



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Metodología para el análisis de contaminantes emergentes en
aguas residuales urbanas y ganaderas**

Autor: Miguel Ángel de la Serna Calleja

Tutor/es: Rebeca López Serna, Juan José Jiménez Sevilla

Tabla de contenido

1	RESUMEN	3
2	ABSTRACT	4
3	INTRODUCCIÓN	5
3.1	Problemática medioambiental:	5
3.1.1	Los purines	5
3.1.2	Las aguas residuales	8
3.2	Contaminantes emergentes:	12
3.2.1	Fármacos y contaminantes emergentes	12
3.2.2	Clasificación de los CECs considerados en este trabajo	13
3.2.3	Incidencia de Contaminantes emergentes en aguas	16
3.2.4	Eliminación de fármacos en aguas residuales con microalgas	18
3.3	Métodos de análisis de fármacos en muestras líquidas	20
3.3.1	Avance histórico del análisis de fármacos en matrices líquidas.....	20
3.3.2	Extracción en fase sólida (SPE).....	22
3.3.3	Cromatografía de líquidos de alta y ultra-alta eficiencia (HPLC y UHPLC)	22
3.3.4	Espectrómetro de masas	23
3.4	Algunos estudios centrados en CECs en matrices acuosas:	25
4	OBJETIVOS DEL TRABAJO	30
5	PARTE EXPERIMENTAL	30
5.1	Material y reactivos	30
5.2	Muestras analizadas	31
5.2.1	Agua Milli-Q	31
5.2.2	Agua residual urbana.....	31
5.2.3	Agua residual ganadera	32
5.3	Dopado de muestra	32

5.4	Preparación de muestra	34
5.4.1	Pretratamiento.....	34
5.4.2	Preparación de disoluciones dopadas.....	34
5.4.1	Extracción en fase sólida, SPE offline	35
5.5	Determinación cromatográfica	37
6	RESULTADOS Y DISCURSIÓN	43
6.1	Selección del volumen de inyección	43
6.1.1	Tratamiento de datos	43
6.1.2	Agua Milli-Q	55
6.1.3	Agua residual urbana.....	58
6.1.4	Agua residual ganadera	62
6.2	Comparación con la SPE Off-line	65
6.3	Influencia de factores. Análisis estadístico	64
6.3.1	Influencia del AEDT	64
6.3.2	Influencia del volumen de inyección.....	65
6.3.3	Análisis multifactorial	66
6.4	Validación de los métodos analíticos	68
6.4.1	Efecto memoria.....	68
6.4.2	Tasa de recuperación absoluta	71
6.5	Incidencia de los compuestos en las muestras de agua residual	75
7	CONCLUSIONES	80
8	BIBLIOGRAFÍA	82
9	ÍNDICE DE FIGURAS	86
10	ÍNDICE DE TABLAS	87

1 RESUMEN

La preparación de muestra para el análisis de microcontaminantes orgánicos en muestras de agua residual se lleva a cabo comúnmente mediante procedimientos de extracción en fase sólida que permiten la preparación conjunta de varias muestras, pero involucran diferentes operaciones de laboratorio; el tiempo de preparación de muestra requerido es del orden de varias horas además del posterior tiempo de análisis cromatográfico. En consecuencia, sería interesante disponer de métodos de análisis automatizados. En esta línea, este trabajo presenta los resultados de un estudio en el que se realiza una extracción en fase sólida acoplada on-line con un sistema de cromatografía UHPLC-MS/MS para la determinación multiresiduo de drogas de uso veterinario y farmacéutico en aguas residuales (influyente y efluente de una depuradora). Como alternativa se ensaya también la inyección directa de grandes volúmenes de agua en el sistema cromatográfico y los resultados de ambos métodos automatizados se comparan con aquellos de una extracción rutinaria en fase sólida off-line. Los volúmenes de inyección adecuados se han seleccionado con la premisa de obtener bajos límites de cuantificación dado que se trata de un análisis de trazas. En las condiciones seleccionadas se han establecido parámetros analíticos básicos como el rango de linealidad, límites de detección y cuantificación y efecto memoria. Se ha trabajado con muestras reales determinando la concentración de las drogas presentes en ellas y su grado de eliminación en el proceso de depuración.

2 ABSTRACT

Sample preparation for analysis of organic micro-pollutants in wastewater samples is commonly carried out by solid-phase extraction procedures that allow the co-preparation of several samples but involve different laboratory operations; the sample preparation time required is of the order of several hours in addition to the subsequent chromatographic analysis time. It would therefore be interesting to have automated methods of analysis. In this line, this paper presents the results of a study in which a solid phase extraction coupled on-line with a UHPLC-MS/MS chromatography system is performed for the multi-residue determination of veterinary and pharmaceutical drugs in wastewater (influent and effluent from a treatment plant). Alternatively, the direct injection of large volumes of water into the chromatographic system is tested and the results of both automated methods are compared with those of routine off-line solid phase extraction. Suitable injection volumes have been selected on the premise of low limits of quantification since this is a trace analysis. Under the selected conditions, basic analytical parameters such as linearity range, detection and quantification limits and memory effect have been established. Work has been carried out with real samples to determine the concentration of drugs present in them and their degree of elimination during the purification process.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Problemática medioambiental:

3.1.1 Los purines

Son los residuos obtenidos de la mezcla de los excrementos sólidos y líquidos del ganado, las aguas residuales procedentes del lavado del propio ganado y la explotación ganadera, y los restos de alimentos del ganado. Generalmente son provenientes del ganado porcino y bovino en granjas de explotación (elevado número de ganado frente a poco espacio para el mismo).

Centrándonos en valores del sector español, el sector porcino español ya es el segundo en cuanto a producción de ganado a nivel europeo tras Alemania (más de 25 millones de cabeza y 90000 explotaciones) y genera más del 20% de la producción europea de purines con un valor cercano a los 50 millones de toneladas anuales de dicho residuo. De toda esa cantidad de residuo, se desaprovechan valores cercanos al 30% porque se liberan al medio sin tratar, no hay zonas cercanas donde usarse como abono, la aportación es excesiva... [1]

Si bien, los purines han sido residuos generados desde el comienzo de la ganadería porcina, antes estos residuos se utilizaban de abono sin apenas necesidad de tratamiento y eran incluso beneficiosos. Sin embargo, es en la actualidad debido a la aparición de grandes explotaciones intensivas cuando ese beneficio se ha convertido en una de las mayores preocupaciones medioambientales y sanitarias actuales. Esto es debido a la gran densidad de ganado (cabezas de ganado por hectárea) que hay en este tipo de explotaciones actuales.

Estos residuos sobrantes que no son aprovechados como abono han de ser mandados a plantas de tratamiento porque si no se tratan o utilizan, generan grandes peligros como:

- La emisión de gases de efecto invernadero (metano, amoníaco) debido a su descomposición.
- Contaminación de aguas superficiales o incluso subterráneas (por filtración de dichos purines por el suelo) por parte de los nitratos que se encuentran en altas concentraciones.
- Contaminación del suelo debido a la alta cantidad de nutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio) y materia orgánica.

En 1998 se aprobó un Real Decreto en España que incentiva proyectos privados que se encarguen de transformar los purines en agua limpia y abono orgánico seco (utilizable en el sector agrícola), además de generar electricidad y aporte de calor (energía eléctrica y térmica). Aún con estas ayudas, en España hay alrededor de 30 plantas de tratamiento de este tipo impulsadas por la Asociación de Empresas para el Desimpacto Ambiental de los Purines (ADAP), mientras que en Alemania hay en torno a 9000. [1]

Lo común con los purines sobrantes era almacenarlos en balsas que son una especie de fosas con material aislante (que evita que se filtre al suelo y pase al agua subterráneo) y al aire libre. Esto tiene múltiples inconvenientes ya que al paso del tiempo el purín va descomponiéndose y puede corroer el aislante y acabar filtrándose al subsuelo, además de que emite gases de efecto invernadero a la atmósfera.

El gran problema de los purines es que, como todo problema emergente, no está correctamente regulado y las sanciones son muy bajas frente al daño que pueden causar.

En la Tabla 1 se muestra la cantidad de residuo total ganadero frente los purines anualmente, en millones de toneladas generada por la ganadería extensiva:

Tabla 1: Cantidad residuo ganadero en millones de toneladas frente al residuo de purines

País	Purines	Total residuos ganaderos
Alemania	78	222
Austria	6	28
Bélgica	12	28
Dinamarca	--	28
España	41	191
Finlandia	2	18
Francia	26	250
Grecia	2	40
Holanda	15	76
Irlanda	1	26
Italia	8	118
Luxemburgo	0.1	2
Portugal	--	25
Reino Unido	10	91
Suecia	--	23
Total	201	1166

Fuente: European Commision – DG Environment (2001a).

Como se puede observar en la Tabla 1 el porcentaje de residuos que constituyen los purines varía mucho en los países de la Unión Europea. Se ve a España rondando el 25% de residuos referido a los purines. [2]

Desde el punto de vista químico los purines son residuos muy complejos debido a su gran heterogeneidad ya que depende de la dilución en agua, el tipo de cría, alimentación, limpieza... Además, contienen mucha variedad de compuestos químicos como se muestra en la Tabla 2 a nivel nacional y europeo.

De todos los compuestos que se muestran en la Tabla 2, cabe destacar que varios sirven para el uso como fertilizantes (K_2O , P_2O_5 y los de nitrógeno) y otro parámetro de interés es la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) que como puede verse a nivel nacional es muy elevada y esto es uno de los motivos por los que se considera contaminante (alta DBO provoca dificultades a otros organismos que requieran oxígeno para desarrollarse).

Tabla 2: Composición de purines sólidos y líquidos en la UE y España

	UNIÓN EUROPEA		ESPAÑA
	Purines Sólidos	Purines Líquidos	Purines Líquidos
Sólidos (%)	25	1 - 18	5 - 7
Materia Orgánica (%)	16,0	3,4 - 7,0	
DBO (mg l-1)	--	--	5.000 - 25.000
N-TK (%)	0,5 - 0,7	0,2 - 1,6	
N-NH4 (%)	0,07 - 0,25	0,21 - 0,36	0,30 - 0,50
P_2O_5 (%)	0,10 - 0,76	0,10 - 1,20	0,10 - 0,30
K_2O (%)	0,4	0,2 - 0,9	0,10 - 0,30
CaO (%)	0,60	0,14 - 0,67	
MgO (%)	0,25	0,05 - 0,18	
Na_2O (%)	--	0,08 - 0,09	
Cd (ppm p.s.)	0,7	0,2 - 0,5	
Cr (ppm p.s.)	1,9	2,4 - 18,0	
Cu (ppm p.s.)	346	180 - 574	333 - 666
Hg (ppm p.s.)	--	0,05	
Ni (ppm p.s.)	5,0	3,2 - 17,0	
Pb (ppm p.s.)	2,8	<1,0 - 12,0	
Zn (ppm p.s.)	387	403 - 919	333 - 666
Se (ppm p.s.)	--	0,6	

Fuente: European Commission – DG ENV (2001a) y Hall (1999).

3.1.2 Las aguas residuales

Se considera agua residual a agua usada de cualquier tipo (urbana, domestica, de riego...) o aguas que se han mezclado en algún momento con las anteriores. Este tipo de aguas en países desarrollados y, sobre todo en zonas urbanas, se conduce por alcantarillado hasta una depuradora, aunque hay casos que se usan fosas sépticas que son altamente perjudiciales para el medio ambiente porque esta agua puede filtrarse de esa fosa a acuíferos y aguas subterráneas contaminando lo que eran aguas limpias.

Son un gran contaminante medioambiental debido a que, en general, no son tratadas hasta que llegan a una estación depuradora. Esta falta de tratamiento provoca que, a lo largo del recorrido, desde donde se libera el agua residual hasta que llega a la depuradora pueda entrar en contacto y por ello contaminar vegetación, animales o la propia atmósfera debido a los gases que libera el metabolismo de las bacterias y otros microorganismos que se encuentran en este tipo de aguas.

a) Componentes del agua residual:

No son iguales las aguas residuales generadas en un medio industrial que en medio doméstico o incluso en medio doméstico cada uso genera aguas residuales muy diferentes en composición.

Es debido a esta variedad y que luego se mezclan todas ellas en el alcantarillado, que el agua residual se considera una mezcla heterogénea de muchos compuestos (depende donde se tome la muestra de agua residual tendrá unos u otros en mayor o menor medida) y que generalmente tiene una fase suspendida y una fase soluble.

En cuanto a componentes químicos de este tipos de aguas se encuentran desde compuestos inorgánicos (cloruros, carbonatos, nitrógeno, fósforo...) a compuestos orgánicos generalmente provenientes de excreciones o de restos de comida (urea, aminoácidos, proteínas, jabón...).

En cuanto a componentes biológicos hay una gran cantidad de microorganismos debido en primera instancia a que por excreciones aparecen mucha cantidad de bacterias (del aparato digestivo o de restos de los alimentos) y a que a lo largo del recorrido del agua residual pueden ir apareciendo. Estas bacterias descomponen parte de los componentes del agua residual que

utilizan como metabolitos (en caso de nuestro estudio estas bacterias metabolizan gran cantidad de los fármacos que vamos a tratar de cuantificar).

b) Depuración del agua residual:

Es un proceso de grandísima importancia para el medio ambiente y la vida humana (tanto por uso humano directo como el agua usada industrialmente). Debido a que las aguas residuales no pueden ser usadas ni para consumo, ni para higiene, ni para industria se debe de realizar un riguroso proceso de limpieza de agua para que el agua saliente tenga los parámetros de calidad adecuados para poder ser usada en cualquiera de esos ámbitos.

La depuradora de agua la denominamos como EDAR (Estación Depuradora de Aguas Residuales). Esta planta tiene edificios especiales para evitar la liberación de ruido y olor de la propia planta y así no suponer tampoco un contaminante de este tipo al medio. Se ve una depuradora genérica en la Figura 1.



Figura 1: Foto aérea de una Depuradora de agua residual

Una depuradora tiene las siguientes etapas/elementos:

1. Entrada a la depuradora: El agua llega por un sistema de alcantarillado nuevo (recubierto en su interior por materiales que esterilizan parcialmente el agua) y entra a los pozos de entrada, tras pasar por unas rejillas con huecos pequeños que se encargan de retirar los residuos sólidos de mayor tamaño y entran a las cámaras de bombeo que son las encargadas de impulsar el agua dentro de la depuradora (puede bombear hasta 4300 litros por segundo de caudal).

2. Pretratamiento: Se realiza con el sistema de pretratamiento que está compuesto por:

➤ Cuatro canales de desbaste fino de 6 mm de paso: Evita la entrada de sólidos de gran tamaño que puedan provocar obstrucciones y problemas en la planta depuradora. Se realiza mediante rejas paralelas con poca separación que deben ser limpiadas discontinuamente y de manera frecuente debido a que puede obstruir la entrada de agua y reducir el caudal (se debe mantener el caudal en unos valores óptimos).

➤ Cuatro canales de desarenado y desengrasado del agua residual: Evita la entrada de grava, arena y partículas minerales pequeñas. Se protege así también la planta ya que estos materiales pueden sedimentar y obstruir bombas u otros aparatos provocando sobrecargas en tratamientos. El desengrasador evita la entrada de grasas o líquidos inmiscibles en la planta que disminuye la capacidad de depuración. Se muestra en la Figura 2.



Figura 2: Zona de pretratamiento EDAR

3. Decantación primaria: Con este sistema se realiza la separación inicial de los sólidos decantables del agua residual (se elimina hasta el 60% de materia sólida en el agua residual) mediante 6 decantadores de 34 metros de diámetro y 3240 metros cúbicos de volumen capaces de tratar todo el agua que entra con el caudal bombeado (los 4300 l/s). Esta zona se ve en la Figura 3.



Figura 3: Zona de decantación primaria EDAR

4. Reactor biológico: Tras decantarse se dirige el flujo a cada una de las cuatro líneas independientes disponibles en el reactor biológico que elimina nutrientes. Este reactor es un

depurador biológico avanzado que permite la eliminación de compuestos con fósforo y nitrógeno (nutrientes) sin tener que añadir compuestos al agua residual usando el método UCT modificado. Es un método desarrollado en Ciudad del Cabo (Sudáfrica) que divide al reactor biológico en tres zonas:

- Zona anaerobia: Sin presencia de oxígeno. Se realiza una fermentación anaerobia con un fango que genera un biogás que genera energía para la propia planta
- Zona anoxica: Presencia limitada de oxígeno.
- Zona aerobia: Presencia muy elevada de oxígeno. Es esta la que hay que tener más controlada ya que la demanda de oxígeno es elevadísima y por ello hay que aportar un volumen de oxígeno muy elevado y de forma uniforme (40000 metros cúbicos).

5. Decantación secundaria: A través de la arqueta de reparto se distribuye el flujo de agua (llamado licor mezcla debido a la presencia de microorganismos provenientes del reactor biológico previo) a cuatro decantadores secundarios de succión donde por la gran densidad del fango que venía del reactor, este se va al fondo activo decantándose y extrayéndose, pudiendo realimentar de nuevo el reactor biológico. El agua que queda en la superficie se considera limpia y se toma por encima para llevarse al siguiente proceso de la planta. Esta zona se ve en la Figura 4.



Figura 4: Zona de decantación secundaria EDAR

6. Tratamiento del agua con rayos ultravioleta: Sirve para realizar la desinfección del agua extraída de la superficie del decantador secundario y, así, poder liberar esta agua al cauce urbano.

7. Edificio de control: Como cualquier planta industrial de gran tamaño, la EDAR cuenta con un edificio de control que monitoriza el proceso y la calidad del agua en cada etapa del proceso gracias a la mecanización del proceso y los caudales.

8. Línea de fangos: Por esta vía discurren los residuos generados en el proceso de depuración para tratarlos y obtener un fango lo más deshidratado (mediante centrifugación y separado de la fase líquida y un posterior secado térmico) posible para reutilizarse en el proceso o en caso de excedente o que no reúna las condiciones para volver a usarse en el reactor, se puede usar como fertilizantes o abonos naturales. Se regeneran cerca de 23 toneladas de fango diarias en la planta.

- Fangos primarios: Proviene directamente de la decantación primaria, se espesan en una línea de espesado que aumenta la concentración del fango o que cultiven el propio fango en medio ácido (hay de ambos tipos).
- Fangos secundarios: Son los obtenidos en la decantación secundaria son espesados por flotación y tras ello se mezclan con los fangos primarios ya concentrados también y se introducen en el reactor juntos.

3.2 Contaminantes emergentes:

3.2.1 Fármacos y contaminantes emergentes

Un fármaco es una sustancia que sirve para prevenir, tratar o curar una enfermedad, dolor físico o infección determinada. Estos fármacos se pueden ingerir de múltiples formas y, cada uno tiene una forma óptima (se pueden preparar para otras formas optimizándolas en algunos casos), ya que su actuación química, absorción del medicamento y dónde actúa está también determinada por su método de ingestión.

Un medicamento es la forma en la que se comercializa el fármaco, es decir, su estado (por ejemplo, ion del fármaco con sulfato), su mezcla (si es racemato, enantiopuro o que exceso enantiomérico tiene), su acondicionamiento (polvos, encapsulado...) y sus excipientes que son las sustancias que acompañan a la molécula activa (jarabe, emulsión, capsula...).

En la actualidad, los medicamentos son mucho más accesibles por la sociedad (sea cual sea su poder adquisitivo) al menos de los medicamentos más comunes (antibióticos o analgésicos) y esto provoca que muchísima gente los consuma y debido a esto puedan aparecer fármacos al analizar matrices medioambientales.

En las aguas residuales se pueden detectar fármacos que pueden ser debido a fármacos tirados directamente al agua residual y a fármacos o sus metabolitos (moléculas a las que los transforma el cuerpo cuando son metabolizados) al excretarlos.

En los purines se pueden detectar fármacos también, sobre todo las denominadas drogas veterinarias que son fármacos administrados a animales de granja para mejorar algún parámetro del producto que se obtiene de estos. En el caso del purín porcino aparecerán drogas veterinarias usadas para que el cerdo aumente de peso o simplemente fármacos que se le dieron para curar o tratar alguna enfermedad.

En ambos casos la cantidad de fármacos liberada a esas matrices medioambientales es muy elevada y, al igual que los purines, es un contaminante que en sí siempre ha habido pero que, actualmente está aumentando exponencialmente y ya se ha convertido en un gran problema. Es por esto, que al igual que los purines se considera a los fármacos un tipo de CECs (Concerned Emergent Contaminants) y son los que vamos a estudiar en este trabajo.

Para entender el por qué son un contaminante peligroso hay que entender que estos fármacos que pasan a las aguas residuales no se consiguen eliminar/limpiar con las depuradoras (al menos las usadas actualmente) y por tanto vuelven al agua de uso humano y se ingieren (aunque sea en pequeñas cantidades). El ingerir fármacos de forma frecuente (como ocurriría si los fármacos no se logran eliminar del agua de uso humano) puede provocar adicciones a medicamentos y, sobre todo, puede generar resistencia bacteriana a ellos. Además, hay algunos fármacos que pueden reaccionar entre sí y dar sustancias de gran tamaño y varios grupos químicos de las que no se conoce su toxicidad o efectos en el organismo tanto humano como animal.

3.2.2 Clasificación de los CECs considerados en este trabajo

En el presente trabajo se va a analizar y cuantificar 59 contaminantes emergentes en muestras de agua residual y en agua residual depurada.

Se trata de fármacos muy variados que se han detectado en ambas matrices y que tienen una degradación relativamente lenta que nos permitirá que no disminuya mucho su concentración y podamos detectarlos y cuantificarlos.

Los fármacos se pueden clasificar según muchos criterios (grupos funcionales, centro activo, zona de actuación en el organismo...) pero en nuestro caso se van a clasificar según su aplicación, que es la clasificación más común, en la Tabla 3 (se separan además por similares grupos o esqueletos químicos).

Tabla 3: Clasificación de los fármacos según su aplicación

Número asignado como analito	Fármacos analizados	Aplicación terapéutica
1	Penicillin G	Antibióticos
2	Amoxicillin	
3	Doxycycline	
4	Tetracycline	
5	Oxytetracycline	
6	Danofloxacin	
7	Enrofloxacin	
8	Marbofloxacin	
9	Ciprofloxacin	
10	Ofloxacin	
11	Levofloxacin	
12	Norfloxacin	
13	Nalidixic acid	
14	Sulfadimidine	
15	Sulfadiazine	
16	Sulfamethoxazole	
17	Sulfamethizole	
18	Sulfathiazole	
19	Sulfapyridine	
20	Tylosin	
21	Erythromycin	
22	Clarithromycin	
23	Apramycin	
24	Tiamulin	
25	Florfenicol	
26	Trimethoprim	
27	Metronidazole	
28	Triclosan	

29	Dexametasone	Analgésicos/ Antiinflamatorio
30	Diclofenac	
31	Naproxen	
32	Ibuprofen	
33	Salicylic acid	
34	Acetaminophen	
35	1,4-Benzoquinone	
36	Acetylsalicylic Acid	
37	Clofibric acid	Reguladores de lípidos
38	Clofibrate	
39	Atorvastatin	
40	Gemfibrozil	
41	Propranolol	Fármacos cardiovasculares
42	Atenolol	
43	Carbamazepine	Fármacos psiquiátricos
44	Fenbendazole	Antiparásitos
45	Progesterone	Hormonas
46	17- α -Ethinylestradiol (EE2)	
47	β -estradiol (E2)	
48	Estrone (E1)	
49	Iohexol	Agentes contrastantes de rayos-X
50	DEET	Insecticidas
51	Atrazine	Pesticidas
52	Methylparaben	Conservantes
53	Ethylparaben	
54	Propylparaben	
55	4-Hydroxybenzoic Acid	
56	Octyphenol	Surfactantes
57	4-nonylphenol	
58	Caffeine	Estimulantes
59	Crotamiton	Anti-picores

3.2.3 Incidencia de Contaminantes emergentes en aguas

En 2017 se realizó un estudio en Portugal que determinó la concentración de varios medicamentos en el agua del río Tago y Mondego, las muestras se tomaron en varios puntos, en concreto 20 puntos distintos, a lo largo de ambos ríos para tener resultados representativos. [5]



Figura 5: Zonas de muestreo de agua de río

Este estudio surge en el contexto de que Portugal se clasificó como un área de agua de estrés moderado-alto sobre todo en el ámbito urbano. Se busca en este estudio 17 compuestos, 5 metabolitos y 1 producto de transformación, pertenecientes a diferentes grupos terapéuticos y han sido seleccionados los medicamentos más consumidos.

Se determinó para cada uno de los analitos la frecuencia de detección (si se detectó o no en cada uno de los puntos de muestreo), el valor mínimo y máximo detectado, el valor medio de todas las medidas y la desviación de esas medidas. Esto se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Determinación de CECs en agua de ríos de Portugal

Therapeutic group/compound	Detection frequency (%)	Minimum (ng L ⁻¹)	Mean (ng L ⁻¹)	Standard deviation (%)	Maximum (ng L ⁻¹)
Antibiotics (Antib)	23.61	24.80	33.53	4.84	39.10
Azithromycin (AZI)	PC 2.78	32.15	33.91	2.48	35.66
Ciprofloxacin (CIP)	PC nd	nd	nd	nd	nd
Clarithromycin (CLA)	PC 20.83	24.80	33.08	5.39	39.10
Erythromycin (ERY)	PC 4.17	32.89	35.51	3.01	38.80
Lipid regulators (Lip reg)	8.33	6.69	9.47	3.31	15.52
Bezafibrate (BEZ)	PC 2.78	11.86	13.69	2.59	15.52
Gemfibrozil (GEM)	PC 6.94	6.69	7.78	1.50	10.34
Simvastatin (SIM)	PC nd	nd	nd	nd	nd
Antiepileptics (Antiepi)	1.39	<MQL	10.90	nd	<MQL
Carbamazepine (CAR)	PC 1.39	<MQL	10.90	nd	<MQL
Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRIs)	27.78	20.70	37.86	8.73	52.97
Citalopram (CIT)	PC 27.78	20.70	39.21	7.93	52.97
Desmethylcitalopram (N-Cit)	M nd	nd	nd	nd	nd
Fluoxetine (FLU)	PC 1.39	25.37	25.37	nd	25.37
Norfluoxetine (Nor-FLU)	M nd	nd	nd	nd	nd
Sertraline (SER)	PC 1.39	23.30	23.30	nd	23.30
Desmethylsertraline (Nor-SER)	M nd	nd	nd	nd	nd
Anti-inflammatories (Anti-inf)	23.61	<MQL	35.87	12.49	69.15
Diclofenac (DIC)	PC 19.44	25.13	33.56	8.43	51.24
4-Hydroxydiclofenac (4-OH-DIC)	M nd	nd	nd	nd	nd
Ibuprofen (IBU)	PC nd	nd	nd	nd	nd
Naproxen (NAP)	PC nd	nd	nd	nd	nd
Paracetamol (PARA)	PC 19.44	<MQL	38.18	15.549	69.15
4-Aminophenol (4-PARA)	TP nd	nd	nd	nd	nd
Hormones (Horm)	nd	nd	nd	nd	nd
17β-Estradiol (E2)	PC nd	nd	nd	nd	nd
Estrone (E1)	M nd	nd	nd	nd	nd
17α-Ethinylestradiol (EE2)	PC nd	nd	nd	nd	nd

Hay 23 analitos, los cuales se muestran a la derecha del nombre si son un compuesto farmacéutico (parent compound o PC), un metabolito (metabolite o M) o un producto de transformación (transformation producto o TP). Si no se detectó el analito es nd (non detected). Todas las medidas se han realizado usando como técnica analítica el HPLC-MS con una SPE previa usando ODS como adsorbente. [5]

Estudiando los valores de la Tabla 4 extraemos mucha información:

- *Detección*
 - De los 23 analitos totales, pertenecientes todos a grupos terapéuticos distintos, se detectaron al menos una vez 11 de ellos.
 - Los que más se detectaron fueron los antibióticos (casi en un 25% de las medidas), los SSRIs (más del 25% de las medidas), los antiinflamatorios (casi en un 25% también) aunque solo se detectaron 2 de los 6 compuestos antiinflamatorios estudiados.
 - Los menos detectados son los reguladores de lípidos (menos del 10%), el antiepiléptico estudiado (prácticamente el 1%) y las hormonas que no se detectaron.
- *Concentraciones medidas:*
 - Prácticamente todos los compuestos detectados (salvo los reguladores de lípidos) lo hicieron en concentraciones de entre 25-40 ng/L o ppb (partes por billón).
 - Los valores máximos y mínimos rondan también valores de 15-60 ng/L.
 - Se puede ver por tanto que las concentraciones de este tipo de contaminantes rondan las partes por billón (10-100 ppb) al menos en el caso aquí estudiado.
- *Conclusión extraída de la tabla:*
 - Aparecen varios compuestos farmacéuticos o derivados de ellos en aguas de río (supuestamente ya depuradas), lo que quiere decir que, efectivamente estos contaminantes no pueden eliminarse en las actuales estaciones depuradoras.
 - La concentración medida de este tipo de contaminantes es del orden de las partes por billón o nanogramos/litro.

3.2.4 Eliminación de fármacos en aguas residuales con microalgas

En los últimos años debido al aumento de la preocupación por este tipo de contaminantes emergentes, se han desarrollado nuevos métodos de purificación de agua de estos contaminantes. Uno de los más efectivos se ha comprobado que es el uso de microalgas en fotobiorreactores, capaces de digerir estos compuestos farmacológicos a compuestos menos perjudiciales. [6]

En este contexto, se estudiaron en este trabajo las concentraciones de varios medicamentos a lo largo del proceso de tratamiento con las microalgas.

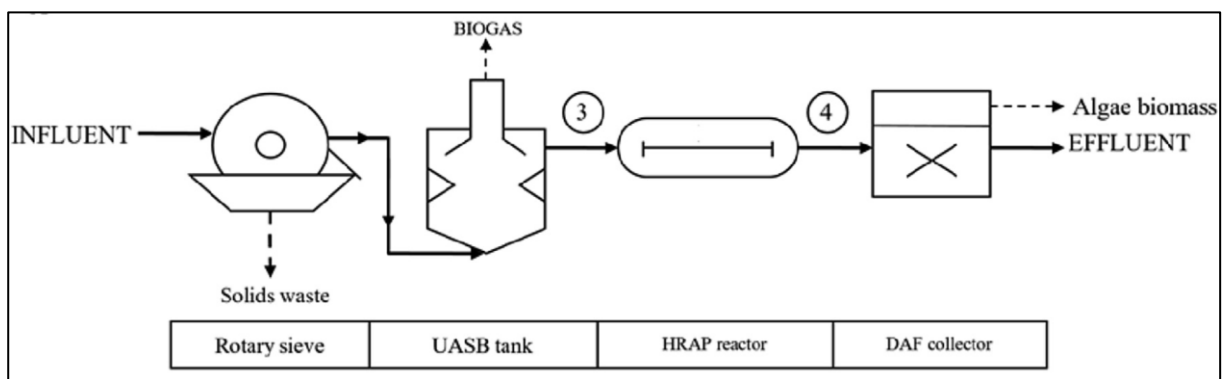


Figura 6: Esquema de purificación con varios reactores de microalgas

Como puede verse en la Figura 6 tenemos primero un rotor que decanta los residuos sólidos y los elimina, un tanque UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket o reactor anaerobio de flujo ascendente) que libera biogás, un reactor HRAP (high rate algae pond o tanque de algas de alto rendimiento) y un colector que separa el efluente de las algas.

En este estudio lo importante es determinar la eliminación de fármacos en aguas urbanas mediante este método. Para ello se mide la concentración en el influente, salida del tanque UASB y salida del reactor HRAP de cada analito y se muestra todo ello en la Figura 7.

Se puede observar la concentración de los diferentes analitos farmacológicos en ng/L en cada uno de los puntos de medida.

Como conclusiones de la Figura 7 se puede deducir que, efectivamente, este método logra una eliminación (en realidad digestión) de estos contaminantes emergentes gracias a microalgas que, a su vez producen biogás y biomasa utilizables.

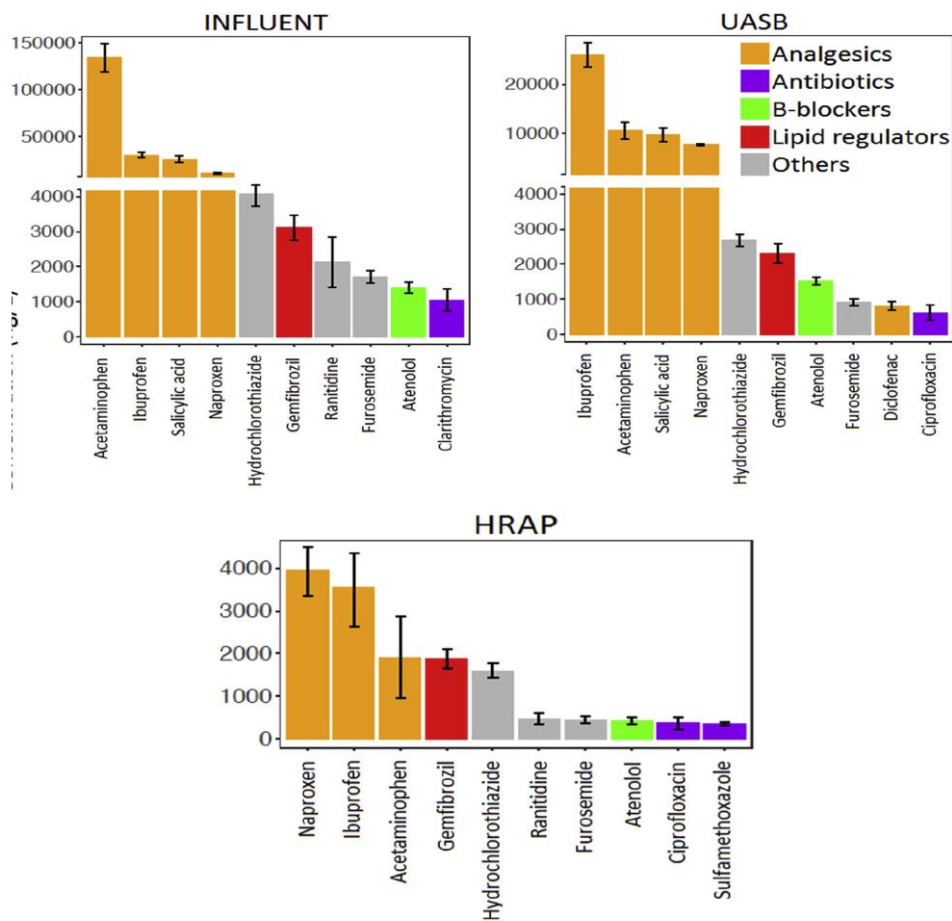


Figura 7: Gráfico de la concentración de los analitos en los distintos puntos del método

Se puede ver, además, en la Figura 7 concretamente, los valores de eliminación de analito medios para cada grupo de fármaco en cada uno de los puntos de determinación comentados (cada bloque es una parte del esquema inicial en orden de izquierda a derecha). Los dos bloques de la derecha son otros lugares medidos que no nos interesan en nuestro trabajo.

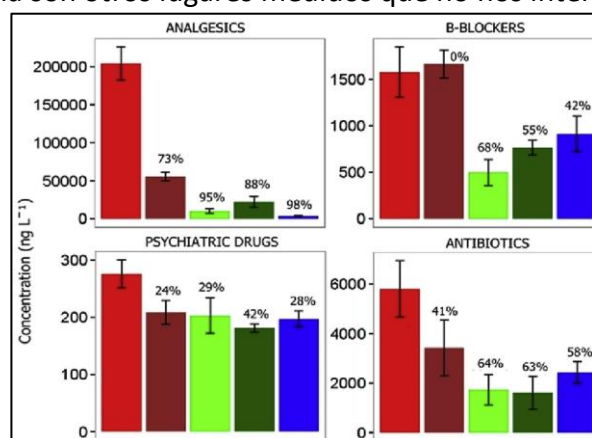


Figura 8: Gráfico de recuperación de cada grupo farmacológico en cada parte del método

Como puede comprobarse en la Figura 8 los valores de concentración de los analitos disminuyen mucho al ir pasando por el proceso de purificación y con unos porcentajes finales muy elevados (salvo en los medicamentos psiquiátricos), por lo que se considera este método de utilizar fotobiorreactores como un método prometedor para eliminar este tipo de contaminantes emergentes. [6]

3.3 Métodos de análisis de fármacos en muestras líquidas

3.3.1 Avance histórico del análisis de fármacos en matrices líquidas

El análisis de fármacos en muestras líquidas a los niveles de concentración que se está realizando no ha sido posible hasta hace apenas 20 años, esto es debido a que los métodos de análisis no eran capaces de detectar y, mucho menos, cuantificar ningún compuesto a nivel de trazas (microgramos o menos).

Los métodos de análisis, así como la mayoría de los elementos relacionados con la química analítica, en los últimos años se han mejorado muchísimo debido a la gran importancia que está adquiriendo el control de calidad. Se han centrado muchos esfuerzos a mejorar los métodos gracias al aumento de los conocimientos sobre contaminantes y, también, a la preocupación con el medio ambiente y lo que se libera al mismo.

Hoy en día, la clase más estudiada de contaminantes emergentes es la de los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) que contienen ~3000 sustancias diferentes (sustancias analgésicas, reguladores de lípidos, hormonas...) [7] y son consumidos por humanos y animales de granja para finalmente ser liberados mediante excreción a aguas residuales urbanas y ganaderas. Estas dos aguas residuales todavía tienen estos compuestos [8-12] incluso después de haber sido tratadas en depuradoras de agua, ya que las depuradoras actuales aun no cuentan con equipos ni procesos adecuados para eliminar la mayoría de estos contaminantes [13,14].

El principal problema de estos contaminantes (concretamente los PPCPs) es que permanecen en el agua ya tratada y vuelven a ser ingeridas por los humanos en concreto al volver a consumir estos productos y en el propio agua que toman (aunque sea en pequeñas cantidades) y el hecho de que ocurra agrava aun más algunos problemas medioambientales [15], aunque aún queda mucha investigación que realizar al respecto.

La contaminación de las aguas residuales urbanas y agrícolas es un hecho ya demostrado y comprobado por estudios de agua en todo el mundo. Estos estudios están más centrados en el agua residual urbana y, todos ellos coinciden en que estos contaminantes (mayormente los compuestos que provienen de los fármacos o sus metabolitos) se encuentran en concentraciones que rondan las decenas de ng/L [5,10,18].

También existen estudios más centrados en las aguas residuales ganaderas que se centran más en como eliminar o, al menos, reducir la concentración de estos contaminantes. Recientemente, varios estudios apuntan al uso de algas capaces de digerir algunos de estos compuestos de la forma farmacéutica o metabolito a otros compuestos menos peligrosos o nocivos [6]. Hay otros que comentan también otros métodos de eliminación de compuestos (aplicables a agua residual urbana también) como son la oxidación, la filtración con membrana o la adsorción sobre carbono activo [14].

Tradicionalmente el análisis de fármacos se ha centrado en analitos hidrófobos compuestos por aromáticos polinucleares o cadenas largas que correspondían generalmente a analgésicos (la familia de fármacos más estudiada), lo que provocaba un estancamiento del análisis de fármacos ya que se centraba solo en el estudio de fármacos apolares y no ampliaba su campo. Para el estudio de estos compuestos se utilizaba la cromatografía de gases acoplada al espectrómetro de masas (GC-MS) con una ionización electrónica (EI) [16]. Debido a la gran reproducibilidad de la cromatografía de gases, el paso a la cromatografía de líquidos ha sido un avance lento.

En la actualidad, debido al aumento de interés en estudiar muchos más fármacos simultáneamente y a que muchos nuevos fármacos tienen más grupos polares, ha centrado el método hacia el estudio de compuestos polares mediante la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) acoplada al espectrómetro de masas (MS) con ionización electrospray. Este avance en el método ha abierto mucho la lista de compuestos estudiables y por tanto ha aumentado la versatilidad mucho en el análisis de este tipo de contaminantes.

El método utilizado en este estudio es: SPE-HPLC-MS. Que comienza con una extracción en fase sólida (SPE) con un cartucho, la separación de analitos se lleva a cabo con un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia y la detección con un espectrómetro de masas (MS)

gracias a una ionización por electroespray que es uno de los métodos más usados y prometedores en este campo de estudio [17,19,20,21,22].

3.3.2 Extracción en fase sólida (SPE)

Es el procedimiento de preparación de muestra general y más utilizado actualmente para matrices líquidas y este tipo de analitos. Se basan en la afinidad de los analitos por un determinado adsorbente al que se adhieren mientras otros compuestos y la propia matriz pasan a través del adsorbente (idealmente sin adherirse ninguno).

Se trata de una extracción cromatográfica en fase inversa (fase móvil polar y fase estacionaria apolar) ya que la fase móvil es acuosa. La fase estacionaria depende del cartucho que se utilice ya que varía con la marca y los analitos buscados.

En nuestro caso el cartucho usado es un cartucho "Oasis HLB Cartridge" perteneciente a la marca "Waters" como el mostrado en la Figura 9 y que tiene un relleno de 60 mg y 3 cm³ compuesto de polipropileno capaz de lograr la extracción de compuestos ácidos, básicos y neutros. Es además una versión que está optimizada para que la sequedad del relleno no afecte a la extracción a diferencia de los rellenos convencionales.



Figura 9: Cartucho OASIS HLB Cartridge

La recuperación de los analitos (desadsorción del relleno) se logra generalmente con una pequeña porción de un disolvente polar sobre el propio cartucho, en este caso con acetonitrilo se logran recuperar los analitos deseados. [23]

3.3.3 Cromatografía de líquidos de alta y ultra-alta eficiencia (HPLC y UHPLC)

Es el aparato crítico a la hora de que el método sea adecuado para la separación de analitos a nivel de trazas y en el número y tipo de analitos que es capaz de separar.

Tradicionalmente se ha utilizado la cromatografía de gases que ha sido históricamente mucho más reproducible, con mejores límites de detección y cuantificación y, utilizada en muchos más métodos oficiales de cuantificación que la cromatografía de líquidos. Sin embargo, la cromatografía de líquidos ha sido foco de mucha optimización y mejora tanto en la optimización de los parámetros usados (flujo, volumen de inyección) como en la composición de la propia columna (el relleno o fase estacionaria).

Este tipo de cromatografía se ha ido optimizando y aumentando su rendimiento y capacidad para separar analitos. En 1906 se desarrolló la cromatografía líquida, 70 años después se mejoró y apareció a la HPLC y desde 1970 que se instauró la HPLC como método con potencial no ha dejado de mejorarse y ha aparecido la UHPLC.

Es esta UHPLC la que vamos a utilizar en nuestro trabajo y tiene como diferencias que utiliza un tamaño de poro mucho menor dando lugar a mejor resolución (altura de plato teórico menor), permite aumentar el flujo sin perder resolución (disminuyendo el tiempo de análisis) y se logran picos más estrechos aumentando la sensibilidad del cromatograma. [24]

3.3.4 Espectrómetro de masas

Es el aparato encargado de la separación final y detección de los analitos. Es muy importante la optimización de este ya que es el que junto con la cromatografía determinará cuales son los límites de detección, cuantificación y la sensibilidad del cromatograma final. Se dice por ello que está acoplado a la cromatografía previa (UHPLC-MS). El espectrómetro de masas se basa de forma genérica en cuatro procesos:

- **Ionización:** Es el paso en el que se pasan a iones los compuestos que llegan. Puede ser una ionización química, electrospray (la que usaremos nosotros), por desorción laser, ionización por impacto electrónico... En nuestro caso usaremos la ionización por electrospray (ESI) en la que los analitos salen del capilar en el que llegan del cromatógrafo (se puede acoplar directamente) en forma de aerosol y se cargan con unos electrodos situados a la salida del aerosol. Es elegida por ser un tipo de ionización débil que evita la fragmentación de los iones.

- **Aceleración de los iones:** Al estar ya los analitos ionizados (cargados) podemos acelerarlos gracias a la incidencia de un campo eléctrico de cuyo potencial y la propia masa de los iones dependerá la velocidad que alcancen.

- **Variación de trayectoria de los iones:** Al ser iones podemos variar su trayectoria si se les hace incidir un campo magnético (en este caso perpendicular a su dirección). De esta manera podemos "eliminar" los iones que no nos interesen para que así no lleguen al detector. Esta eliminación depende de la masa de los iones, el campo magnético y otros parámetros.

- **Detección:** Tras haber atravesado todo el aparato los iones llegan a un detector conocido como electromultiplicador (aumenta mucho la señal eléctrica que surge cuando llega un ión) capaz de detectar iones en cantidades muy bajas. Es crítico en los límites de detección y cuantificación.

El q-TOF (tiempo de vuelo o trampa de iones) está compuesto por un cuadrupolo inicial que elimina los iones que no nos interesan y tras ello separa los de interés en una "cámara" denominada de tiempo de vuelo. Inicialmente se frenan los iones (que todos salgan del mismo punto) para luego transmitirles a todos la misma energía cinética (se diferenciarán por tanto en las velocidades), recorrerán la cámara del tiempo de vuelo con la misma energía cinética separándose por tanto por tamaños y llegando al detector. Este tipo de analizador se utiliza generalmente para buscar metabolitos de los fármacos.

El triple cuadrupolo está compuesto de tres cuadrupolos seguidos. El primer cuadrupolo se comporta de manera que genera un campo electromagnético oscilante capaz de separar iones y eliminar los que no están en un rango de masas deseado. El segundo cuadrupolo actúa de cámara de ionización ya que en su interior hay un gas noble que provoca colisiones con los iones fragmentándolos. El tercer cuadrupolo actúa como el primero separando iones (conocidos como hijos de los primeros iones padres).

Este es el analizador que utilizaremos en el trabajo y que, nos servirá para en cada compuesto detectar un pico del ion padre y otro del ion hijo de cada compuesto.

Como es evidente la señal del pico padre será más intensa que la del pico (no se fragmenta el % de los iones padres) y por ello usaremos la señal del pico padre para cuantificar y la del pico hijo para comprobar que el ion detectado corresponde al analito realmente (ya que los picos padre e hijo aparecen al mismo tiempo de análisis).

3.4 Algunos estudios centrados en CECs en matrices acuosas:

Estas diferentes partes del método de análisis de fármacos en muestras acuosas pueden optimizarse atendiendo a mucho tipo de parámetros diferentes, los cuales en algunos casos dependen de los propios fármacos a analizar. [25]

Centrándonos en la SPE podemos optimizar parámetros como el relleno del cartucho, la propia estructura del cartucho, la cantidad de relleno, el eluyente utilizado, el pH de la muestra de agua a determinar...

La marca y tipo de cartucho utilizado suele ser generalmente “Waters” y “OASIS HLB”. En cuanto al relleno puede variar según los analitos a determinar, en el estudio que vamos a comentar se utiliza un polímero basado en monómeros de N-vinilpirrolidona y divinilbenceno.

Para la optimización de los otros parámetros se miden la misma muestra (con fármacos variados), usando como eluyentes acetonitrilo [A], metanol [B], hidroxilamonio/ metanol (5/95) [C] y formaldehido/metanol (2/98) [D]. Midiendo en todos estos casos el porcentaje de recuperación (% recovery) que da cuenta de la diferencia del pico medido a la muestra y tras la extracción. El pH óptimo de muestra en este trabajo para determinar analitos farmacéuticos es 2.5-3.

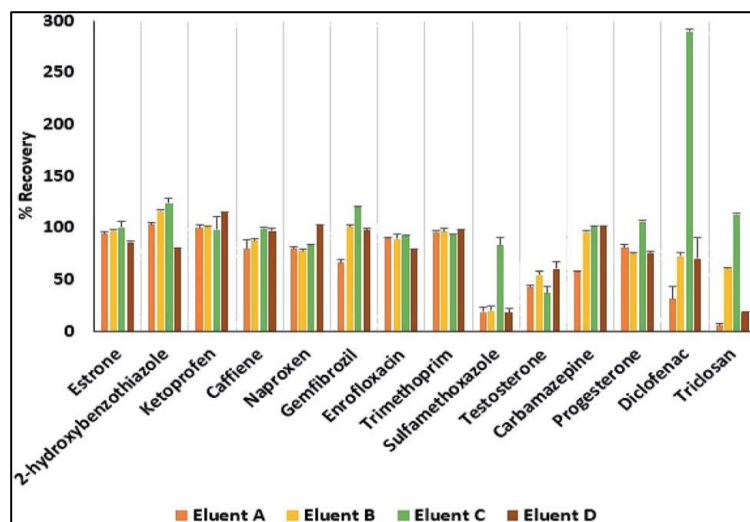


Figura 10: Porcentaje de recuperación de la SPE con cada eluyente

Como puede observarse prácticamente todos los porcentajes de recuperación rondan el 100% (algunos lo superan y otros no) y prácticamente no hay variación al variar el eluyente, pero se toma al eluyente C hidroxilamonio/metanol (5/95) como el óptimo ya que prácticamente en todos los fármacos es el que da mayor porcentaje.

Habiendo optimizado todos los valores de la SPE en el estudio se utilizó **HPLC-MS** para detectar y cuantificar esos mismos fármacos y se obtuvieron los siguientes límites analíticos:

Tabla 5: Límites de detección y cuantificación de fármacos en SPE-HPLC-MS

Compound	Conc. range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Estrone	1–500	0.992	0.3	1.0
2-Hydroxybenzothiazole	5–500	0.993	1.5	5.0
Ketoprofen	1–500	0.998	0.3	1.0
Caffeine	5–500	0.995	1.5	5.0
Naproxen	1–500	0.996	0.15	0.5
Gemfibrozil	5–500	0.995	1.5	5.0
Enrofloxacin	1–500	0.995	0.3	1.0
Trimethoprim	5–500	0.997	1.5	5.0
Sulfamethoxazole	1–500	0.996	0.30	1.0
Testosterone	1–500	0.998	0.30	1.0
Carbamazepine	1–500	0.991	0.15	0.5
Progesterone	1–500	0.998	0.3	1.0
Diclofenac	5–500	0.995	1.5	5.0
Triclosan	5–500	0.999	1.5	5.0

Podemos ver en la Tabla 5 que ambos límites son muy bajos y corresponden a concentraciones a nivel de trazas como las que nos interesan a nosotros (incluso algunos fármacos coinciden con los nuestros). También se muestra como el rango lineal de concentraciones es elevado y da un parámetro de regresión “ r^2 ” muy próximo a la unidad que indica una línea muy próxima a la recta.

Deducimos de este estudio, en general todos los revisados usan un HPLC-MS para el análisis, que es un método muy optimizado y que da LOD y LOQ muy buenos a nivel de trazas, además de rangos lineales muy grandes. Es el proceso de la SPE el que tiene más variaciones y es por ello por lo que se ha comentado como se optimiza en este estudio concreto (aunque no coincidan algunos parámetros con los nuestros). [26]

El último y crucial paso para la optimización de un método de análisis es lo que se conoce como validación del método. Esto consiste en determinar parámetros analíticos que tiene ese método para cada analito estudiado como pueden ser los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del propio método o el rango lineal.

En el estudio de un método de análisis de aguas de pozo en Bélgica utilizando UHPLC acoplado a MS con una preparación de muestra por extracción en fase sólida SPE-offline con cartuchos de la marca Waters (condiciones muy similares a las estudiadas en este trabajo se realizó la validación del método para 46 analitos de la misma naturaleza que los nuestros obteniendo los parámetros mostrados en la Tabla 6 (R^2 =coeficiente de determinación y g =parámetro de ajuste): [27]

Tabla 6: Datos de validación del método UHPLC-MS para aguas de pozo en Bélgica

Antimicrobial Drugs	R^2	g (%)	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)
Amphenicols				
Chloramphenicol	0.9956	6.83	0.05	0.05
Florphenicol	0.9977	5.44	0.04	0.05
Cephalosporins				
Cefapirin	1.0000	0.32	0.03	0.05
Cefquinome	0.9947	6.33	0.02	0.05
Ceftiofur	0.9983	4.44	0.04	0.05
Diaminopyrimidines				
Trimethoprim	0.9973	5.36	0.004	0.05
Lineosamides				
Lincomycin	0.9960	11.56	0.05	0.05
Macrolides				
Erythromycin A	0.9930	8.63	0.03	0.05
Tilmicosin	0.9993	2.99	0.05	0.05
Tylosin	0.9976	4.60	0.05	0.05
Nitrofurans				
Furaltadon	0.9969	5.69	0.04	0.05
Furazolidon	0.9946	7.61	0.04	0.05
Nifursol	0.9969	10.38	0.04	0.05
Nitrofurantoin	0.9985	4.01	0.04	0.05
Penicillins				
2,5-diketopiperasin ¹	0.9973	5.34	0.03	0.05
Cloxacillin	0.9959	6.50	0.02	0.05
Oxacillin	0.9952	7.14	0.03	0.05
Penicillin G	0.9976	8.20	0.03	0.05
Penicillin V	0.9988	3.93	0.01	0.05
Pleuromutilins				
Tiamulin	0.9969	6.00	0.03	0.05
Quinolones				
Ciprofloxacin	0.9942	7.75	0.03	0.05
Danofloxacin	0.9954	7.79	0.04	0.05
Difloxacin	0.9945	7.54	0.03	0.05
Enrofloxacin	0.9928	8.38	0.03	0.05
Flumequine	0.9995	2.68	0.03	0.05
Marbofloxacin	0.9952	7.48	0.01	0.05
Nalidixic acid	0.9947	7.27	0.02	0.05
Norfloxacin	0.9941	7.80	0.03	0.05
Ofloxacin	0.9935	8.22	0.03	0.05
Oxolinic acid	0.9983	7.62	0.03	0.05
Sarafloxacin	0.9954	6.88	0.03	0.05
Sulfonamides				
Sulfachloropyridazine	0.9956	6.30	0.02	0.05
Sulfadiazine	0.9981	4.51	0.02	0.05
Sulfadimethoxine	0.9934	8.41	0.01	0.05
Sulfadoxine	0.9951	7.18	0.01	0.05
Sulfamethoxazole	0.9975	4.94	0.02	0.05
Sulfamerazine	0.9989	3.47	0.02	0.05
Sulfamethazine	0.9973	5.35	0.01	0.05
Sulfathiazole	0.9984	4.15	0.001	0.05
Tetracyclines				
4-epichlortetracycline	0.9957	5.31	0.03	0.05
4-epioxytetracycline	0.9970	4.16	0.03	0.05
4-epitetracycline	0.9907	8.19	0.05	0.05
Chlortetracycline	0.9943	7.53	0.04	0.05
Doxycycline	0.9997	1.61	0.03	0.05
Oxytetracycline	0.9955	6.90	0.05	0.05
Tetracycline	0.9952	7.18	0.03	0.05

En la ciudad China de Wuhan se realizó un estudio similar al Belga ya que se basaba también en el uso de cartuchos Waters-Oasis HLB de SPE-offline con los que usando UHPLC-MS se analizarían fármacos en agua del río Han, afluente del gran río Yangtzé.

Primero se realizó la validación de dicho método para 29 analitos en la mencionada matriz teniendo en cuenta los mismos parámetros que el estudio mencionado justo anteriormente (que estudiaba aguas de pozo belgas) y además el parámetro de recuperación o “recovery” que se centra en el porcentaje de analito detectado frente al que había en la muestra inicial, sin tratamiento de muestra y procedimiento experimental. Dichos valores de valoración se muestran en la Tabla 7: [28]

Tabla 7: Datos de validación del método UHPLC-MS para aguas de río en Wuhan

No.	Pharmaceuticals	Linearity r^2	LOD ug/l	LOQ ug/l	Recovery (12.5 ng/l) % n = 3	Recovery (25 ng/l) % n = 3
1	Clarithromycin	0.9981	0.01	0.03	82.86	82.42
2	Clindamycin	0.9994	1.0	3.33	96.89	95.06
3	Erythromycin	0.9982	1.0	3.33	77.90	80.19
4	Lincomycin	0.9988	0.5	1.67	93.25	88.63
5	Metronidazole	0.9999	0.1	0.33	70.70	71.68
6	Ofloxacin	0.9717	0.01	0.03	60.57	63.99
7	Sulfamethoxazole	0.9992	0.1	0.33	87.94	99.38
8	Trimethoprim	0.999	0.05	0.16	89.12	93.41
9	Caffeine	0.9982	0.5	1.67	106.02	104.39
10	Carbamazepine	1.0000	0.1	0.33	97.27	103.36
11	Fluconazole	0.9997	0.1	0.33	90.70	93.16
12	Gabapentin	0.9993	1.0	3.33	78.95	81.67
13	Irbesartan	0.9998	0.5	1.67	91.95	94.38
14	Metformin	0.9972	0.01	0.03	89.89	75.33
15	Metoprolol	1.0000	0.05	0.16	86.52	96.32
16	Nicotine	0.9940	0.01	0.03	91.36	96.17
17	Olanzapine	0.9971	1.0	3.33	50.27	62.98
18	Salbutamol	0.9999	0.01	0.03	100.04	76.17
19	Theobromine	0.9953	2.5	8.33	88.04	85.34
20	Valsartan	0.9986	0.01	0.03	90.32	100.06
21	4-AA	0.9937	0.1	0.33	70.29	75.24
22	4-FAA	0.9999	0.1	0.33	94.02	87.94
23	4-AAA	0.9999	0.05	0.17	97.62	95.83
24	Cotinine	0.9998	0.01	0.03	97.19	105.74
25	Dextropropofol	0.9998	0.01	0.03	85.67	88.16
26	10-hydroxy-carbamazepine	0.9989	0.1	0.33	97.28	89.24
27	Metoprolol acid	0.9972	0.5	1.67	85.16	77.17
28	Paraxanthine	0.9973	2.5	8.33	94.61	82.61
29	Trans-3hydroxy cotinine	0.9995	0.05	0.16	101.05	101.86

Tras realizar la validación se pasó a estudiar la concentración de dichos analitos en varios puntos del río Han y Yangtzé cercanos a la ciudad de Wuhan.

Estos diferentes puntos donde se ha realizado la toma de muestra se han abreviado como se muestra en la Tabla 8:

Tabla 8: Abreviaturas de los puntos de muestreo en el análisis de agua de río en Wuhan

Sampling locations	Abbreviation
Yangtze River Downstream	R1
Yangtze River Upstream	R2
Han River	R3
Yangtze River Upstream outside of Wuhan	R4
Yangtze River Upstream outside of Wuhan	R5
Yan East Lake Location 1	L1
Yan East Lake Location 2	L2
Yan west lake Location 1	L3
Yan west lake Location 2	L4
East Lake Location 1	L5
East Lake Location 2	L6
East Lake Location 3	L7
East Lake Location 4	L8
South Lake Location 1	L9
South Lake Location 2	L10
Wild Zhi Lake	L11
Tangxun Lake	L12

Se ven en la Tabla 9 la concentración detectada con el método comentado UHPLC-MS [28]:

Tabla 9: Datos de concentración de 29 fármacos en diferentes puntos de muestreo en agua de río en Wuhan

No.	Compound	R1	R2	R3	R4	R5	L1	L2	L3
1	Clarithromycin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	Clindamycin	≤LOQ ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9.7
3	Erythrocin	≤LOQ	nd	≤LOQ	nd	≤LOQ	nd	nd	nd
4	Lincomycin	20.2	31.1	14.6	4.7	10.5	nd	≤LOQ	nd
5	Metronidazole	1.1	≤LOQ	nd	≤LOQ	≤LOQ	nd	nd	nd
6	Ofloxacin	1.9	nd	2.3	nd	2	nd	nd	nd
7	Sulfamethoxazole	1.8	0.8	1.3	1.2	1.7	nd	nd	≤LOQ
8	Trimethoprim	2.5	9.8	2	3.8	3.5	nd	nd	0.6
9	Caffeine	56.9	7.2	15.5	12	22	nd	3.4	36.8
10	Carbamazepine	≤LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.2
11	Fluconazole	1.5	1	0.9	nd	0.8	1.0	nd	2.9
12	Gabapentin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13	Irbesartan	nd	≤LOQ	nd	nd	nd	≤LOQ	≤LOQ	4.6
14	Metformin	16.9	12.8	5.6	5.4	9	0.2	3.2	45.3
15	Metoprolol	1.0	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ	nd	nd	0.5
16	Nicotine	10.3	2.5	0.3	3.2	2.7	0.8	0.5	1.5
17	Olanzapine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	≤LOQ
18	Salbutamol	1.9	1.6	1.7	0.9	1.2	4	4.3	2.1
19	Theobromin	36.8	nd	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ	39.8
20	Valsartan	23.2	4.2	nd	nd	nd	19	8.4	84.9
21	4-AA	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ
22	4FAA	6.8	3.7	5.5	7.3	9.3	nd	2.1	4.8
23	4AAA	109	35.9	75.2	84.4	105.5	nd	26.5	84
24	Cotinine	2.1	1.3	1.0	1.4	1.3	1.0	1.2	1.7
25	Dextrorphan	0.3	nd	nd	nd	nd	0.2	nd	0.6
26	10-hydroxy-carbamazepine	2.4	nd	1.3	1.1	1.4	1.3	15.5	54.1
27	Metoprolol acid	11.9	nd	nd	≤LOQ	4.4	nd	nd	30.1
28	Paraxanthine	≤LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	≤LOQ
29	Trans-3 hy cotinine	0.8	0.5	0.7	0.7	0.9	0.7	1.6	1.7

No.	Compound	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12
1	Clarithromycin	nd	nd	nd	nd	nd	9.9	1.7	nd	nd
2	Clindamycin	nd	nd	nd	≤LOQ	≤LOQ	26.4	11.1	≤LOQ	31.1
3	Erythrocin	nd	nd	nd	nd	nd	≤LOQ	≤LOQ	nd	nd
4	Lincomycin	≤LOQ	nd	nd	6.5	6.0	19.5	13.6	15.5	12.6
5	Metronidazole	0.8	≤LOQ	nd	≤LOQ	1.0	5.1	1.7	1.3	nd
6	Ofloxacin	nd	nd	nd	nd	nd	4.8	nd	nd	nd
7	Sulfamethoxazole	nd	nd	0.8	0.88	1.7	2.5	1.8	1.9	0.9
8	Trimethoprim	3.5	nd	15.7	1.5	nd	nd	2.0	1.9	2.0
9	Caffeine	14.4	7.9	8.7	204.3	220.0	8.9	6.5	70.5	8.6
10	Carbamazepine	0.9	≤LOQ	≤LOQ	0.8	7.0	5.0	4.0	≤LOQ	1.0
11	Fluconazole	6.8	5.7	5	6.7	2.0	20.6	13.1	6.4	8.8
12	Gabapentin	nd	nd	nd	nd	8	nd	nd	nd	nd
13	Irbesartan	≤LOQ	nd	≤LOQ	≤LOQ	16.7	8.0	18	16.7	≤LOQ
14	Metformin	10.1	0.9	0.7	9.7	8.7	97.5	37.5	121.4	48.5
15	Metoprolol	nd	nd	nd	10.7	5.0	10.8	4.8	2.5	0.5
16	Nicotine	0.5	0.9	0.3	2.8	3.0	0.3	nd	0.5	0.2
17	Olanzapine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	84.9
18	Salbutamol	2.4	2.8	3.3	15.3	35.1	nd	2.7	2.4	3.2
19	Theobromin	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ	76.5	79.5	155.2	70.8	83.1	50.1
20	Valsartan	58.9	28.33	18	24.5	14	128.8	120.7	140.6	13.2
21	4-AA	nd	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ	≤LOQ	0.8	0.8	≤LOQ	≤LOQ
22	4FAA	9.4	1.5	1.8	15.3	1	21.7	15.3	10.3	6.3
23	4AAA	99.4	23.7	20.1	5.1	6	32.29	24.65	160.9	125.4
24	Cotinine	1.2	1.3	1.5	6.1	1.1	1.8	1.3	1.1	1.3
25	Dextrorphan	0.3	nd	0.2	0.9	1	3.6	1.9	1	0.4
26	10-hydroxy-carbamazepine	24.1	15.7	46	6.8	2	16.4	11.3	12.4	5.6
27	Metoprolol acid	16.5	10.9	11.9	2.1	9	203.3	150.3	76.1	31.3
28	Paraxanthine	nd	nd	nd	≤LOQ	≤LOQ	30.5	≤LOQ	≤LOQ	nd
29	Trans-3 hy cotinine	0.9	1	1	7.99	5.2	2.7	1.2	0.7	0.6

4 OBJETIVOS DEL TRABAJO

- Optimizar el volumen de inyección en los métodos de análisis basados en la inyección de grandes volúmenes y en la extracción en fase sólida online para el análisis de compuestos farmacéuticos en muestras acuosas.
- Comparar tres métodos de análisis (inyección directa de grandes volúmenes, extracción en fase sólida online y extracción en fase sólida offline) para la determinación de los analitos de interés en aguas residuales urbanas.
- Evaluar la incidencia de determinadas drogas en muestras de agua residual.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material y reactivos

A lo largo de todo el proceso experimental se usaron varios aparatos, reactivos y material.

- **Aparatos:**

- Equipo de cromatografía Sciex Exion UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) con una columna de fase inversa Phenomenex con partículas de Kinetic EVO C18 de 1.7 μm de diámetro. Posee una bomba binaria, cuatro depósitos de disolventes, un sistema de eliminación de burbujas (desgasificador) y un sistema automatizado de inyección de muestra.
- Equipo de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) Sciex 6500+ QqQ con ionización de electrospray con ambos modos de ionización, positiva y negativa, en el mismo ciclo de análisis.
- Equipo de obtención de agua Milli-Q ultrapura: El agua ultrapura se obtiene con el sistema de purificación Milli-Q Advantage A10 de Merck Millipore de la marca Waters Chromatography.
- Evaporador asistido por nitrógeno: El sistema utilizado para evaporar es el Organomation N-Evap 11250.
- Centrífuga de frascos de 250 mL: El modelo de centrífuga utilizado es la Thermo Cientific Legent RT+.

- **Instrumentación:**

- Instrumentación habitual de laboratorio (matraces, vasos de cromatografía, vasos precipitados, pipetas Pasteur...).
- Capilares de vidrio Vitrex (20, 50, 100 y 200 μL).
- Micropipeta y puntas de micropipeta.
- Cartuchos extracción en fase solida OASIS HLB 3CC 60 mg fase estacionaria.
- Jeringas de vidrio Hamilton.
- Jeringas de plástico de 2 y 5 mL con sus puntas (microlances).
- Filtro de jeringa de Nylon de 0.45 μm poro y de PTFE de 0.22 μm .
- Filtros de fibra de vidrio de 0.7 μm , de celulosa de 0.45 μm y de PTFE de 0.22 μm .

- **Reactivos:**

- Nitrógeno seco 99.9% de pureza.
- Metanol, acetonitrilo y ácido fórmico pureza LC/MS (>99%).
- Ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) con pureza mayor 99.9%.
- Disolventes orgánicos para lavado del material (agua Milli-Q, etanol y acetona).
- Patrones de los 60 analitos a analizar y patrones internos deuterados de 22 de ellos.

5.2 Muestras analizadas

5.2.1 Agua Milli-Q

Es agua ultrapura que ha sido filtrada y desionizada de forma mucho más rigurosa que otras aguas destiladas o desionizadas, generalmente por osmosis inversa. Se obtiene gracias a un destilador especial en el propio laboratorio (Milli-Q Reference) capaz de purificarla hasta dicho punto a partir del agua de grifo de la misma zona de trabajo (Valladolid en nuestro caso).

5.2.2 Agua residual urbana

Se va a analizar agua residual urbana tanto en la entrada como en la salida de una depuradora por separado. La depuradora está una situada en Aldeamayor de San Martín, municipio situado en la provincia de Valladolid, España. Considerándose agua residual bruta la de la entrada y agua residual depurada la de salida.

5.2.3 Agua residual ganadera

Se va a analizar purín tanto bruto como depurado al igual que con el agua residual. En este caso el purín bruto proviene de una granja de Cantalejo, municipio situado en la provincia de Segovia, España. El purín depurado es obtenido en el laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad de Valladolid a partir del purín bruto usando fotobiorreactores conteniendo microalgas.

5.3 Dopado de muestra

En el procedimiento experimental se van a determinar concentraciones de drogas en disoluciones de muestras acuosas dopadas con disoluciones estándar que contengan todos los analitos a determinar.

Este dopado de muestras va a realizarse añadiendo a las muestras acuosas a estudiar cierto volumen de disolución estándar ya preparada. Cada patrón preparado de esta manera tendrá por lo tanto una concentración y al medirse se obtendrá la recta de calibrado matriz-patrón (excepto en el análisis de agua Milli Q) a partir de la cual se determinará la concentración de la muestra sin dopar.

Para preparar estos patrones se usan varias disoluciones patrón ya preparadas, con concentraciones distintas para facilitar la preparación de las disoluciones del calibrado patrón deseado. Dichas disoluciones y concentraciones son las siguientes:

- Standard Solution (SS): Disolución estándar de 20 mg/L.
- Standard Solution' (SS'): Disolución estándar de 2 mg/L (1:10 de la SS).
- T: Disolución estándar de 0.5 mg/L (1:4 de la SS').
- T': Disolución estándar de 0.05 mg/L (1:10 de la T).
- T'': Disolución estándar de 0.005 mg/L (1:10 de la T').
- T^x: Disolución estándar de $0.5/10^x$ mg/L (1:10 de la T^{x-1}).

Además, hay ciertos analitos de los que se dispone de un patrón interno disponible, el mismo compuesto deuterado. Se utilizan estos patrones internos para preparar otras disoluciones estándar con ellos de igual manera que con los patrones de los propios analitos. Son las siguientes:

- Internal Standard Solution (iSS): Disolución de patrones internos estándar de 20 mg/L.
- Internal Standard Solution' (iSS'): Disolución de patrones internos estándar de 2 mg/L.
- C: Disolución de patrones internos estándar de 0.5 mg/L. La disolución C contiene los siguientes patrones deuterados:
 - Sulfadiazine-d4
 - Sulfadimidine-d4
 - Ciprofloxacin-d8
 - Sulfamethoxazole-d4
 - Danofloxacin-d3
 - Enrofloxacin-d5
 - Salicylic acid-d4
 - Bisphenol A-d8
 - Methylparaben-d4
 - Ethylparaben-d5
 - Propylparaben-d7
 - Clofibric acid-d4
 - Naproxen-d3
 - Diclofenac-d4
 - Ibuprofen-d3
 - Triclosan-d3

Todas ellas son preparadas en metanol y con las concentraciones mostradas en la Tabla 10:

Tabla 10: Disoluciones estándar y sus concentraciones

Stock Solution		Concentration (mg/L)	Concentration (µg/L)
SS	iSS	20	
SS'	iSS'	2	
T	C	0,5	500
T'		0,05	50
T''		0,005	5
T'''		0,0005	0,5
T ^{IV}		0,00005	0,05

5.4 Preparación de muestra

5.4.1 Pretratamiento

En el análisis de muestras de agua residual y purín se realiza un pretratamiento que consiste en una centrifugación inicial y, tras ello, una doble filtración de dicha fase acuosa evitando el sólido precipitado y una congelación final hasta que se vaya a usar para preparar la línea de calibrado. Este pretratamiento no es necesario para el agua Milli-Q ya que esta es ultrapura y no tiene partículas en suspensión.

En el paso de centrifugación se usan frascos de 250 mL en la centrífuga (se pueden introducir hasta 6 frascos, que han de estar perfectamente equilibrados en el rotor). El programa usado para eliminar las partículas en suspensión fue de 10000 rpm durante 10 minutos. Al sacar los frascos se observan dos fases, la fase sólida de partículas en el fondo y la fase acuosa.

En el paso de filtración se realiza primero con discos de fibra de vidrio de 0.7 μm echando la muestra acuosa directamente de los frascos de la centrífuga y evitando en lo posible que caiga el precipitado para no obturar el filtro. Tras ello se toma esa muestra y se vuelve a filtrar con un filtro de disco de celulosa de 0.45 μm . La primera filtración fue para minimizar las partículas de gran tamaño en el filtro de 0.45 μm y evitar así su obturación.

Terminado el pretratamiento tenemos la muestra acuosa filtrada por 0.45 μm y pasamos a introducirla en frascos de 500 mL de PET ámbar (es ámbar para que algunos de los analitos como las ciclinas que son fotosensibles no se degraden) y se congelan (para evitar que bacterias en la muestra degraden algunos analitos).

5.4.2 Preparación de disoluciones dopadas

La noche antes del día de preparación se descongelan las muestras. Si se observan partículas en suspensión tras descongelar se vuelve a filtrar con un filtro de 0.45 μm .

Se pasa a preparar las disoluciones con que se realizarán las líneas de calibrado matriz-patrón. Dependiendo el punto de la recta de calibrado se añadirá a un matraz de 100 mL un volumen de una determinada disolución estándar y, cuando corresponda, se añadirán 100 µL de la disolución C (patrones internos de 0.5 mg/L) y se enrasará con la matriz (agua residual, agua Milli-Q o purín).

5.4.1 Extracción en fase sólida, SPE offline

Como se va a comparar tres métodos analíticos: SPE-offline (realizada con cartuchos en el laboratorio), inyección directa y SPE-Online (realizada de forma automática por el propio aparato) se parten en todos los casos de una misma disolución preparada. Del volumen preparado, 100 ml, se retiran 1.5 mL para la inyección directa y 1.5 ml para la SPE-online, realizándose la extracción off-line de un volumen de 97 mL.

Para la SPE-Offline se emplean de cartuchos OASIS HLB 3CC con 60 mg fase estacionaria en una cubeta que permite la extracción con hasta 20 cartuchos a la vez conectados a vacío. El proceso de extracción es el siguiente:

1. **Activación del cartucho:** Se rellenan los cartuchos con metanol (3 mL aproximadamente) y se deja que vaya cayendo por gravedad por los cartuchos activándolos. Se repite de nuevo de igual manera de forma que pasaron alrededor de 6 mL por cada cartucho por gravedad.

2. **Acondicionamiento del cartucho:** Se rellenan los cartuchos con agua Milli-Q (3 mL aproximadamente) dejándolo caer igual que antes por gravedad. Se repite de nuevo de forma que pasan también cerca de 10 mL de agua ultrapura.

3. **Extracción de la muestra con el cartucho:** Se conectan los cartuchos a los recipientes que contienen nuestras disoluciones preparadas y activando la bomba de vacío se va realizando la extracción de todas ellas simultáneamente.

4. **Lavado del cartucho:** Se rellena el cartucho con una disolución del 5% de metanol en agua y se deja caer por gravedad, ayudándose a veces con un pequeño encendido de la bomba de vacío para ayudar a pasar esta mezcla que pasa muy lentamente.

5. **Secado del cartucho:** Se enciende la bomba durante 20 minutos con el fin de secar totalmente los cartuchos.

6. **Guardado de los cartuchos:** Estos cartuchos pueden ya congelarse para evitar la degradación de nuestros analitos guardándolos todos en papel de aluminio hasta que vaya a realizarse la elución de estos.

Tras la extracción hay que realizar el paso de elución, cuya finalidad es redissolver los compuestos que se han extraído en el cartucho. Ha de usarse un disolvente capaz de redissolver los compuestos (mucha solubilidad de los analitos en el disolvente y poca de posibles impurezas).

La elución se lleva a cabo, primero atemperando los cartuchos que estaban congelados durante 10 minutos aproximadamente. Tras ello se colocan los cartuchos en la cubeta usada en la extracción colocando bajo el cartucho un tubo de ensayo para recoger dicho líquido. Finalmente se realiza la elución con 2x3 mL de acetonitrilo y dejando que caiga por gravedad.

La evaporación del extracto se lleva a cabo a temperatura ambiente bajo una corriente de nitrógeno.

Tras ello, los analitos se encontrarán en las paredes del tubo de ensayo, por ello se realiza una redisolución de estos con 1.5 mL de metanol (en 3 vertidas) sobre las paredes del tubo y se recoge el metanol con una pipeta Pasteur y se deja caer por las paredes varias veces. Todo esto para tratar de lograr que no quede apenas nada adherido en las paredes superiores.

Se pasan esos 1.5 mL de metanol a un vial de inyección y se repite la evaporación bajo nitrógeno y cuando no queda líquido se congelan dichos viales ``vacíos`` (en realidad los analitos estarán adheridos a las paredes) a -82°C .

En el momento de la inyección se saca esos viales y se vierte en ellos 1 mL de la fase móvil que se usará en la cromatografía (5% de metanol en agua con 0.1 % de ácido fórmico), se agita bien y se toma todo con una jeringa y usando un filtro de jeringa de PTFE de 0.22 μm se filtra sobre un vial de cromatografía ámbar que es finalmente inyectado.

5.5 Determinación cromatográfica

• Separación cromatográfica

Para determinar las características analíticas de todos los métodos utilizados (inyección directa, SPE-Offline y SPE-Online) y la concentración de los analitos a estudiar (60 analitos de interés farmacológico), la separación cromatográfica se realizó en una columna EVO-C18 (Phenomenex) de 5 cm de longitud, un diámetro interno de 2.1 mm y un tamaño de partícula de 1.7 μm .

La fase móvil utilizada es una mezcla agua/metanol, de proporciones variables según un gradiente, con 0.1% de ácido fórmico. El gradiente de concentraciones comienza siendo metanol al 5% en agua durante 1 minuto, aumenta la concentración del metanol al 95% durante 2 minutos y se mantiene constante en ese valor durante 3 minutos, tras ello disminuye la concentración de metanol hasta el 5% durante 4 minutos y se mantiene en esa concentración otros 4 minutos (reequilibrio del sistema).

El flujo de fase móvil se mantiene constante en 0.5 mL/min, la temperatura de operación también es fija en 40°C. El volumen de inyección sin embargo es variable ya que se van a estudiar varios volúmenes en los métodos automatizados (inyección directa y SPE-Online) para encontrar el volumen óptimo.

• Inyección de muestra

Dependiendo el método de análisis utilizado hay diferencias en el proceso de separación en la extracción de los analitos, o bien en la inyección al sistema UHPLC.

➤ *Inyección directa:*

Para la inyección directa se filtran los 1.5 mL, tomados previamente, con un filtro de jeringa de PTFE de 0.22 μm pasándolo a un vial cromatográfico de 2 mL. Todos estos viales se etiquetan como corresponden y se congelan a -82° para evitar la degradación de los analitos.

En este tipo de método, como indica su nombre, se procede simplemente a la inyección de la matriz sin realizar ninguna extracción previa. Se optimizará el volumen de inyección en el proceso ya que una variable crítica.

➤ *SPE-Offline:*

Para la SPE-offline se inyectan directamente al sistema cromatográfico, de igual forma que la inyección directa, ya que la extracción de los analitos ya se ha producido previamente como se ha explicado.

➤ *SPE-Online:*

Para la SPE-Online se filtran los 1.5 mL, tomados previamente, con un filtro de jeringa de PTFE de 0.22 µm pasándolo a un vial cromatográfico de 2 mL. De igual forma que la inyección directa se etiquetan todos los viales y se congelan a -82°.

En este caso, el propio sistema cromatográfico Sciex Exion UHPLC realiza de forma automatizada la extracción en fase sólida ya que el diagrama de flujo del sistema cromatográfico incluye un mini cartucho Strata X, de dimensiones 20 x 2 mm, que realiza la extracción y luego pasa a la columna cromatográfica.

• **Detección cromatográfica**

Para realizar la detección y determinación de los analitos estudiados se ha utilizado un sistema de espectrometría de masas acoplado al sistema cromatográfico UHPLC. Un sistema de espectrometría de masas está formado por varias partes:

- Sistema de introducción de muestra: es un capilar de nebulización.
- Fuente de ionización: por la cual se ionizan los analitos y compuestos coextraídos, nuestro aparato ha utilizado una ionización blanda de tipo electrospray en modo positivo y negativo con los siguientes parámetros:
 - Flujo de N₂ (gas de nebulización): 45 unidades
 - Capilar de ionización o voltaje del electrodo: 4500 V
 - Gas cortina (N₂): 35 unidades
 - Gas de secado: 45 unidades
 - Temperatura del gas de secado: 400°C
- Analizador de masas: es el encargado de separar los iones con diferente relación de masa/carga (m/z) aplicando un ultra alto vacío con el fin de evitar colisiones de los iones de analito con otras partículas gaseosas. En este caso se ha utilizado un triple cuadrupolo (QQQ) ya que se trata de un espectrómetro de masas en tándem.

En el primer cuadrupolo se selecciona el pseudoión molecular de cada droga que se fragmenta en el 2º cuadrupolo mediante una energía de colisión aplicada por el gas N₂ en condiciones de alta energía. Esto permite monitorizar dos de las transiciones (ión padre-fragmento) que son característicos de cada compuesto, siendo normalmente la primera transición la más intensa y, por ello la utilizada para cuantificar. La segunda transición sirve para comprobar que se está integrando el pico correcto ya que debe aparecer al mismo tiempo de retención que la primera transición.

– Detector: permite revelar el ión que nos interesa y proporcionar una señal eléctrica que es proporcional a la concentración del compuesto.

Tabla 11: Tiempos de retención (RT), transiciones seguidas (m/z) y voltajes aplicados en el espectrómetro de masas para cada compuesto y transición.

RT (min)	Compuesto	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
0,64	Amoxicillin 1	365,9	348,9	26	13	28
	Amoxicillin 2		114,2	26	29	12
0,80	Atenolol 1	267,1	145,1	11	33	24
	Atenolol 2		190,3	11	29	4
0,91	Metronidazole 1	172,0	128,4	41	21	6
	Metronidazole 2		82,1	41	35	14
1,13	Acetaminophen 1	151,9	110,0	61	23	16
	Acetaminophen 2		108,9	61	55	14
1,15	Iohexol 1	821,8	804,1	126	33	26
	Iohexol 2		602,8	126	43	46
1,50	Sulfadiazine 1	251,0	155,9	71	23	20
	Sulfadiazine 2		108,2	71	31	12
1,84	Sulfathiazole 1	255,9	155,9	96	21	8
	Sulfathiazole 2		108,1	96	33	12
1,93	Sulfapyridine 1	250,1	156,1	61	23	10
	Sulfapyridine 2		108,1	61	35	12
2,18	Trimethoprim 1	291,0	230,1	51	33	18
	Trimethoprim 2		261,1	51	35	16
2,77	Marbofloxacin 1	362,9	320,1	66	23	24
	Marbofloxacin 2		326,7	66	25	24
3,30	Tetracycline 1	445,0	410,2	51	27	32
	Tetracycline 2		427,1	51	19	32

3,57	Apramycin 1	271,0	156,1	50	20	19
	Apramycin 2		180,0	50	40	19
3,61	Sulfamethizole 1	270,9	156,1	31	21	10
	Sulfamethizole 2		108,1	31	35	12
3,64	Oxytetracycline 1	460,9	426,1	151	27	30
	Oxitetracycline 2		442,9	151	19	32
3,68	Caffeine 1	195,0	137,9	71	27	18
	Caffeine 2		110,6	71	31	16
3,76	Sulfadimidine 1	278,9	186,7	86	25	22
	Sulfadimidine 2		124,1	86	33	6
3,82	Ofloxacin 1	362,0	318,3	86	29	26
	Ofloxacin 2		261,1	86	37	14
3,90	Levofloxacin 1	362,0	318,1		27	20
	Levofloxacin 2		261,0		37	24
3,93	Norfloxacin 1	320,1	276,2	96	27	18
	Norfloxacin 2		233,1	96	37	16
4,04	Ciprofloxacin 1	332,0	313,9	31	29	38
	Ciprofloxacin 2		231,1	31	57	16
4,15	Sulfamethoxazole 1	253,9	156,2	66	23	24
	Sulfamethoxazole 2		108,0	66	33	16
4,16	Danofloxacin 1	357,9	340,1	86	33	24
	Danofloxacin 2		314,1	86	27	38
4,18	Enrofloxacin 1	359,9	316,2	91	29	38
	Enrofloxacin 2		341,9	91	33	38
4,18	Florfenicol 1	357,8	339,9	66	13	24
	Florfenicol 2		241,3	66	25	14
4,43	4-Hydroxybenzoic acid 1	136,8	92,8	-5	-16	-15
	4-Hydroxybenzoic acid 2		64,9	-5	-40	-13
4,42	Salicylic acid 1	136,9	93,5	-40	-22	-15
	Salicylic acid 2		94,7	-40	-38	-33
4,46	Bisphenol A 1	227,0	227,1	-60	-14	-15
	Bisphenol A 2		211,1	-60	-26	-13
4,47	Propanolol 1	260,1	183,1	66	25	12
	Propanolol 2		116,1	66	25	8
4,48	Methylparaben 1	152,9	120,9	66	21	14
	Methylparaben 2		108,9	66	15	30

4,52	Doxycycline 1	444,9	427,9	111	27	34
	Doxycycline 2		410,1	111	37	36
4,72	Tiamulin 1	494,1	192,2	51	29	10
	Tiamulin 2		119,7	51	59	12
4,79	Tylosin 1	916,2	772,3	156	43	36
	Tylosin 2		174,1	156	51	10
4,84	Ethylparaben 1	164,9	136,9	-35	-20	-11
	Ethylparaben 2		136,8	-35	-20	-13
4,86	Nalidixic acid 1	233,1	187,1	21	37	18
	Nalidixic acid 2		159,9	21	45	18
4,92	Clarithromycin 1	748,3	590,2	96	25	40
	Clarithromycin 2		157,9	96	41	26
4,93	Carbomazepine 1	237,0	194,2	66	29	12
	Carbomazepine 2		193,3	66	47	6
4,98	Penicillin G 1	334,9	160,0	111	23	18
	Penicillin G 2		176,6	111	19	16
5,02	Atrazine 1	216,0	173,9	71	25	22
	Atrazine 2		103,9	71	41	16
5,03	DEET 1	192,0	119,3	56	23	10
	DEET 2		90,3	56	41	10
5,03	Propylparaben 1	178,9	137,1	-60	-20	-13
	Propylparaben 2		136,1	-60	-24	-7
5,06	Erythromycin 1	734,2	576,1	46	25	36
	Erythromycin 2		157,8	46	37	22
5,06	Dexamethasone 1	392,9	355,1	41	19	20
	Dexamethasone 2		147,3	41	39	10
5,13	4-nonylphenol 1	219,1	132,9	-65	-42	-7
	4-nonylphenol 2		117,0	-65	-80	-13
5,14	Clofibric acid 1	212,9	127,1	-35	-24	-15
	Clofibric acid 2		85,0	-35	-14	-9
5,14	Naproxen 1	231,1	185,1	56	21	12
	Naproxen 2		170,5	56	37	10
5,14	Fenbendazol 1	299,9	268,1	96	29	22
	Fenbendazol 2		159,9	96	49	10
5,25	Octylphenol 1	204,9	205,1	-200	-14	-19
	Octylphenol 2		148,3	-200	-26	-7

5,32	Atorvastatin 1	559,2	440,2	26	33	38
	Atorvastatin 2		250,1	26	59	18
5,37	Diclofenac 1	293,9	250,3	-10	-18	-7
	Diclofenac 2		214,1	-10	-28	-9
5,37	Ibuprofen 1	205,0	159,1	-35	-10	-15
	Ibuprofen 2		160,9	-35	-12	-21
5,38	Clofibrate 1	243,0	169,4	86	17	22
	Clofibrate 2		197,2	86	13	10
5,39	Progesterone 1	315,1	109,2	141	31	10
	Progesterone 2		297,2	141	23	28
5,50	Triclosan 1	286,8	286,9	-90	-6	-17
	Triclosan 2		141,8	-90	-48	-15
5,54	Estrone (E1) 1	271,1	253,3	101	19	10
	Estrone (E1) 2		133,1	101	35	12
5,55	β -Estradiol (E2) 1	273,0	255,0	46	17	14
	β -Estradiol (E2) 2	273,1	107,8	61	41	14
5,56	17- α -Ethinylestradiol 1	297,1	107,7	81	33	12
	17- α -Ethinylestradiol 2	297,1	77,1	71	79	10
5,63	Crotamiton 1	204,1	69,4	61	35	12
	Crotamiton 2		136,1	61	27	14
5,90	Gemfibrozil 1	248,9	121,0	-5	-30	-7
	Gemfibrozil 2		127,5	-85	-14	-5
5,84	Acetylsalicylic acid 1	181,1	160,9	71	17	14
	Acetylsalicylic acid 2		125,1	71	19	16
5,95	1,4-Benzoquinone 1	109,0	80,9	121	19	4
	1,4-Benzoquinone 2		53,3	121	29	12

La Tabla 11 muestra los diferentes parámetros de operación óptimos para cada compuesto como son la masa del pseudoión molecular (Q1), la masa del fragmento (Q3), el potencial de entrada al orificio (entrada al espectrómetro de masas, DP), la energía de colisión (necesaria para la fragmentación del pseudoión molecular, CE) y el potencial de salida de la celda de colisión (focaliza los iones antes de su entrada al Q3, CXP). El voltaje EP necesario para la colimación inicial de los iones se ha mantenido constante en un valor de 10V y el tiempo de observación para cada transición ha sido de 7ms. Para la adquisición de datos se ha utilizado el software OS de Sciex.

6 RESULTADOS Y DISCURSIÓN

6.1 Selección del volumen de inyección

El volumen de inyección es, en muestras líquidas, el factor más determinante e influyente en los métodos automáticos ya que es el factor que determina la cantidad de muestra introducida a la columna y, por tanto, la cantidad de muestra estudiada y analizada.

Se va a estudiar la influencia de varios volúmenes de inyección en el área y anchura de pico para dos métodos analíticos automáticos como son la inyección directa y la extracción en fase sólida online (ID y SPE-Online). Estos volúmenes estudiados son del orden de los microlitros (μL).

A priori cuanto mayor sea el volumen mayor debería ser la sensibilidad del análisis porque es mayor la muestra introducida y para volúmenes pequeños habría más dificultad de detectar y cuantificar los analitos. Sin embargo, a mayor volumen mayor es también la señal detectada y por ello el detector puede llegar a la saturación y dar bajos rangos de linealidad.

El estudio del volumen óptimo ha de realizarse para cada matriz estudiada ya que el efecto matriz también varía según el volumen de inyección.

Se seleccionará el volumen que nos de los límites de detección más bajos y buenos rangos lineales ya que nos interesa un método para detectar los analitos a nivel de trazas. A ser posible se seleccionará un volumen de inyección que de un límite de cuantificación menor a 50 ng/L.

6.1.1 Tratamiento de datos

Una vez han sido inyectados los extractos en el UHPLC-MS se realiza la separación cromatográfica y la posterior detección en el espectrómetro de masas de las transiciones características de cada compuesto, generándose cromatogramas en los que se observa la intensidad de señal frente el tiempo de retención.

Los cromatogramas son automáticamente procesados por el software SciexOS, cuantificándose el área de los picos cromatográficos (mediante su integración). Dicho programa ya tiene los valores optimizados de las transiciones de los analitos a determinar y es capaz de aportar los cromatogramas individuales de cada compuesto para cada transición.

Se va a mostrar este proceso desde la obtención de los cromatogramas hasta la cuantificación del compuesto para dos analitos en el análisis de la corriente de salida de la depuradora de agua residual urbana para la inyección directa (para cualquier tipo de muestra, método de análisis y compuesto es idéntico). Uno de los analitos mostrados (Ciprofloxacina) es analizado con su patrón interno (Ciprofloxacina-d8) y el otro (Ofloxacina) es analizado sin patrón interno asociable.

1. Procesado de cromatogramas:

Cuando se tienen todos los resultados de las inyecciones, se realiza una comprobación de la integración realizada por el programa, pudiendo realizarse una corrección manual a la integración.

Se muestran a continuación los cromatogramas correspondientes a la concentración de 20 µg/L y 0.1 µg/L de la inyección directa. Se observan los 4 cromatogramas (uno para cada volumen de inyección) para cada compuesto en cada concentración.

Como puede verse en las Figura 11-12, al aumentar el volumen de inyección aumenta la intensidad de la señal detectada y además en ambos casos se observa también que el tiempo de retención aumenta al aumentar dicho volumen.

Comparando además las Figura 11-12 con las Figura 14-14 se observa que al disminuir la concentración de la muestra inyectada (de 20 a 0.1 µg/L) disminuye la intensidad de la señal detectada como era de esperar.

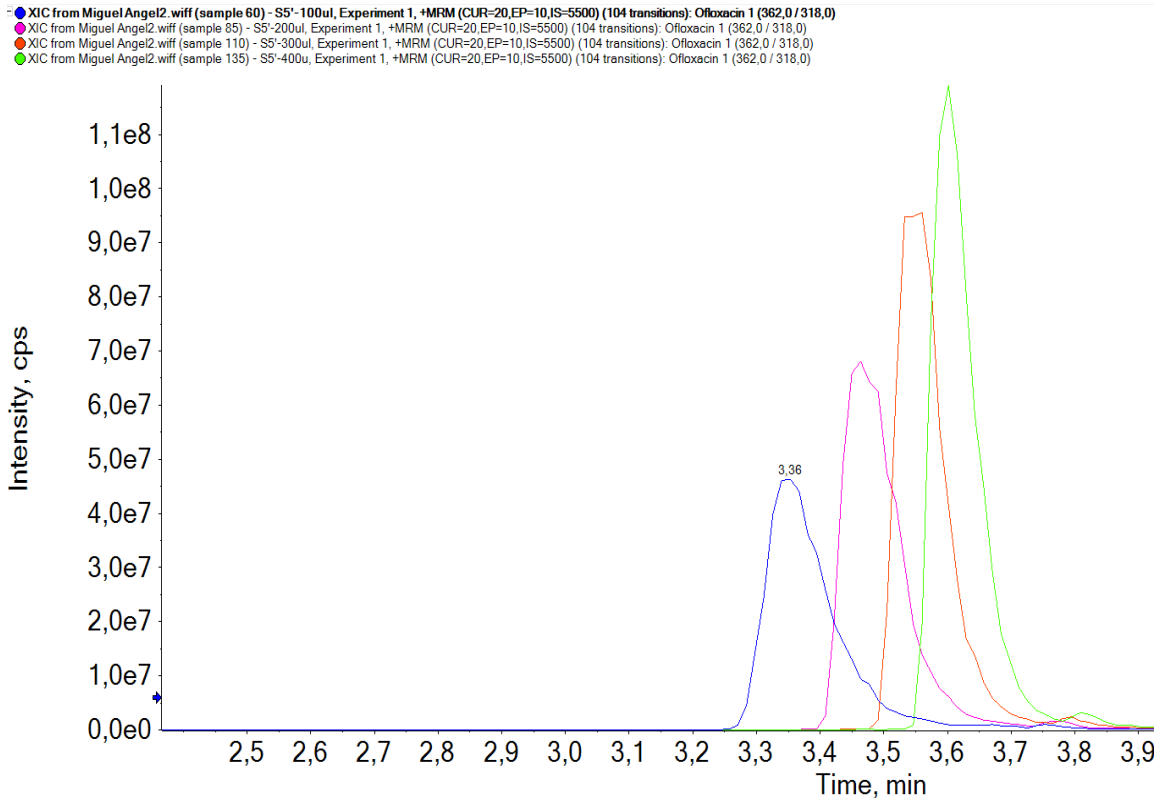


Figura 11: Cromatogramas del Ofloxacin a 20 µg/L para los 4 volúmenes de inyección

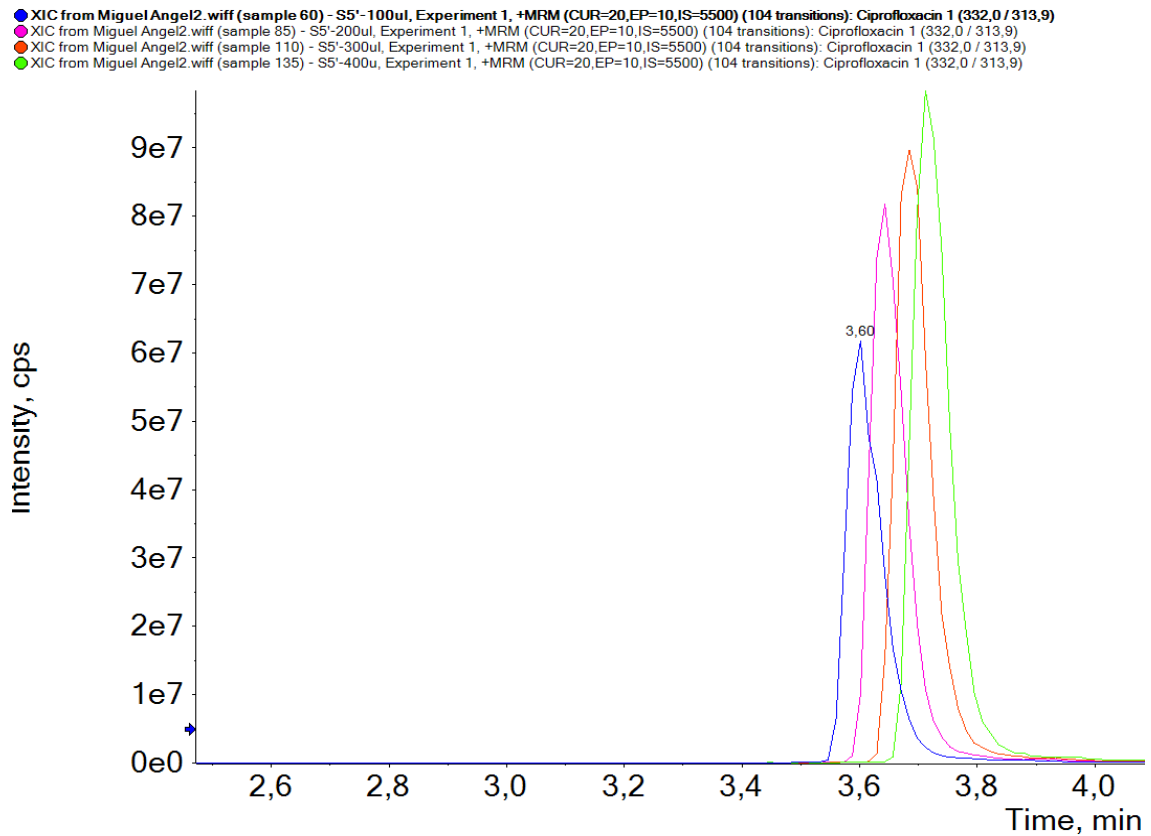


Figura 12: Cromatogramas del Ciprofloxacín a 20 µg/L para los 4 volúmenes de inyección

- XIC from Miguel Angel2.wiff (sample 54) - S10'-100ul, Experiment 1, +MRM (CUR=20,EP=10,IS=5500) (104 transitions): Ciprofloxacín 1 (332,0 / 313,9)
- XIC from Miguel Angel2.wiff (sample 79) - S10'-200ul, Experiment 1, +MRM (CUR=20,EP=10,IS=5500) (104 transitions): Ciprofloxacín 1 (332,0 / 313,9)
- XIC from Miguel Angel2.wiff (sample 104) - S10'-300ul, Experiment 1, +MRM (CUR=20,EP=10,IS=5500) (104 transitions): Ciprofloxacín 1 (332,0 / 313,9)
- XIC from Miguel Angel2.wiff (sample 129) - S10'-400ul, Experiment 1, +MRM (CUR=20,EP=10,IS=5500) (104 transitions): Ciprofloxacín 1 (332,0 / 313,9)

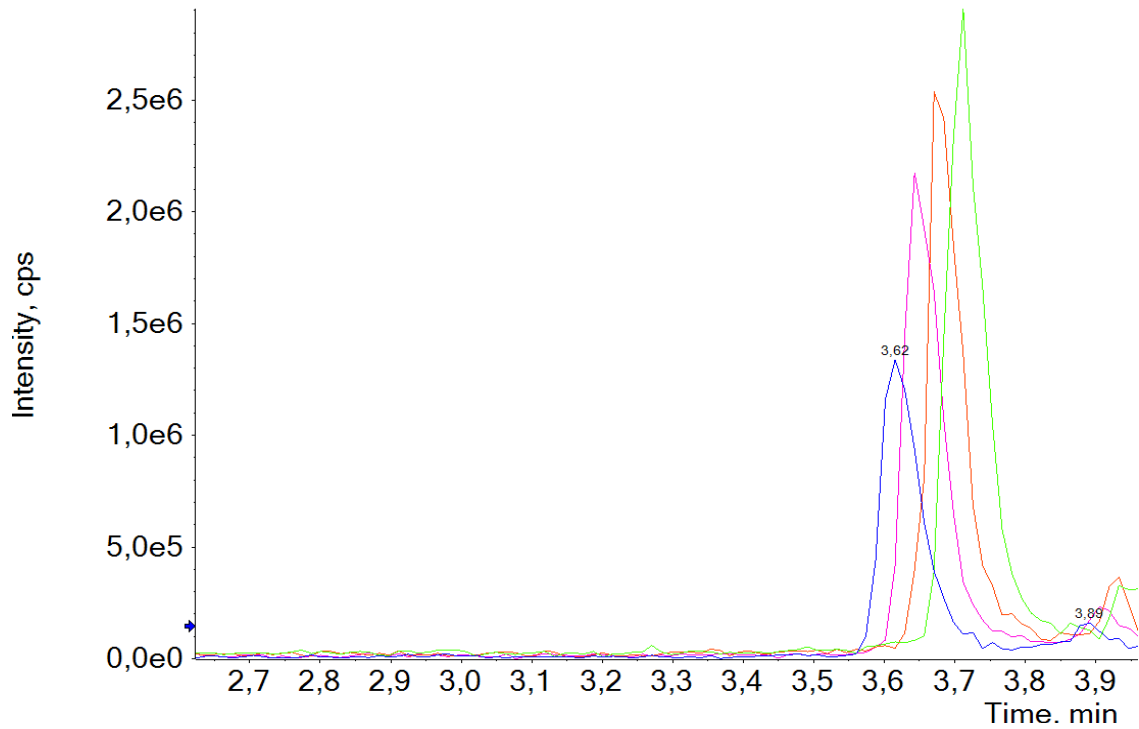


Figura 13: Cromatogramas del Ofloxacin a 0,1 µg/L para los 4 volúmenes de inyección

- XIC from Miguel Angel2.wiff (sample 54) - S10'-100ul, Experiment 1, +MRM (CUR=20,EP=10,IS=5500) (104 transitions): Ofloxacin 1 (362,0 / 318,0)
- XIC from Miguel Angel2.wiff (sample 79) - S10'-200ul, Experiment 1, +MRM (CUR=20,EP=10,IS=5500) (104 transitions): Ofloxacin 1 (362,0 / 318,0)
- XIC from Miguel Angel2.wiff (sample 104) - S10'-300ul, Experiment 1, +MRM (CUR=20,EP=10,IS=5500) (104 transitions): Ofloxacin 1 (362,0 / 318,0)
- XIC from Miguel Angel2.wiff (sample 129) - S10'-400ul, Experiment 1, +MRM (CUR=20,EP=10,IS=5500) (104 transitions): Ofloxacin 1 (362,0 / 318,0)

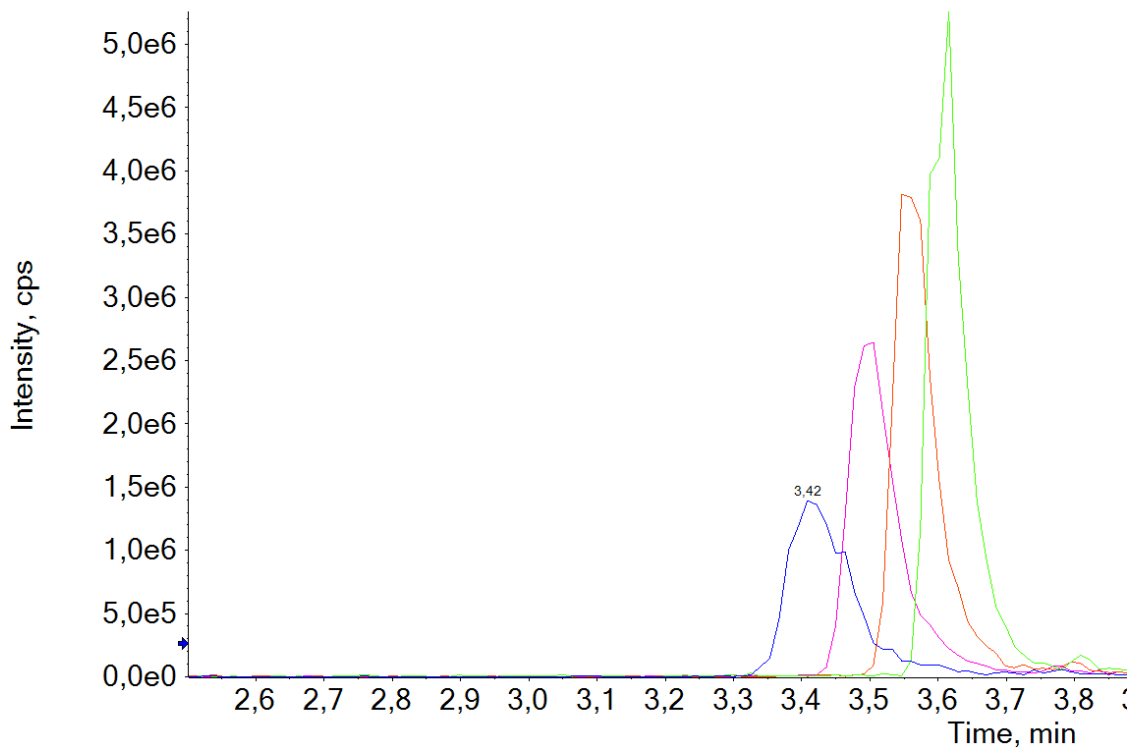


Figura 14: Cromatogramas del Ciprofloxacín a 0,1 µg/L para los 4 volúmenes de inyección

2. Recopilación de los datos en tablas y representación gráfica:

Cuando se sabe ya que todos los picos están bien integrados, se recogen en tablas varios parámetros característicos: área de pico, área del pico del patrón interno (si hay), relación señal/ruido, anchura al 5% de altura y factor de asimetría (anchura lado derecho/anchura lado izquierdo).

Con los valores de área y concentración se va a realizar la representación del área frente a la concentración, con la pequeña diferencia que los compuestos que tienen un patrón interno asociado van a tener representación de la relación de áreas (área compuesto dividido por el área patrón interno) frente a la concentración de analito. Se denomina a estos calibrados matriz-patrón ya que los patrones de calibración contienen la matriz de la muestra.

Se muestran a continuación en las Tabla 12-19 los valores obtenidos en la integración de ambos compuestos para los 4 volúmenes analizados en la inyección directa del efluente.

Tabla 12: Resultados de la integración para el Ofloxacin con 100 uL de volumen de inyección

Concentración (µg/L)	Área	S/R	Anchura 5%	Factor asimetría
Blanco 1	3,8*10 ⁶	84,7	0,28	1,76
Blanco 2	4,0*10 ⁶	89,4	0,29	2,26
0,0005	4,0*10 ⁶	67,8	0,26	2,04
0,0010	4,1*10 ⁶	83,2	0,24	1,59
0,0050	3,9*10 ⁶	76,0	0,25	1,81
0,0100	4,7*10 ⁶	108,4	0,24	1,15
0,0500	5,8*10 ⁶	90,7	0,27	2,35
0,1000	8,7*10 ⁶	136,6	0,25	2,44
0,5	1,5*10 ⁷	194,2	0,25	1,84
1	2,5*10 ⁷	290,2	0,24	1,92
4	1,0*10 ⁸	1022,5	0,23	2,72
10	1,9*10 ⁸	1326,0	0,24	2,82
20	3,2*10 ⁸	2237,3	0,26	2,10
40	5,0*10 ⁸	2436,4	0,26	1,84
60	6,2*10 ⁸	2176,9	0,26	2,34
80	7,4*10 ⁸	3080,7	0,29	1,96
100	8,6*10 ⁸	1922,1	0,29	2,04

Tabla 13: Resultados de la integración para el Ciprofloxacina con 100 uL de volumen de inyección

Concentración (µg/L)	Área	Área pl	S/R	Anchura 5%	Factor asimetría
Blanco 1	3,4*10 ⁶	5,0*10 ⁷	104,7	0,15	2,36
Blanco 2	3,5*10 ⁶	6,5*10 ⁷	138,7	0,16	2,15
0,0005	2,6*10 ⁶	6,0*10 ⁷	91,1	0,15	2,65
0,0010	2,9*10 ⁶	3,1*10 ⁷	69,7	0,15	1,36
0,0050	2,6*10 ⁶	6,0*10 ⁷	133,5	0,12	2,62
0,0100	4,5*10 ⁶	6,1*10 ⁷	124,2	0,14	2,08
0,0500	4,0*10 ⁶	4,9*10 ⁷	115,1	0,15	2,20
0,1000	5,3*10 ⁶	5,0*10 ⁷	158,8	0,16	2,14
0,5	9,1*10 ⁶	6,0*10 ⁷	185,0	0,15	2,31
1	1,6*10 ⁷	5,3*10 ⁷	420,5	0,14	2,41
4	1,1*10 ⁸	6,0*10 ⁷	1254,9	0,14	1,68
10	1,4*10 ⁸	6,1*10 ⁷	1350,7	0,14	2,44
20	2,5*10 ⁸	5,0*10 ⁷	2338,4	0,15	1,99
40	4,3*10 ⁸	5,5*10 ⁷	2471,4	0,15	2,96
60	4,9*10 ⁸	5,2*10 ⁷	2054,6	0,15	1,75
80	5,7*10 ⁸	5,0*10 ⁷	2289,4	0,16	1,59
100	6,2*10 ⁸	5,6*10 ⁷	2253,9	0,17	2,06

Tabla 14: Resultados de la integración para el Ofloxacina con 200 uL de volumen de inyección

Concentración (µg/L)	Área	S/R	Anchura 5%	Factor asimetría
Blanco 1	5,4*10 ⁶	125,8	0,19	1,44
Blanco 2	5,9*10 ⁶	151,4	0,20	1,85
0,0005	5,4*10 ⁶	167,1	0,19	1,82
0,0010	6,0*10 ⁶	170,2	0,19	1,59
0,0050	5,6*10 ⁶	129,5	0,18	1,58
0,0100	6,6*10 ⁶	194,8	0,20	2,03
0,0500	8,2*10 ⁶	222,5	0,20	1,57
0,1000	1,3*10 ⁷	249,5	0,19	1,48
0,5	2,3*10 ⁷	443,2	0,19	1,83
1	3,9*10 ⁷	684,9	0,19	2,03
4	1,4*10 ⁸	2583,4	0,19	1,44
10	2,6*10 ⁸	2797,7	0,20	1,95
20	4,2*10 ⁸	3382,5	0,21	1,95
40	7,0*10 ⁸	3687,9	0,23	2,34
60	8,4*10 ⁸	3126,7	0,23	1,86
80	9,4*10 ⁸	3182,5	0,24	2,11
100	1,0*10 ⁹	3207,3	0,25	1,86

Tabla 15: Resultados de la integración para el Ciprofloxacín con 200 uL de volumen de inyección

Concentración (µg/L)	Área	Área pl	S/R	Anchura 5%	Factor asimetría
Blanco 1	5,1*10 ⁶	7,8*10 ⁷	145,0	0,15	1,50
Blanco 2	4,3*10 ⁶	8,4*10 ⁷	131,2	0,13	1,34
0,0005	4,3*10 ⁶	9,1*10 ⁷	125,9	0,13	1,44
0,0010	4,1*10 ⁶	9,2*10 ⁷	155,3	0,15	1,43
0,0050	3,6*10 ⁶	8,4*10 ⁷	87,3	0,13	1,75
0,0100	5,7*10 ⁶	8,1*10 ⁷	118,4	0,14	1,86
0,0500	5,6*10 ⁶	7,1*10 ⁷	109,3	0,12	1,64
0,1000	7,8*10 ⁶	7,5*10 ⁷	160,5	0,14	1,80
0,5	1,5*10 ⁷	7,9*10 ⁷	382,6	0,14	1,83
1	2,6*10 ⁷	7,8*10 ⁷	609,7	0,13	1,61
4	1,6*10 ⁸	8,0*10 ⁷	2123,3	0,13	1,67
10	2,0*10 ⁸	9,2*10 ⁷	2122,4	0,14	1,50
20	3,3*10 ⁸	7,4*10 ⁷	2659,7	0,14	1,43
40	5,4*10 ⁸	8,6*10 ⁷	2615,2	0,16	1,58
60	6,4*10 ⁸	7,1*10 ⁷	2590,1	0,16	1,62
80	6,9*10 ⁸	6,9*10 ⁷	2740,3	0,15	1,77
100	7,6*10 ⁸	8,2*10 ⁷	2088,8	0,17	1,32

Tabla 16: Resultados de la integración para el Ofloxacín con 300 uL de volumen de inyección

Concentración (µg/L)	Área	S/R	Anchura 5%	Factor asimetría
Blanco 1	7,6*10 ⁶	198,5	0,16	1,70
Blanco 2	7,6*10 ⁶	232,9	0,16	1,55
0,0005	7,2*10 ⁶	217,6	0,18	1,74
0,0010	7,5*10 ⁶	190,8	0,16	1,35
0,0050	6,9*10 ⁶	184,6	0,15	1,42
0,0100	8,3*10 ⁶	224,7	0,18	1,83
0,0500	1,0*10 ⁷	245,8	0,17	1,93
0,1000	1,6*10 ⁷	373,3	0,17	2,23
0,5	2,8*10 ⁷	2686,8	0,16	1,69
1	4,8*10 ⁷	832,8	0,18	1,37
4	1,7*10 ⁸	2124,0	0,17	1,55
10	3,1*10 ⁸	3403,1	0,18	1,84
20	5,0*10 ⁸	3674,6	0,18	1,38
40	7,4*10 ⁸	4705,6	0,20	1,91
60	8,4*10 ⁸	4520,4	0,22	2,78
80	9,4*10 ⁸	4595,1	0,33	2,12
100	9,7*10 ⁸	3121,3	0,34	4,34

Tabla 17: Resultados de la integración para el Ciprofloxacina con 300 uL de volumen de inyección

Concentración (µg/L)	Área	Área pl	S/R	Anchura 5%	Factor asimetría
Blanco 1	6,4*10 ⁶	8,1*10 ⁷	177,6	0,16	1,69
Blanco 2	6,0*10 ⁶	1,0*10 ⁸	141,2	0,16	2,08
0,0005	5,2*10 ⁶	1,1*10 ⁸	112,5	0,16	1,63
0,0010	5,1*10 ⁶	1,1*10 ⁸	149,1	0,15	1,59
0,0050	4,7*10 ⁶	1,1*10 ⁸	269,0	0,14	1,87
0,0100	7,4*10 ⁶	1,0*10 ⁸	181,8	0,15	1,56
0,0500	6,5*10 ⁶	9,7*10 ⁷	160,0	0,14	1,55
0,1000	8,6*10 ⁶	8,6*10 ⁷	178,2	0,15	2,00
0,5	1,8*10 ⁷	1,0*10 ⁸	374,5	0,13	1,66
1	2,9*10 ⁷	9,5*10 ⁷	1039,8	0,14	1,29
4	1,8*10 ⁸	1,0*10 ⁸	1801,0	0,14	1,75
10	2,3*10 ⁸	1,1*10 ⁸	1936,6	0,14	1,53
20	3,8*10 ⁸	9,5*10 ⁷	2240,8	0,15	1,43
40	6,1*10 ⁸	7,7*10 ⁷	2472,9	0,16	1,34
60	6,9*10 ⁸	9,1*10 ⁷	2930,3	0,17	1,74
80	7,8*10 ⁸	9,3*10 ⁷	4741,9	0,18	2,19
100	8,4*10 ⁸	7,8*10 ⁷	2638,1	0,18	1,12

Tabla 18: Resultados de la integración para el Ofloxacina con 400 uL de volumen de inyección

Concentración (µg/L)	Área	S/R	Anchura 5%	Factor asimetría
Blanco 1	8,9*10 ⁶	208,1	0,15	1,48
Blanco 2	8,9*10 ⁶	784,1	0,15	2,06
0,0005	7,8*10 ⁶	205,0	0,14	1,47
0,0010	8,9*10 ⁶	214,6	0,14	1,37
0,0050	7,8*10 ⁶	184,6	0,14	1,29
0,0100	9,6*10 ⁶	314,4	0,15	1,83
0,0500	1,2*10 ⁷	347,8	0,15	1,48
0,1000	1,9*10 ⁷	469,6	0,15	1,37
0,5	3,4*10 ⁷	861,3	0,15	1,85
1	5,6*10 ⁷	1072,0	0,15	1,95
4	1,9*10 ⁸	2673,4	0,15	1,47
10	3,2*10 ⁸	2610,8	0,16	1,93
20	5,3*10 ⁸	3350,1	0,17	1,66
40	7,5*10 ⁸	4005,5	0,20	2,58
60	8,4*10 ⁸	4310,9	0,29	3,67
80	9,1*10 ⁸	3306,8	0,29	5,34
100	9,5*10 ⁸	1733,9	0,22	1,18

Tabla 19: Resultados de la integración para el Ciprofloxacín con 400 uL de volumen de inyección

Concentración (µg/L)	Área	Área pl	S/R	Anchura 5%	Factor asimetría
Blanco 1	8,7*10 ⁶	1,1*10 ⁸	133	0,15	1,61
Blanco 2	7,5*10 ⁶	1,2*10 ⁸	146,4	0,13	1,51
0,0005	6,3*10 ⁶	1,2*10 ⁸	154,6	0,16	1,76
0,0010	6,3*10 ⁶	1,2*10 ⁸	116,4	0,15	1,61
0,0050	5,1*10 ⁶	1,2*10 ⁸	101,4	0,13	1,32
0,0100	8,4*10 ⁶	1,2*10 ⁸	168,2	0,15	1,42
0,0500	7,4*10 ⁶	1,0*10 ⁸	151,7	0,13	1,41
0,1000	1,0*10 ⁷	9,5*10 ⁷	192,7	0,14	1,41
0,5	1,9*10 ⁷	1,2*10 ⁸	324,1	0,14	1,54
1	3,3*10 ⁷	1,1*10 ⁸	452,6	0,14	1,71
4	2,1*10 ⁸	1,2*10 ⁸	1417,8	0,14	1,34
10	2,5*10 ⁸	1,1*10 ⁸	1871,8	0,15	1,61
20	4,2*10 ⁸	1,0*10 ⁸	3087,9	0,15	1,53
40	6,5*10 ⁸	1,1*10 ⁸	3634,3	0,17	1,31
60	7,8*10 ⁸	9,8*10 ⁷	3882,5	0,18	1,16
80	8,4*10 ⁸	9,7*10 ⁷	3214,3	0,19	1,13
100	9,0*10 ⁸	1,1*10 ⁸	2432,8	0,20	1,09

Con los valores de área frente a concentración se realiza la representación lineal con la que luego se puede determinar el rango lineal y la concentración de la muestra. Se muestra en la Figura 15 representación del Ofloxacin para los 4 volúmenes de inyección distintos en la inyección directa.

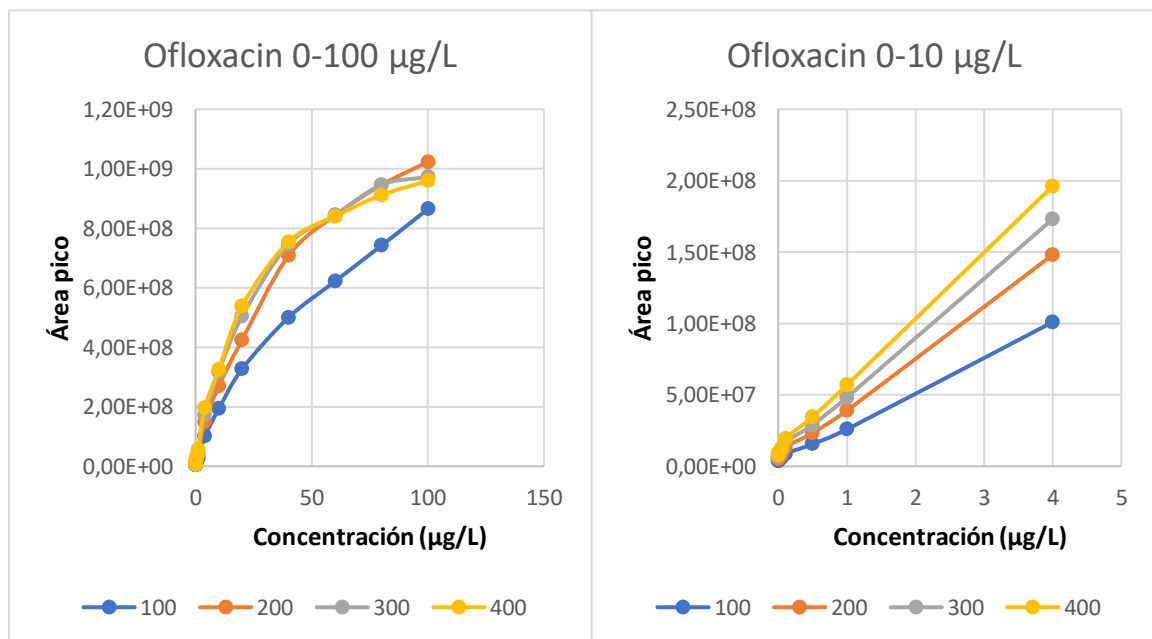


Figura 15: Representación del área de pico frente la concentración para los diferentes volúmenes estudiados en ID para el Ofloxacin

En la representación del Ofloxacin (Figura 15) se ve como el rango lineal no es de 0-100 µg/L ya que la recta se curva a partir de los 4 µg/L debido a la saturación del detector, es por esto por lo que se realiza otro grafico delimitando el rango a 4 µg/L. Se escoge el valor del rango lineal atendiendo a que el parámetro R^2 del ajuste lineal sea mayor o igual a 0,99. Se ve, además, como ocurre en el resto de los casos que al aumentar el volumen de inyección aumenta la pendiente de la recta.

Tras recopilar todos los datos se realiza una tabla resumen (Tabla 20) en la que se seleccionan los datos de anchura y factor de simetría de una concentración arbitraria (60 µg/L) para comparar esos parámetros entre los distintos volúmenes.

Se añade también el límite de cuantificación y detección del método (MLQ y MLD respectivamente) que se calculan multiplicando por 10 y por 3 la división de concentración en µg/L entre señal/ruido respectivamente.

El rango lineal exacto se expresa mediante la diferencia entre la concentración máxima de linealidad (a la cual deja de ser una recta la representación de intensidad frente concentración) y el valor del MLQ (concentración mínima cuantificable). En la Tabla 20 se muestra en unidades de ng/L para poder compararlo entre volúmenes y ver variación notable.

Tabla 20: Resumen de parámetros analíticos para la inyección directa para Ofloxacin y Ciprofloxacina

Analito	Volumen (µL)	Anchura 5%	Factor simetría	MLQ (ng/L)	Rango lineal (ng/L)
Ofloxacin	100	0,26	2,32	27	9972,4
Ofloxacin	200	0,23	2,61	8	3991,5
Ofloxacin	300	0,22	4,02	9	3991,1
Ofloxacin	400	0,29	3,93	7	3993,3
Ciprofloxacina	100	0,15	1,72	69	19931,5
Ciprofloxacina	200	0,16	2,11	25	19974,8
Ciprofloxacina	300	0,17	2,42	14	19986,4
Ciprofloxacina	400	0,18	1,14	18	19982,1

El cálculo de parámetros como el MLQ, el MLD, el rango lineal y la pendiente dependen de si hay señal en el blanco (si hay compuesto en la muestra sin dopar). Si no hay señal en el blanco, se calculan como se ha mostrado en este apartado, es decir, con la recta del calibrado matriz-patrón. En el caso de estos dos compuestos, hay señal y no valdrían dichos parámetros.

Si hay señal en el blanco hay que calcular antes las concentraciones presentes para calcular después dichos parámetros. Las concentraciones en las muestras se determinan mediante un calibrado de adiciones patrón y posteriormente se realiza el calibrado matriz patrón en el que se representa el área frente la concentración total (suma de la concentración de la muestra y la concentración de dopado). Es de esta recta, con la concentración de la muestra calculada de la que se extraen dichos parámetros.

3. Cálculo de concentración:

Se trabaja con muestras de agua real que pueden contener los compuestos que se estudian. Para poner a punto un método de análisis es necesario conocer cuáles están presentes y en qué concentración. El cálculo de concentración en la muestra estudiada (en este ejemplo el efluente de agua residual urbana) se realiza mediante una calibración de adiciones patrón que en este caso cuenta con 2 blancos y varias muestras con concentraciones ascendentes de analito.

Al realizarse la representación mostrada en el anterior apartado con todas las muestras (incluidos los blancos), teniendo en cuenta las concentraciones añadidas se determina la concentración que había en los blancos mediante el cálculo de la intersección con el eje x' , de la concentración, y cambiándole el signo (concentración equivalente).

Teniendo ese valor correspondiente a la concentración del blanco se realiza una nueva representación denominada calibrado matriz-patrón en la que se representa el área frente la concentración real de las muestras (suma de la concentración calculada en la muestra más la concentración añadida al dopar con patrones).

Con esta nueva representación obtenemos la pendiente que nos aporta el método para ese analito al tiempo que es posible calcular también el MLQ, el MLD y el rango lineal a partir de la concentración total presente cuando la presencia es positiva.

En la Tabla 21 se muestran los valores de concentración calculadas de ambos analitos en cada volumen para el efluente en la inyección directa.

Tabla 21: Concentraciones calculadas en el efluente de la ID del Ofloxacin y Ciprofloxacina

Analito	Volumen (µL)	Concentración calculada efluente (µg/L)
Ofloxacin	100	0,29
Ofloxacin	200	0,15
Ofloxacin	300	0,19
Ofloxacin	400	0,20
Ciprofloxacina	100	0,91
Ciprofloxacina	200	0,39
Ciprofloxacina	300	0,36
Ciprofloxacina	400	0,28

6.1.2 Agua Milli-Q

El estudio del volumen de inyección se comienza para el agua Milli-Q, en la que se asume un efecto matriz nulo, o casi nulo, se han estudiado 25, 50, 100, 200, 300 y 400 μL como volúmenes de inyección para ambos métodos automáticos. El estudio de los volúmenes en el agua Milli-Q va a servir para descartar algún volumen de inyección para las muestras de agua residual urbana y ganadera.

Para poder seleccionar el volumen óptimo se van a estudiar tres factores principales: el límite de cuantificación del método (MLQ), el rango lineal y la anchura del pico al 5% de la altura del pico desde la línea de base.

Para cada volumen se van a estimar varios parámetros estadísticos que nos den idea de los valores obtenidos de esos tres factores estudiados. Los parámetros estadísticos que nos dan mejor idea de ello son la mediana y los percentiles.

La mediana (μ) indica cual es el valor central de una serie de datos y se observa en nuestro caso que es más adecuada que la media para dar idea de un valor orientativo de cada factor, ya que la última es más susceptible a variar mucho por valores extremos.

Los percentiles nos dan los valores del factor por debajo de los cuales se encuentran un % determinado de compuestos. El percentil 90% nos da el valor del factor por debajo del cual se encuentran el 90% de los valores. Nos sirve para darnos una idea de cómo es la distribución de nuestros datos.

Se muestra en la Tabla 22 os parámetros estadísticos comentados para los tres factores estudiados en cada método de análisis y volumen de inyección.

Tabla 22: Resumen de parámetros estadísticos en los métodos automáticos para el agua Milli-Q

Milli-Q	Inyección directa									SPE Online								
	MLQ (ng/L)			Rango lineal			Anchura 5%			MLQ (ng/L)			Rango lineal			Anchura 5%		
Vol iny (μL)	μ	P25%	P75%	μ	P90%	P95%	μ	P90%	P95%	μ	P25%	P75%	μ	P90%	P95%	μ	P90%	P95%
25	5	0,1	80	99549,5	99999,8	99999,9	0,12	0,37	0,48	565	144	1160	79270,0	99711,0	99937,7	0,44	0,71	0,74
50	3	0,2	76	99448,3	99999,7	99999,7	0,12	0,34	0,50	254	75	578	99418,6	99990,9	99998,3	0,44	0,74	0,87
100	2	0,2	52	79999,8	99999,1	99999,1	0,13	0,37	0,50	106	14	555	79999,0	99969,7	99997,6	0,45	0,97	1,09
200	0.4	0,1	11	79992,9	99999,6	99999,7	0,12	0,44	0,66	94	15	225	69235,4	99975,6	99990,4	0,46	0,90	1,09
300	0.4	0,1	35	79983,1	99988,8	99999,6	0,12	0,55	0,66	71	5	179	79871,5	99936,1	99961,8	0,50	0,82	1,10
400	0.3	0,04	17	19999,8	99986,5	99999,8	0,12	0,67	0,96	66	2	121	49822,1	99933,7	99998,0	0,65	0,85	1,15

De la Tabla 22 se pueden acotar cuales son los mejores volúmenes en estos métodos:

- Inyección directa: Se usarán 100, 200, 300 y 400 μL en las muestras de aguas residuales a estudiar ya que son los volúmenes de inyección que menores límites de cuantificación ofrecen en dicho método. A partir de un volumen de inyección de 100 μL el 75% de los analitos tiene MLQ del orden de 50 ng/L o inferiores.
- SPE-Online: Se usarán también 100, 200, 300 y 400 μL como volúmenes de inyección para las muestras de agua residual por el mismo motivo de dar buenos límites de cuantificación.

Se ha tomado el factor del límite de cuantificación como prioritario frente la anchura y el rango lineal ya que nos interesa un método con bajos límites de cuantificación para poderlos utilizar en el estudio de analitos a nivel de trazas.

Además de estos parámetros estadísticos se realizó un conteo de los analitos para los que se tiene un límite de cuantificación (MLQ) menor de 50 ng/L. Se calculó el porcentaje de dichos analitos frente al total de analitos que dan señal en cada método. Con este porcentaje nos hacemos a la idea de que volúmenes de inyección son mejores para el análisis de concentraciones a nivel de trazas.

Se muestra en la Tabla 23 el conteo y porcentaje de compuestos con MLQ menor que 50 ng/L frente los detectados para cada método y cada volumen para poder acotar los mejores volúmenes de inyección en cada método.

Tabla 23: Conteo y porcentaje de analitos con MLQ<50 ng/L frente los detectados en agua Milli-Q

Volumen inyección (μL)	Inyección directa			SPE-Online		
	Nº Analitos con MLQ<50 ng/L	Nº Analitos detectados	% Analitos detectados y MLQ<50 ng/L	Nº Analitos con MLQ<50 ng/L	Nº Analitos detectados	% Analitos detectados y MLQ<50 ng/L
25	32	44	73	6	45	13
50	33	44	75	9	46	19
100	33	45	74	17	46	37
200	35	44	80	18	47	38
300	37	43	86	20	47	43
400	34	42	81	22	45	49

En la Tabla 23 se observa que los volúmenes de inyección de 100, 200, 300 y 400 μL proporcionan porcentajes de compuestos elevados con MLQs menores de 50 ng/L tanto en la inyección directa como en la SPE-Online, y de acuerdo también con los resultados mostrados anteriormente.

Como conclusión, se han acotado los volúmenes de 6 posibles a 4 volúmenes para el estudio de las muestras de agua residual urbana y ganadera en las que ya se tomará entre estos volúmenes el óptimo para cada una.

6.1.3 Agua residual urbana

Para esta matriz se va a seleccionar solo un volumen como óptimo para realizar la posterior validación del método.

Se van a estudiar 100, 200, 300 y 400 μL como volúmenes candidatos y se va a seleccionar el volumen que mejores resultados nos dé para cada corriente de la depuradora (influyente y efluente) y para cada método automático. El volumen óptimo no tiene por qué ser el mismo en cada corriente, ni en cada método.

Para seleccionar el volumen óptimo se va a realizar el estudio de la misma manera que con el agua Milli-Q.

Se va a estudiar inicialmente una tabla con parámetros estadísticos como son la mediana y los percentiles para poder acotar cuales son con ese criterio los mejores volúmenes de inyección en cada método y en este caso también en cada corriente (el agua Milli-Q no había ese estudio).

Tras ello se va a estudiar una segunda tabla en la que se calculará el porcentaje de compuestos para los que el método y volumen de inyección aporten un MLQ menor de 50 ng/L frente los que dan señal.

Teniendo en cuenta ambas tablas se determinará definitivamente cual es el volumen óptimo para cada corriente de agua y cada método de análisis automático y será el usado para cuantificar y para realizar la validación del método posteriormente.

Se muestran en las Tabla 24-25 los parámetros estadísticos para los tres factores estudiados en cada método, cada volumen y cada corriente de agua residual urbana.

Tabla 24: Resumen de parámetros estadísticos en los métodos automáticos para el agua residual urbana con SPE-Online

		SPE Online								
		MLQ (ng/L)			Rango lineal (ng/L)			Anchura 5%		
Volumen (μL)		μ	P25%	P75%	μ	P90%	P95%	μ	P90%	P95%
Influyente	100	189	23	575	99471,3	99990,7	99995,1	0,51	0,88	1,03
	200	122	17	489	99320,6	99985,1	99988,1	0,55	0,89	0,96
	300	112	15	386	79990,4	99985,1	99990,6	0,56	0,89	1,08
	400	79	19	319	79942,4	99975,2	99998,2	0,58	0,98	1,11
Efluente	100	100	65	210	99420,6	99967,2	99997,1	0,53	1,10	1,22
	200	103	50	173	79918,0	99981,5	99989,7	0,52	0,98	1,10
	300	103	35	142	79518,7	99916,7	99989,4	0,52	0,99	1,14
	400	70	39	137	49953,2	99933,3	99943,2	0,54	1,06	1,19

Tabla 25: Resumen de parámetros estadísticos en los métodos automáticos para el agua residual urbana con ID

		Inyección directa								
		MLQ (ng/L)			Rango lineal (ng/L)			Anchura 5%		
Volumen (μL)		μ	P25%	P75%	μ	P90%	P95%	μ	P90%	P95%
Influyente	100	133	25	316	98927,3	99975,0	99979,3	0,12	0,36	0,46
	200	37	14	296	79744,5	99969,5	99991,9	0,12	0,42	0,47
	300	57	12	175	79388,6	99969,5	99998,8	0,13	0,42	0,54
	400	70	10	246	59929,6	99918,6	99978,7	0,14	0,50	0,72
Efluente	100	47	19	117	39936,9	99883,4	99918,0	0,11	0,35	0,42
	200	38	13	85	39955,8	99946,0	99984,4	0,11	0,42	0,58
	300	38	13	83	39682,7	99915,3	99960,9	0,13	0,44	0,69
	400	23	10	67	19981,8	99908,0	99886,5	0,14	0,40	0,45

En las Tabla 24-25 se obtiene como conclusiones:

- En la inyección directa:
 - Influyente: Los mejores volúmenes son 200 y 300 μL ya que son los dos que proporcionan MLQ más bajos y rango lineales amplios, siendo ambos similares en dicho rango. Las anchuras de pico son muy similares por lo que no se tienen tanto en cuenta.
 - Efluente: Los mejores volúmenes son 300 y 400 μL ya que son los dos que proporcionan MLQ más bajos. El de 300 tiene mejor rango lineal, mientras que 400 tiene mejor MLQ.

- En la SPE-Online:
 - Influyente: Los mejores volúmenes son 300 y 400 μL ya que son los que menor MLQ tienen y ambos tienen similares rangos lineales entre sí. Las anchuras de pico son similares entre sí.
 - Efluente: Los mejores volúmenes son 200, 300 y 400 μL ya que 200 y 300 tienen buen rango lineal y 400 es el que mejor MLQ tiene de todos ellos. Las anchuras de pico son similares entre sí. Se observa también que las anchuras de pico son más grandes en la SPE-Online que en la inyección directa.

Finalmente, para seleccionar el volumen óptimo entre estos acotados, en la Tabla 26 se realizó un conteo del número de analitos que tienen un límite de cuantificación menor a 50 ng/L y se calculó el porcentaje de estos frente al total de los analitos detectados y se priorizará frente a la mediana.

El volumen que aporte mayor porcentaje en la Tabla 26 será el que más nos convendrá debido a que la prioridad del método es que sea bueno a nivel de trazas, centrándonos sobre todo en los volúmenes previamente acotados.

Tabla 26: Conteo y porcentaje de analitos con MLQ<50 ng/L frente los detectados en agua residual urbana

Corriente agua residual urbana	Volumen inyección (µL)	Inyección directa			SPE-Online		
		Nº Analitos con MLQ<50 ng/L	Nº Analitos detectado	% Analitos detectado y MLQ<50 ng/L	Nº Analitos con MLQ<50 ng/L	Nº Analito detectado	% Analito detectado y MLQ<50 ng/L
Influente	100	15	42	35	14	42	33
	200	20	39	51	14	42	33
	300	18	39	46	16	41	39
	400	18	39	46	16	40	40
Efluente	100	21	41	51	8	38	21
	200	23	40	57	9	39	23
	300	23	40	57	12	39	30
	400	28	40	70	11	38	28

En la Tabla 26 se obtienen como volúmenes óptimos:

- En la inyección directa:
 - Influyente: El volumen seleccionado es **200 µL** debido a que es el que mayor porcentaje de analitos bajo ese límite de 50 ng/L nos proporciona (51%).
 - Efluente: El volumen seleccionado es **400 µL** debido a que es el que mayor porcentaje de analitos bajo ese límite de 50 ng/L nos proporciona (70%).
- En la SPE-Online:
 - Influyente: El volumen seleccionado es 300 µL debido a que, aunque no es el que mayor porcentaje nos dé (300 µL nos da 39% y 400 µL 40%), nos proporciona los mismos analitos con ese límite (16) y detecta uno a mayores que el volumen de 400 µL (41).
 - Efluente: El volumen seleccionado es 300 µL debido a que es el que mayor porcentaje de analitos bajo ese límite de 50 ng/L nos proporciona (30%).

Como conclusión, en la selección de los volúmenes de inyección óptimos, los seleccionados son 300 µL para la SPE-Online tanto en influente como efluente. En la inyección directa son 200 µL para el influente y 400 µL para el efluente.

6.1.4 Agua residual ganadera

Para esta matriz, así como para la de agua residual urbana, se va a seleccionar solo un volumen como óptimo para realizar la posterior validación del método.

Se van a estudiar 100, 200, 300 y 400 μL como volúmenes candidatos y se va a seleccionar el volumen que mejores resultados nos dé para cada corriente del biorreactor (influyente y efluente) y para cada método automático. El volumen óptimo no tiene por qué ser el mismo en cada corriente, ni en cada método.

Para seleccionar el volumen óptimo se va a realizar el estudio de la misma manera que con el agua residual urbana con una pequeña variación: el rango de concentraciones de las adiciones patrón comprende concentraciones desde 0.0005 hasta 40 $\mu\text{g/L}$.

Se van a estudiar los mismos datos, con parámetros estadísticos como son la mediana y los percentiles, como en el caso del agua residual urbana.

Tras ello se mostrará el porcentaje de compuestos para los que el método y volumen de inyección aporten un MLQ menor de 50 ng/L .

Teniendo en cuenta ambos tipos de datos se determinará definitivamente cual es el volumen óptimo, únicamente para el método de análisis de inyección directa (ya que se vio en el agua residual urbana que era el método automático que mejores resultados aportaba) en ambas corrientes.

Se muestran dichos valores en las Tabla 27-28.

Tabla 27: Resumen de parámetros estadísticos para el agua residual ganadera con ID influyente

Influyente	Inyección directa								
	MLQ (ng/L)			Rango lineal (ng/L)			Anchura 5%		
Vol iny (μL)	μ	P25%	P75%	μ	P90%	P95%	μ	P90%	P95%
100	28	12	227	19997,0	39964,0	39970,9	0,13	0,37	0,50
200	22	7	259	19992,8	39980,7	39987,7	0,15	0,52	0,58
300	18	8	226	19992,4	39984,3	39990,5	0,16	0,47	0,64
400	20	6	190	19991,8	39984,7	39989,1	0,16	0,41	0,74

Tabla 28: Resumen de parámetros estadísticos para el agua residual ganadera con ID efluente

Efluente	Inyección directa								
	MLQ (ng/L)			Rango lineal (ng/L)			Anchura 5%		
Vol iny (μL)	μ	P25%	P75%	μ	P90%	P95%	μ	P90%	P95%
100	23	8	319	19985,7	39697,7	39828,4	0,11	0,35	0,44
200	18	4	192	19996,9	39966,9	39974,7	0,12	0,38	0,50
300	18	5	131	19990,8	39959,0	39980,2	0,12	0,46	0,56
400	18	4	90	19991,8	39939,8	39978,4	0,13	0,45	0,74

En las Tabla 27-28 se obtienen como conclusiones:

- Influyente: Todos los volúmenes tienen valores de mediana del MLQ, rango lineal y anchura muy similares. Los mejores volúmenes de inyección según la mediana del MLQ son 300 y 400 μL. Según el rango lineal y la anchura el mejor volumen de inyección es 100 μL.
- Efluente: Al igual que en la corriente de entrada todos los volúmenes tienen valores de mediana del MLQ, rango lineal y anchura muy similares. Los mejores volúmenes de inyección según la mediana del MLQ son 200, 300 y 400 μL. Según el percentil de 75% se puede ver que 400 μL es un volumen que da notablemente menor valor en este parámetro. Según el rango lineal el mejor sería 200 μL.

En estas tablas no obtenemos resultados tan claros para seleccionar uno o dos volúmenes óptimos como obtuvimos en el estudio estadístico de la ID en el agua residual urbana. Según el parámetro observado el volumen óptimo varía. A continuación, se va a considerar el número de compuestos con MLQ inferior a 50 ng/L.

Se muestra en la Tabla 29 los porcentajes de compuestos con MLQ inferior a 50 ng/L frente el total de compuestos que se detectaron a cada volumen de inyección con la ID para ambas corrientes de la depuradora.

Tabla 29: Conteo y porcentaje de analitos con MLQ<50 ng/L frente los detectados con la inyección directa en agua residual ganadera

Corriente agua residual ganadera	Volumen inyección (μL)	Nº Analitos con MLQ<50 ng/L	Nº Analitos detectado	% Analitos detectado y MLQ<50 ng/L
Influente	100	25	41	61
	200	24	39	62
	300	25	39	64
	400	25	38	66
Efluente	100	21	38	55
	200	24	38	63
	300	26	38	68
	400	25	38	66

Con la Tabla 29 podemos deducir:

Al obtenerse porcentajes tan parejos en ambas corrientes y casi todos los volúmenes, analizamos más el conteo de compuestos que el porcentaje en sí mismo.

- Influyente: Tanto 100 como 300 y 400 tienen el mismo número de analitos con MLQ<50 ng/L (25), por ello el volumen seleccionado será el que nos dé mayor número de analitos detectados. En esta corriente, inyectando 100 μL detectamos el mayor número de analitos teniendo el mismo número de ellos con MLQ inferior a 50 ng/L. El volumen óptimo en ID para el influente es por ello 100 μL, aunque el porcentaje estrictamente sea menor.
- Efluente: Todos los volúmenes de inyección detectan el mismo número de analitos, por ello el volumen óptimo será aquel que nos aporte el mayor número de ellos con el MLQ inferior a 50 ng/L. En este caso, el volumen óptimo es 300 μL ya que da más compuestos con ese criterio y coincide, lógicamente, con el volumen con mayor porcentaje de estos.

Como conclusión, los volúmenes óptimos seleccionados en la inyección directa para el agua residual ganadera son 100 μL para el influente y 300 μL para el efluente.

6.2 Comparación con la SPE Off-line

En la extracción en fase sólida offline, es decir, la realizada en el laboratorio manualmente, no hay que elegir ningún volumen de inyección. En el método rutinario se inyecta un volumen de 10 μ L después de concentrar los extractos.

Se va a comprobar si los métodos automáticos son comparables, o al menos dan valores poco discordantes, y por tanto podrían sustituir al método manual y ganar así en repetibilidad, reproducibilidad y menor tiempo de tratamiento de muestra.

La comprobación se realiza comparando los valores de los métodos automáticos recopilados en las tablas generadas en el apartado de selección de volumen frente los valores obtenidos en la extracción realizada manualmente.

Se muestra en las Tabla 30-31 los parámetros estadísticos obtenidos con la SPE-Offline, para los 3 factores estudiados: MLQ, rango lineal y anchura de pico, y para los tipos de agua estudiados incluyendo la diferencia entre corriente en el agua residual.

Tabla 30: Resumen de parámetros estadísticos en los métodos automáticos para el agua Milli-Q con SPE-Offline

Agua Milli-Q	SPE Offline								
	MLQ (ng/L)			Rango lineal			Anchura 5%		
	μ	P25%	P75%	μ	P90%	P95%	μ	P90%	P95%
	0.7	0.03	5	59969.8	99998.2	99999.8	0.18	0.51	0.56

Tabla 31: Resumen de parámetros estadísticos en los métodos automáticos para el agua residual urbana con SPE-Offline

	SPE Offline								
	MLQ (ng/L)			Rango lineal (ng/L)			Anchura 5%		
	μ	P25%	P75%	μ	P90%	P95%	μ	P90%	P95%
	Agua residual urbana influente	23	8	120	49936.6	99972.5	99992.8	0.13	0.38
Agua residual urbana efluente	13	4	41	39554.7	99024.4	99587.7	0.13	0.33	0.35

En las Tabla 30-31 se observa que los valores de MLQ son valores muy bajos y, menores que mediante los métodos automáticos, por tanto, valores bastante buenos.

Se muestra a continuación la Tabla 32 con el conteo y porcentaje de analitos con MLQ inferior a 50 ng/L frente al total de los detectados en las tres matrices estudiadas en la SPE-Offline.

Tabla 32: Conteo y porcentaje de analitos con MLQ<50 ng/L frente los detectados en las matrices acuosas estudiadas

	Nº Analitos con MLQ<50 ng/L	Nº Analitos detectados	% Analitos detectados y MLQ<50 ng/L
Agua Milli-Q	35	39	90
Agua residual urbana influente	27	44	61
Agua residual urbana efluente	31	41	76

De igual manera que con los parámetros estadísticos, el conteo y los porcentajes son valores muy buenos para el análisis de analitos a nivel de trazas ya que en las tres matrices dan porcentajes de analitos con MLQ menor a 50 ng/L mayores al 50% siendo el número de analitos detectado muy alto también.

Para poder comparar los métodos automáticos (inyección directa y SPE-Online) con el método manual (SPE-Offline) se muestra en la Tabla 33 la comparación del porcentaje de compuestos con MLQ inferior a 50 ng/L para el volumen óptimo en cada método automático con los valores obtenidos en el SPE-Offline en el agua residual urbana de entrada y salida.

Tabla 33: Comparación de los porcentajes de analitos con MLQ<50 ng/L en el agua residual urbana entre los tres métodos de análisis

Agua residual urbana influente			
	Nº Analitos con MLQ<50 ng/L	Nº Analitos detectados	% Analitos detectados y MLQ<50 ng/L
SPE-Offline	27	44	61
SPE-Online (300 µL)	16	41	39
Inyección directa (200 µL)	20	39	51
Agua residual urbana efluente			
	Nº Analitos con MLQ<50 ng/L	Nº Analitos detectados	% Analitos detectados y MLQ<50 ng/L
SPE-Offline	31	41	76
SPE-Online (300 µL)	12	39	30
Inyección directa (400 µL)	28	40	70

De la Tabla 33 se extrae como conclusión que el método de análisis manual es el que mejores porcentajes proporciona, al tiempo que da porcentajes más o menos similares a la inyección directa que, como método automático es mucho más rápido y los analitos detectados son prácticamente los mismos.

Se puede observar también que los porcentajes de analitos con MLQ inferior a 50 ng/L son mayores en el efluente de depuradora que en el influente (salvo en la SPE-Online) debido a ser una matriz más limpia.

6.3 Influencia de factores. Análisis estadístico

Además del volumen de inyección, se va a comprobar estadísticamente si hay otros factores que afecten determinantemente a los resultados del método aplicado a aguas residuales urbanas. Entre los factores a estudiar, destaca la influencia del AEDT (Ácido etilendiaminotetraacético).

6.3.1 *Influencia del AEDT*

Para determinar la influencia del AEDT en el proceso analítico se ha realizado el análisis del agua residual urbana en ausencia y en presencia de AEDT (0.1%). Se comparan las respuestas obtenidas para estas tres concentraciones mediante un ANOVA que estudie dicho factor sobre el área de pico y la anchura.

De esta forma podemos determinar mediante un ANOVA simple si el AEDT afecta significativamente al valor del área de pico y a la forma del pico (mediante la anchura de este). Dichos ANOVA simples estudiados para los tres métodos conjuntamente sobre ambas variables se muestran en las Tabla 34-35.

Tabla 34: ANOVA simple sobre la influencia AEDT en el área de pico

Fuente	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,86*10 ¹⁵	1	1,86*10 ¹⁵	0,08	0,7745
Intra grupos	9,16*10 ¹⁹	4031	2,27*10 ¹⁶		
Total	9,16*10 ¹⁹	4032			

Tabla 35: ANOVA simple sobre la influencia AEDT en la anchura al 5% de pico

Fuente	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,45	1	0,45	6,75	0,0094
Intra grupos	270	4031	0,07		
Total	270	4032			

Las conclusiones que se extraen con estos gráficos ANOVA simples para el AEDT son:

- La adición de AEDT no influye significativamente ($\alpha=0,05$) al factor área de pico debido a que el valor de P es mayor que 0,05.
- La adición de AEDT influye significativamente ($\alpha=0,05$) al factor de anchura al 5% de pico ya que el valor de P es menor que 0,05.

Como lo que nos interesa del método es el área de pico, y la anchura de pico no varía excesivamente a pesar la diferencia significativa observada se asume que la adición de AEDT no es crítica para el método. Por lo tanto, en las condiciones óptimas de los tres métodos de análisis para el agua residual urbana se omite la adición de AEDT. Similares conclusiones se obtienen cuando se consideran los métodos de análisis por separado.

6.3.2 Influencia del volumen de inyección

El otro factor relevante para la optimización del método es el volumen de inyección, que ya ha sido seleccionado previamente. Ahora, se va a comprobar si el volumen de inyección es un factor influyente tanto en el área de pico como en la anchura al 5% del pico para los dos métodos automáticos (SPE-Online e inyección directa). Y, por tanto, poder confirmar que la selección del volumen de inyección óptimo era una operación crítica.

Para estudiar su influencia se realiza un ANOVA simple para cada una de las variables a estudiar (área y anchura) considerando los diferentes volúmenes como factores controlados. Los resultados de estos ANOVA simples se muestran en las Tablas 36-37.

Tabla 36: ANOVA simple sobre la influencia volumen inyección en el área de pico

Fuente	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,27*10 ¹⁸	4	3,17*10 ¹⁷	14,14	0,0001
Intra grupos	9,04*10 ¹⁹	4028	2,24*10 ¹⁶		
Total	9,17*10 ¹⁹	4032			

Tabla 37: ANOVA simple sobre la influencia volumen inyección en la anchura al 5% de pico

Fuente	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12	4	3	49,69	0,0001
Intra grupos	257	4028	0,06		
Total	270	4032			

La conclusión que se extrae con estos gráficos ANOVA simples para el volumen es:

- El volumen de inyección, como era de esperar, es un factor que influye significativamente ($\alpha=0,05$) a las dos variables estudiadas (área de pico y anchura de este) ya que el valor de P es menor que 0,05.

Es por esto por lo que se ha buscado cual es el volumen óptimo para cada método y corriente, debido a que el volumen si influye en estas variables y, por ello, en la cuantificación posterior.

6.3.3 Análisis multifactorial

Aparte de estudiar solo la influencia de un único factor se ha estudiado la influencia conjunta de varios factores mediante un ANOVA multifactorial en el que se estudia la influencia del método de análisis, la corriente del agua y de nuevo la concentración del AEDT añadida.

Se muestran en las Tablas 38-39 los ANOVA multifactoriales en el que el factor A es la corriente de agua (influyente a la depuradora de agua o efluente de esta), el factor B es el método de análisis usado (inyección directa, SPE-offline, SPE-Online) y el factor C es la presencia o no del AEDT en la muestra.

Tabla 38: ANOVA multifactorial de tres factores sobre la influencia en el área de pico

Fuente	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Corriente agua dep	$1,31 \cdot 10^{15}$	1	$1,31 \cdot 10^{15}$	0,06	0,8098
B:Método análisis	$2,84 \cdot 10^{17}$	2	$1,42 \cdot 10^{17}$	6,27	0,0019
C:Concentración AEDT	$1,66 \cdot 10^{15}$	1	$1,66 \cdot 10^{15}$	0,07	0,7866
RESIDUOS	$9,14 \cdot 10^{19}$	4028	$2,27 \cdot 10^{16}$		
TOTAL	$9,17 \cdot 10^{19}$	4032			

Tabla 39: ANOVA multifactorial de tres factores sobre la influencia en la anchura al 5% de pico

Fuente	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Corriente agua dep	0,45	1	0,45	11,94	0,0005
B:Método análisis	117	2	58	1565,76	0,0000
C:Concentración AEDT	0,49	1	0,49	12,90	0,0003
RESIDUOS	151	4028	0,038		
TOTAL	270	4032			

Las conclusiones que se extraen con estos gráficos ANOVA multifactoriales son:

- El factor A (corriente de agua en la depuradora) no afecta significativamente ($\alpha=0,05$) al área de pico, pero si afecta significativamente ($\alpha=0,05$) a la anchura del pico al 5%; debido a que el valor de P es mayor que α y menor que α respectivamente.

Se deduce que la matriz afecta a la forma del pico debido a que el efluente es una matriz más limpia que el influente a la depuradora.

- El factor B (método de análisis utilizado) afecta significativamente ($\alpha=0,05$) a ambas variables ya que el valor de P es menor que 0,05.

Esto era esperable ya que el método de análisis y sobre todo el diferente volumen de inyección tiene que influir claramente sobre las dos variables estudiadas.

- El factor C (concentración de AEDT) ya se había comentado con el ANOVA simple.

6.4 Validación de los métodos analíticos

En este apartado se realiza la validación del método. Esto consiste en el establecimiento de los parámetros analíticos más relevantes del método. Estos parámetros son los que se comparan entre diferentes métodos analíticos para elegir qué método es el más efectivo, el más preciso o el más sensible, por ejemplo.

Entre estos parámetros analíticos de la validación del método hay alguno ya comentado y mostrado como los límites de cuantificación y detección del método (MLQ y MLD respectivamente) y el rango lineal del método. Además, hay también más parámetros como la recuperación, el efecto memoria y la precisión del método estudiado.

Todos estos parámetros se van a estudiar para las condiciones óptimas de cada método de análisis (el volumen de inyección óptimo para cada método automático y sin añadir AEDT).

6.4.1 Efecto memoria

Se conoce como efecto memoria al error producido en una medida analítica debido a la contaminación debida a una medida previa. Suele ser debido a una mala limpieza de alguno de los instrumentos utilizados o a la utilización de métodos automatizados. El error en la medida suele ser un sesgo aditivo en la medida.

Es un error que se puede evitar o, al menos, minimizar con una limpieza correcta del aparato e instrumentos utilizados. Se puede minimizar inyectando los patrones en orden creciente de concentración y, entre tandas diferentes se inyectan varios blancos (fase móvil).

Para estudiar este efecto en nuestros métodos se va a comparar el área de pico de la última inyección de cada tanda (la más concentrada, de 100 µg/L) y el blanco inyectado inmediatamente posterior a dicha muestra. Se muestra el resultado como porcentaje (área blanco/área muestras * 100).

Se muestran en las Tabla 40-41 los valores de dicho porcentaje para cada método con su volumen de inyección óptimo y para cada analito separadas en las dos corrientes de agua.

Tabla 40: Efecto memoria (%) para el efluente del agua residual urbana

Analito	Método análisis		
	Inyección directa	SPE-Online	SPE-Offline
PenicillinG	0	0	0
Oxytetracycline	0	0,5	0
Doxycycline	3	1	1
Marboflaxin	0	0,5	0
Erofloxacin	1	1	1
Danofloxacin	2	1	1
Sulfathiazole	0	5	0,05
Sulfamethizole	0	5	0,05
Sulfadimidine	0	3	0,05
Sulfamethoxazole	0,05	6	0,05
Tylosin	0,1	0,5	0,1
Tiamulin	0,05	0,1	0,05
Apramycin	0	2	0
Trimethoprim	0,1	1	0,1
Florfenicol	0	0	0
Fenbendazol	2	4	2
Dexamethasone	0	0,5	0,1
Progesterone	0,1	1	0,1
Methylparaben	0	0	0
Carbamazepine	0,5	1	2
Propanolol	0,5	3	0,5
Metronidazole	0	0	0,05
Ofloxacin	0,5	1	0
Naproxen	0,1	1	0,1
Clarithromicyn	0,1	0,5	0,1
Erythromicyn	0	0	0,1
Levofloxacin	0,5	1	0,1
Norfloxacin	0	1	0,1
Atorvastatin	0,1	0,5	0,5
Atenolol	0	0	0,01
Atrazine	0,5	1	1
DEET	0,1	0,5	0,5
Ciprofloxacin	0,5	2	0,5
Crotamiton	0,1	1	0,5
Ethylparaben	0	0	0
Propylparaben	0,1	0	0,5
Diclofenac	0,1	1	7
Ibuprofen	0	0	0
Clofibrac acid	0,1	0,5	0,1
Gemfibrocil	0,1	1	0,1
SUMA TOTAL	12,3	48,1	19,41

Tabla 41: Efecto memoria (%) para el influente de agua residual urbana

Analito	Método análisis		
	Inyección directa	SPE-Online	SPE-Offline
PenicillinG	0	0	0
Oxytetracycline	0,1	0,7	0
Doxycycline	3	1	4
Marboflaxin	0	0,5	0
Erofloxacin	1	1	0,5
Danofloxacin	3	3	0,5
Sulfathiazole	0,01	2	0,05
Sulfamethizole	0	5	0,05
Sulfadimidine	0	3	0,05
Sulfamethoxazole	0,1	4	0,05
Tylosin	0,1	1,0	0,1
Tiamulin	0,01	0,3	0,05
Apramycin	0	3	0
Trimethoprim	0,1	1	0,1
Florfenicol	0	0	0
Fenbendazol	2	2	2
Dexamethasone	0	0,5	0,1
Progesterone	0,1	1	0,1
Methylparaben	0	0	0
Carbamazepine	0,5	2	2
Propanolol	0,5	2	0,5
Metronidazole	0	0	0,05
Ofloxacin	0,5	1	0
Naproxen	0,1	1	0,5
Clarithromycin	0,1	0,5	0,1
Erythromycin	0	0	0
Levofloxacin	0,5	1	0,1
Norfloxacin	0	1	0
Atorvastatin	0,1	0,5	0,1
Atenolol	0	0	0,01
Atrazine	1	1	1
DEET	0,1	0,5	0,5
Ciprofloxacin	0,1	2	0,5
Crotamiton	0,1	0,5	0,5
Ethylparaben	0	0	0
Propylparaben	0	0,5	0,1
Diclofenac	0,1	1	1
Ibuprofen	0	0	0
Clofibric acid	0,1	1	0,1
Gemfibrocil	0,1	2	0,1
SUMA TOTAL	13,42	46,5	14,81

Se puede ver en la fila ``SUMA TOTAL`` de las Tabla 40-41 que los valores del efecto memoria son básicamente similares en la inyección directa y en la SPE-Offline, con valores individuales por analito muy bajos. Sin embargo, la suma de los porcentajes en la SPE-Online son considerablemente mayores que en los otros dos métodos, además de que los valores individuales son mayores en comparación también.

6.4.2 Tasa de recuperación absoluta

Es un parámetro de validación que da cuenta de la exactitud de las cuantificaciones del método utilizado. En este caso, se determinan los nanogramos de analito que se detectan mediante el método automático frente a los nanogramos de una inyección convencional.

Es un porcentaje que nos muestra por tanto la porción de cantidad que detecta nuestro método frente la total que había en la muestra estudiada, en nuestro caso los patrones dopados. El porcentaje obtenido generalmente en las recuperaciones absolutas debe ser bajo (no cercano al 100%) debido a que incluye las posibles pérdidas por el efecto matriz y por el proceso de preparación de muestra, este último suele dar lugar a recuperaciones bajas.

Para determinar este porcentaje en cada analito y método de análisis, cada uno con su volumen de inyección óptimo seleccionado, se divide la cantidad real detectada en el vial entre la cantidad teórica en el mismo.

La cantidad teórica del vial para cada patrón (muestra dopada) se conoce ya que se preparó el calibrado matriz-patrón (con concentraciones desde 0,0005 hasta 100 µg/L) y se conoce el volumen de inyección de cada método de análisis. Dicha cantidad teórica es el producto de la concentración teórica por el volumen de inyección determinado.

La cantidad real se calcula mediante un calibrado patrón externo, convencional, en disolvente (fase móvil), preparado aparte del calibrado matriz-patrón comentado, en la que se representa el área de la señal obtenida frente la concentración de cada muestra. Se realiza la interpolación de las áreas obtenidas con el método automático de análisis de las muestras de agua residual utilizando la recta de calibrado en disolvente.

Teniendo esas dos cantidades se calcula el porcentaje. Se debe tener en cuenta el rango lineal de los dos tipos de calibrado (matriz-patrón y patrón externo) ya que las áreas de los patrones (muestras dopadas) deben estar en el rango de linealidad. Además, en los analitos que se hayan detectado en las muestras de agua, las áreas usadas serán las áreas obtenidas menos el área de la muestra sin dopar (blanco).

Se muestra en las Tabla 42-43 las recuperaciones absolutas (recovery %) obtenidas con la media de las recuperaciones de cada patrón estudiado y la desviación estándar de dichas recuperaciones (RSD%) para el agua residual urbana en la corriente de entrada y salida de la depuradora con ambos métodos automáticos.

Tabla 42: Recuperación absoluta y desviación estándar de las mismas en agua residual urbana con ID

Analito	Efluente		Influente	
	Recuperación (%)	Desviación (RSD%)	Recuperación (%)	Desviación (RSD%)
PenicillinG	85	22	96	12
Doxycycline	76	22	88	5
Marboflaxin	42	12	56	20
Erofloxacin	41	21	49	21
Danofloxacin	43	7	43	38
Sulfathiazole	9	17	20	23
Sulfamethizole	24	12	51	30
Sulfadimidine	25	12	30	19
Sulfamethoxazole	9	18	10	18
Tylosin	265	19	254	28
Tiamulin	72	20	88	9
Apramycin	53	7	45	17
Trimethoprim	48	10	45	11
Florfenicol	50	8	58	16
Fenbendazol	16	20	19	28
Dexamethasone	40	23	38	30
Progesterone	24	66	25	41
Methylparaben	47	6	47	10
Carbamazepine	24	36	146	24
Propranolol	21	16	25	7
Metronidazole	9	44	13	9
Ofloxacin	47	9	52	18
Naproxen	30	9	34	12
Clarithromycin	58	13	33	37
Erythromycin	42	27	39	23
Levofloxacin	48	26	49	14
Norfloxacin	71	25	67	16
Atorvastatin	95	41	67	84
Atenolol	22	16	16	24
Atrazine	41	7	42	8
DEET	91	4	76	2
Ciprofloxacin	42	59	5	29
Crotamiton	43	5	42	10
Ethylparaben	24	16	19	58
Propylparaben	12	24	14	6
Diclofenac	26	25	32	20
Ibuprofen	25	29	23	71
Clofibric acid	36	15	37	19
Gemfibrocil	20	20	23	13

Tabla 43: Recuperación absoluta y desviación estándar de las mismas en agua residual urbana con SPE-Online

Analito	Efluente		Influyente	
	Recuperación (%)	Desviación (RSD%)	Recuperación (%)	Desviación (RSD%)
PenicillinG	43	4	22	19
Doxycycline	118	11	134	2
Marboflaxin	37	16	42	31
Erofloxacin	31	27	39	16
Danofloxacin	33	24	35	32
Sulfathiazole	25	12	25	21
Sulfamethizole	20	9	18	51
Sulfadimidine	18	20	22	54
Sulfamethoxazole	16	15	19	3
Tylosin	64	15	71	9
Tiamulin	97	9	74	10
Apramycin	65	24	55	13
Trimethoprim	28	25	33	33
Florfenicol	59	17	25	14
Fenbendazol	10	9	13	36
Dexamethasone	48	12	43	33
Progesterone	19	16	14	46
Methylparaben	56	9	48	9
Carbamazepine	64	13	62	24
Propranolol	27	12	26	14
Metronidazole	42	5	40	14
Ofloxacin	51	21	59	30
Naproxen	23	28	36	53
Clarithromycin	66	15	77	11
Erythromycin	27	47	24	9
Levofloxacin	49	23	47	21
Norfloxacin	63	34	74	11
Atorvastatin	48	66	91	23
Atenolol	40	35	23	58
Atrazine	53	1	49	4
DEET	90	45	95	12
Ciprofloxacin	38	59	36	15
Crotamiton	45	10	38	11
Ethylparaben	33	4	28	14
Propylparaben	28	9	23	33
Diclofenac	39	2	21	21
Ibuprofen	32	15	45	2
Clofibric acid	41	32	37	11
Gemfibrocil	24	4	13	29

Hay analitos en los que se obtiene una única recuperación dentro del rango lineal del calibrado y por ello solo habiendo un valor no puede calcularse la desviación estándar y en la tabla se muestra con un guion (-).

Podemos observar que los resultados obtenidos son valores muy variables entre analitos, esto es común ya que en la recuperación absoluta se tiene en cuenta todo el proceso desde la preparación hasta la detección de muestra y, cada analito tiene un comportamiento y da lugar a valores muy variables entre ellos.

Los resultados de recuperación absoluta se pueden comparar si es sobre el mismo analito y método de análisis, donde si se ven en general valores mucho más similares y comparables.

6.5 Incidencia de los compuestos en las muestras de agua residual

Una vez se han calculado las concentraciones de los analitos en las muestras de agua residual urbana, tanto de entrada como de salida a la depuradora, se comparan entre sí las concentraciones de cada analito en ambas corrientes para poder determinar cuál ha sido el porcentaje de eliminación de dicho analito en el proceso de depuración.

Se muestra en la Tabla 44 las concentraciones de cada analito y el porcentaje de eliminación conseguido en el proceso de depuración en ambas corrientes de agua residual urbana en la depuradora y para cada método de análisis estudiado. Todos los valores mostrados en la Tabla 44 corresponden a los valores obtenidos con los métodos optimizados (volumen de inyección óptimo).

Hay algún método en que se no detecta un analito que si ha detectado mediante otro método como se muestra en la tabla (n.d. siendo los no detectados). Esto es debido principalmente a las diferencias de sensibilidad (MLQs) entre los diferentes métodos.

Tabla 44: Concentraciones de agua residual urbana y porcentaje de eliminación con los tres métodos de análisis

Analito	ID			SPE-Online			SPE-Offline		
	Conc influente (ng/L)	Conc efluente (ng/L)	% eliminado	Conc influente (ng/L)	Conc efluente (ng/L)	% eliminado	Conc influente (ng/L)	Conc efluente (ng/L)	% eliminado
Doxycycline	970	231	76	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-
Erofloxacin	n.d.	258	<0	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-
Danofloxacin	325	68	79	612	331	46	n.d.	n.d.	-
Sulfathiazole	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	218	<0
Sulfadimidine	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	74	<0
Sulfamethoxazole	454	n.d.	100	n.d.	n.d.	-	321	227	29
Tylosin	n.d.	63	<0	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-
Tiamulin	869	184	79	751	123	84	60	52	14
Trimethoprim	n.d.	41	<0	n.d.	109	<0	91	17	81
Fenbendazol	197	183	7	170	138	18	17	3	81
Progesterone	556	n.d.	100	232	173	25	248	n.d.	100
Methylparaben	2420	475	80	2651	352	87	2322	306	87
Carbamazepine	85	24	72	118	56	52	28	10	65
Propanolol	946	172	82	n.d.	n.d.	-	217	78	64
Metronidazole	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	91	84	7
Ofloxacin	714	198	72	571	474	17	119	72	40
Naproxen	3802	3260	14	4565	3169	31	3860	2769	28
Clarithromicyn	87	44	49	203	84	59	168	64	62
Erythromicyn	1219	790	35	n.d.	n.d.	-	n.d.	502	<0
Levofloxacin	798	224	72	602	380	37	192	103	46
Norfloxacin	n.d.	702	<0	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-
Atorvastatin	174	138	21	233	233	0	483	28	94
Atenolol	395	331	16	95	279	<0	232	222	5

Analito	ID			SPE-Online			SPE-Offline		
	Conc influente (ng/L)	Conc efluente (ng/L)	% eliminado	Conc influente (ng/L)	Conc efluente (ng/L)	% eliminado	Conc influente (ng/L)	Conc efluente (ng/L)	% eliminado
Atrazine	68	28	59	n.d.	53	<0	12	7	38
DEET	326	129	60	411	326	21	221	190	14
Ciprofloxacín	530	279	47	1455	1210	17	891	603	32
Crotamiton	178	119	33	n.d.	113	<0	175	56	68
Ethylparaben	1030	n.d.	100	n.d.	n.d.	-	776	79	90
Propylparaben	1723	835	52	1515	292	81	1573	441	72
Diclofenac	1232	553	55	920	515	44	n.d.	n.d.	-
Ibuprofen	21820	12453	43	20015	11202	44	15741	7063	55
Clofibríc acid	1351	826	39	n.d.	n.d.	-	362	229	37
Gemfibrocil	1566	1375	12	907	727	20	233	174	25

Las concentraciones calculadas en la inyección directa y la SPE-offline son valores comparables y cercanos, sobre todo las concentraciones en el influente. Los de la SPE-Online son valores no tan similares.

Los porcentajes de eliminación obtenidos no son comparables prácticamente entre métodos. Se ve además algún porcentaje negativo, que supone una concentración de analito mayor en la corriente de salida de la depuradora que en la entrada de esta.

El aumento en la señal detectada (y por ello en la concentración) en la corriente de salida frente la de entrada a la depuradora, a priori, es un resultado inesperado. Sin embargo, hay algunas posibles explicaciones a que el porcentaje de eliminación de un analito sea negativo:

- Que las muestras no hayan sido cogidas teniendo en cuenta el tiempo hidráulico de residencia de la depuradora y, por lo tanto, no sean exactamente comparables. Al tomarse sin tenerse en cuenta el punto hidráulico, el caudal es diferente y por ello se asume una dilución diferente entre ellas.
- Que en la entrada el analito estuviese unido a un compuesto biológico (derivatizado), generalmente ácido glucurónico (glucuronizado), y se hidrolice durante el tratamiento de la depuradora. Esto provocaría que en la entrada el analito no sea detectado por nuestro método, por estar derivatizado y no en la forma en la que se detecta óptimamente en nuestro método, y en la salida de la depuradora si se detecte debido a que se haya hidrolizado y se encuentre libre el propio analito y por ello se detecte íntegramente.
- Que dentro del proceso de depuración el agua residual cruce algún paso en el que el tratamiento de limpieza utilizado, generalmente los lodos utilizados, se encuentre saturado de ese compuesto determinado.

7 CONCLUSIONES

- En los ensayos con agua ultrapura Milli-Q el aumento del volumen de inyección incrementa el número de analitos cuyo MQL es inferior 50 ng/L, siendo recomendable en líneas generales la inyección de 100-400 μL .

- En los ensayos con agua residual urbana el volumen de inyección seleccionado para la extracción en fase sólida Online es 300 μL , para la inyección directa el volumen de inyección recomendado es diferente según se trate del influente, 200 μL , o del efluente, 400 μL , de la depuradora.

- La selección del volumen óptimo en función del porcentaje de compuestos para los que se obtiene un MQL inferior a 50 ng/L es coherente generalmente con el valor de la mediana de los MQL para los diferentes volúmenes de inyección.

- Mediante la SPE-Offline se obtienen mejores MQL para un mayor porcentaje de compuestos, si bien la inyección directa de volúmenes elevados podría ser una alternativa adecuada dada la rapidez y menor laboriosidad de este último método.

- La anchura de pico es mayor en los métodos automatizados que emplean volúmenes de inyección elevados frente a la inyección de 10 μL habitual en los métodos Offline. La anchura de pico es claramente superior en la SPE Online.

- El uso de AEDT para complejar determinados cationes presentes en las aguas urbanas no es necesario para incrementar las áreas de pico de los analitos. Se ha observado que la adición de AEDT disminuye significativamente la anchura de los picos cromatográficos si bien en pequeña cuantía.

- El efecto memoria en la inyección directa es inferior al 1% salvo para el danofloxacina, doxycycline y fenbedazol. En la SPE-Online el efecto memoria es superior de forma global y por analito.

- Las tasas de recuperación absolutas obtenidas mediante los métodos automatizados, que tienen en cuenta la influencia de la matriz en la preparación de muestra y en la ionización electrospray, son inferiores al 100% en el análisis de aguas urbanas como era esperable salvo para la tylosin y la doxycycline.

- Se ha detectado una treintena de drogas en el agua residual urbana calculándose los porcentajes de eliminación durante el proceso de depuración, aunque en algún caso los resultados difieren según el método de análisis.

- Para el agua residual ganadera, en función del número de compuestos cuyo MQL es inferior a 50 ng/L, el volumen de inyección recomendado para el análisis mediante inyección directa de influentes es 100 μ L, y 300 μ L en el caso de efluentes.

8 BIBLIOGRAFÍA

- [1] uned, V. M. R.-R. 100cias@, época, N., & 2017, undefined. (n.d.). Vida científica COLABORACIONES EN CIENCIAS DE LA NATURALEZA PURINES. SU IMPACTO MEDIOAMBIENTAL EN ESPAÑA. *E-Spacio.Uned.Es*. Retrieved May 30, 2021, from <http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:revista100cias-2017-numero10ne-5165/Purines.pdf>
- [2] Valdecantos, A., Fuentes, D., Cortina, J., & Casanova, G. (2002). *Aprovechamiento de los purines. Requisitos para su utilización agraria y forestal*. <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/4318>
- [3] EDAR: *Depuración prolongada de agua. (1 de enero de 2021)*. Obtenido de Acciona: <http://www.acciona.com/es/soluciones/agua/areas-actividad/depuracion>
- [4] Twenergy. (17 de diciembre de 2019). *Funcionamiento de una depuradora de aguas residuales*. Obtenido de <https://twenergy.com/ecologia-y-reciclaje/funcionamiento-de-una-depuradora-de-aguas-residuales-1299/>
- [5] Pereira, A. M. P. T., Silva, L. J. G., Laranjeiro, C. S. M., Meisel, L. M., Lino, C. M., & Pena, A. (2017). Human pharmaceuticals in Portuguese rivers: The impact of water scarcity in the environmental risk. *Science of the Total Environment*, 609, 1182–1191. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.200>
- [6] Villar-Navarro, E., Baena-Nogueras, R. M., Paniw, M., Perales, J. A., & Lara-Martín, P. A. (2018). Removal of pharmaceuticals in urban wastewater: High rate algae pond (HRAP) based technologies as an alternative to activated sludge based processes. *Water Research*, 139, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.072>
- [7] Richardson, S. D., & Ternes, T. A. (2011). Water analysis: Emerging contaminants and current issues. In *Analytical Chemistry* (Vol. 83, Issue 12, pp. 4616–4648). <https://doi.org/10.1021/ac200915r>
- [8] Mascolo, G., Laera, G., Pollice, A., Salerno, C., Mascolo, G., Balest, L., Cassano, D., Laera, G., Lopez, A., Pollice, A., & Salerno, C. (2009). Article in *Bioresource Technology*. *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.057>

- [9] Mompelat, S., Bot, B. Le, international, O. T.-E., & 2009, undefined. (n.d.). Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Elsevier*. Retrieved May 30, 2021, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412008002225>
- [10] Heberer, T. Journal of hydrology. (2002). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Elsevier*. Retrieved May 30, 2021, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022169402001658>
- [11] Ellis, J.-E. (2006). Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Elsevier*. Retrieved May 30, 2021, from *Environmental pollution* <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026974910600011X>
- [12] Wennmalm, Å., & Gunnarsson, bo. (2005). Public Health Care Management of Water Pollution with Pharmaceuticals: Environmental Classification and Analysis of Pharmaceutical Residues in Sewage Water. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*, 39(3), 291–297. <https://doi.org/10.1177/009286150503900307>
- [13] Onesios, K., Jim, T., Biodegradation, E. B.-, & 2009, undefined. (n.d.). Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *Springer*. Retrieved May 30, 2021, from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10532-008-9237-8.pdf>
- [14] Zwiener, C., & Zwiener, C. (2007). Occurrence and Analysis of Pharmaceuticals and Their Transformation Products in Drinking Water Treatment. *Article in Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1159–1162. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0818>
- [15] Kümmerer, K. (2008). *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=hS1EAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR28&dq=Kümmerer+K.+Pharmaceuticals+in+the+Environment:+Sources,+Fate,+Effects+and+Risks.+3rd+ed.+Berlin,+Germany:+Springer%3B+2008.+28-34+p.&ots=wNAFxJqueC&sig=AkCvm6rzUsKjvJTmxZ9d7cd5R8w>
- [16] Togola, A., chemistry, H. B.-A. and bioanalytical, & 2007, undefined. (2007). Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. *Springer*, 388(3), 627–635. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1251-x>

- [17] Miao, X.-S., & Metcalfe, C. D. (2003). Determination of Carbamazepine and Its Metabolites in Aqueous Samples Using Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *ACS Publications*, 75(15), 3731–3738. <https://doi.org/10.1021/ac030082k>
- [18] Caliman, F. A., & Gavrilescu, M. (2009). Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - A review. In *Clean - Soil, Air, Water* (Vol. 37, Issues 4–5, pp. 277–303). <https://doi.org/10.1002/clen.200900038>
- [19] Vanderford, B. J., Pearson, R. A., Rexing, D. J., & Snyder, S. A. (2003). Analysis of Endocrine Disruptors, Pharmaceuticals, and Personal Care Products in Water Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *ACS Publications*, 75(22), 6265–6274. <https://doi.org/10.1021/ac034210g>
- [20] Mikel, C., Almazan, P., West, R., ... B. C.-T. D., & 2009, undefined. (n.d.). LC-MS/MS extends the range of drug analysis in pain patients. *Journals.Lww.Com*. Retrieved May 30, 2021, from https://journals.lww.com/drug-monitoring/FullText/2009/12000/LC_MS_MS_Extends_the_Range_of_Drug_Analysis_in.12.aspx
- [21] Lim, C., Bulletin, G. L.-B. and P., & 2002, undefined. (2002). Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. In https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/25/5/25_5_547/_article/-char/ja/
- [22] Mottaleb, m. A. And w. C. Brumley. *Environmental analytical chemistry of pharmaceutical and personal care products: the separations focus turns to polar analytes. Trends in Chromatography. Research Trends, Trivandrum, India, 2:11-29, (2006).*
- [23] Waters TM (16 de Enero de 2021). Waters products. Obtenido de <https://www.waters.com/nextgen/es/es/shop/sample-preparation--filtration/wat094226-oasis-hlb-3-cc-vac-cartridge-60-mg-sorbent-per-cartridge-30--m-1.html>
- [24] Morales, J. C. (22 de Abril de 2006). Ultra-eficiencia con UHPLC. Optimización de rendimiento y productividad. págs. 3-20.

- [25] Ahuja, S., & Dong, M. (2005). *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=k_pD5hlj5DkC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Ahuja,+S.,+%26+Dong,+M.+\(Eds.\).+\(2005\).+Handbook+of+pharmaceutical+analysis+by+HPLC.+Elsevier.&ots=PIfjrGWY9b&sig=I5y_YijYRhc7obudOWeKqLvSDiM](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=k_pD5hlj5DkC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Ahuja,+S.,+%26+Dong,+M.+(Eds.).+(2005).+Handbook+of+pharmaceutical+analysis+by+HPLC.+Elsevier.&ots=PIfjrGWY9b&sig=I5y_YijYRhc7obudOWeKqLvSDiM)
- [26] Dubey, M., Vellanki, B., Methods, A. K.-A., & 2020, undefined. (n.d.). A systematic approach of method development for analysis of multiple classes of emerging contaminants in wastewater: a case study of a biological nutrient removal. *Pubs.Rsc.Org*. Retrieved May 30, 2021, from <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/ay/d0ay01131b>
- [27] Goessens, T., Huysman, S., Troyer, N. De, Talanta, A. D.-, & 2020, undefined. (n.d.). Multi-class analysis of 46 antimicrobial drug residues in pond water using UHPLC-Orbitrap-HRMS and application to freshwater ponds in Flanders, Belgium. *Elsevier*. Retrieved May 30, 2021, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914020306172>
- [28] Asghar, M., Zhu, Q., Sun, S., environment, Q. S.-S. of the total, & 2018, undefined. (n.d.). Suspect screening and target quantification of human pharmaceutical residues in the surface water of Wuhan, China, using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Elsevier*. Retrieved May 30, 2021, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718313536>

9 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Foto aérea de una Depuradora de agua residual	9
Figura 2: Zona de pretratamiento EDAR.....	10
Figura 3: Zona de decantación primaria EDAR	10
Figura 4: Zona de decantación secundaria EDAR.....	11
Figura 5: Zonas de muestreo de agua de rio	16
Figura 6: Esquema de purificación con varios reactores de microalgas	18
Figura 7: Gráfico de la concentración de los analitos en los distintos puntos del método	19
Figura 8: Gráfico de recuperación de cada grupo farmacológico en cada parte del método..	19
Figura 9: Cartucho OASIS HLB Cartridge.....	22
Figura 10: Porcentaje de recuperación de la SPE con cada eluyente	25
Figura 11: Cromatogramas del Ofloxacin a 20 µg/L para los 4 volúmenes de inyección	45
Figura 12: Cromatogramas del Ciprofloxacina a 20 µg/L para los 4 volúmenes de inyección...	45
Figura 13: Cromatogramas del Ofloxacin a 0,1 µg/L para los 4 volúmenes de inyección.....	46
Figura 14: Cromatogramas del Ciprofloxacina a 0,1 µg/L para los 4 volúmenes de inyección..	46
Figura 15: Representación del área de pico frente la concentración para los diferentes volúmenes estudiados en ID para el Ofloxacin.....	51

10 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cantidad residuo ganadero en millones de toneladas frente al residuo de purines....6	6
Tabla 2: Composición de purines sólidos y líquidos en la UE y España7	7
Tabla 3: Clasificación de los fármacos según su aplicación14	14
Tabla 4: Determinación de CECs en agua de ríos de Portugal16	16
Tabla 5: Límites de detección y cuantificación de fármacos en SPE-HPLC-MS26	26
Tabla 6: Datos de validación del método UHPLC-MS para aguas de pozo en Bélgica.....27	27
Tabla 7: Datos de validación del método UHPLC-MS para aguas de río en Wuhan28	28
Tabla 8: Abreviaturas de los puntos de muestreo en el análisis de agua de río en Wuhan29	29
Tabla 9: Datos de concentración de 29 fármacos en diferentes puntos de muestreo en agua de río en Wuhan.....29	29
Tabla 10: Disoluciones estándar y sus concentraciones33	33
Tabla 11: Tiempos de retención (RT), transiciones seguidas (m/z) y voltajes aplicados en el espectrómetro de masas para cada compuesto y transición.....39	39
Tabla 12: Resultados de la integración para el Ofloxacin con 100 uL de volumen de inyección47	47
Tabla 13: Resultados de la integración para el Ciprofloxacín con 100 uL de volumen de inyección48	48
Tabla 14: Resultados de la integración para el Ofloxacin con 200 uL de volumen de inyección48	48
Tabla 15: Resultados de la integración para el Ciprofloxacín con 200 uL de volumen de inyección49	49
Tabla 16: Resultados de la integración para el Ofloxacin con 300 uL de volumen de inyección49	49
Tabla 17: Resultados de la integración para el Ciprofloxacín con 300 uL de volumen de inyección50	50
Tabla 18: Resultados de la integración para el Ofloxacin con 400 uL de volumen de inyección50	50
Tabla 19: Resultados de la integración para el Ciprofloxacín con 400 uL de volumen de inyección51	51
Tabla 20: Resumen de parámetros analíticos para la inyección directa para Ofloxacin y Ciprofloxacín52	52

Tabla 21: Concentraciones calculadas en el efluente de la ID del Ofloxacin y Ciprofloxacina ..	54
Tabla 22: Resumen de parámetros estadísticos en los métodos automáticos para el agua Milli-Q	56
Tabla 23: Conteo y porcentaje de analitos con MLQ<50 ng/L frente los detectados en agua Milli-Q	57
Tabla 24: Resumen de parámetros estadísticos en los métodos automáticos para el agua residual urbana con SPE-Online	59
Tabla 25: Resumen de parámetros estadísticos en los métodos automáticos para el agua residual urbana con ID.....	59
Tabla 26: Conteo y porcentaje de analitos con MLQ<50 ng/L frente los detectados en agua residual urbana	61
Tabla 27: Resumen de parámetros estadísticos para el agua residual ganadera con ID influente	62
Tabla 28: Resumen de parámetros estadísticos para el agua residual ganadera con ID efluente	63
Tabla 29: Conteo y porcentaje de analitos con MLQ<50 ng/L frente los detectados con la inyección directa en agua residual ganadera	64
Tabla 30: Resumen de parámetros estadísticos en los métodos automáticos para el agua Milli-Q con SPE-Offline	66
Tabla 31: Resumen de parámetros estadísticos en los métodos automáticos para el agua residual urbana con SPE-Offline.....	66
Tabla 32: Conteo y porcentaje de analitos con MLQ<50 ng/L frente los detectados en las matrices acuosas estudiadas	63
Tabla 33: Comparación de los porcentajes de analitos con MLQ<50 ng/L en el agua residual urbana entre los tres métodos de análisis	63
Tabla 34: ANOVA simple sobre la influencia AEDT en el área de pico.....	64
Tabla 35: ANOVA simple sobre la influencia AEDT en la anchura al 5% de pico	64
Tabla 36: ANOVA simple sobre la influencia volumen inyección en el área de pico.....	65
Tabla 37: ANOVA simple sobre la influencia volumen inyección en la anchura al 5% de pico	65
Tabla 38: ANOVA multifactorial de tres factores sobre la influencia en el área de pico	66
Tabla 39: ANOVA multifactorial de tres factores sobre la influencia en la anchura al 5% de pico	66

Tabla 40: Efecto memoria (%) para el efluente del agua residual urbana	69
Tabla 41: Efecto memoria (%) para el influente de agua residual urbana	70
Tabla 42: Recuperación absoluta y desviación estándar de las mismas en agua residual urbana con ID	73
Tabla 43: Recuperación absoluta y desviación estándar de las mismas en agua residual urbana con SPE-Online	74
Tabla 44: Concentraciones de agua residual urbana y porcentaje de eliminación con los tres métodos de análisis	77