

DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE UHPLC-MS/MS PER A LA DETERMINACIÓ DE FTALATS EN ALIMENTS ENVASATS

Naiara Pardo-Mates⁽¹⁾, Francesca Serrano⁽¹⁾, Oscar Núñez^(1,2,3)

⁽¹⁾Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès, 1-11, 08028 Barcelona, Espanya

⁽²⁾Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària, Universitat de Barcelona, Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Espanya

⁽³⁾Professor Agregat Serra Hünter, Generalitat de Catalunya, Espanya

e-mail: npardoma8@ub.edu



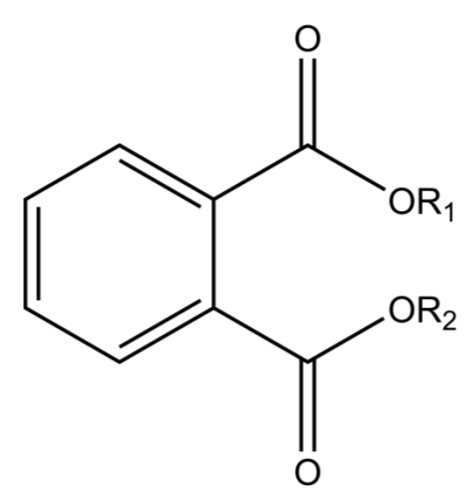
INTRODUCCIÓ

Els èsters d'àcid ftàlic són uns compostos àmpliament utilitzats com additius en productes plàstics per augmentar la seva flexibilitat, transparència, durabilitat i elasticitat. Degut al gran nombre d'aplicacions industrials que tenen, la seva producció anual és de milions de tones i són utilitzats en els envasos de productes de consum com ara aliments i begudes.

Una característica rellevant dels ftalats és que no estan units químicament als plàstics com ara al policlorur de vinil, motiu pel qual es pot produir una alliberació d'aquests compostos en el medi ambient i la seva migració des dels envasos fins als aliments que contenen [1]. Diverses investigacions han demostrat que els ftalats són tòxics per a la salut humana degut a que poden actuar com disruptors endocrins.

Per tant, l'objectiu d'aquest treball és desenvolupar un mètode de cromatografia de líquids d'ultra-elevada eficàcia acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem (UHPLC-MS/MS) i avaluar la seva aplicabilitat en la determinació de ftalats en matrius d'aigua mineral.

COMPOSTOS



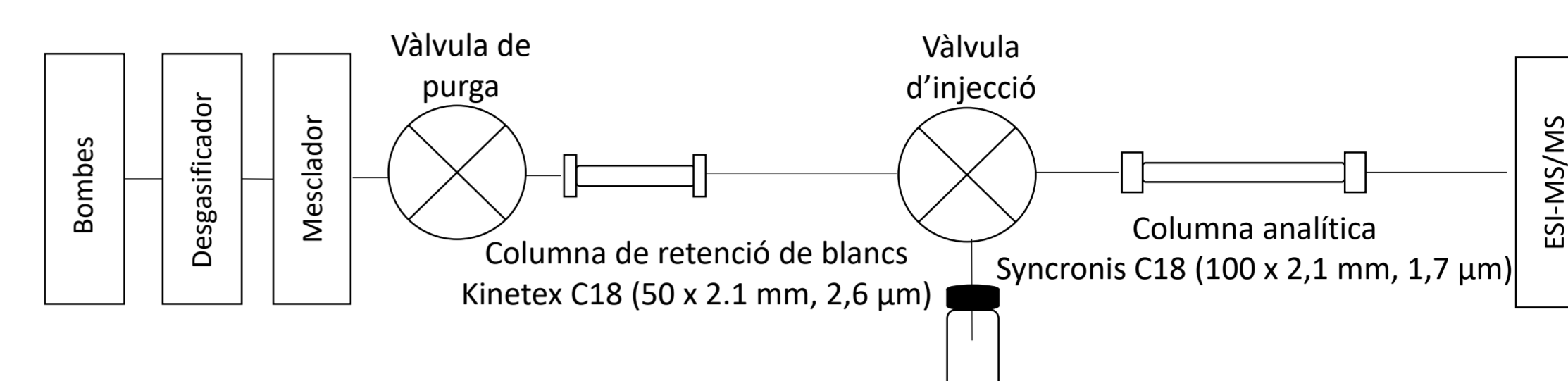
Estructura química general dels ftalats

Nom	Abreviació	Fórmula estructural	Nom	Abreviació	Fórmula estructural
Ftalat de dimetil	DMP	C ₆ H ₄ (COOCH ₃) ₂	Ftalat de di-n-butil	DBP	C ₆ H ₄ (COO(CH ₂) ₃ CH ₃) ₂
Ftalat de dietil	DEP	C ₆ H ₄ (COOC ₂ H ₅) ₂	Ftalat de benzil butil	BBP	CH ₃ (CH ₂) ₂ OOC-C ₆ H ₄ -COOCH ₂ C ₆ H ₅
Ftalat de dialil	DAP	C ₆ H ₄ (COOCH ₂ CH=CH ₂) ₂	Ftalat de diciohexil	DCP	C ₆ H ₄ (COOC ₆ H ₁₁) ₂
Ftalat de di-n-propil	DPrP	C ₆ H ₄ (COO(CH ₂) ₂ CH ₃) ₂	Ftalat de di-n-hexil	DNHP	C ₆ H ₄ (COO(CH ₂) ₅ CH ₃) ₂
Ftalat de diisobutil	DiBP	C ₆ H ₄ (COOCH ₂ CH(CH ₃) ₂) ₂	Ftalat de di(2-etilhexil)	DEHP	C ₆ H ₄ (COOCH ₂ CH(C ₂ H ₅)(CH ₂) ₃ CH ₃) ₂

INSTRUMENTACIÓ

Cromatografia de líquids:

Open Accela AS UHPLC System (Thermo Fisher Scientific)



Espectrometria de masses:

TSQ Quantum Ultra AM (Thermo Fisher Scientific)

Font d'ionització: Electrospai, ESI (+)

Analitzador: Triple quadrupol (QQQ)

Paràmetres H-ESI	
Voltatge de la font	4 kV
Temperatura de vaporització	350 °C
Cabal del gas envoltant	40 u.a.
Cabal del gas "Ion Sweep"	0 u.a.
Cabal del gas auxiliar	25 u.a.
Temperatura del capil·lar	270 °C

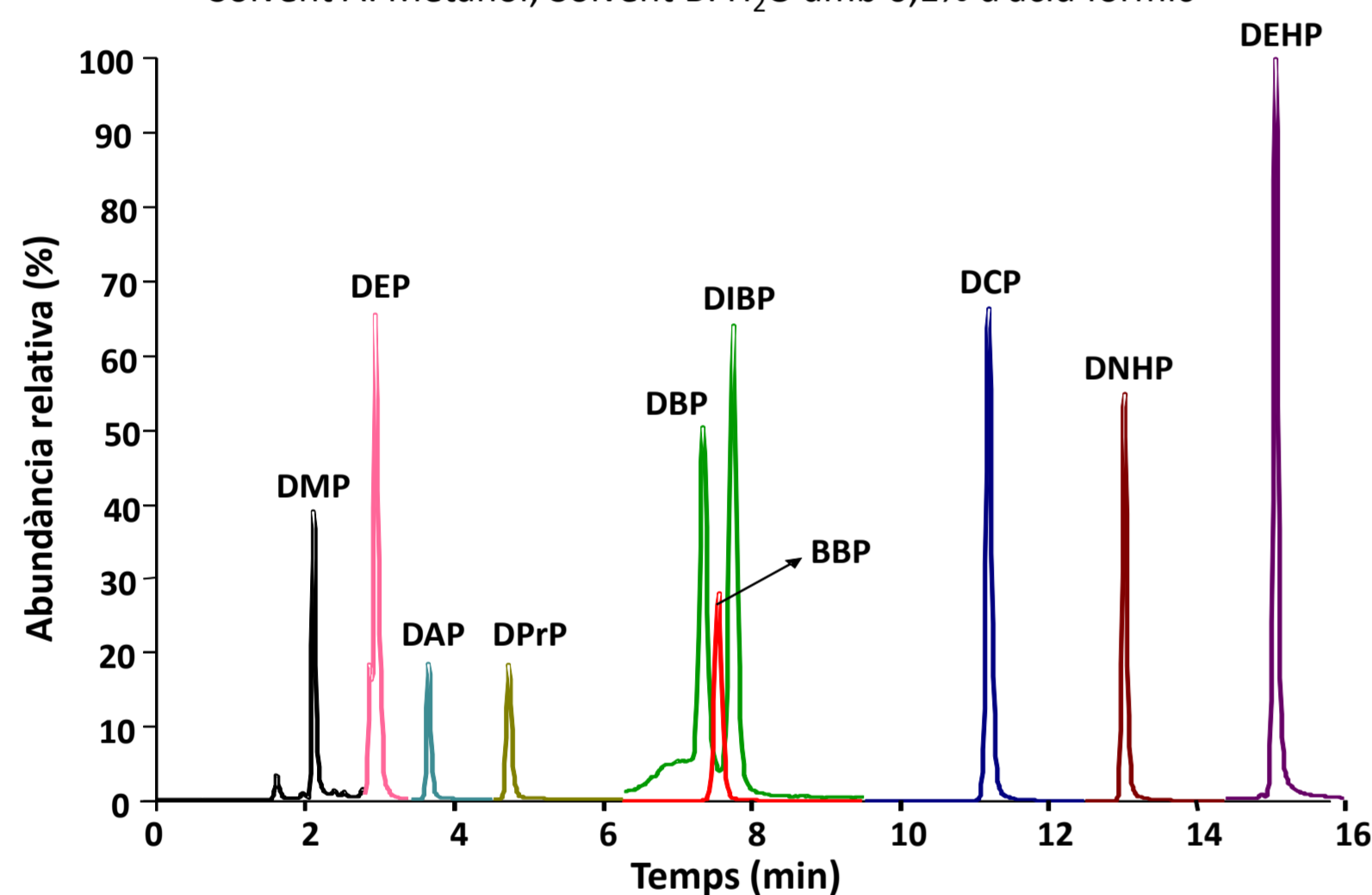
u.a.: Unitats arbitràries

DESENVOLUPAMENT I VALIDACIÓ DEL MÈTODE UHPLC-ESI-MS/MS

OPTIMITZACIÓ SEPARACIÓ CROMATOGRÀFICA

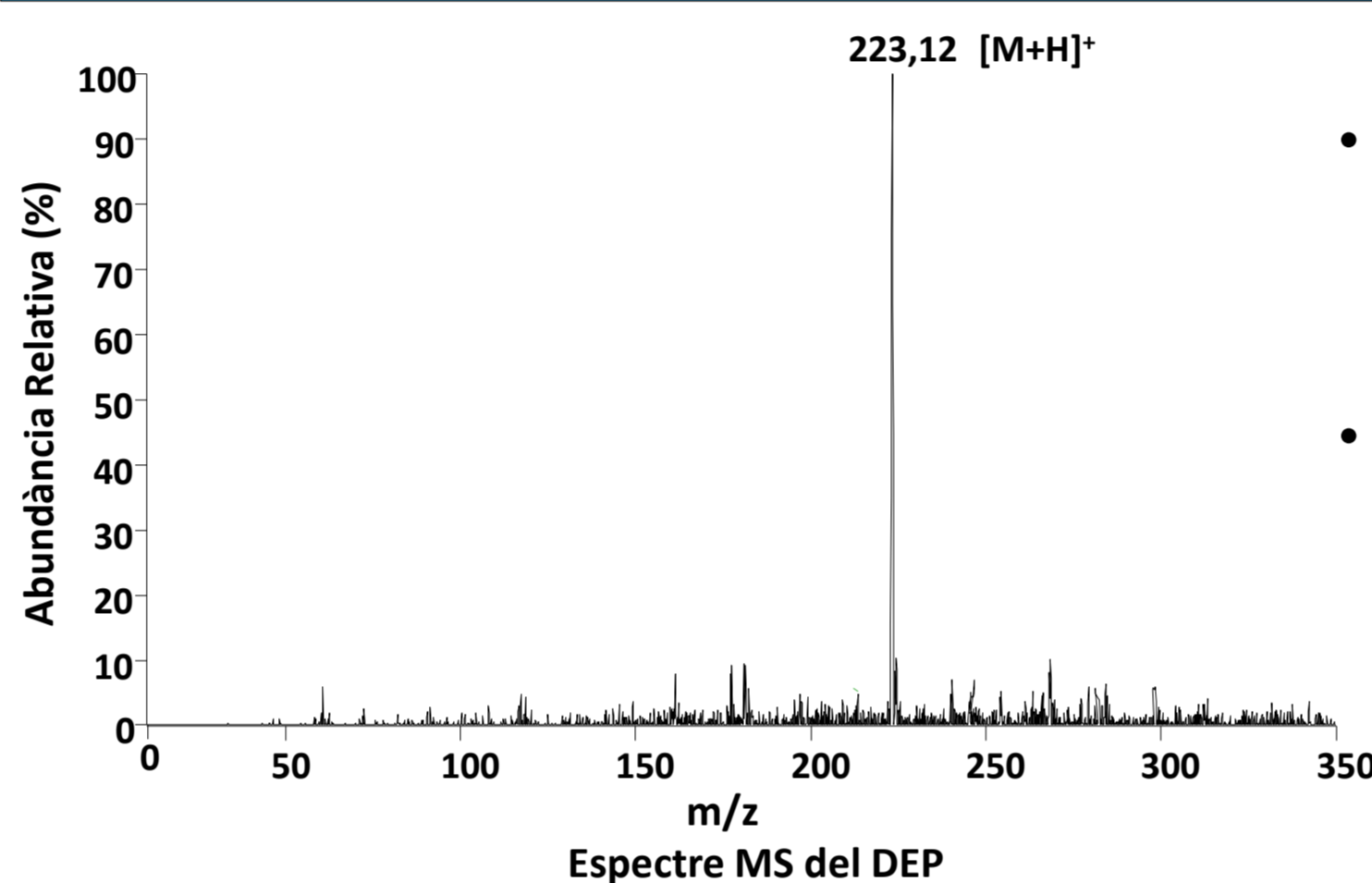
Temps (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	60	40
0.5	75	25
6	80	20
10	90	10
12	100	0
17	100	0
18.5	60	40
24	60	40

Solvent A: Metanol; Solvent B: H₂O amb 0,1% d'àcid fòrmic



Separació cromatogràfica en mode SIM (solució patró de 500 µg/L)

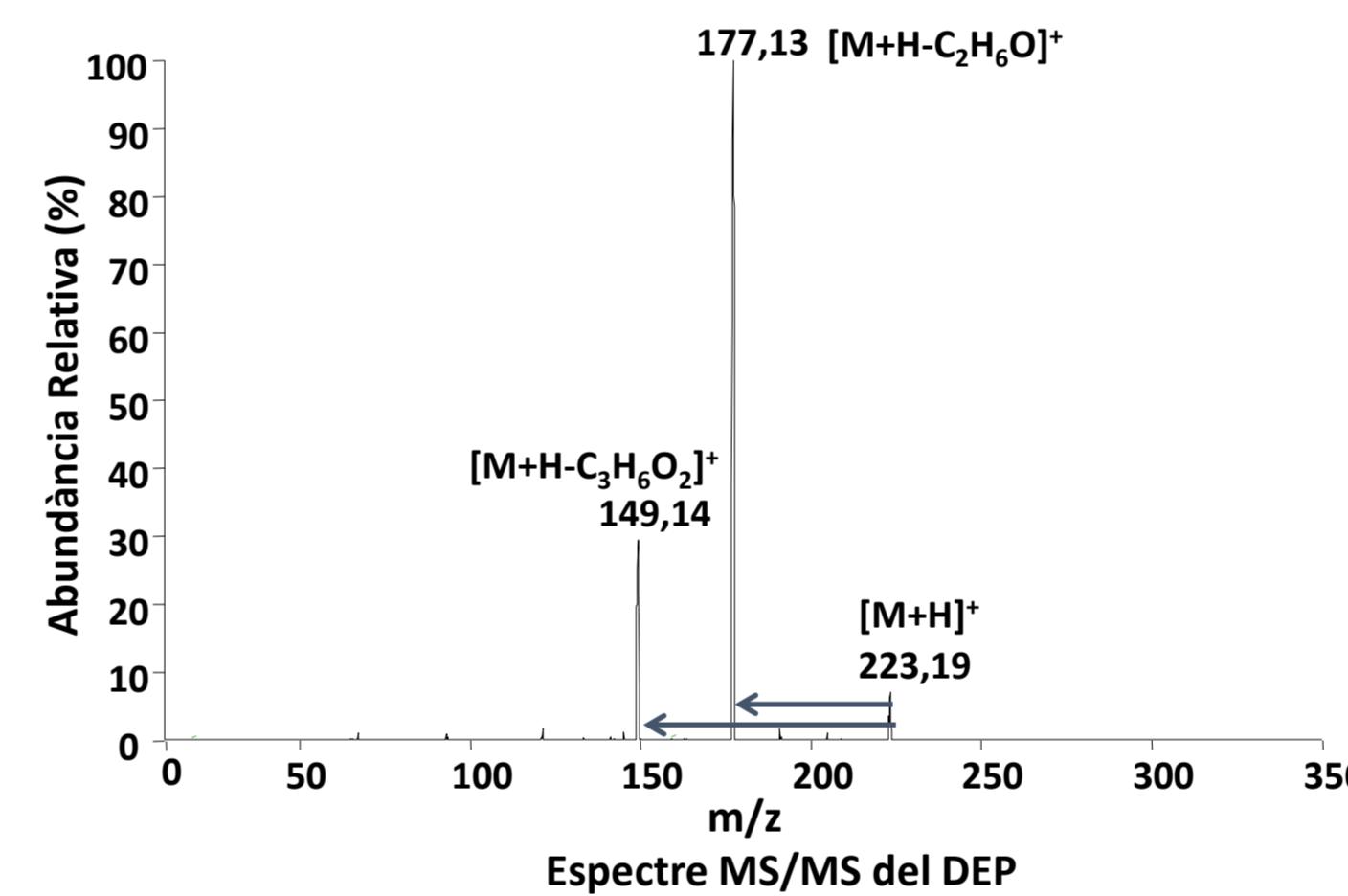
ESPECTRES MS I MS/MS



Espectre MS del DEP

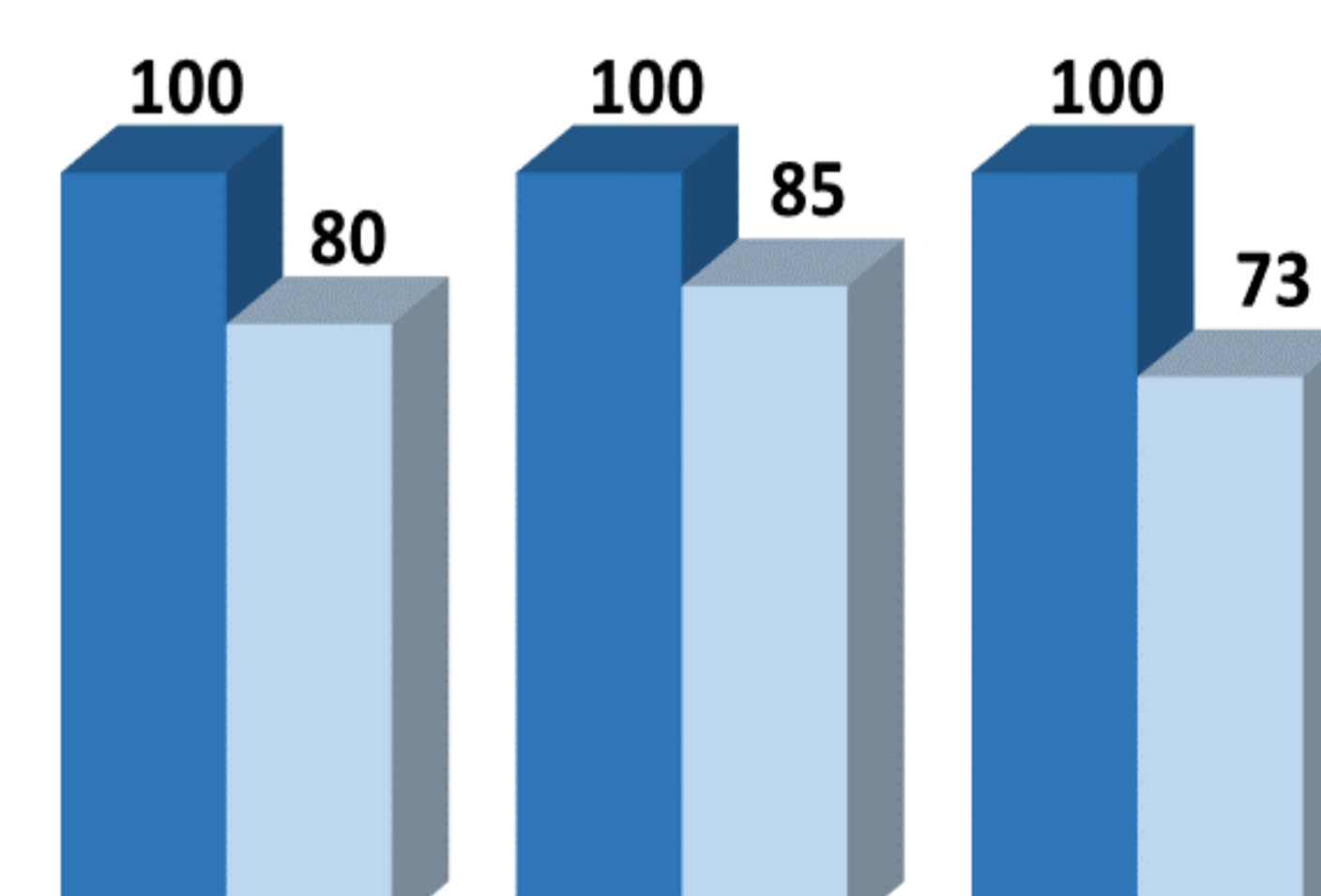
- Es realitza l'estudi MS per seleccionar l'ió precursor de cada compost
- En els deu ftalats l'ió precursor (pic base de l'espectre) correspon a la molècula protonada [M+H]⁺

- Es realitza l'estudi MS/MS dels ions precursors per a seleccionar els ions productes més abundants
- Els dos ions productes més abundants es seleccionen com a transicions de quantificació i de confirmació (mode SRM)



Espectre MS/MS del DEP

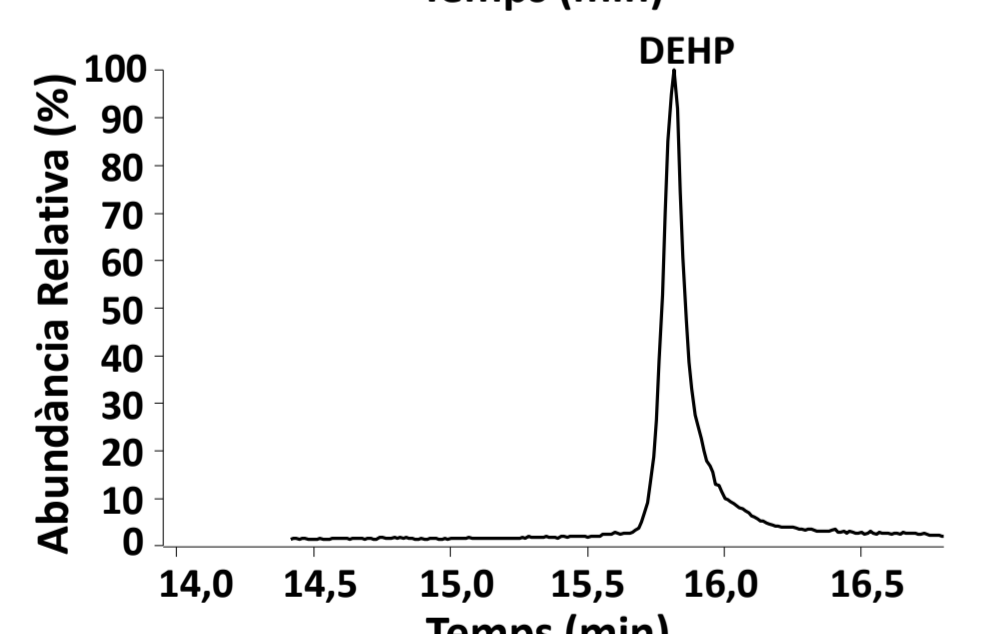
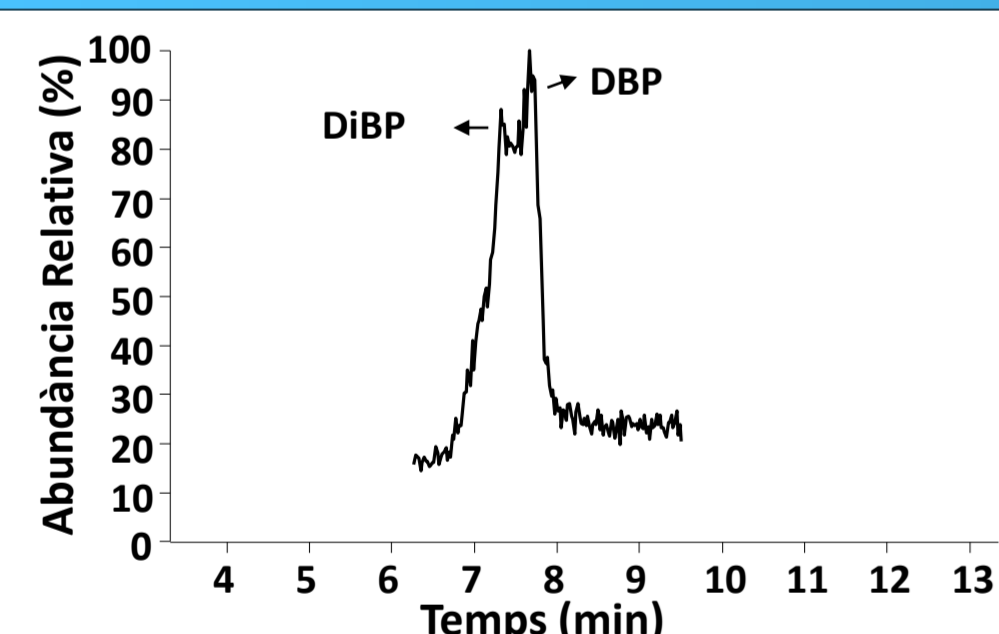
ESTUDI DE SUPRESSIÓ DE LA IONITZACIÓ



Compost	Abundància Relativa compost injectat individualment	Abundància Relativa compost injectat en mescla i en coelució
DiBP	100%	20%
DBP	100%	15%
BBP	100%	27%

% Supressió de la ionització
La separació cromatogràfica a línia de base d'aquests tres ftalats és necessària per evitar l'efecte de supressió de la ionització

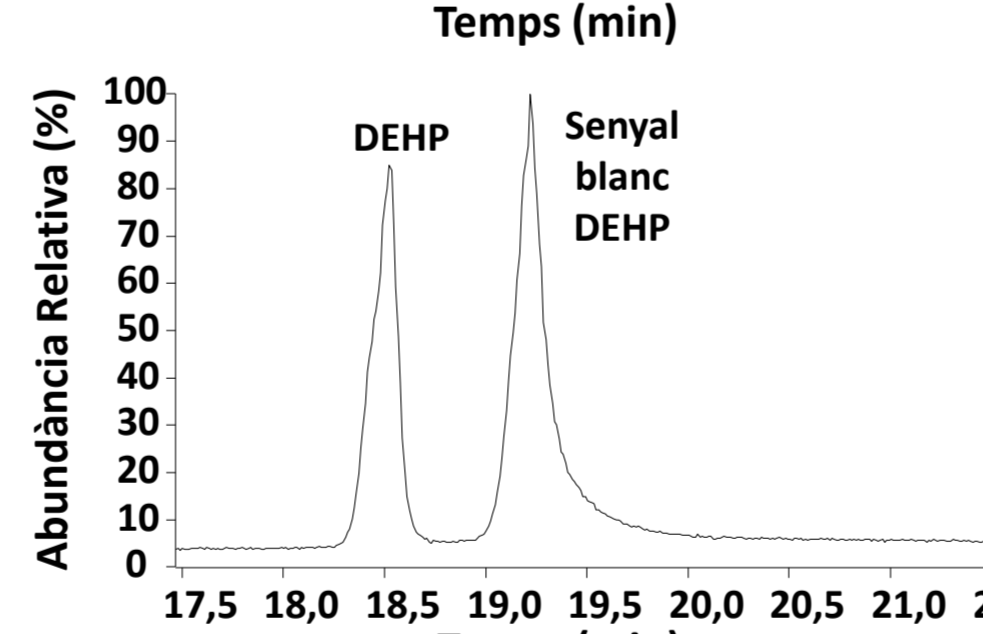
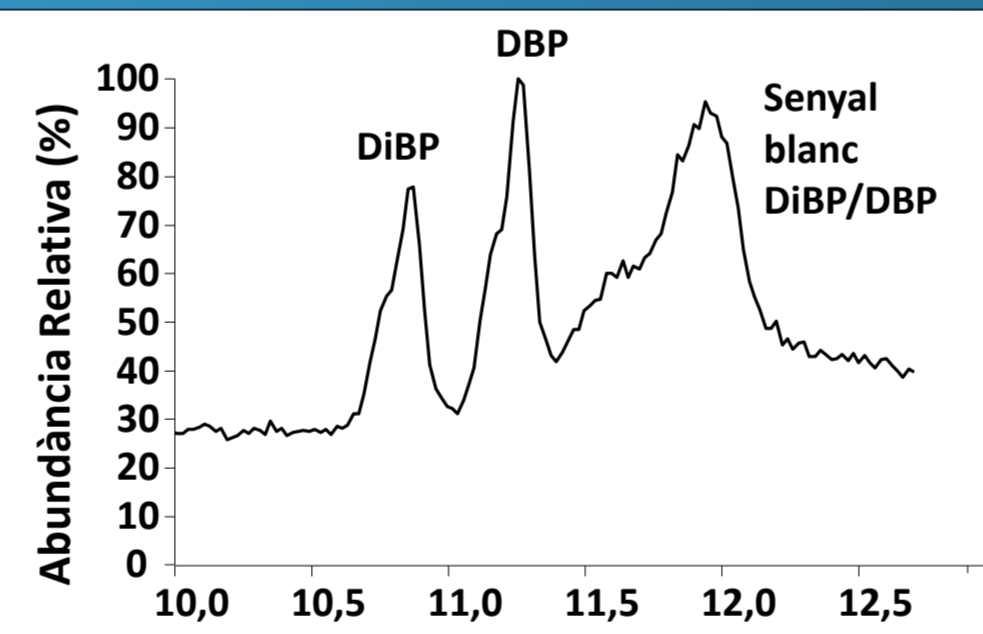
ESTUDI DE BLANCS INSTRUMENTALS



Contaminació instrumental de ftalats (blanc de metanol)

Per tal d'eliminar la contaminació instrumental de tres ftalats, s'utilitza una columna de retenció de blancs col·locada entre la bomba i l'injector de l'instrument UHPLC

En els cromatogrames s'observa clarament la separació entre la senyal de ftalats que prové de les mostres i la senyal que prové de la contaminació instrumental (que elueix més tard degut a la columna de retenció de blancs)



Cromatograma d'una solució patró de 50 µg/L

PARÀMETRES DE QUALITAT INSTRUMENTALS

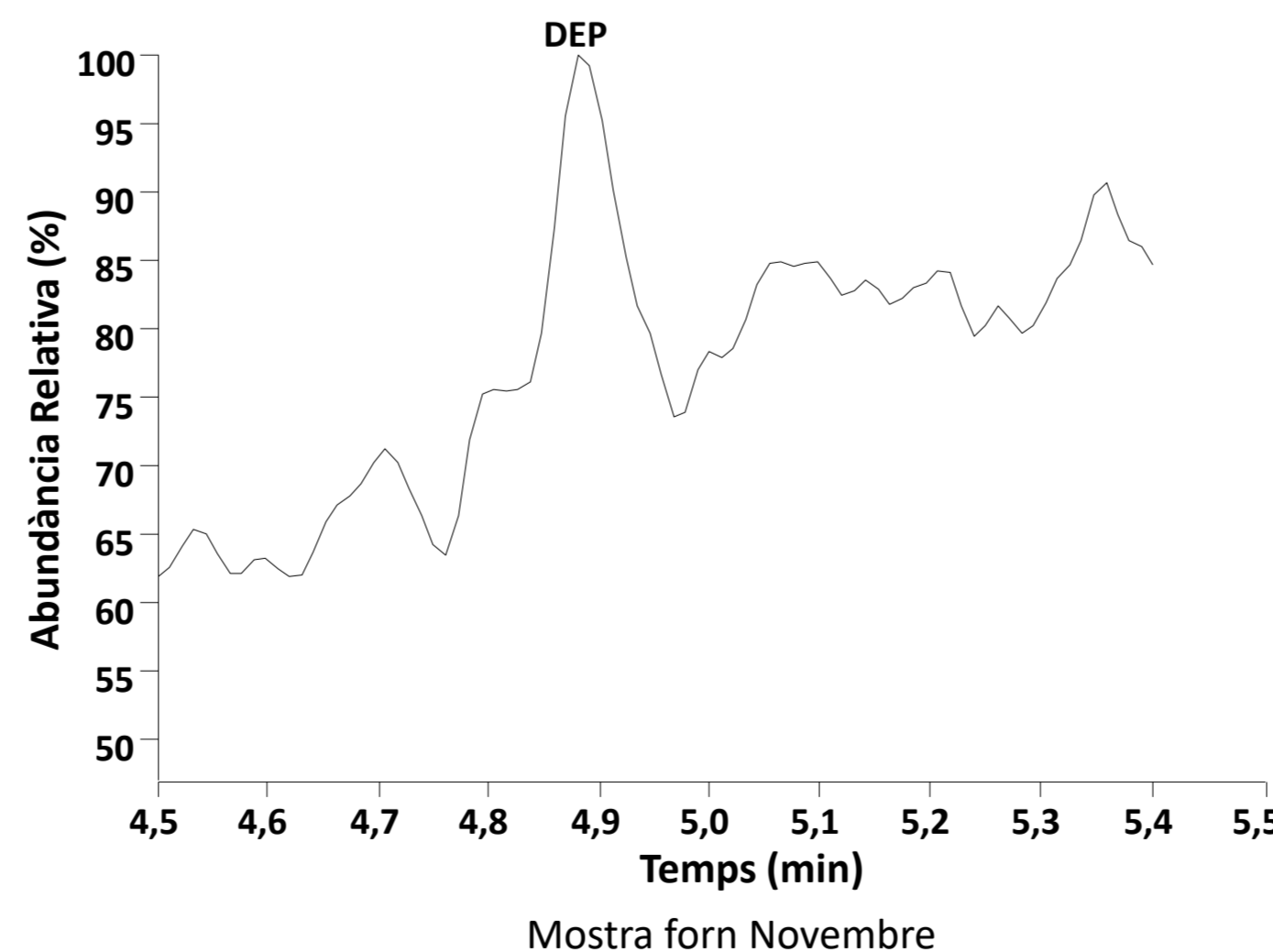
Compost	DMP	DEP	DAP	DPrP	DBP	BBP	DiBP	DCP	DNHP	DEHP
LOD (µg/L)	4	5	1	1	9	4	9	2	4	5
LOQ (µg/L)	13	17	4	4	30	13	30	7	12	17
Linealitat (r ²)	0,998	0,997	0,998	0,998	0,997	0,998	0,998	0,997	0,999	0,997
PRIMER NIVELL (~300 µg/L)										
Precisió (dins del dia, n=5, %RSD)	10,7	4,5	2,5	2,3	3,6	5,2	2,8	6,7	8,3	13,2
Precisió (entre dies, n=3x5, %RSD)	9,3	10,0	19,4	21,7	14,9	23,1	19,8	16,3	6,3	13,4
Concentració real (µg/L)	300	304	300	301	300	297	302	302	302	300
Concentració calculada (µg/L)	294	321	312	311	310	325	308	301	269	302
Veracitat (% error relatiu)	2,0	5,6	4,0	3,3	3,3	9,4	1,9	0,3	10,9	0,6
SEGON NIVELL (~50 µg/L)										
Precisió (dins del dia, n=5, %RSD)	11,6	9,9	9,8	7,7	0,5	3,4	7,0	2,9	3,1	1,7
Precisió (entre dies, n=3x5, %RSD)	17,9	12,5	16,2	6,7	4,1	18,7	21,9	10,9	7,0	14,2
Concentració real (µg/L)	50	51	50	50	50	50	50	50	50	50
Concentració calculada (µg/L)	43	46	48	50	53	51	47	54	52	46
Veracitat (% error relatiu)	14,0	9,8	4,0	0	6,0	2,0	6,0	8,0	4,0	8,0
TERCER NIVELL (~20 µg/L)										
Precisió (dins del dia, n=5, %RSD)	7,9	6,7	3,4	2,1	0,3	0,3	6,2	12,7	6,5	5,5
Precisió (entre dies, n=3x5, %RSD)	15,2	8,7	13,2	23,1	23,9	6,7	12,7	12,5	12,5	12,5
Concentració real (µg/L)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Concentració calculada (µg/L)	17	18	20	21	21	21	23	17	22	22
Veracitat (% error relatiu)	15,0	10,0	0	5,0	0	5,0	15,0	15,0	10,0	10,0
QUART NIVELL (~5 µg/L)										
Precisió (dins del dia, n=5, %RSD)	13,4	6,5								
Precisió (entre dies, n=3x5, %RSD)	12,8	6,8								
Concentració real (µg/L)	5	5								
Concentració calculada (µg/L)	4	6								
Veracitat (% error relatiu)	20,0	20,0								

ESTUDIS DE MIGRACIÓ EN MOSTRES D'AIGUA MINERAL ENVASADES EN AMPOLLES DE PLÀSTIC

Es realitza un estudi al llarg de 6 mesos (Octubre 2016-Abril 2017) mantenint ampelles d'aigua mineral envasades en plàstic sota quatre condicions d'exposició diferents (10 ampelles/condició)

- Fosc (Temp. ambient)
- Condicions ambientals (a l'aire lliure)
- Forn (40 °C)
- Congelador (-4 °C)

Mostres positives només pel DEP en les ampelles d'aigua mantingudes a 40 °C a partir del segon mes d'exposició. Les concentracions són sempre inferiors al límit de quantificació (17 µg/L) i properes al límit de detecció (5 µg/L).



Mostra forn Novembre

Per a l'anàlisi de mostres d'aigua, s'estudia l'efecte matriu comparant la senyal dels ftalats en aigua LC-MS (50 µg/L) i en una mostra d'aigua mineral fortificada a la mateixa concentració. Es comparen els resultats amb un test-t per a mitjanes de dues mostres aparellades:

Estadístic t (t _{calculada})	0,222597535
P (T<t) dues cues	0,828818348
Valor crític de t (dues cues) (t _{crítica})	2,262157158

- P (T<t) dues cues > α (0,05) → No hi ha diferències significatives entre les senyals dels ftalats comparades
- t_{calculada} < t_{crítica} → No hi ha efecte matriu en l'anàlisi de mostres d'aigua mineral

CONCLUSIONS

- S'ha desenvolupat un mètode UHPLC-ESI-MS/MS per a l'anàlisi de 10 ftalats amb un temps d'anàlisi inferior a 20 min i als nivells requerits per la legislació.
- Només tres ftalats (DiBP, DBP i BBP) presenten supressió de la ionització (15-27%), tot i que no suposa un problema excessiu atès que s'aconsegueix la seva separació cromatogràfica gairebé a línia de base.
- S'aconsegueix eliminar el problema de blancs instrumentals amb la utilització d'una columna de retenció de blancs col·locada entre la bomba i l'injector de l'instrument UHPLC.
- S'ha validat el mètode desenvolupat obtenint LODs entre 1-9 µg/L i bones precisions (0,3-23,9%) i veracitats (0-20%) a diferents nivells de concentració.
- Els estudis de migració portats a terme mostren que no es produeix migració dels ftalats avaluats a concentracions perilloses en cap de les condicions d'exposició avaluades al llarg de sis mesos.
- No s'ha observat efecte matriu en les mostres d'aigua mineral analitzades. Es pot concloure que el mètode proposat és adequat per a l'anàlisi de ftalats en mostres d'aigua envasades en plàstic.

REFERÈNCIES

[1] J.-C. Fan, L. Wu, X. Wang, X.-H. Huang, Q. Jin, S.-T. Wang, Determination of the migration of 20 phthalate esters in fatty food packaged with different materials by solid-phase extraction and UHPLC-MS/MS, Anal. Methods. 4 (2012) 4168-4175.

AGRAÏMENTS

Els autors agraeixen el suport financer rebut del Ministeri Espanyol d'Economia i Competitivitat (projecte CTQ2015-63968-C2-1-P) i de l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca en el projecte 2014 SGR-539.