

# DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO CLOFÍBRICO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES MASAS

Manuel Sánchez Zarza<sup>1</sup>, Martha Avilés Flores<sup>2</sup> y Luis Alberto González Esquivel<sup>3</sup>

Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Paseo Cuauhnáhuac 8532, Jiutepec, Morelos 62550 México.

<sup>2,3</sup>Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

Correro electrónico:manuels@tlaloc.imta.mx

## RESUMEN

Se desarrolló y validó una metodología para la cuantificación de ácido clofibríco derivatizado con trimetilsilildiazometano en muestras de agua por cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (CG-MS). El método se validó en diferentes parámetros como linealidad, exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación. Las concentraciones de validación se encuentran en el intervalo de 0.0025 a 0.1644  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los límites de detección y cuantificación obtenidos son 0.0003 y 0.0053  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

*Palabras clave: ácido clofibríco, trimetilsilildiazometano, validación.*

## INTRODUCCIÓN

Las aguas superficiales y las aguas subterráneas son actualmente la mayor fuente de producción de agua potable en todo el mundo, sin embargo estudios han revelado recientemente la presencia de fármacos en las ciudades de Alemania, Italia, Estados Unidos y Canadá; como ácido clofibríco

(270  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y gemfibrozil (70  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), bezafibrato (27  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), carbamezapina (258  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), diclofenaco (6  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), penazona (400  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), provocando un grave problema de salud pública.

Los fármacos llegan al medio ambiente por medio de su metabolización y excreción por el hombre. El fármaco administrado puede ser excretado sin ningún cambio, en forma de conjugados de glucurónidos o sulfatos, como metabolito principal o como una mezcla de metabolitos (Strennet *et al.*, 2004). En general, en el organismo los fármacos son metabolizados por diversos mecanismos, luego son excretados en forma de derivados polares y solubles en agua, que presentan una actividad farmacológica reducida respecto al compuesto original (Flores *et al.*, 2008; Bellido, 2006).

En aguas superficiales al norte de América y Europa, se han detectado concentraciones de 0.75-1.50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido clofibríco (Sanderson *et al.*, 2003), mientras que Pedersen *et al.* (2005) reportaron concentraciones de Gemfibrosil en cuerpos de irrigación en regiones áridas de Estados

Recibido: 3 abril de 2012. Aceptado: 26 mayo de 2012.

Publicado como ARTÍCULO CIENTÍFICO en Ra Ximhai 8(2): 157-161.

Edición Especial: Contaminación y Medio Ambiente.

Unidos de 190- 790 ng•L-1 y en corrientes de agua de 160 – 360 ng•L-1.

En México Siemens *et al.* (2008) realizaron un estudio con muestras de agua residual municipal provenientes del Valle del Mezquital en México, con el objetivo de determinar las concentraciones y flujos de fármacos en este sistema de irrigación. Los resultados de Acido Clofibrico, oscilaron entre 0.02 y 0.22 µg•L-1. Estas concentraciones son menores en comparación con los resultados de estudios realizados en ciudades europeas (Carballa *et al.*, 2005).

En la determinación de ácido clofibrico el uso de cromatografía de gases espectrometría de masas se facilita por su conversión a ester volátil. Los metilesteres son particularmente convenientes para la ionización electrónica en espectrometría de masas y producidos por la reacción de sustratos ácidos con diazometano.

Una alternativa es el trimetilsilildiazometano (TMSDM), que es un derivado del diazometano, sin embargo éste es muy selectivo y exhibe reacción con el ácido carboxílico para producir el metilester, el TMSDM es fácil de usar y más seguro que el diazometano. El uso del TMSDM para la conversión de compuestos fenoxiácidos o similares a metilesteres para análisis por CG/MS se ha reportado en estudios realizados por Johnson *et al.* (1997).

### Objetivo

El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar el método de Acido Clofibrico por cromatografía de gases masas, empleando como derivatizante trimetilsilildiazometano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrolló un método para la validación de ácido clofibrico, mediante el método de adición de estándar. El método implica una extracción en fase sólida con cartuchos de extracción en fase sólida Chromabond C18 de 3mL 500mg. El método se validó en el rango de concentraciones de 0.0025 a 0.1644 µg•L-1.

### Reactivos

Estándar de Acido Clofibrico marca Aldrich Chemical Co. >99%, Derivatizante N-(t-butildimetilsilil)-N metiltrifluoroacetamida (MBSTFBA), trimetilsilildiazometano (TSDM), Surrogado 4,4'-Diclorobifenilo, Metanol grado HPLC, Hexano grado HPLC, Acetona grado HPLC, Viales de 1.8 mL Microjeringas de 1000, 500, 100, 50, 25 µL.

### Equipos

Cromatógrafo de gases VARIAN modelo 3800 acoplado a espectrómetro de masas/masas modelo VARIAN SATURNO 2200, Columna capilar VF5ms 30 m X 0.25mm X 0.25 µm, las muestras fueron inyectadas al cromatógrafo de gases.

Balanza analítica OHAUS, Potenciómetro Orion-Termo, Baño Ultrasónico, Sistema de extracción en fase sólida marca VARIAN equipado con una bomba de vacío, Rotavapor, Concentrador de muestras Minivap

### Condiciones cromatográficas

Se determinaron las mejores condiciones del cromatógrafo de gases en cuanto a la respuesta en la señal y separación del pico de ácido clofibrico, el programa de temperatura fue el siguiente: 65°C durante 2 min, seguido de 30°C min-1 hasta alcanzar una temperatura de 180°C, posteriormente seguir a 1°C min-1 hasta la temperatura de

230°, finalmente a 300°C durante 30°Cmin-1 para tener un tiempo final de corrida de 13.5 min.

Para detectar los analitos, primero se realizó en modo SCAN (todos los iones) en un rango de escaneo de 50-500 m/z y una vez identificados los analitos en modo SIM (monitoreo selectivo de iones). La temperatura de la fuente de impacto de electrones fue de 220°C. La energía de ionización fue fijada en 70eV.

### Validación del método analítico

Para evaluar los parámetros de linealidad, precisión y exactitud se prepararon 21 concentraciones de acidoclofibricopor duplicado en el rango de 0.0025 a 0.1644 µg/L-1.

Linealidad. La linealidad del método es la relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas del analito. La curva de calibración para ácido clofibrico

se construyó con la relación de áreas de analito a estándar versus las concentraciones del analito.

Se realizó el análisis de regresión lineal para determinar la linealidad del método así como para generar la ecuación de la curva de calibración  $y = mx + b$ , donde y es la relación de área, x la concentración, m la pendiente y b el intercepto.

Se usaron estándares externos para la cuantificación. Las curvas de calibración se obtuvieron con siete concentraciones estándar (regresión lineal:  $R^2 > 0.98$ ). La identidad de las sustancias en muestras sintéticas se confirmó revisando la abundancia relativa de los iones característicos (Figura 1).

Se realizaron pruebas con dos derivatizantes (Trimetilsilildiazometano y el MTBSTFA), el que generó una señal más sensible fue el Trimetilsilildiazometano.

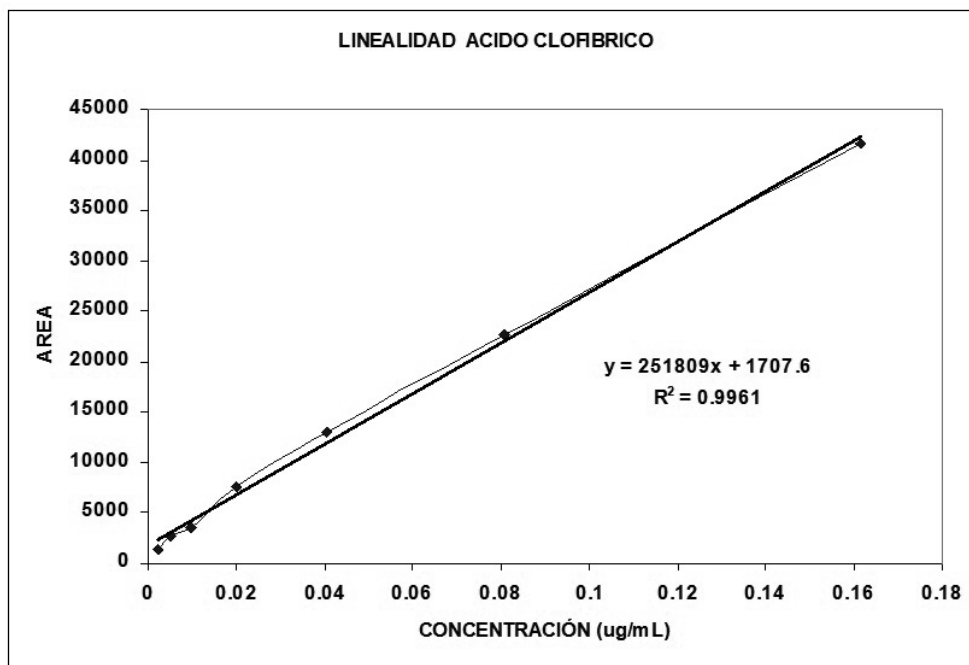
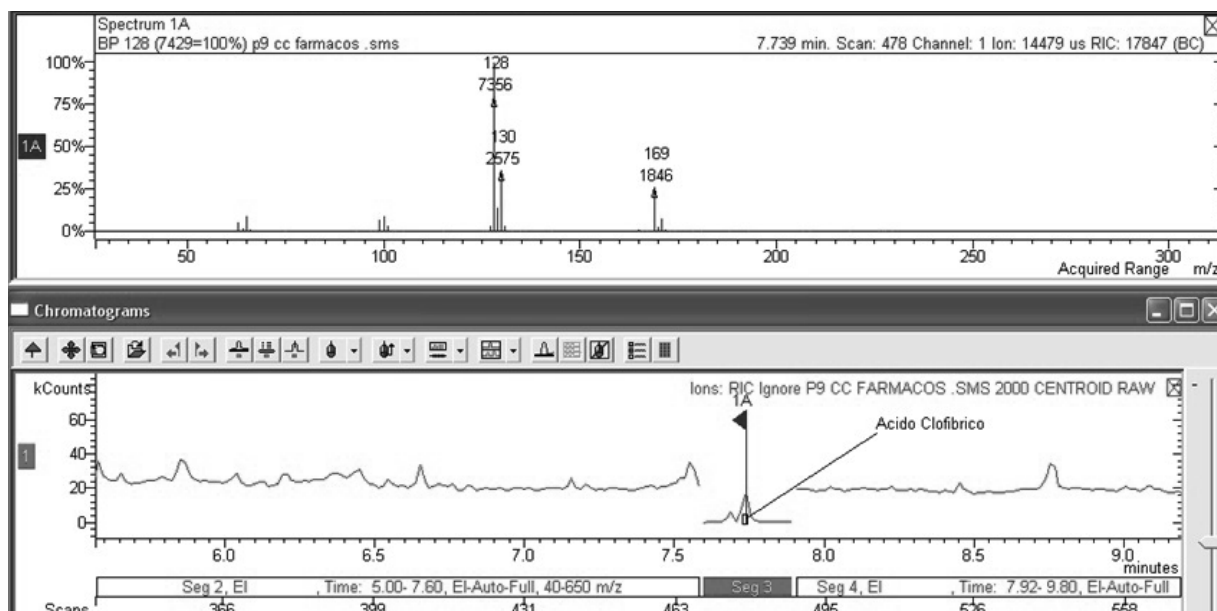


Figura 1 Linealidad ácido clofibrico

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 2. Cromatógrama de ácido clofibrico**

Para calcular la linealidad se analizaron 6 diluciones del estándar por triplicado, se demostró respuesta lineal en el rango de 0.0025 a 0.1644  $\mu\text{gL}^{-1}$ . El coeficiente de correlación superior a 0.99 (figura 1) para la relación de área versus concentración, sugiere una fuerte relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas de ácido clofibrico. Un coeficiente de variación menor de 5%, indica que el instrumento es preciso bajo las condiciones del análisis establecidas. En la Figura 2 se muestra el cromatograma del ácido clofibrico.

### Precisión

La precisión se evaluó mediante nueve

determinaciones con tres niveles de concentración 0.0050, 0.0404 y 0.1614  $\mu\text{gL}^{-1}$ . Los resultados obtenidos se indican en la tabla 1. Los valores de desviación estándar son de 2.07, 0.49 y 0.42, lo que confirma la precisión del método analítico.

### Exactitud

Los resultados del ensayo obtenidos se indican en la tabla 2. Los valores porcentuales de recuperación obtenidos se encuentran dentro del límite estándar de entre 86.02 y 95.32, lo que confirma la exactitud del método.

### Límites de detección y cuantificación

La determinación del límite de detección

**Cuadro 2. Resultados de la exactitud del método.**

Concentración Teórica ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	Porcentaje de recobro (%)						
0.0050	88.85	89.88	91.14	88.46	86.02	86.34	87.83
0.0404	91.05	90.01	89.99	90.02	89.98	91.01	90.04
0.1614	95.32	95.06	95.18	95.24	95.30	95.28	94.99

**Tabla 3. Resultados de muestras agua de pozo y agua residual.**

Tipo de muestra	Concentración $\mu\text{gL}^{-1}$
Agua pozo	0.037
Agua pozo	0.055
Agua residual	0.103

y cuantificación se realizó en base a la desviación estándar de la respuesta del blanco y a la pendiente de la curva de linealidad, obteniéndose valores de  $0.0003 \mu\text{gL}^{-1}$  para el límite de detección y  $0.0053 \mu\text{gL}^{-1}$  para el límite de cuantificación.

**Análisis de muestras de agua potable**

Se realizó un muestreo en un pozo de abastecimiento y una descarga de agua residual de un municipio del Estado de Hidalgo, con el fin de cuantificar la presencia de acidoclofibrico en los dos tipos de agua; los resultados se presentan en la siguiente tabla

**CONCLUSIONES**

Se concluye que el método de derivatización con el Trimetilsilildiazometano es más sensible que el aplicado con el MTBSTFA para la identificación y determinación de ácido clofibrico. El límite de detección alcanzado con esta técnica de análisis ( $0.0003 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) está por debajo lo reportado en la bibliografía, lo que indica además que el método de extracción en fase sólida es el adecuado para este fármaco. La precisión del método es adecuada y está por debajo de lo especificado ( $\geq 20\%$ ) y cumple con el especificado en los métodos EPA. En base a los resultados obtenidos de la validación se concluye que el método de análisis de ácido clofibrico por cromatografía de gases masas y extracción en fase sólida es un método sensible y confiable.

**LITERATURA CITADA**

Andreozzi, R., Marotta, R., Nicklas, P., 2003. Pharmaceutical in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50, 1319-1330.

Bellido, D., 2006. Metabolismos de fármacos y sus implicaciones clínicas. *Manual de Nutricion y metabolismo*. Cap 10. 1 ed. Sep. 625p.

Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Lomopart, M., Garcia, C., Rodriguez, I., Gomez, M., Ternes, T., 2005. Behaviour of pharmaceutical and personal care products in a sewage treatment plant of northwest Spain. *Water Science and technology*. 8, 29-35.

Flores, J., Media, V.A., Armijo, J.A., 2008. *Metabolismo de los fármacos. Farmacología humana*. 6 Ed. Masson Barcelona. 1540 p.

Gross, M., Petrovic, M., Barcelo, D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography- tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* Vol. 70. 4, 678-690

Johnson, P.D., Rimmer, D.A., Brown, R.H. Adaptation and application of a multiresidue method for the determination of a range of pesticides, including phenoxy acid herbicides in vegetation, based on high resolution gel permeation chromatographic

clean-up gas chromatographic analysis with mass-selective detection. *J. Chromatogr. A* 1997; 765: 245-250 and Johnson, P.D., Rimmer, D. A., Brown, R.H. Determination of phenoxy acid herbicides in vegetation, utilizing high resolution gel permeation chromatographic clean-up methylation with trimethylsilyldiazomethane prior to gas chromatographic analysis with mass-selective detection. *J. Chromatogr. A* 1996; 755: 3-11.

Pedersen, J., Soliman, M., Suffet, M. (2005). Human pharmaceuticals, hormones, and personal care products ingredients in runoff from agricultural fields irrigated with treated wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1625-1632.

Siemens, J., Huschek, G., Siebe, C., Kaupenjohann, M., 2008. Concentration and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system. Mexico City-Mezquitalvalley. *Water Research*. 42, 2124-2134.

Strenn, B., Clara, M., Gans, O., Kreuzinger, N., 2003. The compartment of selected pharmaceutical in sewage treatment plants. *Water Pollution VII*. WIT Press, Southampton, UK

Sanderson, H., Johnson, D.J., Wilson, C.J., Brain, R.A., Solomon, K.R., 2003. Probabilistic Hazard assessment of environmentally occurring pharmaceutical toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicology Letters* 144, 383-395.