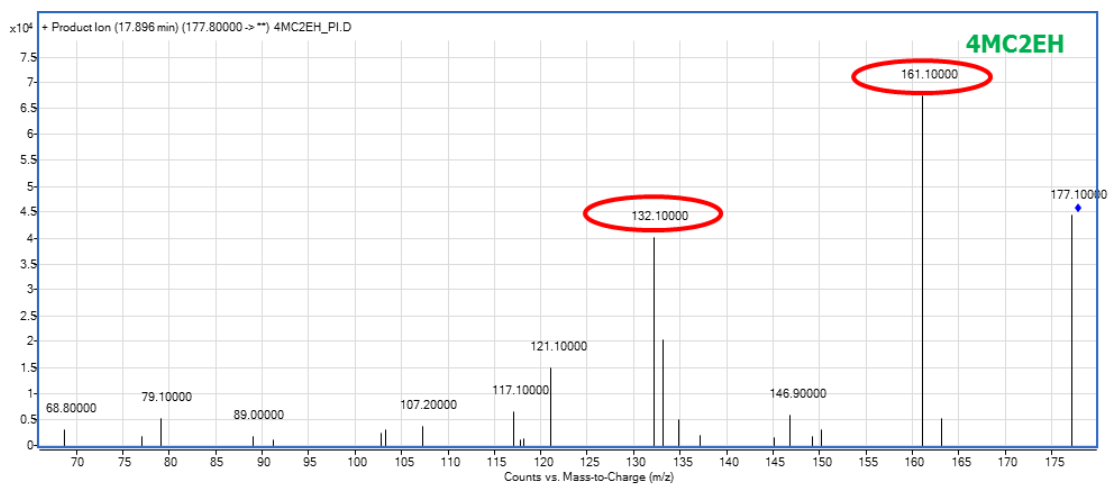


Figura 16. Espectro del 2EH4MC obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

9. Cinamato D₅

Full Scan

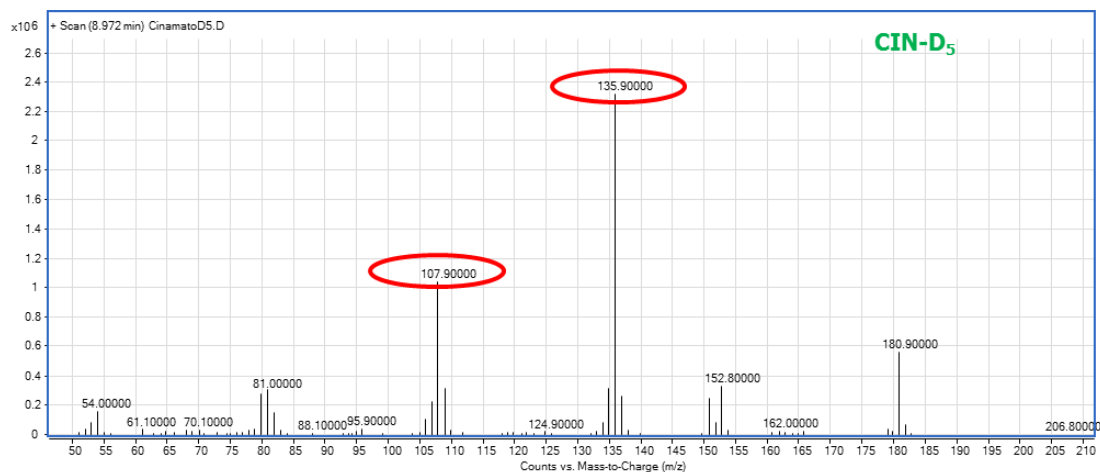


Figura 17. Espectro del CIN-D₅ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Full Scan”.

Product Ion

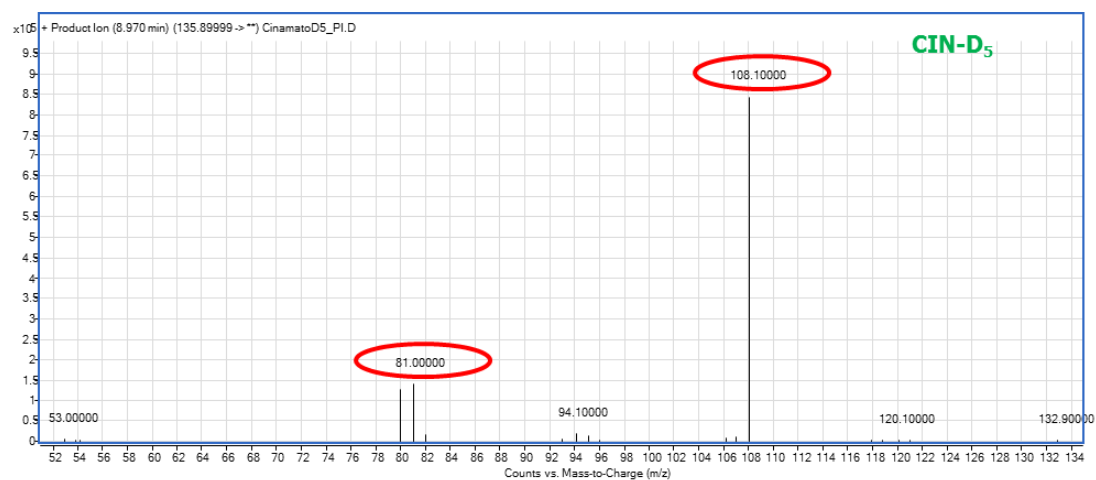


Figura 18. Espectro del CIN-D₅ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

10. BHT D₁₂

Full Scan

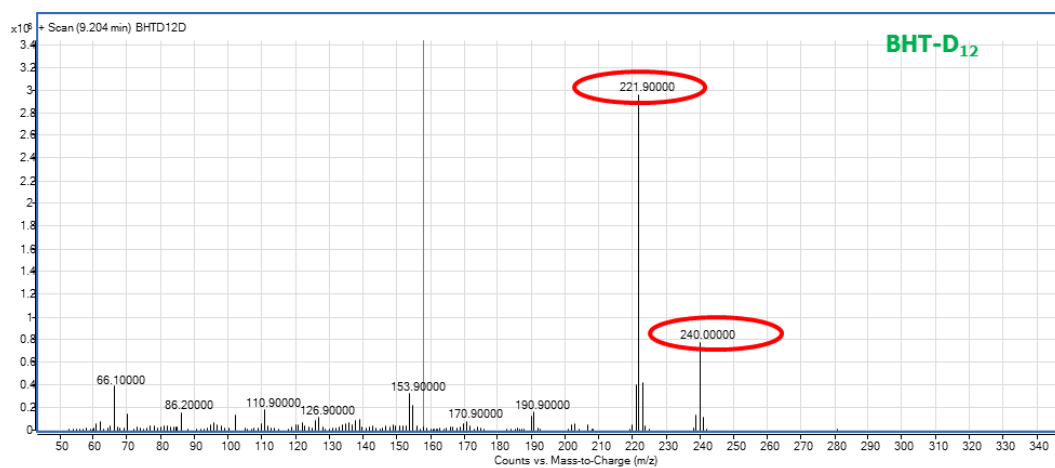


Figura 19. Espectro del BHT-D₁₂ obtenido mediante GC-MS/MS en modo "Full Scan".

Product Ion

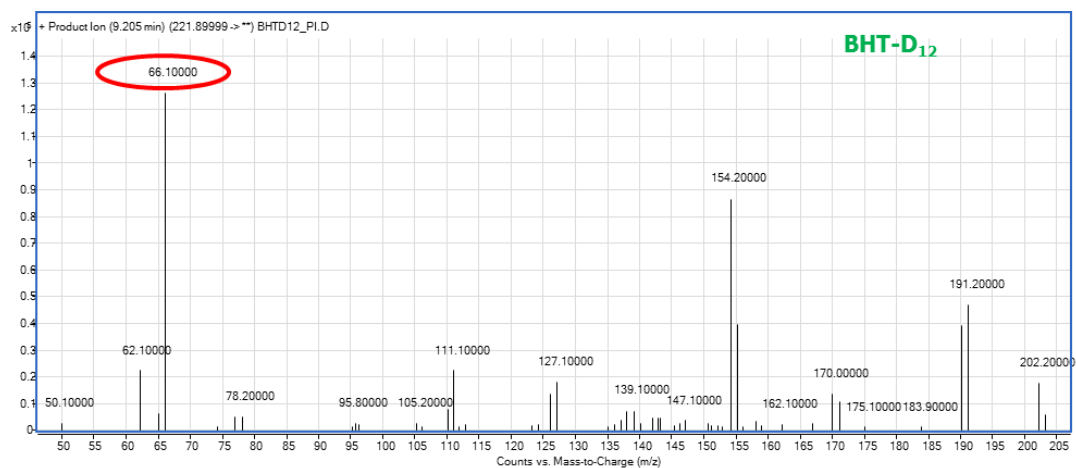
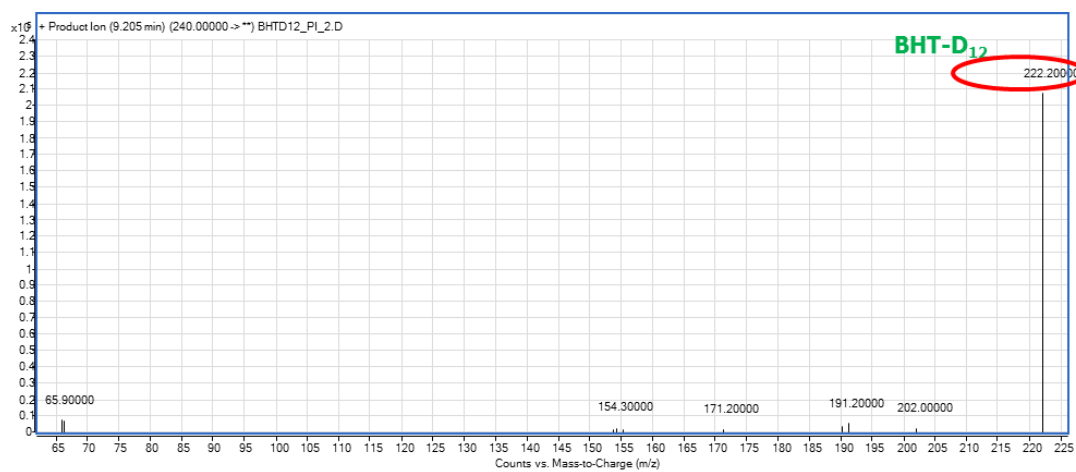


Figura 20. Espectro del BHT-D₁₂ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

11. DMP D₆

Full Scan

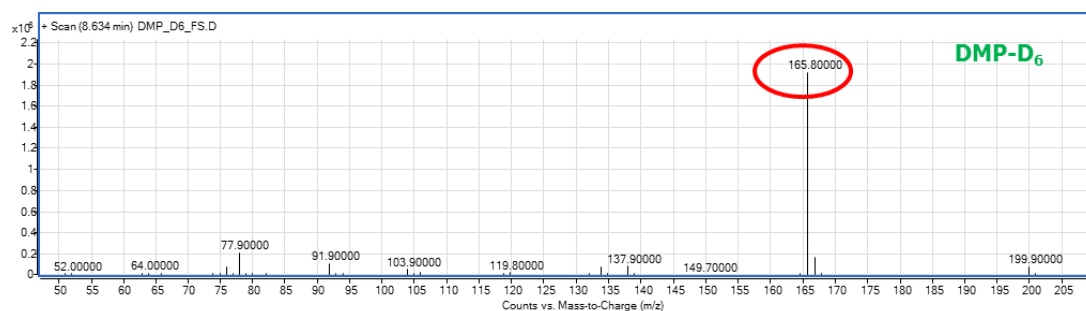


Figura 21. Espectro del DMP-D₆ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Full Scan”.

Product Ion

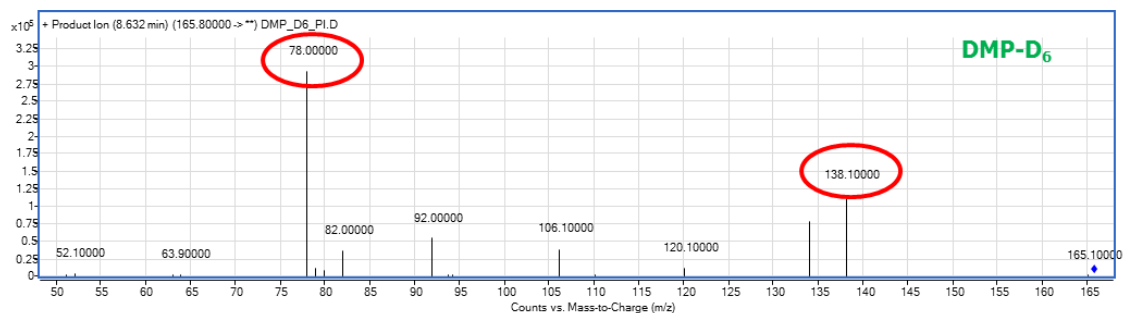


Figura 22. Espectro del DMP-D₆ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

12. DOP D₄

Full Scan

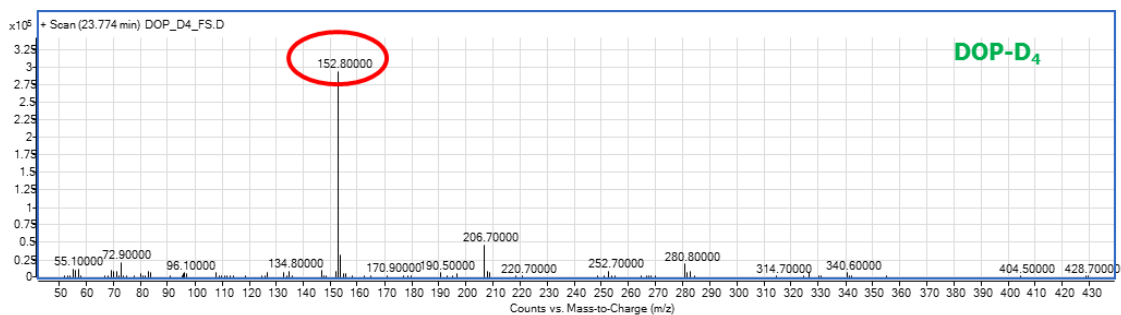


Figura 23. Espectro del DOP-D₄ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Full Scan”.

Product Ion

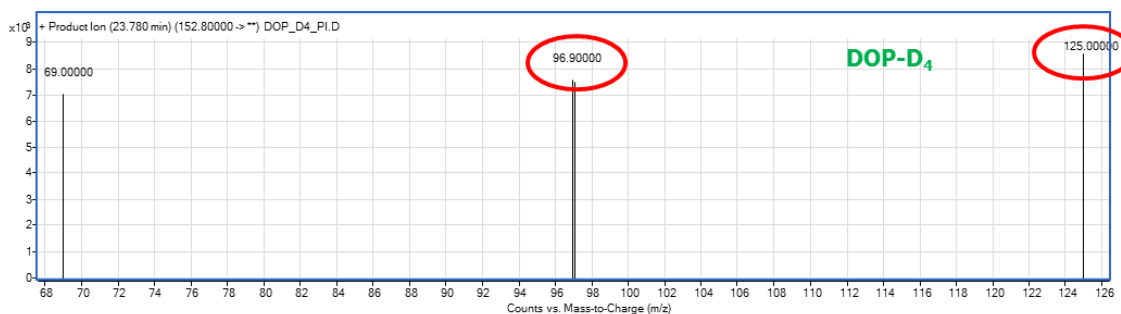


Figura 24. Espectro del DOP-D₄ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

13. DBP D₄

Full Scan

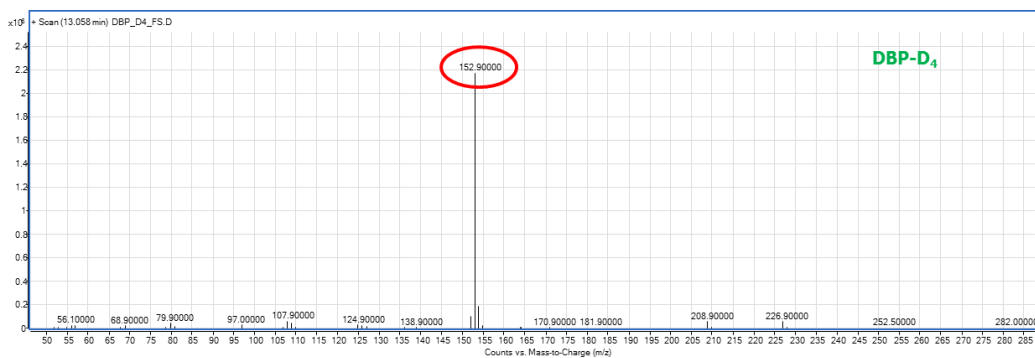


Figura 25. Espectro del DBP-D₄ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Full Scan”.

Product Ion

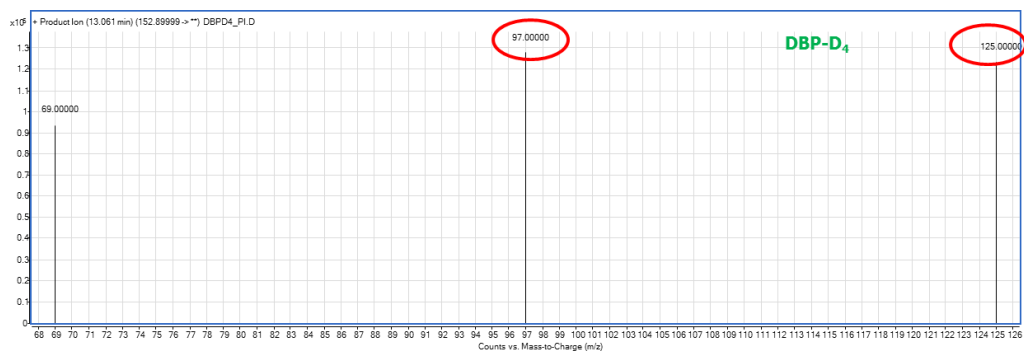


Figura 26. Espectro del DBP-D₄ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

14. DEHP D₄

Full Scan

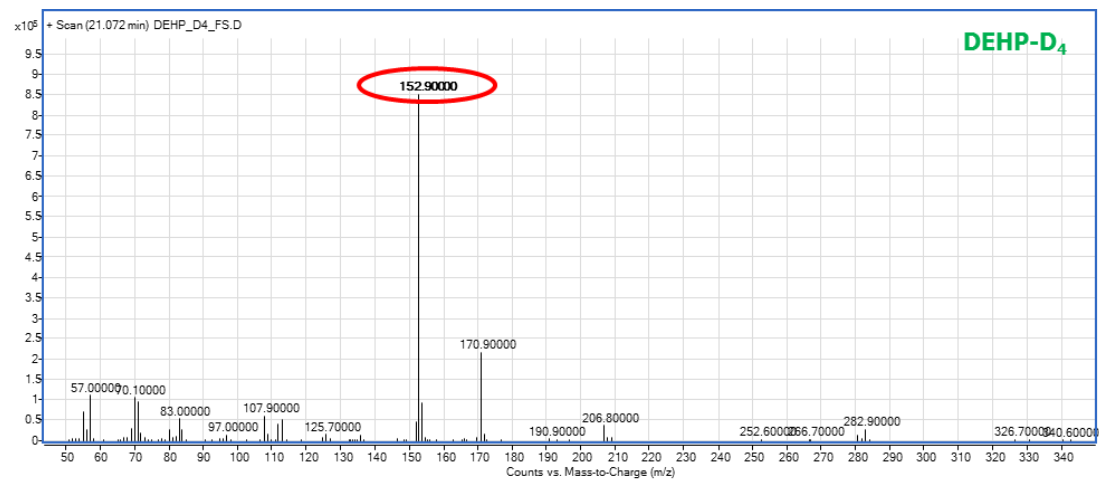


Figura 27. Espectro del DEHP-D₄ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Full Scan”.

Product Ion

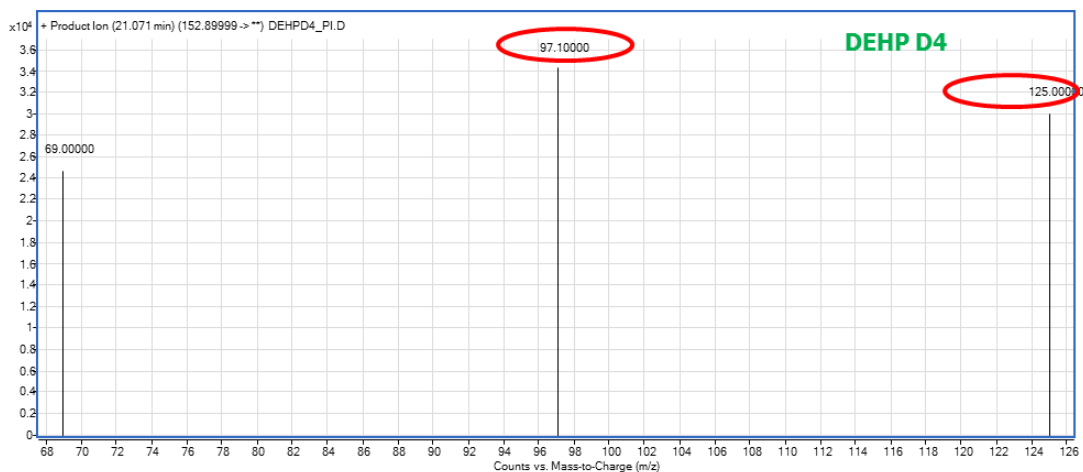


Figura 28. Espectro del DEHP-D₄ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

15. DEP D₄

Full Scan

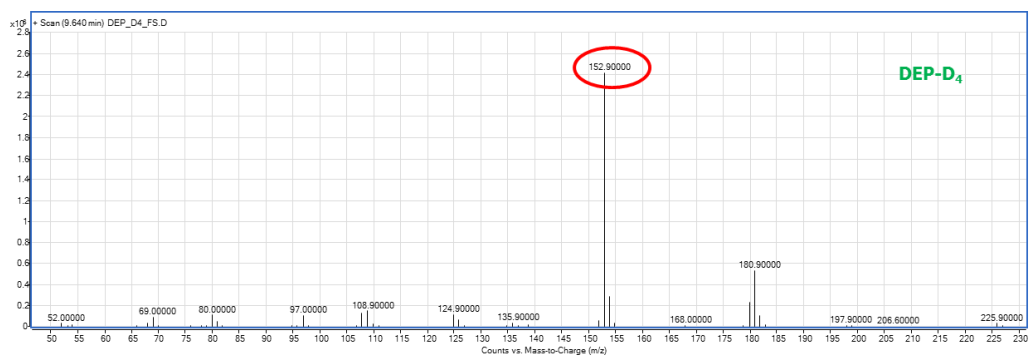


Figura 29. Espectro del DEP-D₄ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Full Scan”.

Product Ion

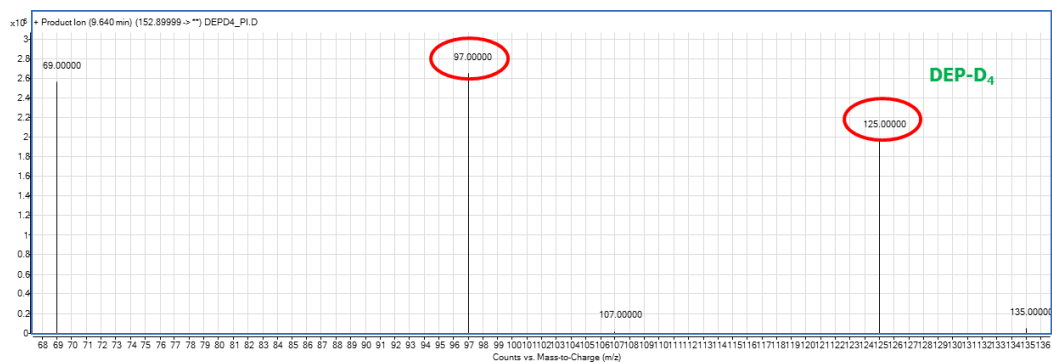


Figura 30. Espectro del DEP-D₄ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

16. DHP D₄

Full Scan

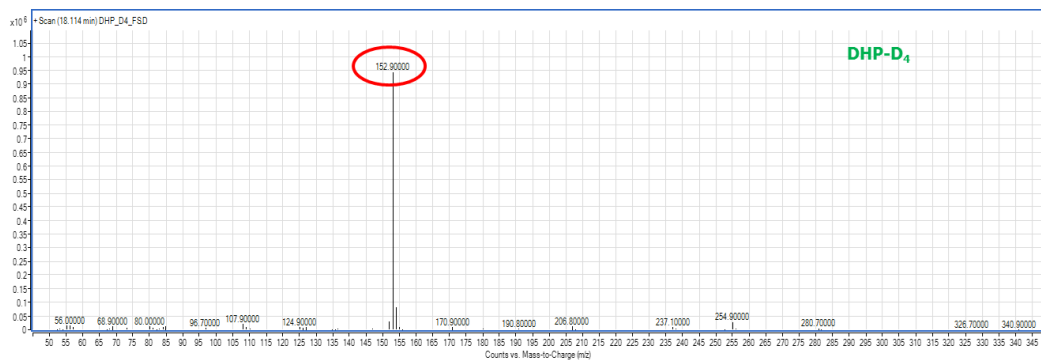


Figura 31. Espectro del DHP-D₄ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Full Scan”.

Product Ion

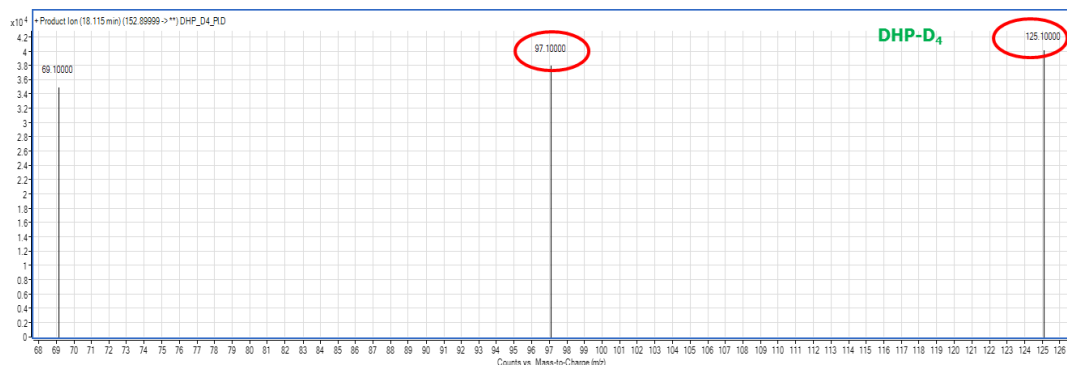


Figura 32. Espectro del DHP-D₄ obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

17. 2,4,6-TTBP

Full Scan

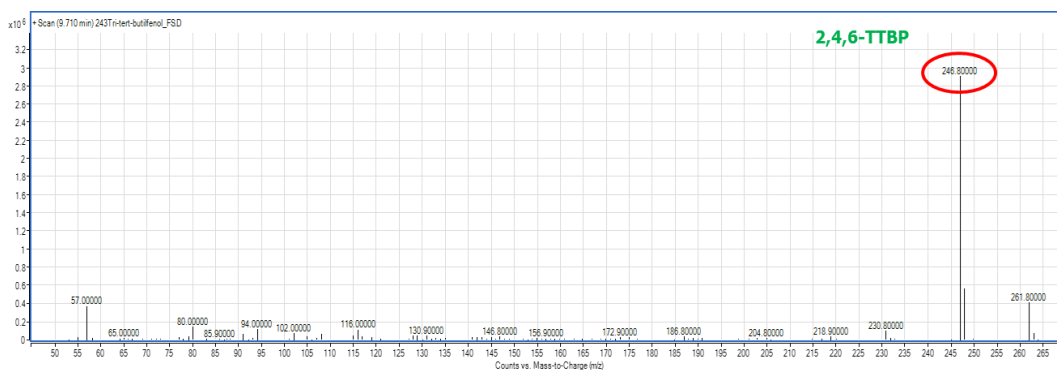


Figura 33. Espectro del 2,4,6-TTBP obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Full Scan”.

Product Ion

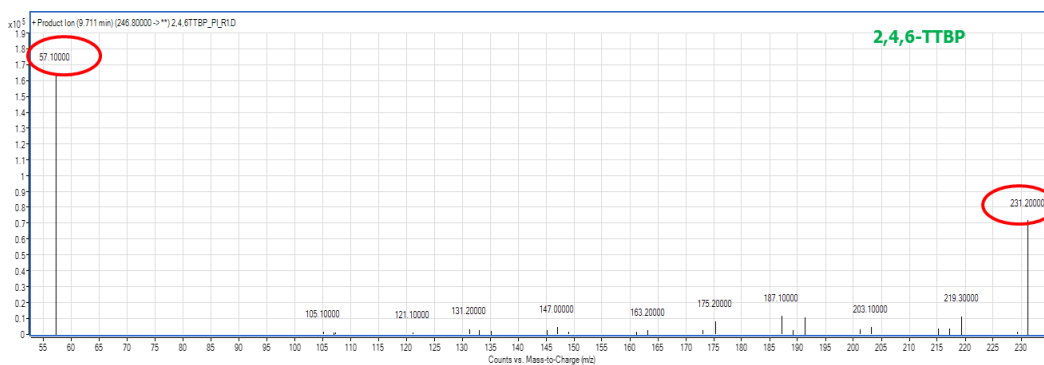


Figura 34. Espectro del 2,4,6-TTBP obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

18. Benzofenona Carbonil ¹³C

Full Scan

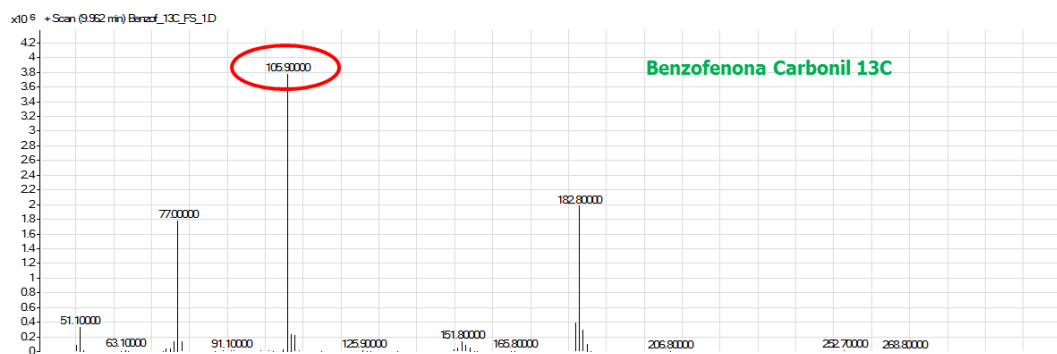


Figura 35. Espectro de la Benzofenona Carbonil ^{13}C obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Full Scan”.

Product Ion

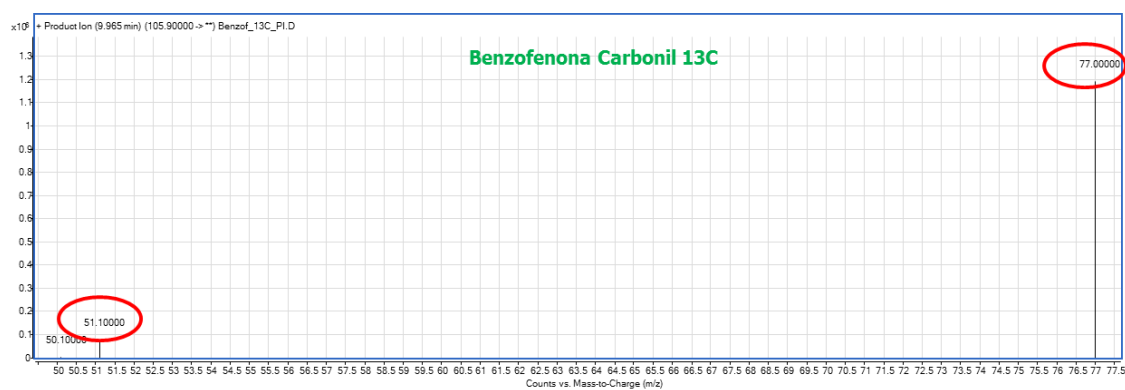


Figura 36. Espectro de la Benzofenona Carbonil ^{13}C obtenido mediante GC-MS/MS en modo “Product Ion”.

ANEXO II

Blancos Cromatográficos

1ª Prueba. Disolvente de lavado de la jeringa del inyector

En este estudio se estudia el disolvente de lavado de la jeringa del inyector. Se inyecta un patrón de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ y a continuación se realiza una inyección de acetato de etilo, evaluando así la contaminación cruzada. Se utilizan nuevos recipientes para los disolventes de lavado (A: ciclohexano, óxido de aluminio; B: ciclohexano, óxido de aluminio). Las condiciones del cromatógrafo son las siguientes:

- Inyector automático:

Etapas de limpieza de la aguja del inyector:

	Pre-inyección	Post-inyección
Lavado con disolvente A	1	4
Lavado con disolvente B	1	4
Lavado con la muestra	1	
Bombeo con la muestra	6	

Temperatura del inyector: 280°C

- Programa de temperaturas del horno:
 50°C (2min), $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$; 190°C , $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, 270°C (5min)
- Línea de transferencia:

Temperatura de la línea de transferencia: 320°C .

En la siguiente figura podemos ver el cromatograma del disolvente inyectado después de inyectar el patrón ($25\mu\text{g L}^{-1}$), observando que hay señal para los compuestos estudiados. Esto indica que se produce contaminación cruzada a pesar de incluir el óxido de aluminio en los disolventes de lavado.

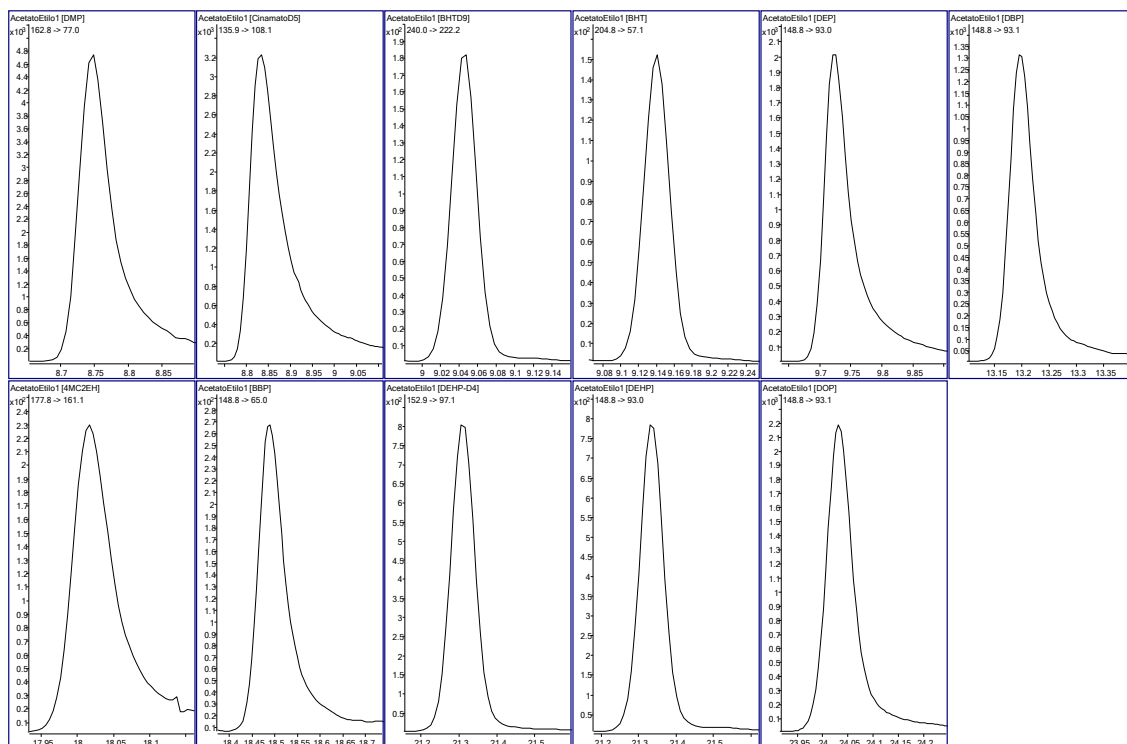


Figura 37. Cromatograma de acetato de etilo obtenido mediante GC-MS/MS en las condiciones detalladas en la prueba 1.

2ª Prueba. Aumento de las etapas de limpieza

Se incrementa el número de etapas de limpieza de la jeringa antes de inyectar, incluyendo una etapa adicional en el programa de temperaturas del horno, con el fin de limpiar la columna cromatográfica. Se inyecta un patrón de $25\mu\text{g L}^{-1}$ y, a continuación, se realiza una inyección de acetato de etilo para evaluar la contaminación cruzada, como se ha hecho en la prueba anterior. Los disolventes del lavado son los mismos que en la prueba 1 y las condiciones del cromatógrafo son:

- Inyector automático:

Etapas de limpieza de la aguja del inyector:

	Pre-inyección	Post-inyección
Lavado con disolvente A	1	4
Lavado con disolvente B	1	4
Lavado con la muestra	1	
Bombeo con la muestra	6	

Temperatura del inyector: 280°C

- Programas de temperaturas del horno:

50°C (2 min), 20°C min⁻¹; 190 °C, 5°Cmin⁻¹, 270 °C (5 min), 20°C min⁻¹, 300 °C (10 min)

- Línea de transferencia

Temperatura de la línea de transferencia: 320°C

En la figura 2 se observa que el acetato de etilo inyectado sigue presentado señal para los compuestos de interés. No obstante, las respuestas son inferiores a las señales obtenidas en la prueba 1, esto indica que es algo más favorable el incremento de las etapas de lavado de la aguja del inyector y la etapa adicional en el programa de temperatura.

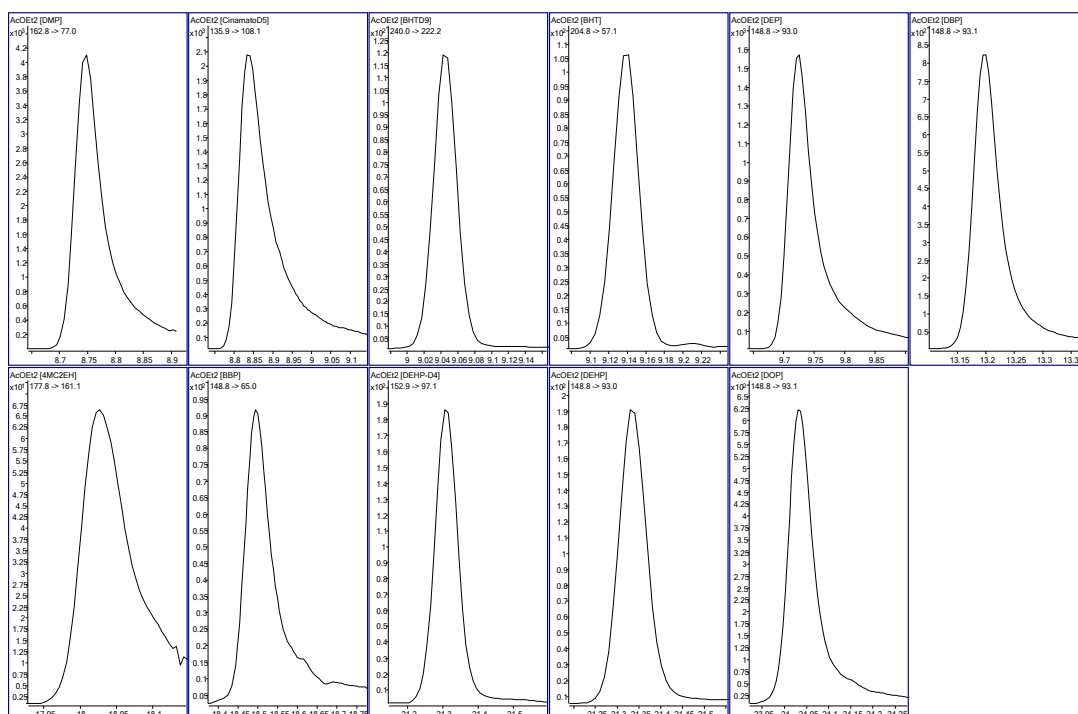


Figura 38. Cromatograma de acetato de etilo obtenido mediante GC-MS/MS en las condiciones detalladas en la prueba 2.

3ª Prueba. Cambio de liner y septum

En la 3ª prueba se sustituye el liner y el septum, lavado previamente con hexano en óxido de aluminio, por unos nuevos. Se inyectan 4 acetatos de etilo para comprobar que el equipo está limpio, observando que las respuestas disminuyen a medida que se incrementa el número de inyecciones de disolvente. Esto indica que cuando se sustituyan el liner y el septum, es necesario la inyección de varios

disolventes para limpiar y verificar que el equipo esté lo más limpio posible antes de proceder a hacer el análisis de las muestras.

Después de inyectar varios disolventes, se inyecta el patrón con la misma concentración que anteriormente, y posteriormente, se realiza una inyección de acetato de etilo para evaluar la contaminación cruzada. Los disolventes de lavado y las condiciones cromatográficas son los mismos que en la prueba 2. En la siguiente figura se muestran los cromatogramas del acetato de etilo antes y después del patrón, observando que seguimos teniendo los problemas de contaminación cruzada.

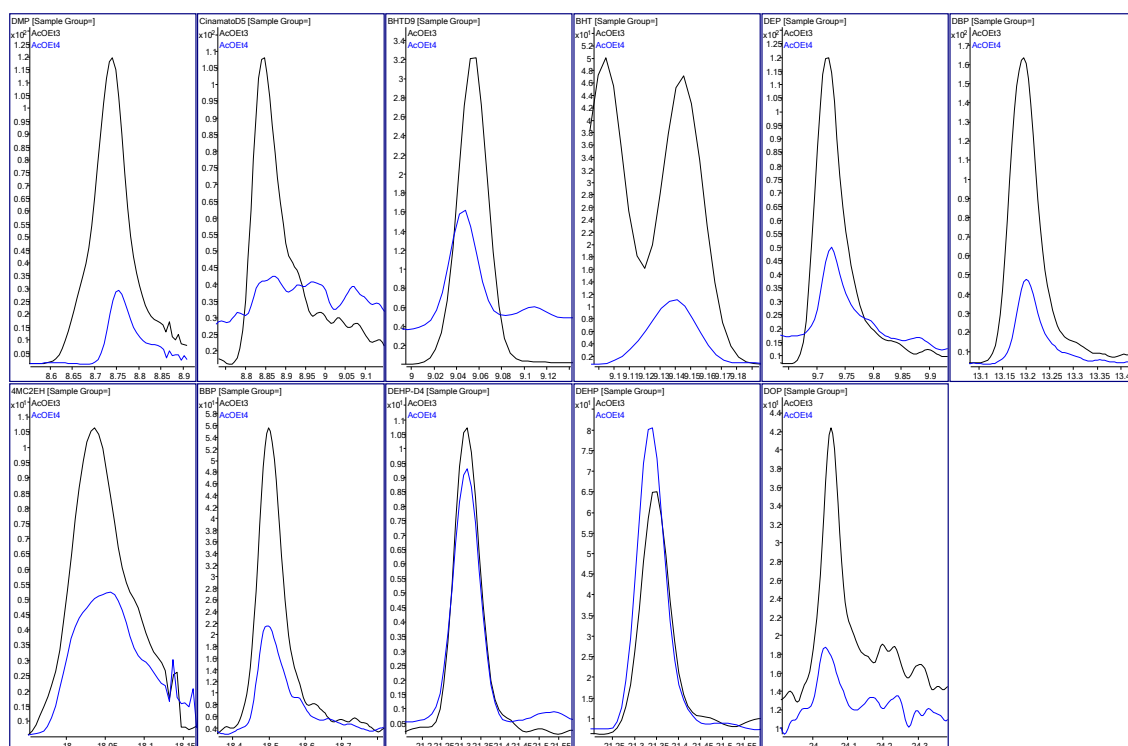


Figura 39. Cromatogramas de acetato de etilo obtenidos mediante GC-MS/MS en las condiciones detalladas en la prueba 3. Línea azul, disolvente inyectado antes del patrón; línea negra, disolvente inyectado tras el patrón.

4ª Prueba. Aumento de etapas de limpieza de la jeringa del inyector

A continuación se realiza una prueba incrementando el número de etapas de limpieza de la jeringa antes y después de la inyección, incrementando el tiempo de la etapa de limpieza en el programa de temperaturas del horno.

Se inyecta un patrón de $25\mu\text{g L}^{-1}$ y, a continuación, se realiza una inyección de ciclohexano para volver a evaluar la contaminación cruzada.

Los disolventes de lavado de la jeringa son los mismos empleados en la prueba 1 y las condiciones del cromatógrafo son las siguientes:

○ Inyector automático:

Etapas de limpieza de la aguja del inyector:

	Pre-inyección	Post-inyección
Lavado con disolvente A	6	6
Lavado con disolvente B	6	6
Lavado con la muestra	1	
Bombeo con la muestra	6	

Temperatura del inyector: 280°C

○ Programas de temperaturas del horno:

50°C (2 min), 20°C min⁻¹; 190 °C, 5°C min⁻¹; 270 °C (5 min), 20°C min⁻¹; 300 °C (13.5 min)

○ Línea de transferencia

Temperatura de la línea de transferencia: 320°C

Se observa en la siguiente figura que el acetato de etilo inyectado con estas condiciones presenta señales más bajas para los compuestos de interés, deduciendo que se reduce la contaminación cruzada.

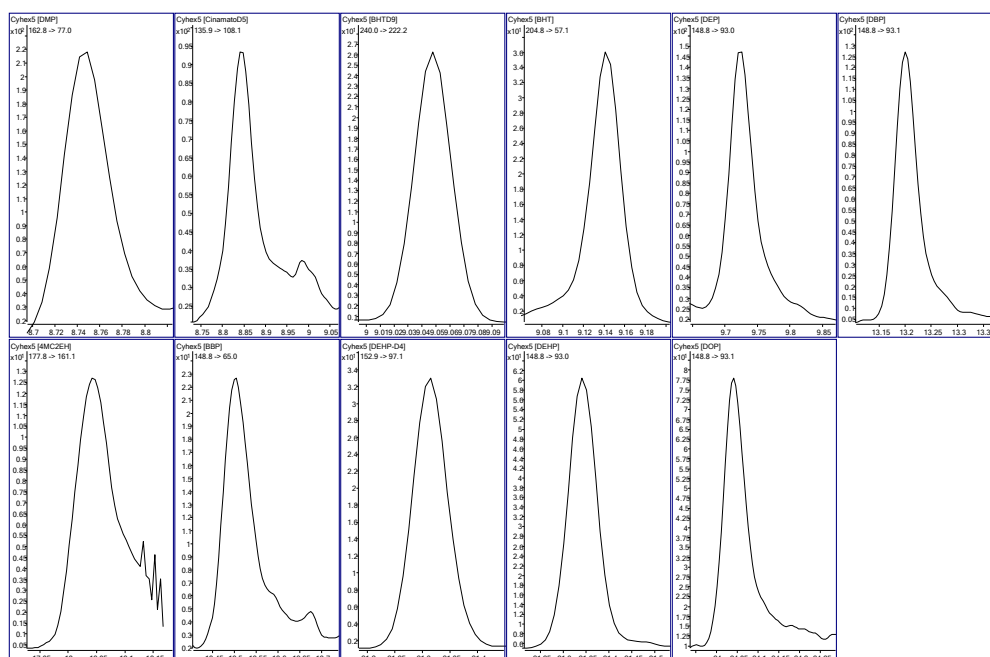


Figura 40. Cromatograma de ciclohexano obtenido mediante GC-MS/MS en las condiciones detalladas en la prueba 4.

5ª Prueba. Incremento de etapas de limpieza de la jeringa

Según los resultados anteriores, se decide incrementar el número de etapas de limpieza de la jeringa y el tiempo de la etapa de limpieza en el programa de temperaturas del horno. Se inyecta un patrón con las mismas condiciones que los anteriores y después se inyectan dos ciclohexanos. Los disolventes de lavado utilizados son los mismos que las pruebas anteriores, y las condiciones del cromatógrafo se recogen a continuación:

- Inyector automático:

Etapas de limpieza de la aguja del inyector

	Pre-inyección	Post-inyección
Lavado con disolvente A	10	10
Lavado con disolvente B	10	10
Lavado con la muestra	1	
Bombeo con la muestra	6	

Temperatura del inyector: 280°C

- Programas de temperaturas del horno:

50°C (2 min), 20°C min⁻¹; 190 °C, 5°C min⁻¹; 270 °C (5 min), 20°C min⁻¹; 300 °C (18.5 min)

- Línea de transferencia:

Temperatura de la línea de transferencia: 320°C.

El primer ciclohexano inyectado después del patrón presenta señales para todos los compuestos, indicando que sigue el problema de la contaminación cruzada. No obstante las señales disminuyen según vamos inyectando disolventes, por tanto, el equipo se limpia con ayuda de varios disolventes.

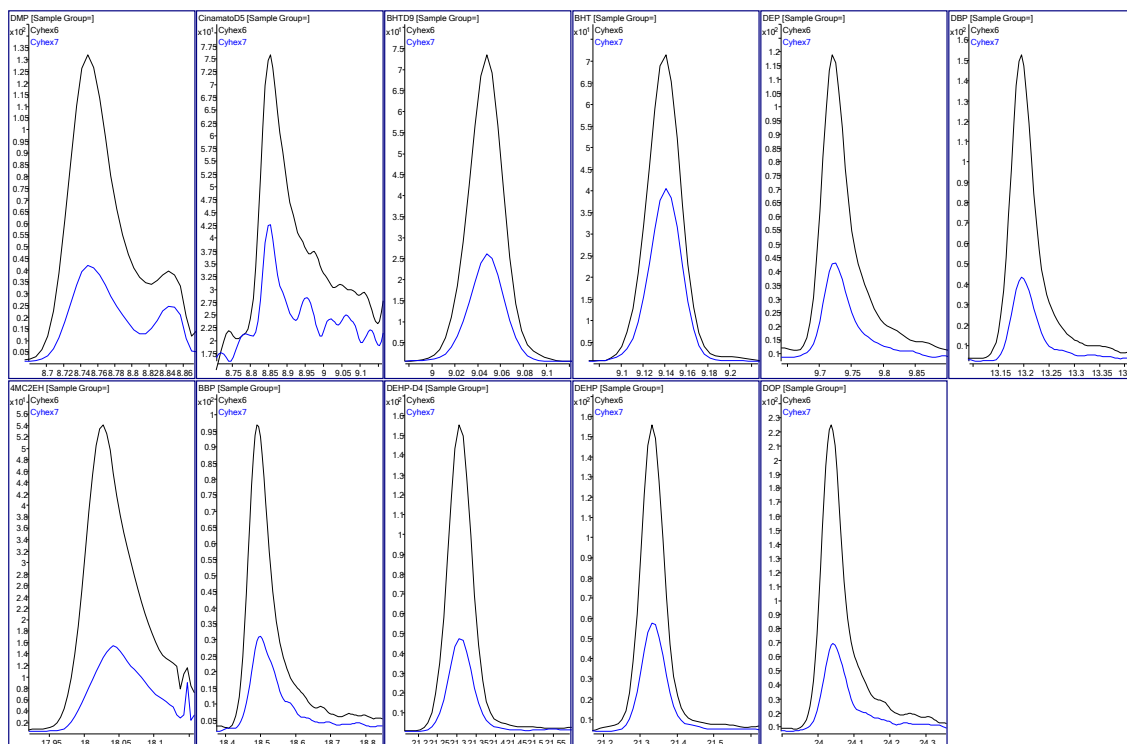


Figura 41. Cromatogramas de ciclohexanos obtenidos mediante GC-MS/MS en las condiciones detalladas en la prueba 5. Línea negra, ciclohexano inyectado tras el patrón, línea azul, segundo ciclohexano.

6ª Prueba. Cambio del 2º disolvente de lavado

Se utiliza ciclohexano conservado en óxido de aluminio (A) y acetato de etilo (B) como disolventes de lavado. Se inyecta un patrón de una concentración menor que el anterior ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) y después se inyecta el acetato de etilo. Las condiciones del equipo son las mismas que en la 5ª prueba.

Aunque disminuyen las respuestas respecto a las otras pruebas realizadas, el problema de memoria no ha desaparecido después de la inyección de un patrón.

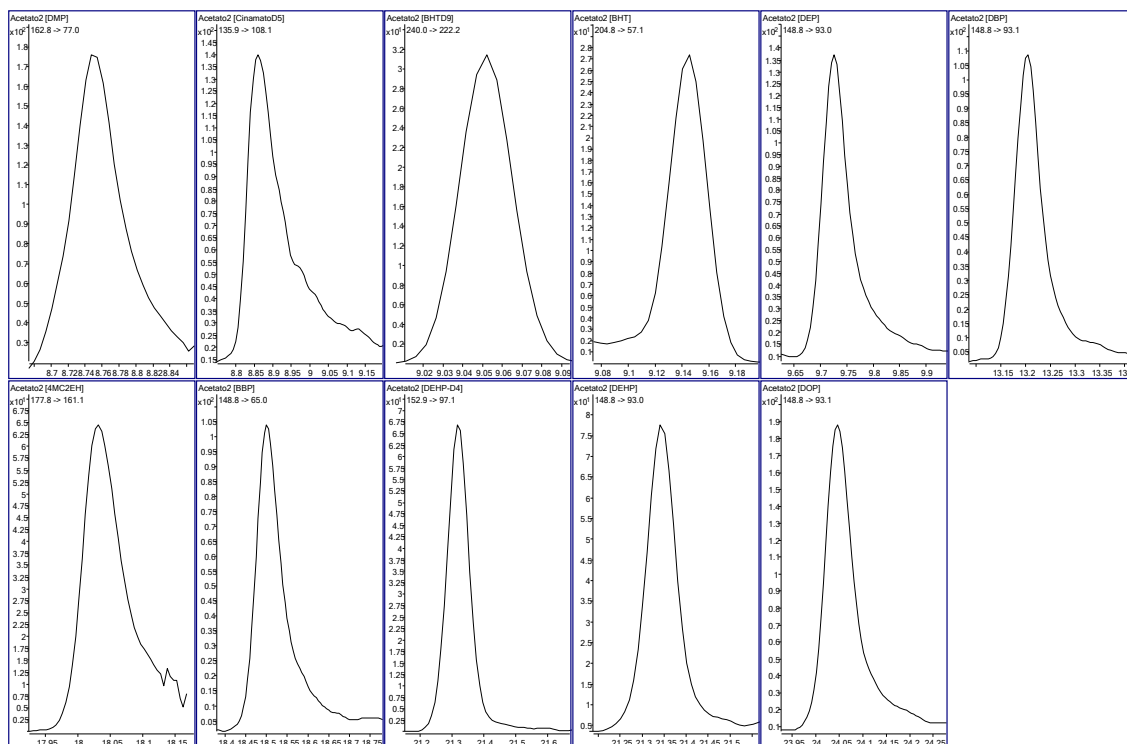


Figura 42. Cromatograma de acetato de etilo obtenido mediante GC-MS/MS en las condiciones detalladas en la prueba 6.

7ª Prueba. Programa de temperaturas en el inyector

Se establecen 6 etapas de limpieza en la inyección tanto antes como después debido a que con 10 etapas de limpieza no hay una mejora significativa. Se incluye un programa de temperaturas en el inyector, con el fin de realiza una limpieza térmica. Se inyecta un patrón de la misma concentración que el anterior y se realizan tres inyecciones consecutivas de acetato de etilo. Los disolventes de lavado son los mismos que en la prueba anterior y las condiciones del cromatógrafo son:

- **Inyector automático:**

Etapas de limpieza de la aguja del inyector

	Pre-inyección	Post-inyección
Lavado con disolvente A	6	6
Lavado con disolvente B	6	6
Lavado con la muestra	1	
Bombeo con la muestra	6	

Programa de temperaturas del inyector: 280°C (28 min), 20°C min⁻¹; 300°C (11 min)

○ Programas de temperaturas del horno:

50°C (2 min), 20°C min⁻¹; 190 °C, 5°C min⁻¹; 270 °C (5 min), 20°C min⁻¹; 300 °C (18.5 min)

○ Línea de transferencia:

Temperatura de la línea de transferencia: 320°C

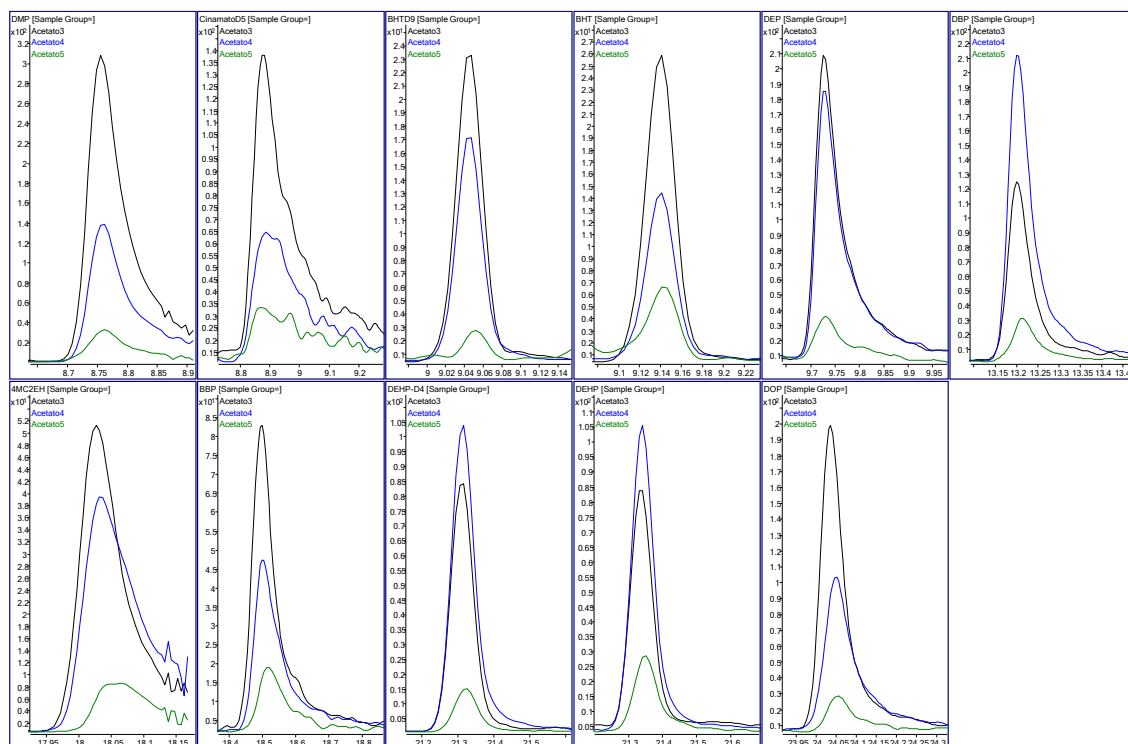


Figura 43. Cromatogramas de acetato de etilo obtenidos mediante GC-MS/MS en las condiciones detalladas en la prueba 7.

8ª Prueba. Disolvente de limpieza

Con las mismas condiciones de la prueba anterior, se inyecta el patrón y se realizan dos inyecciones consecutivas de ciclohexano. Se observa que en la segunda inyección del ciclohexano las respuestas son prácticamente despreciables para todos los compuestos, lo que indica que este disolvente limpia mejor que el acetato de etilo, aunque se observa contaminación cruzada.

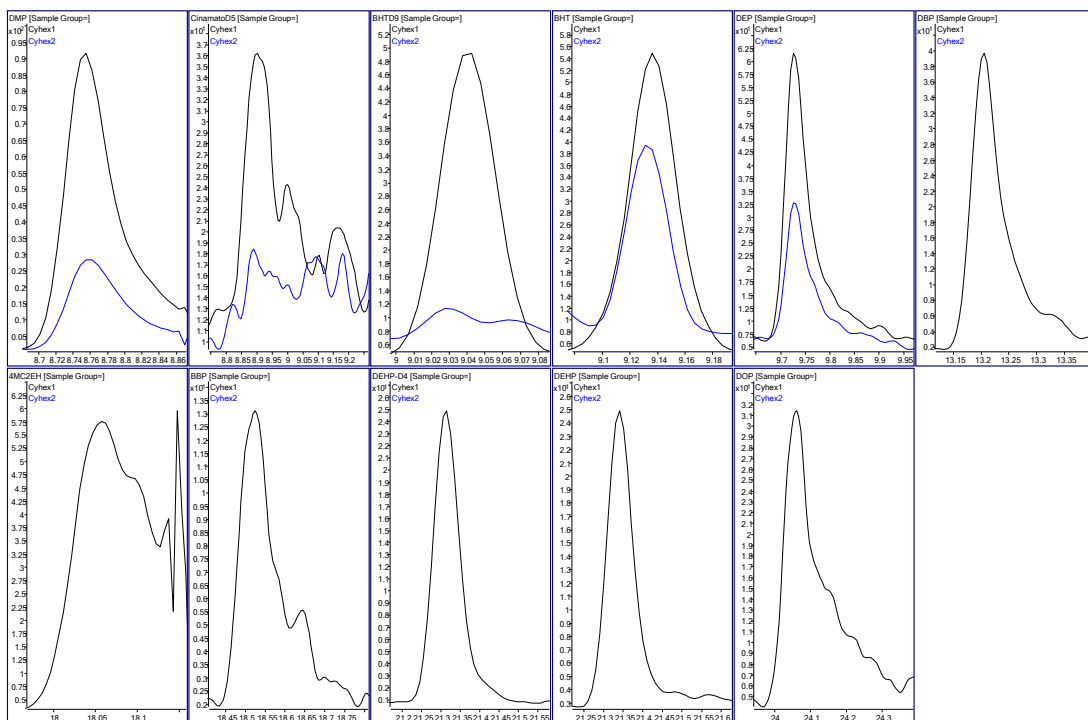


Figura 44. Cromatogramas de ciclohexano obtenidos mediante GC-MS/MS en las condiciones detalladas en la prueba 8.

9ª Prueba. Incremento en las temperaturas del programa del inyector y del horno

Se incrementa la temperatura del programa del inyector y del horno a 320°C. Se inyecta un patrón y a continuación un ciclohexano. Los disolventes de lavado utilizado son los mismos que en la prueba 6 y las condiciones del cromatógrafo se recogen a continuación:

- **Inyector automático:**

Etapas de limpieza de la aguja del inyector

	Pre-inyección	Post-inyección
Lavado con disolvente A	6	6
Lavado con disolvente B	6	6
Lavado con la muestra	1	
Bombeo con la muestra	6	

Programa de temperaturas del inyector: 280°C (28 min), 20°C min⁻¹; 300°C (11 min)

- **Programas de temperaturas del horno:**

50°C (2 min), 20°C min⁻¹; 190 °C, 5°C min⁻¹; 270 °C (5 min), 20°C min⁻¹; 300 °C (7.5 min)

- Línea de transferencia:

Temperatura de la línea de transferencia: 320°C.

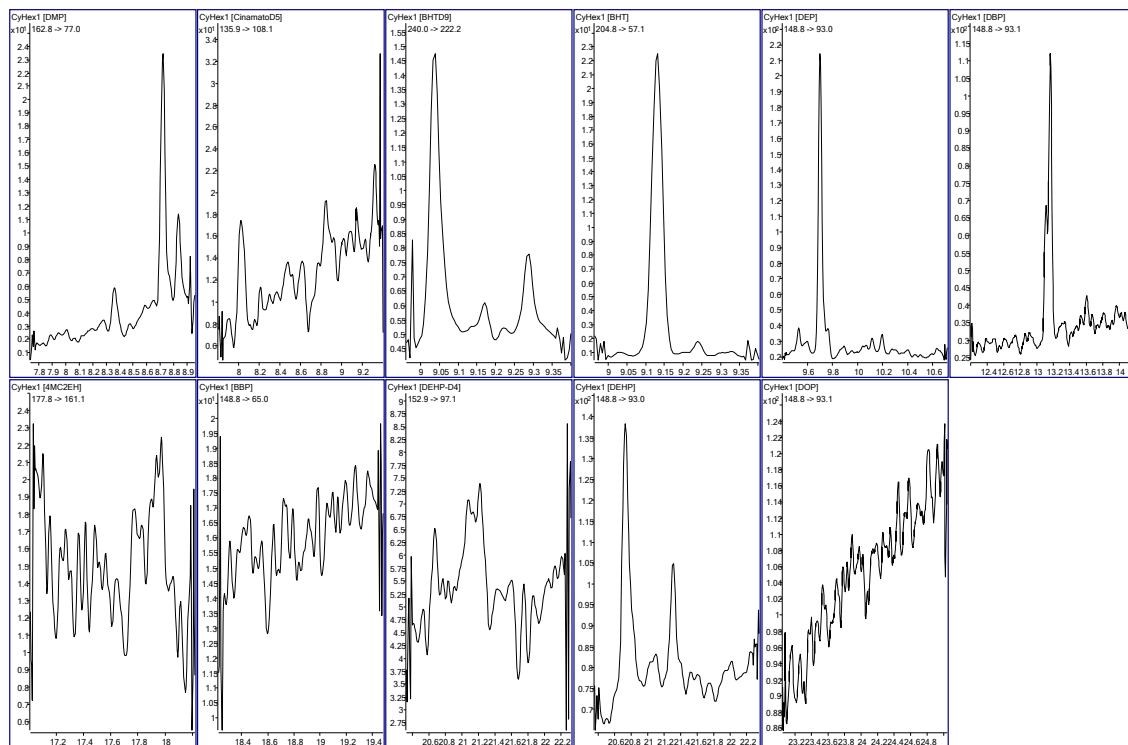


Figura 45. Cromatograma de ciclohexano obtenido mediante GC-MS/MS en las condiciones detalladas en la prueba 9.

Las señales obtenidas son despreciables para todos los compuestos de interés, lo que indica que trabajando en estas últimas condiciones se consigue minimizar los problemas de contaminación cruzada.