

ISSN 0379-9123

VOL. 22
N° 1

SOCIEDAD CIENTÍFICA DEL PARAGUAY

R E V I S T A

Tercera Época. Año XXII



Estudio de caso: Validación del método SPME-GC/MS para la determinación del Metil Tert-butil Éter y sus productos de degradación en agua subterránea

Case study: Validation of the SPME-GC / MS method for determination of Methyl Tert-Butyl Ether and its degradation products in groundwater

¹Roberto Nuñez, ²Hugo Leguizamón, ²Claudia Velazco, ²Alison Alegre,
¹Cynthia Bernal, ¹Juan Facetti .F.,

1Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ingeniería, Cátedra de Química General
2Analítica S.A. Dirección de Laboratorio de Alta Complejidad. Grupo SUMI.
San Lorenzo - Paraguay
oben84@hotmail.com

Recibido: 20/05/2017

Aceptado: 30/06/2017

Resumen: El Metil tert-butil Éter (MTBE) es un combustible oxigenado ampliamente utilizado en Paraguay, así como en muchos países de América del Sur como elevadores del octanaje para reemplazar los aditivos tóxicos prohibidos en la gasolina. En varios países europeos se encontró en aguas subterráneas debido a la fuga de tanques de gasolina. Se realizó la validación del método analítico para MTBE y sus sub-productos de degradación como Tert-butil Alcohol (TBA) y Tert-butil Formiato (TBF) mediante micro extracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (SPME-GC/MS), utilizando procedimientos estandarizados de validación. Este método está todavía en desarrollo incluyendo el enfriamiento de la fibra de extracción. En este estudio, la temperatura de la fibra fue de 21-25°C. Otros parámetros evaluados fueron: especificidad, linealidad, sensibilidad, límite de detección, exactitud, incluyendo una evaluación de la veracidad y precisión. El volumen de muestra fue de 5mL con el agregado de 1,8 gramos de NaCl como modificador de matriz, la muestra es extraída a temperatura constante de 35°C con agitación constante por exposición de la fibra en el Headspace durante 30 minutos bajo una temperatura entre 21 a 25°C. Se trazó una curva de calibración lineal en el intervalo de 0-200 µg/L para MTBE. El r² del método fue 0,9991 -0,9925 y 0,9992 para MTBE, TBA y TBF respectivamente, con desviación estándar relativa de 0,5 a 6,6%. Los Límites de Detección Inferiores obtenidos fueron de 0,009 µg/L para MTBE; 0,029 µg/L para TBA y 0,010 µg/L de TBF. La exactitud se evaluó con veracidad y precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, obteniendo recuperaciones entre 100,4 y 106,8% con desviación estándar relativa hasta 6,4%. Este método cumple con los criterios de validación dentro de los niveles de concentración, ofrece alta sensibilidad y selectividad suficiente para la investigación bioanalítica y por lo tanto es adecuado para el uso rutinario en el análisis de estas moléculas orgánicas en agua potable y subterránea.

Palabras claves: extracción de Headspace y microextracción en fase sólida (SPME), MTBE, TBF, TBA, cromatografía de gases, espectrometría de masas, validación.

Abstract: Methyl tert-butyl ether (MTBE) is a fuel oxygenate widely used in Paraguay as well as in many South American countries as octane enhancers to replace toxic additives that have been phased out of gasoline. In several European countries was founded in groundwater due to leaking of gasoline tanks in the ground. Validation of the analytical method was performed for MTBE and its bi-products of degradation as tert-butyl alcohol (TBA) y tert-butyl formate (TBF) by solid phase micro-extraction and gas-chromatography coupled with mass spectrometer (SPME-GC/MS) using standard validation procedures. This method is still under development including the cooling of the extraction fiber. Under this study, the fiber temperature was 21-25°C. Other parameters evaluated were: specificity, linearity, sensitivity, detection limit, accuracy, including an evaluation of the veracity and precision. 5mL of sample with 1.8g of NaCl added as matrix modifier, extracted with continuous steering at 35°C for 30 minutes. A linear calibration curve was plotted over the range of 0-200 µg/L for MTBE. The lineal r² of the method were 0.9991 -0.9925 and 0.9992 for MTBE, TBA y TBF respectively, with relative standard deviation of 0.5 to 6.6%. The Lower Detection Limits obtained were 0.009µg/L for MTBE; 0.029µg/L for TBA and 0.010µg/L TBF. Accuracy was evaluated with veracity and precision in conditions of repeatability and reproducibility obtaining recoveries between 100.4 y 106.8% with relative standard deviation up to 6.4%. In addition temperatre range, ie. 21-25°C, showed to be appropriate. This method fulfill validation criteria within the levels of concentration, offered high sensitivity and selectivity enough for bioanalytical investigation and thus is adequate for routine use in the analysis of these analytes in drinking water and groundwater.

Key words: Head Space extraction and Solid Phase Micro-Extraction (SPME), MTBE, TBF, TBA, Gas Chromatography, Mass Spectrometry, Validation.

1. Introducción

El MTBE es un oxigenante de combustibles, comúnmente utilizado para aumentar la eficiencia de la combustión y disminuir la contaminación del aire. La emisión del MTBE ocurre durante la manipulación de combustibles en las estaciones de servicio y se ha convertido en un contaminante de aguas subterráneas debido a su alta solubilidad, bajo coeficiente de partición octanol-agua, fácil movilidad y limitada degradación [1]. Consecuentemente el MTBE ha sido encontrado como uno de los más frecuentes contaminantes de aguas subterráneas en los últimos años. La introducción de MTBE en el subsuelo por fuentes puntuales como ser fugas de tanques de almacenamiento subterráneos, puede constituir un riesgo para las aguas subterráneas, no sólo debido al bajo nivel límite de olor y sabor, sino también por la toxicidad del éter que aún no está claramente entendida, aunque la OMS ha descrito algunos efectos mutagénicos y carcinógenos en animales expuestos [2,3].

Estudios realizados en España en pozos cercanos a contenedores subterráneos donde se comprobaron fugas, se encontró un aumento de 666 mg/L de MTBE y su producto de degradación el Tert-butyl Alcohol (TBA), de 0,1 a 62mg/L a cuatro años de la detección de la fuga. Por los niveles registrados, se observó que el MTBE migra en el agua ya que fueron encontradas concentraciones del mismo en zonas más alejadas de la fuente de contaminación².

El MTBE se describe generalmente como un compuesto "recaitrante", relacionado esto con el enlace éter químicamente no reactivo [4,5] y el átomo de carbono terciario. Sin embargo hay algunas condiciones en las que la molécula puede ser degradada debido a la presencia de un oxidante o comunidades microbianas altamente activas [6]. Las velocidades de degradación son generalmente lentas, pero los principales productos de su degradación son en todos los casos, Tert-butyl Formiato (TBF) por fotooxidación atmosférica y TBA en la fase acuosa, este último muy soluble en agua y con demostrada toxicidad y carcinogenicidad en ratas y ratones [7]. Por otra parte, la acumulación de TBF en fase acuosa no se observa por lo general debido a que se hidroliza fácilmente a TBA[8].

Debido a las características de volatilidad que presentan estos compuestos se han desarrollado varias técnicas analíticas basadas en la extracción por Headspace y Microextracción en fase sólida (SPME) utilizando diversas condiciones y analizadas por cromatografía gaseosa acoplado a espectrometría de masas dando resultados satisfactorios aplicados en cada caso particular. Sin embargo estas técnicas aún se encuentran en desarrollo, habiéndose encontrado evidencias de que la temperatura de la fibra de extracción influye en la extracción del analito [9 - 11].

El objetivo de este trabajo es proveer la validación de la referida técnica analítica y verificar el desempeño del instrumental de laboratorio. Los resultados pueden proporcionar una guía práctica en la implementación del método de validación visando programas internos de aseguramiento de la calidad. El trabajo realizado comprende el estudio de un método por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas, por extracción de la muestra por medio de una fibra de microextracción en fase sólida del Headspace a temperaturas entre 21 y 25°C, utilizando un patrón de MTBE isotópicamente marcado con deuterio y evaluando los parámetros de eficacia para la estandarización del método. Posteriormente se realiza la validación del método más eficaz según las normativas internacionalmente aceptadas.

2. Materiales y Métodos

Patrones

Se utilizaron patrones de MTBE marca Fluka con pureza de 99,9%, TBA marca Fluka con pureza de 99,9%, TBF con pureza de 99,0%. Como patrón interno se utilizó el MTBE-d3 marcado isotópicamente con deuterio de la marca Fluka con una pureza de 99,0%. Se prepararon soluciones madre diluidas con metanol y de las mismas se realizaron diluciones en agua tratada por medio de calentamiento a ebullición por dos horas para eliminar cualquier contaminante que pueda interferir [12].

Muestreo de agua

Las muestras de agua son colectadas en viales de 40mL siguiendo los procedimientos de muestreo normalizados para agua potable y subterránea [13, 14].

Proceso de extracción

La extracción de los analitos de interés fue realizada por medio de la microextracción en fase sólida con ayuda del inyector automático AOC 5000 provisto de un módulo de SPME con fibra de extracción de 75µm de Polidimetilsiloxano/carboxen. El volumen de muestra fue de 5mL con el agregado de 1.8 gramos de NaCl pro análisis como modificador de matriz, la muestra es extraída a temperatura constante de 35°C con agitación constante por exposición de la fibra en el Headspace durante 30 minutos bajo una temperatura entre 21 a 25°C. Una vez que la extracción es completada, la fibra es inyectada en el cromatógrafo gaseoso.

Equipamiento

El análisis fue realizado con un cromatógrafo de fase gaseosa acoplado a un espectrómetro de masas de la marca Shimadzu, modelo QP-2010 Plus equipado con una columna capilar marca Restek VMS de 30 metros de longitud, 0,25mm de diámetro 1,4µm de espesor del film, provisto de un sistema de inyección automática AOC-5000 con módulo de microextracción en fase sólida. La temperatura del puerto de inyección fue de 200°C en modo split con radio de 10, el ciclo de calentamiento de la columna fue de 35°C (7min), 4°C/min hasta 90°C (0min), 35°C/min hasta 220°C (2 min) con una velocidad de 34 cm/s. El espectrómetro de masas cuenta con un modo de ionización por impacto electrónico (EI) a 70eV, la temperatura de interface entre el cromatógrafo y el espectrómetro de masas fue de 240°C, la temperatura de la cámara de ionización fue utilizada a 230°C, el tiempo de adquisición fue de 4 a 20 minutos utilizando los iones característicos para cada analito (Tabla 1).

Compuesto	Ion Target	Ion de Ref. 1	Ion de Ref. 2
MTBE	73	41	57
TBA	59	41	57
TBF	59	56	57
MTBE d3	76	41	57

Tabla 1: Iones característicos utilizados en el espectrómetro de masas

Validación

El proceso de validación fue realizado según lineamientos de la guía de validación de metodologías analíticas de Eurachem [15]. Los parámetros evaluados incluyen la selectividad, linealidad, sensibilidad, límites de detección, exactitud, incluyendo una evaluación de la veracidad y precisión. La selectividad fue evaluada midiendo la capacidad de detección del analito en una muestra fortificada comparada a un blanco de muestra y un blanco de reactivos. La linealidad fue evaluada por medio de una curva de calibración en el rango de 0 a 200µg/L. La sensibilidad del método fue obtenido a partir de la curva de calibración realizada, la cual describe la variación de señal por unidad de concentración. La exactitud fue evaluada determinando la veracidad del método por medio del análisis de recuperación de fortificados en muestras reales. También fue determinada la precisión por medio de análisis en réplicas de una muestra de referencia en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia. Los límites de detección de los compuestos de interés fueron

determinados por medio del análisis de señal del analito y el ruido del instrumento, considerando un valor de señal/ruido de 3 para el límite de detección.

Todos los parámetros de validación fueron evaluados bajo el sistema de gestión de calidad de la Norma ISO 17025, asegurando las condiciones ambientales adecuadas, para así evitar la pérdida de los analitos y el control continuo de los parámetros que puedan afectar al proceso, como ser la temperatura del ambiente de trabajo.

3. Resultados y discusión

Selectividad

Debido a que el método de detección contempla la utilización de tres iones característicos del espectro de masas para la cuantificación e identificación de cada compuesto, la identificación de cada uno es realizada en forma inequívoca y la señal de los analitos no posee una interferencia significativa de la matriz. Se determinó además el porcentaje de señal de los blancos analizados comparados a la muestra fortificada dando una señal del MTBE en el blanco de muestra y blanco de reactivos de 0,02% y 0,06% respectivamente. El análisis de TBA arrojó valores promedio de 0,56% y 0,34% para el blanco de muestra y de reactivos. El TBF no presentó una señal en la zona del tiempo de retención del compuesto en ambas pruebas, dando resultados de 0,00%. Por tanto se considera que el método es selectivo para la identificación y cuantificación del MTBE y sus productos de degradación.

Linealidad y Sensibilidad

De acuerdo a las curvas de calibración realizadas analizando niveles de concentración de 0,0 – 0,2 – 2,0 – 10,0 – 50,0 – 100,0 y 200,0µg/L se determinó una relación lineal existente entre la concentración del analito y la relación de la señal del detector correspondiente y la señal del patrón interno para los tres compuestos en estudio. En la figura 1 se presentan las curvas de calibración para los cuales los coeficientes de correlación r^2 obtenidos fueron de 0,9991 - 0,9925 – 0,9992 para MTBE, TBA y TBF respectivamente con desvío estándar relativo de 0,5 a 6,6%. Por tanto se considera que el método es lineal hasta una concentración de 200,0µg/L para los tres compuestos. La Sensibilidad del método fue calculado a partir de la pendiente de la curva de calibración de cada compuesto, obteniéndose un valor para MTBE de 0,1465, 0,0141 para TBA y 0,0520 para TBF. Por tanto se observa que el método tiene una mayor sensibilidad para el MTBE, seguido del TBF y por el TBA.