

## P8

### CONTAMINANTES EMERGENTES: DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS EN AGUAS SUPERFICIALES

Garrido, E.; Martín, J. (jbueno@us.es); Santos, J.L. (jlsantos@us.es); Aparicio, I. (iaparicio@us.es); Alonso, E. (ealonso@us.es)  
FQM344: Análisis Químico Industrial y Medioambiental

#### RESUMEN

Estudios recientes han mostrado la presencia de un amplio grupo de principios activos farmacológicos en el medioambiente procedentes principalmente de la descarga de estaciones depuradoras de aguas residuales. Entre ellos, son de especial interés aquellos empleados en el tratamiento de enfermedades crónicas, como los fármacos antihipertensivos, no sólo debido a su consumo continuado, sino además a su potente mecanismo de acción, lo que los hace especialmente peligrosos para el medioambiente.

En este trabajo se ha optimizado y validado una metodología analítica, basada en la extracción en fase sólida y determinación mediante cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo, para la determinación de los tres fármacos antihipertensivos más consumidos (irbesartan, telmisartan y valsartan) en aguas superficiales. Las recuperaciones obtenidas se situaron entre el 84 y el 101 %. La precisión, medida en unidades de desviación estándar relativa, fue inferior al 10 % y los límites de detección se situaron entre 0.24 y 2.01 ng/L.

**Palabras clave:** *fármacos antihipertensivos, aguas superficiales, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.*

#### ABSTRACT

Recent studies have reported the presence of a broad spectrum of pharmaceutical compounds in several environmental compartments, where they mainly end up due to discharges of effluent wastewater. Among them, pharmaceuticals designed to treat chronic diseases, including hypertensive pharmaceuticals, are of special interest, not only due to its continued consumption, but also for their potent mechanism of action, which makes them especially dangerous for the environment.

In this work, an analytical method, based on solid phase extraction and determination by liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry detector, has been optimized and validated for the determination of three of the most consumed antihypertensive pharmaceuticals (irbesartan, telmisartan and valsartan) on surface water samples. The recoveries obtained were between 84 and 101%. Precision, expressed as relative standard deviation, was < 10%, and limits of detection were between 0.24 and 2.01 ng/L.

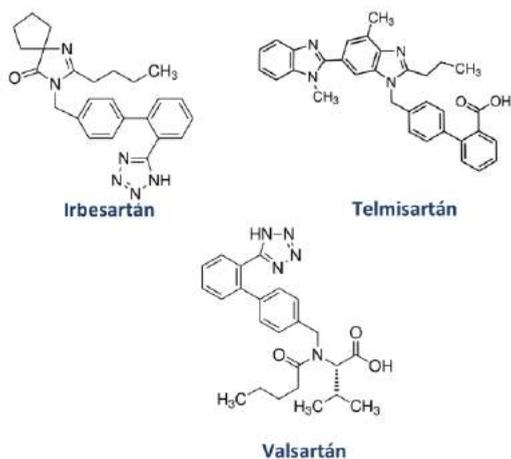
**Keywords:** *antihypertensive drugs, surface waters, liquid chromatography-mass spectrometry.*

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las actividades domésticas e industriales son a menudo la principal fuente de contaminantes en el medio acuático. Pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos o bifenilos policlorados son algunos ejemplos de los contaminantes orgánicos clásicos que se encuentran con frecuencia en los sistemas acuáticos (Oliveira et al., 2011; Pitarch et al., 2016). Sin embargo, el incremento en el uso de productos cotidianos como jabones, perfumes, desodorantes, medicamentos prescritos o materiales plásticos, entre otros, ha dado lugar a la descarga continua al medio acuático de cientos de nuevos contaminantes orgánicos.

En los últimos años ha crecido el interés por la presencia de estos contaminantes emergentes en el medioambiente, en especial en el caso de los fármacos. Estos contaminantes ha sido detectados en varias matrices ambientales como aguas residuales (Santos et al., 2009), lodos (Martín et al., 2011) o aguas superficiales (Meffe and Bustamante et al., 2014) a concentraciones que van desde unos pocos ng a cientos de microgramos por litro. Al tratarse de compuestos específicamente diseñados para generar una respuesta en organismos vivos, estas concentraciones, aunque bajas, podrían causar efectos sobre el ecosistema. Además, fármacos como los antihipertensivos, empleados en el tratamiento de enfermedades crónicas, no necesitan ser persistentes, ya que su descarga al medioambiente es continua. Fármacos como irbersartán, valsartán o telmisartán (Figura 1), presentan un potente mecanismo de acción, lo que los hace especialmente peligrosos para el ecosistema.

Recientemente se han desarrollado metodologías analíticas que permiten la determinación de varios principios activos farmacológicos de diferentes grupos terapéuticos como betabloqueantes, antibióticos, antiinflamatorios, antidepresivos y reguladores de lípidos. Sin embargo, hasta la fecha existen muy pocos métodos que permitan la determinación simultánea de fármacos antihipertensivos. De hecho, aunque recientemente se ha avanzado hacia su determinación simultánea, la mayoría de métodos que se han publicado en la literatura científica reciente se limitan a la determinación individual de alguno de estos fármacos.



**Figura 1.** Estructura química de los compuestos

En base a ello, el objetivo de este trabajo es proponer un método analítico para la determinación simultánea de los tres fármacos antihipertensivos de mayor consumo (irbesartán, valsartán, y telmisartán) en aguas superficiales. El método propuesto se basó en el tratamiento de las muestras mediante extracción en fase sólida (SPE) y la posterior determinación mediante cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo (LC-MS/MS). La aplicabilidad del método se verificó mediante en análisis de aguas superficiales de la ciudad de Sevilla.

## METODOLOGÍA

### *Tratamiento de muestras.*

Para la extracción de los contaminantes se emplearon 250 ml de muestra, previamente filtrada y acidificada a pH 2 con ácido clorhídrico, se añadió el patrón interno (fenacetina-etoxi-1-<sup>13</sup>C) y se cargaron en los cartuchos Oasis HLB (acondicionados con metanol y agua a pH 2). Una vez cargados, se realizó la etapa de clean-up percolando 3 ml de una mezcla metanol:agua (5:95 v/v). La elución de los fármacos se realizó empleando tres alícuotas de 1 mL de metanol a un flujo de 1 mL/min. Las alícuotas combinadas se evaporaron a sequedad mediante una corriente de nitrógeno y el residuo se reconstituyó en 0.3 mL de metanol:agua (50:50 v/v). El extracto obtenido se filtró a través de un filtro de nylon de 0,22 μm y 20 μL se inyectaron en el cromatógrafo.

### *Determinación mediante LC-MS/MS*

El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de líquidos de marca Agilent Technologies de la serie 1200 equipado con desgasificador, bomba binaria, muestreador automático y compartimento termostatzado para la columna.

El espectrómetro de masas empleado fue el modelo 6410 QqQ de Agilent, equipado con fuente de ionización por electrospray operando en modo positivo. El análisis mediante espectrometría de masas se realizó empleando los siguientes parámetros: voltaje del capilar 3000 V, flujo de gas 9 L/min, temperatura 350 °C y presión del nebulizador 40 psi. La monitorización se realizó en el modo *multiple reaction monitoring* (MRM). Para cada analito se seleccionaron dos transiciones: la más intensa fue empleada en la cuantificación, la menos intensa y la relación entre ambas se emplearon para la identificación (Tabla 1).

Fármaco	Ión precursor ( <i>m/z</i> )	MRM 1 (Cuantificación) ( <i>m/z</i> )	MRM 2 (Identificación) ( <i>m/z</i> )	Fragmentor (V)	Energía de colisión (V)
Irbesartán	429.2	207.1	195.2	132	24
Valsartán	436.2	291.1	207.1	84	12
Telmisartán	515.2	497.3	305.1	156	36

**Tabla 1.** Parámetros empleados en la determinación de fármacos antihipertensivos mediante espectrometría de masas de triple cuadrupolo.

La separación cromatográfica se realizó empleando una columna HALO C18 (50x4.6 mm ID; 2,7 micras) (Teknokroma, España). La elución se realizó en gradiente empleando como fase móvil acetonitrilo (con un 0,1% (v/v) de ácido fórmico) (A) y una solución acuosa de formiato de amonio 10 mM (con el 0,1% (v/v) de ácido fórmico) (B) a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min y una temperatura de columna de 30 °C. El gradiente empleado fue el siguiente: 0-2 min isocrático al 10% del disolvente A; 2-13 min, gradiente lineal de 10 a 90% del disolvente A; 13-15.5 min isocrático 90% de disolvente A y, finalmente, vuelta a las condiciones iniciales (10% de la fase orgánica) en 2 min.

### **Validación del método**

El método propuesto se validó en términos de eficacia, precisión, límites de detección y límites de cuantificación.

La eficacia del método se determinó empleando muestras dopadas (por triplicado) mediante la comparación de las áreas de pico obtenidas en las muestras dopadas, la obtenida en las mismas muestras sin dopar y en una disolución patrón a la misma concentración que la esperada en el extracto. Los límites de detección y cuantificación instrumentales se determinaron como las concentraciones a las que

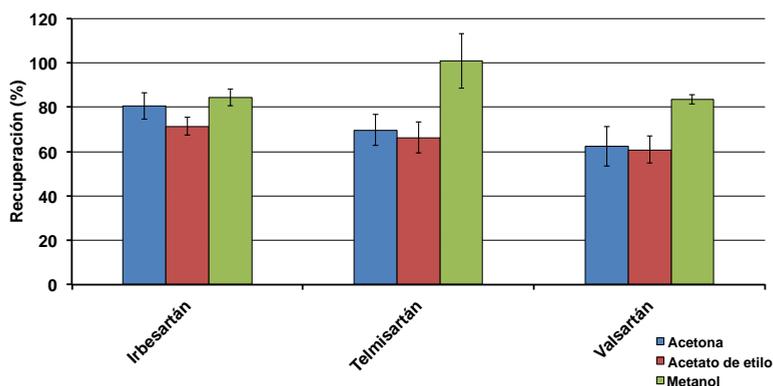
les correspondía una relación señal-ruido de 3 y 10, respectivamente. Posteriormente, se determinaron los límites de detección y cuantificación del método aplicando a los límites instrumentales la eficacia del método y el factor de concentración conseguido en el proceso de tratamiento de la muestra.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Optimización del método.*

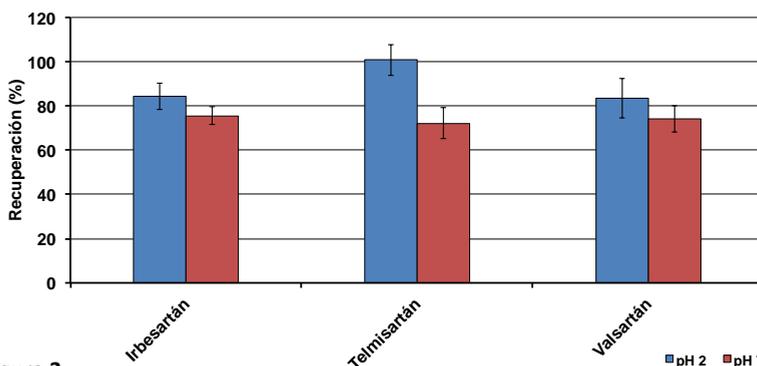
La optimización del método se realizó estudiando la influencia de aquellos parámetros de mayor importancia en el proceso de extracción (disolvente empleado en la elución y pH de la muestra). Para ello, se emplearon muestras dopadas (por triplicado) que se sometieron al proceso descrito en tratamiento de muestras empleando diferentes disolventes de elución (metanol, acetona y acetato de etilo) y diferentes valores de pH de muestra (pH 2 y 7).

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos empleado diferentes disolventes de elución. Las mayores recuperaciones se obtuvieron empleado metanol como disolvente de elución (valor medio 88 %), seguido de acetona (70 %) y acetato de etilo (65 %). De acuerdo con estos resultados se seleccionó metanol como disolvente de elución.



**Figura 2.** Influencia del disolvente de elución en la extracción de fármacos antihipertensivos.

La Figura 3 muestra la influencia del pH de la muestra en el extracción de fármacos antihipertensivos. Las mayores recuperaciones se obtuvieron acidificando la muestra a pH 2 (84% en el caso de irbesartán y valsartán y 101% en el caso del telmisartán). Las eficacias obtenidas en las muestras a pH 7 no superaron el 80 % en ninguno de los compuestos estudiados.



**Figura 3.** Influencia del pH de la muestra en la extracción de fármacos antihipertensivos.

### *Validación del método.*

El método propuesto se validó determinando eficacia, precisión (expresada como desviación estándar relativa (DER)) y límites de detección (LD) y cuantificación (LC). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Fármaco	Recuperación (%)	Precisión (%)	LD (ng/L)	LC (ng/L)
Irbesartán	84	4	2.01	4.06
Telmisartán	101	9	0.24	0.88
Valsartán	84	5	0.30	1.05

**Tabla 2.** Parámetros de validación del método propuesto.

Se obtuvieron altas eficacias para los tres principios activos (del 84 % en el caso de irbesartán y valsartán y del 101 % en el caso del telmisartán). La precisión fue inferior del 9% y los límites de cuantificación, inferiores 4.06 ng/L, adecuados de acuerdo con las concentraciones esperadas de estos fármacos en aguas superficiales.

### *Aplicación a muestras reales*

Para probar la aplicabilidad del método propuesto, se analizaron 18 muestras de aguas superficiales tomadas en la provincia de Sevilla. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. Todas las muestras analizadas presentaron alguno de los fármacos a concentraciones de hasta 3121 ng/L (media de hasta 727 ng/L).

Compuesto	Rango (ng/L)	Media (ng/L)	Frecuencia (%)
Irbesartán	<LC-167	45,0	33
Telmisartán	<LC-1531	176	18
Valsartán	<LC-3121	727	39

<LC: inferior al límite de cuantificación.

**Tabla 3.** Concentraciones y frecuencia de detección de fármacos antihipertensivos en las muestras analizadas (n=18).

## CONCLUSIONES

En este trabajo, se ha desarrollado un método analítico, basado en extracción en fase sólida y posterior determinación mediante cromatografía de líquidos con detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo para la determinación de tres fármacos antihipertensivos en aguas superficiales.

Las eficacia del método fue superior al 84 % y la precisión inferior al 9 %. Además, los límites de cuantificación fueron adecuados de acuerdo con las concentraciones a los que estos contaminantes se encuentran en las aguas superficiales.

La aplicabilidad del método fue comprobada mediante el análisis de los fármacos en aguas superficiales de la provincia de Sevilla.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto CGL2013-44402-R) la financiación recibida para la ejecución de este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2011. Monitoring of pharmaceutically active compounds on the Guadalquivir River basin (Spain): occurrence and risk assessment. *J. Environ. Monit.* 13. 2042–2049.

Meffe, R., Bustamante, I., 2014. Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy. *Sci. Total Environ.* 481. 280–295.

Oliveira, T., Santacroce, G., Coleates, R., Hale, S., Zevin, P., Belasco, B., 2011. Concentrations of polychlorinated biphenyls in water from US Lake Ontario tributaries between 2004 and 2008. *Chemosphere* 82. 1314–1320.

Pitarch, E., Cervera, M.I., Portolés, T., Ibáñez, M., Barreda, M., Renau-Pruñonosa, A., Morella, I., López, F., Albarrán, F., Hernández, F., (2016). Monitoring of organic micro-pollutants in surface and groundwater in the surrounding of a solid-waste treatment plant of Castellón, Spain. *Sci. Total Environ.* 548-549. 211-220.

Santos, J.L., Aparicio, I., Callejón, M., Alonso, E., 2009. Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *J. Hazard. Mat.* 164. 1509-1516.