

Análisis de Toxinas Ambientales y Alteraciones Metabólicas en orina por Inyección Directa en el Sistema HPLC-GC-ECD

El sistema KONIK K2 HPLC-HRGC ha sido validado satisfactoriamente como un método directo de análisis de pesticidas en muestras biológicas a niveles de trazas.

Es ampliamente conocido que la exposición a tóxicos medioambientales es causa de indeseables peligros y riesgos en la salud humana y animal. Por ello, la monitorización biológica para determinar la naturaleza y concentración de los tóxicos medioambientales (y/o sus metabolitos) directamente en los fluidos biológicos (sangre, suero, orina) se hace indispensable y, consecuentemente, diferentes tipos de métodos analíticos son necesarios para la estimación de la exposición humana a dichos compuestos.

El uso incorrecto de los plaguicidas puede plantear problemas graves para el hombre a corto y largo plazo: neurotoxicidad, carcinogenicidad, teratogenicidad, mutagenicidad, efectos en hígado, alteraciones hormonales, alteraciones del sistema inmunológico, efectos transplacentarios, etc. La población potencialmente expuesta no comprende a sólo los trabajadores agrícolas, ya que un uso incorrecto puede traducirse en problemas de contaminación medioambiental y extenderse a aquellas personas que se expongan por vía respiratoria al sobrepasar niveles máximos permitidos en el aire, o bien, por vía digestiva por consumo de alimentos con niveles de estas sustancias superiores a los admitidos.

La determinación de residuos de pesticidas en muestras biológicas requiere la aplicación de procedimientos de "clean-up", tales como extracción Líquido-Líquido o extracción en fase sólida, con la finalidad de eliminar las interferencias y reducir los límites de detección de los compuestos de interés.

En este trabajo se propone un método para la determinación directa de Pesticidas Organoclorados en orina usando el sistema multidimensional K2 HPLC-HRGC (basado en la interfase patentada TOTAD). La combinación HPLC-HRGC prácticamente elimina la etapa de preparación de muestra, ya que la muestra se inyecta directamente en el HPLC sin otra etapa de pre-tratamiento que una simple filtración. Los pesticidas son retenidos en la columna de HPLC, mientras las sales y otras interferencias son eliminadas. A continuación los

OCPs son eluidos de la columna de HPLC y son transferidos al HRGC donde se llevará a término la separación y detección de los compuestos.

Experimental

El innovador sistema KONIK K2 HPLC-HRGC une en sinergia el potencial de separación y fraccionamiento del HPLC, tanto en fase normal como en fase reversa, con la separación y detección selectiva del HRGC.



Figura 1: Sistema KONIK K2 HPLC-HRGC

LC-GC Diagrama de Flujo

El diagrama de Flujo (Figura 2) describe los principios de operación de la interfase. Esta interfase (nº patente: US 6.402.947 B1) permite atrapar los analitos en el inyector modificado del sistema HRGC. La trampa es mantenida a la temperatura definida por el usuario mientras un flujo de Helio controlado digitalmente, elimina el disolvente de la trampa y mantiene el flujo en columna. Posteriormente, la trampa es calefaccionada para desorber los compuestos retenidos que pasan a la columna del HRGC donde tiene lugar la separación cromatográfica y posterior detección.

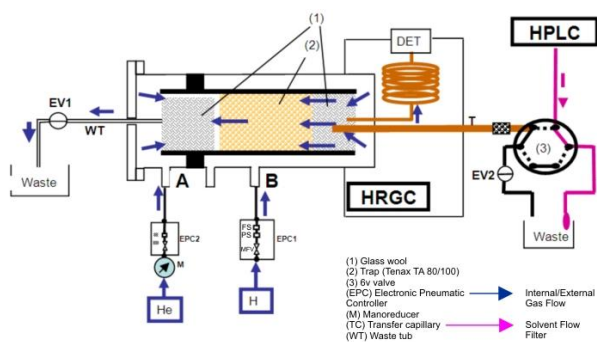


Figura 2-a: Etapa de estabilización

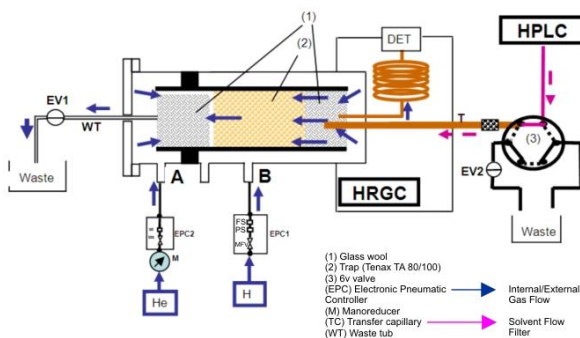


Figura 2-b: Etapa de transferencia

1- Estabilización

El Helio entra en el liner empaquetado a través del flujo externo (500 mL/min) y del flujo interno (500 mL/min) (A y B in Figura 2). El eluyente proveniente del HPLC es enviado al desecho. La temperatura del inyector K2 se mantiene a 80°C. La temperatura del horno del HRGC se mantiene a 40°C. EV1 está abierta y EV2 cerrada.

2- Transferencia

El eluyente con los analitos de interés llega al liner a 0.1 mL/min a través del capilar de transferencia (CT). El Helio empuja el disolvente hacia el desecho a través de la trampa adsorbente. Los analitos son retenidos mientras que el disolvente es eliminado por el tubo de desecho (TD en Figura 2).

3- Eliminación del disolvente residual

El disolvente proveniente del LC es enviado al desecho. El Helio empuja el disolvente residual del capilar de transferencia hacia el desecho. Estas condiciones son mantenidas durante 2 minutos para conseguir la total eliminación del disolvente. EV2 se mantiene abierta.

4- Desorción Térmica

El Helio entra únicamente a través del flujo de gas externo (A en figura 2) hacia la columna. La interfase K2 es calefaccionada durante 5 minutos, de manera que los compuestos retenidos son desorbidos y transferidos a la columna del GC. EV1 y EV2 están cerradas.

Condiciones Cromatográficas

La Tabla 1 describe los patrones, muestras y condiciones necesarias del sistema Konik K2 HPLC-HRGC. El control de los equipos, la adquisición de datos y el análisis de los mismos, han sido realizados mediante el Software Konikrom® Chromatography Data System.

Tabla 1: Condiciones Cromatográficas

Muestras: Orina adicionada con el standard de OCPs. Concentración final: 100 ng/mL (LOD 10 ng/mL).

Standard: Mezcla de Pesticidas Organoclorados (OCP) de Supelco; conteniendo 20 µM/mL de α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, heptachlor, aldrin, heptachlor epoxide, endosulfan I, p,p'-DDE, dieldrin, endrin, endosulfan II, p,p'-DDD, endrin aldehyde, endosulfan sulfate, p,p'-DDT, methoxychlor.

HPLC Condiciones

Columna: C18 Kromasil 100, 100x4.6 mm, 5 µm
Volumen de Inyección: 100 µL (LOD: 1000 µL)
Detector: UV-VIS 220 nm
Fase móvil: H₂O 100% (0-10 min a 1 mL/min); Isopropanol (10-30 min a 0.1 mL/min)

K2 Interfase Condiciones

Adsorbente: TENAX TA 80/100 mesh
Temp. De Adsorción: 80 °C
Temp. De Desorción: 275 °C
Flujo de Transferencia: 0.1 mL/min / 20 min
Flujo de Helio: 500 mL/min (A) + 500 mL/min (B)

HRGC Condiciones

Columna: KAP-5 (5% Phenyl Methyl Silicone); 30m x 0.25mm x 0.25 µm
Portador: Helium a 11.5 psi
Horno: 40°C (30.5min); 30°C/min to 180°C; 8°C/min to 210°C; 4°C/min to 270°C (10min)
Detector: ECD a 330°C; Detector Gas: N₂ a 50mL/min

MS Condiciones

Modo de Ionización: EI (+)
Energía: -70eV
Temp. de la fuente: 160°C
Temp. De la línea de transferencia: 270°C
Velocidad de barrido: 100 ms/ion (SIM)

Resultados

a. Optimización del método: Elección del eluyente de HPLC

El sistema KONIK K2 HPLC+HRGC permite el uso de todo tipo de columnas de HPLC; todo tipo de eluyentes, así como métodos de HPLC en fase normal o en fase reversa. La figura 2 muestra el incremento de sensibilidad usando las mismas condiciones para el análisis de orina adicionada con 100 ng/mL de OCPs, cambiando el disolvente de la fase móvil del HPLC: Acetona, Metanol o Isopropanol.

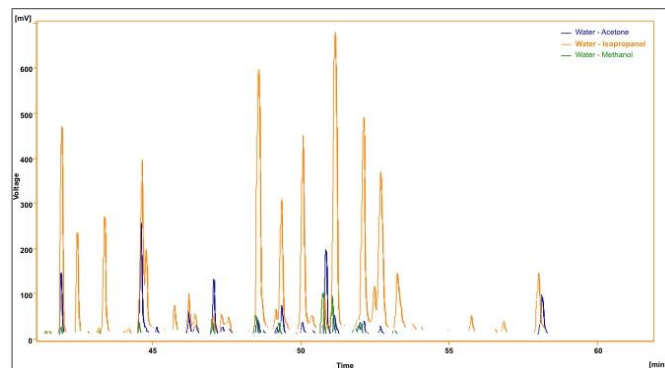


Figura 3: Elección del eluyente de HPLC: Acetona (azul), Metanol (verde) o Isopropanol (naranja).

b. Optimización del método: Elección de la fracción a transferir; optimización de las condiciones de GC/ECD

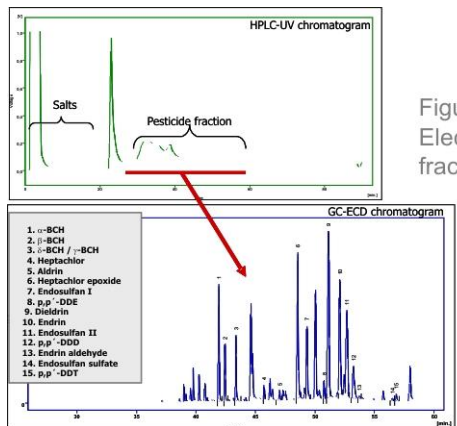


Figure 4:
Elección de la fracción a transferir

2 muestra los resultados de coeficiente de correlación obtenido y la Figura 6 muestra algunos ejemplos de las curvas de calibrado obtenidas para distintos compuestos.

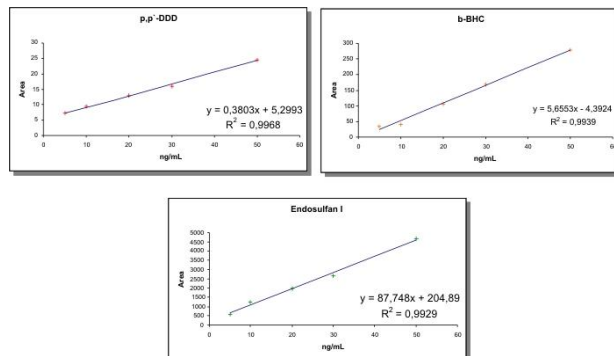


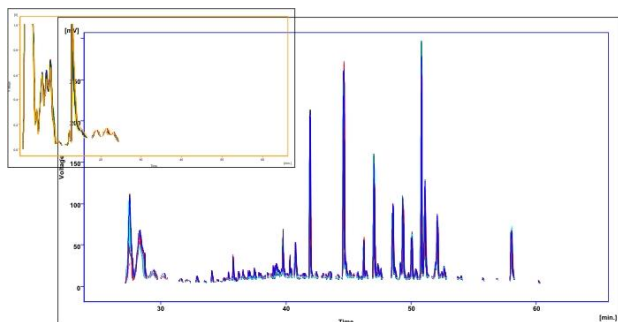
Figura 6: Linealidad - ejemplos

c. Parámetros de calidad

La Tabla 2 muestra los resultados de límite de detección (LOD), precisión y linealidad para los pesticidas seleccionados con el sistema KONIK K2 HPLC-HRGC con detector ECD.

	LOD (ng/mL) S/N=3	Precisión (n=6)		Linealidad (r²)
		RSD Rt (%)	RSD área (%)	
α-BHC	0.03	0.02	6.1	0.994
β-BHC	0.5	0.03	12.5	0.994
γ-BHC / δ-BHC	0.4	0.11	12.8	0.986
Heptachlor	0.4	0.04	5.2	0.991
Aldrin	1.0	0.03	11.2	0.999
Heptachlor epoxide	0.03	0.03	8.2	0.994
Endosulfan I	0.03	0.05	6.5	0.993
p,p'-DDE	0.09	0.03	7.0	0.995
Dieldrin	0.01	0.04	7.4	0.993
Endrin	0.02	0.02	7.8	0.990
Endosulfan II	0.24	0.04	10.8	0.991
p,p'-DDD	8.3	0.04	2.3	0.997
Endrin aldehyde	1.4	0.04	12.0	0.983
Endosulfan sulfate	15	0.02	10.1	0.989
p,p'-DDT	2.7	0.06	12.2	0.995
Methoxychlor	---	----	---	---

Figure 5: Precisión – 6 cromatogramas superpuestos



Linealidad

La linealidad ha sido establecida mediante el análisis de 5 concentraciones distintas de orina adicionada. La Tabla

CONCLUSIONES

Se ha demostrado la validez del equipo KONIK K2 HPLC-HRGC para la determinación de pesticidas en muestras biológicas por inyección directa.

El método propuesto permite la automatización del análisis de componentes orgánicos en matrices acuosas, como por ejemplo, la orina.

El método propuesto elimina el tiempo empleado en la etapa de preparación de muestras dado que no se requiere otro pretratamiento que una simple filtración.

El sistema completo HPLC+K2+HRGC es totalmente automatizado, evitando posibles errores causados en la etapa de manipulación de las muestras.

El método descrito presenta buenos resultados de precisión y una alta sensibilidad acorde con los límites de detección establecidos en la legislación.

El HPLC como método de preparación de muestras es una buena alternativa a las técnicas tradicionales, tales como extracción líquido-líquido o SPE.



Hay más información disponible acerca del equipamiento de KONIK en: www.konik-group.com ó de la aplicación en: applications.lab@konik-group.com