

Validación de un método analítico que determina hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua mediante cromatografía líquida de alto rendimiento

Juliana Vargas Quezada¹; Viviana Sánchez Vásquez²; Karem Veloz Pinto³

(Recibido: mayo 18, Aceptado: octubre 29, 2021)

<https://doi.org/10.29076/issn.2602-8360vol5iss9.2021pp22-28p>

Resumen

La cromatografía líquida de alta resolución tiene la capacidad de separar, identificar y cuantificar los compuestos que están presentes en cualquier muestra. El objetivo de este estudio fue validar un método cromatográfico que permita definir si es confiable y reproducible según los requerimientos establecidos en la norma ISO 17025:2017, llegando a un nivel más bajo de acuerdo a la normativa ambiental. La validación se realizó en la ciudad de Guayaquil, Ecuador, a partir de 15 muestras en total (agua natural, potable, residual doméstica e industrial), con la técnica de extracción en fase sólida (SPE) en modalidad de cartuchos Oasis[®]HLB. Para la preparación de las muestras se realizó el acondicionamiento del cartucho OASIS agregando 5 ml de diclorometano grado HPLC, enjuague con 5 ml de metanol grado HPLC y luego 5 ml de agua tipo I, carga de 500 ml de muestra a 15 ml/min, lavado con 5 ml agua tipo I, elución con 8 ml de diclorometano (5 ml enjuagar la botella y 3 ml en el cartucho), evaporación a sequedad para reconstituir con 2 ml de ACN, en un vial de 2 ml. La inyección del extracto se realizó en el HPLC, siendo los resultados integrados automáticamente por el software. Los parámetros estadísticos que se generaron como resultado fueron repetibilidad, precisión intermedia, incertidumbre, veracidad, límite de detección y cuantificación. Concluyendo que el desarrollo del método analítico permite identificar 15 HAP's con buena resolución y simetría.

Palabras Clave: agua; cromatografía; cromatografía líquida de alta resolución; hidrocarburos aromáticos policíclicos; HAPs; HPLC; incertidumbre; validación.

Validation of an analytical method that determines polycyclic aromatic hydrocarbons in water by high performance liquid chromatography

Abstract

High performance liquid chromatography has the ability to separate, identify and quantify the compounds that are present in any sample. The objective of this study was the validation of a chromatographic method that allows to define if it is reliable and reproducible according to the requirements established in ISO 17025:2017, reaching a lower level according to environmental regulations. The validation was carried out in the city of Guayaquil, Ecuador, taking 15 samples in total (natural, potable, domestic and industrial residual water), with the solid phase extraction technique (SPE) in the form of Oasis[®]HLB cartridges. For the preparation of the samples, the OASIS cartridge was conditioned by adding 5 ml of HPLC grade dichloromethane, rinsed with 5 ml of HPLC grade methanol and then 5 ml of type I water, 500 ml of sample was charged at 15 ml / min, washed with 5 ml water type I, eluted with 8 ml of dichloromethane (5 ml rinse the bottle and 3 ml in the cartridge), evaporate to dryness to reconstitute with 2 ml of ACN, place in a 2 ml vial. The injection of the extract was performed in the HPLC, being the results automatically integrated by the software. The statistical parameters that were generated as a result are repeatability, intermediate accuracy, uncertainty, veracity, limit of detection and quantification. Concluding that the development of the analytical method allows us to identify 15 PAHs with good resolution and symmetry.

Keywords: water; chromatography; high performance liquid chromatography; polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs; HPLC; uncertainty; validation.

¹ Especialista en Gestión de Sistemas de Calidad, Analista II de Laboratorio, Grupo Químico Marcos, Guayaquil, Ecuador. Email: yulyrina@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1331-1559>

² Magister en Gestión de la Calidad y Productividad, Babahoyo, Ecuador. Email: viviv0908@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9200-4292>

³ Química y Farmacéutica, Representante Técnica, Laboratorios Beautik, Guayaquil, Ecuador. Email: klisvp17@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0695-7850>

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) se originan del procesamiento o combustión del petróleo; y son más de 100 analitos, siendo 16 los más estudiados (Figura 1) por ser altamente cancerígenos en concentraciones bajas (1), a pesar de ser insolubles en el agua es necesaria su determinación en aguas potables, naturales y residuales (2).

Los HAP's son compuestos orgánicos que contienen hidrógeno y carbón, los cuales forman anillos aromáticos, y se encuentran comúnmente en agua, aire y suelo (3). Son considerados contaminantes orgánicos persistentes, hidrofóbicos, altamente estables en el ambiente, se encuentran presentes a bajas concentraciones ($\mu\text{g/L}$) y su principal riesgo es su capacidad de bioacumulación y biomagnificación. Son peligrosos debido a su presencia, toxicidad, destino y transporte en sistemas acuáticos (4).

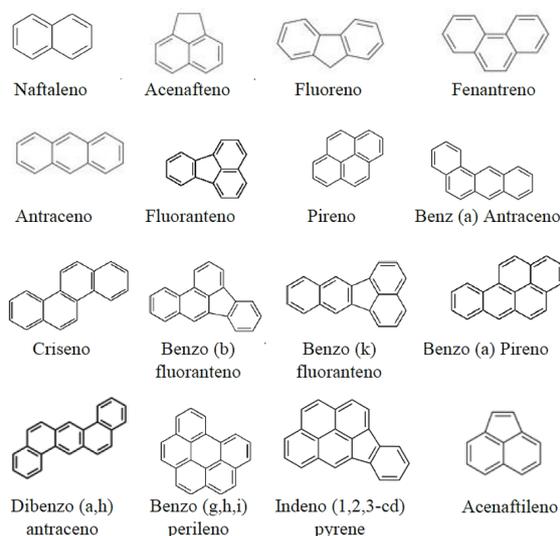


Figura 1. Fórmula Química de los 16 HAP's

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) es una técnica que permite separar mezclas complejas. La separación ocurre en una columna que tiene un relleno poroso (fase estacionaria) y la mezcla disuelta en un solvente (fase móvil) pasa a través de la columna. Los

componentes (analitos) por su afinidad con el relleno de la columna salen en diferentes tiempos los cuales son registrados por un detector, esta información se ve reflejada en un Cromatograma. HPLC tiene la capacidad de separar, identificar y cuantificar los compuestos que están presentes en cualquier muestra sea esta de origen farmacéutico, alimenticio, cosmético, forense, ambiental, es por tener estas características que se utiliza para determinar concentraciones bajas a nivel de trazas de compuestos como son los HAP's.

Uno de los principales problemas que enfrenta la sociedad moderna es el deterioro y creciente nivel de contaminación de los recursos naturales; los ecosistemas se ven alterados por una gran cantidad de sustancias químicas tóxicas generadas por diversas actividades industriales, de servicios, domésticas, urbanas y agrícolas (5). El agua es sin dudas uno de los recursos naturales más valiosos del planeta, sin embargo, su calidad está cada vez más deteriorada y escasa debido al incremento de la población, el desarrollo y la industrialización. Durante los últimos años se ha reportado un incremento de contaminantes orgánicos persistentes en el agua, muchos de los cuales son considerados potencialmente tóxicos para el ambiente y la salud humana, como es el caso de los HAP's (6).

Los contaminantes orgánicos persistentes en el agua como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), representan un riesgo potencial para el ambiente y la salud (7), de allí que su correcta identificación es indispensable (8). El agua es un recurso natural no renovable que debe ser preservado y para determinar su calidad es necesario analizar varios parámetros que están estipulados en la ley de gestión ambiental entre ellos los hidrocarburos aromáticos policíclicos (9). Validar un método analítico permite obtener valores de incertidumbre cercanos al valor verdadero en la cuantificación de los parámetros de estudio, pues toman en cuenta

las desviaciones que pueden existir en el momento del ensayo sean estos ocasionados por los equipos, el personal o la aplicación del método. (10).

La norma ISO 17025:2005 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de calibración y ensayos” indica que los métodos deben ser validados para confirmar que son adecuados para el fin previsto. Siendo este un requerimiento de norma, nos encontramos dos investigaciones que validan un método normalizado, pero lo limitan a un solo tipo de agua: un método analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable EPA 550 en la ciudad de México con un equipo HPLC acoplado a un espectrómetro de masas (11), y la estandarización, validación y evaluación de la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas del río Cuyabeno en un equipo HPLC con detector UV-VIS y fluorescencia con el método EPA 550.1 (9)

La validación de un método, en este caso cromatográfico, permitirá definir si es confiable y reproducible además según los requerimientos establecidos en la norma ISO 17025:2017 (12) y llegar a un nivel más bajo de la normativa ambiental. Por lo que se estableció como objetivo validar el método normalizado EPA 550.1 que determina hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua bajo la norma ISO 17025.

METODOLOGÍA

La extracción de los HAP’s se realizó mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés) en modalidad de cartuchos Oasis®HLB. La elución se hizo con diclorometano y la concentración con un rotaevaporador lo que permite llegar a niveles más bajos de detección.

Se prepara solución stock de 16 HAP’s a partir de estándares certificados la cual sirve para preparar las soluciones de curva de calibración y fortificar muestras de agua potable, natural y residual. Se empleó un cromatógrafo de

HPLC 3000 THERMO con automuestreador, horno de columna y detector de fluorescencia (13). Las condiciones del equipo se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de equipo HPLC

Cromatógrafo líquido	Ultimate 3000 THERMO			
Detector	Fluorescencia THERMO			
	<i>Tiempo</i>	<i>Excitación (nm)</i>	<i>Emisión (nm)</i>	
	0	255	315	
	7	277	330	
	8.5	247	364	
	10	244	400	
	12	237	460	
	12.8	237	385	
	16	277	376	
	20	255	420	
	24.2	300	415	
	27	250	495	
Columna	Hypersil Green PAH en mm 150*4.6 tamaño de partícula 5 µm			
Fase móvil	Agua (A) - Acetonitrilo (B)			
	<i>Tiempo</i>	<i>Flujo</i>	<i>% A</i>	<i>%B</i>
	0	2 ml/min	50	50
	5	2 ml/min	50	50
	30	2 ml/min	1	99
	31	2 ml/min	50	50
Horno de columna	28 °C			
Duración de la corrida	31 minutos			

El desarrollo de la validación se realizó en la ciudad de Guayaquil, Ecuador, para lo cual se tomaron 15 muestras de agua en total, divididas en 5 por cada tipo de matriz: origen natural del río Daule, agua potable de la zona norte, agua residual doméstica (planta de tratamiento) y agua residual industrial (efluente de gasolinera), las mismas que fueron fortificadas para su respectivo análisis. Para la preparación de las muestras se realizó el acondicionamiento del cartucho

OASIS agregando 5 ml de diclorometano grado HPLC, enjuague con 5 ml de metanol grado HPLC y luego 5 ml de agua tipo I, carga de 500 ml de muestra a 15 ml/min, lavado con 5 ml agua tipo I, elución con 8 ml de diclorometano (5 ml enjuague de la botella y 3 ml en el cartucho). Se evapora a sequedad para reconstituir con 2 ml de ACN y se coloca en un vial de 2 ml. La inyección del extracto se realizó en el HPLC, los resultados son integrados automáticamente por el software Chromeleon.

La curva de calibración se estableció desde un material de referencia certificado que contiene los 16 HAP's, que permite el cálculo de los límites de detección y cuantificación en las muestras, precisión y veracidad del método.

Las interferencias del método pueden ser los contaminantes en los solventes, material de vidrio los cuales pueden elevar la línea base en el cromatograma. Se debe demostrar que no hay interferencias mediante la corrida de un blanco por cada lote de muestras corridas. La parte fundamental en la validación de un método que determine los HAP's es que deben de contar con un rango de trabajo que este dentro de los límites máximos permisibles que la ley estipula.

Los datos obtenidos en el software Chromeleon se evaluaron estadísticamente mediante Análisis de Varianza (ANOVA), una técnica estadística usada para separar y calcular la variación debido a los errores aleatorios de la medición de la variación causada por cualquier otro factor que podría introducir cambios en la medida de la concentración de las muestras. Con los

valores obtenidos de la precisión y el error sistemático se calculó la incertidumbre de la medición. Se elaboró un programa en Excel para calcular los parámetros estadísticos de interés y la posición determinada por los errores aleatorios.

RESULTADOS

De los 16 HAP's en estudio quedó establecida la validación del método para 15 HAP's que son los analitos que se pueden detectar y cuantificar en el detector de fluorescencia a excepción del Acenaftileno que solo se puede detectar por el detector UV-Vis.

Se obtuvieron cromatogramas con la separación de los 15 HAP's en estudio tanto en las matrices fortificadas de agua natural, residual y potable como en los estándares (ver Tabla 2). Los parámetros estadísticos que se generaron como resultado fueron: repetibilidad, precisión intermedia, incertidumbre, veracidad, límite de detección y cuantificación. No se identificaron valores menores a 0,002 mg/l, por lo tanto, el límite de detección (LD) es igual al límite de cuantificación (LC) 0,002 mg/l.

Se fijaron objetivos de validación en repetibilidad $\leq 25\%$ y de precisión intermedia $\leq 30\%$ obteniéndose 5,59 % como el más alto y de 2,80% como el más bajo. En precisión intermedia el más alto 6,58% y de 3,96% como el más bajo. Siendo estos datos menores que los datos obtenidos por los referentes empíricos. Los resultados se obtuvieron en base al cálculo del análisis de varianza que se realizó con las tres repeticiones durante cinco días.

Tabla 2. Coeficientes de variación de Repetitividad y Precisión intermedia

Analitos	Concentración mg/l	Repetibilidad % CVr	Precisión intermedia % CVR	Incertidumbre %U	Veracidad % Recuperación
Naftaleno	0,008 a 0,080	5,25	5,59	35,62	101,66
Acenafteno	0,002 a 0,080	5,59	6,58	46,01	104,98
Fluoreno	0,002 a 0,080	4,41	5,19	34,21	101,95
Fenantreno	0,002 a 0,080	3,04	4,08	26,92	98,41
Antraceno	0,002 a 0,080	5,59	6,58	46,01	104,98
Fluoranteno	0,002 a 0,080	2,80	3,96	34,75	102,17
Pireno	0,002 a 0,080	4,44	5,34	37,73	101,42
Benzo (a) Antreceno	0,002 a 0,080	4,41	5,19	34,21	101,95
Criseno	0,002 a 0,080	4,44	5,34	37,73	101,42
Benzo (b) Fluoranteno	0,002 a 0,080	3,61	4,81	32,35	102,80
Benzo (k) Fluoranteno	0,002 a 0,080	5,59	6,58	46,01	104,98
Benzo (a) Pireno	0,002 a 0,080	4,44	5,34	37,73	101,42
Dibenzo (a,h) Antraceno	0,002 a 0,080	5,34	6,48	32,05	102,29
Benzo (g,h,i) Perileno	0,002 a 0,080	3,04	4,08	26,92	98,41
Indeno (1,2,3-cd) Pireno	0,002 a 0,080	5,59	6,58	46,01	104,98

El intervalo de trabajo fue de 0,002 mg/l a 0,08 mg/l, excepto para el Naftaleno que fue de 0,008 mg/l a 0,08 mg/l. Se obtuvieron los valores de incertidumbre para los 15 HAP's correspondiente al 95% de confianza presentando valores menores al 35% para el Fluoreno 34,21%, Fenantreno 26,92%, Fluoranteno 34,75%, Benzo (a) Antraceno 34,21%, Benzo (b) fluoranteno 32,35%, Dibenzo (a,h) antraceno 32,05%, Benzo (g,h,i) perileno 26,92%; y valores entre 35%-46,01% para el Naftaleno 35,62%, Criseno, Pireno y Benzo (a) pireno 37,73%, y para el Acenafteno, Antraceno e Indeno (1,2,3-cd) Pireno 46,01%.

Los valores obtenidos del porcentaje de recuperación fueron de 98,41 para el Fenantreno y Benzo (g,h,i) Perileno, de 101,42 - 101,95 para el Naftaleno, Pireno, Criseno, Benzo (a) Pireno, Fluoreno y Benzo (a) Antreceno, de 102,17 - 102,80 para Fluoranteno, Benzo (b) fluoranteno y Dibenzo (a,h) Antraceno, y de 104,98 para Acenafteno, Antraceno, Benzo (k) Fluoranteno e Indeno (1,2,3-cd) Pireno; demostrando que el porcentaje de recuperación de cada analito

cumple con el objetivo de validación propuesto ya que todos los valores se encuentran dentro del rango de 70 - 120%.

CONCLUSIONES

Se realizó un estudio de validación para la determinación cuantitativa de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua mediante cromatografía líquida de alto rendimiento con la técnica de extracción en fase sólida (SPE) en modalidad de cartuchos Oasis[®]HLB. Se desarrollaron los procedimientos estadísticos de los parámetros de validación: repetibilidad, precisión intermedia, incertidumbre, veracidad, límite de detección y cuantificación; evaluando cada uno de estos con los respectivos criterios de aceptación en función del objetivo planteado.

El desarrollo de un método analítico instrumental en el equipo HPLC permitió identificar 15 HAP's con buena resolución y simetría. Para la determinación de la exactitud se calculó el porcentaje de recuperación de cada uno de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, encontrando que el porcentaje

de recuperación de los 15 HAP's está entre 98,41 y 104,98%, ninguno menor que 70% ni mayor a 120% en cada una de las concentraciones, lo cual indica exactitud del método. Se obtuvieron los porcentajes de los coeficientes de variación de la repetibilidad y de la precisión intermedia de cada uno de los analitos para determinar si existen similitud entre los datos en condiciones constantes o variadas, cumpliendo los resultados con lo estipulado.

La definición del protocolo de validación permite tener las pautas para realizar el número de repeticiones, las cuales generan los datos para realizar el análisis estadístico. La metodología es amigable con el ambiente debido a que no emana vapores y los residuos líquidos que genera son colectados y eliminados a través de un gestor ambiental, es fácil de aprender y adaptar. Después del desarrollo de la investigación y el análisis estadístico de los resultados se declara el método analítico cromatográfico **validado**, con su respectivo rango de aplicación de acuerdo con lo estipulado en la legislación vigente.

REFERENCIAS

1. Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., Gutiérrez, A. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2005; 39(1): 27-36.
2. Kromidas, S. *Practical Problem Solving in HPLC*. Saarbrücken, Alemania: Wiley-VCH. 2004
3. Abdel-Shafy, H.I., Mansour, S.M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. 2015; 2-17. doi: 10.1016/j.ejpe.2015.03.011
4. Bryer P. J., Elliott, J. N., y Willingham, E. J. The effects of coal tar based pavement sealer on amphib-ian development and metamorphosis. *Ecotoxicology*. 2006; 15(3): 241–247. doi: 10.1007/s10646-005-0055-z
5. Santana-Romero, JL., Valdés-Callado, M., Olivares-Rieumont, S., Lima-Cazorla, L. Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos ligeros en aguas superficiales de los ríos Almendares y Luyanó en La Habana. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*. 2012; 43:1-7
6. Patiño Y., Díaz E. y Ordóñez S. Water Micropollutants: Classification And Treatment Technologies. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. 2014; 5: 1–20.
7. Blanco Enríquez, E. G., Zavala Díaz de la Serna, F. J., Peralta Pérez, M. del R., Ballinas Casarrubias, L., & Rocha Gutiérrez, B.A. Análisis de la biorremoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua por SPME-GC/MS. *Revista Int. de Contaminación Ambiental*. 2019; 35: 27–36. <https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.esp03.04>
8. Mumtaz, M., & George, J. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, U.S. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology*. 1999; 18(2): 141–147. <https://doi.org/10.3109/15569529909037564>
9. Velásquez, V. Estandarización, Validación y Evaluación de la Concentración de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Aguas del Río Cuyabeno. Trabajo de Grado. [Sangolquí, Ecuador]: Universidad de las Fuerzas Armadas. 2014
10. Eurachem/Citac. Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas, Guía CG 4 EURACHEM / CITAC. In Eurachem/Citac: Vol. 3rd Edition. 2012
11. Díaz Moroles, NE., Alfaro Barbosa, JM., Garza Ulloa, H. Método analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable. *Ciencia UANL*. 2001; 4 (4): 420-425.
12. ISO (2017). ISO/ IEC 17025:2017 *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. International Organization for Standardization.

13. LabTraining (2011). *High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Module 3. HPLC Free E – Course*, (2011 – 2012),

Lab-Training.com. Recuperado de <http://lab-training.com/landing/free-hplc-training-programme-5/>