

Trabajo Fin de Máster

Máster “Laboratorio Avanzado de Química”

Facultad de Ciencias Experimentales



Determinación de trihalometanos en aguas de consumo y aguas regeneradas mediante extracción por espacio de cabeza y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Determination of trihalomethanes in water for human consumption and reclaimed water by headspace and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS)

Agustín Manuel París Reche
Curso Académico 2021-2022
Convocatoria: Julio

Directora: Ana Agüera López

Codirectora: Patricia Plaza Bolaños

Determinación de trihalometanos en aguas de consumo y aguas recicladas mediante extracción por espacio-cabeza y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Memoria del Trabajo Fin de Máster en Laboratorio Avanzado de Química presentada por
Agustín Manuel París Reche

Almería, 8 de julio de 2022

Agustín Manuel París Reche

MEMORIA

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1 DESINFECCIÓN DE AGUAS	4
3.2. SUBPRODUCTOS PROCEDENTES DE LA DESINFECCIÓN DE AGUAS	4
3.2.1. Formación de trihalometanos	5
3.2.2. Impactos para la salud debidos a la presencia de trihalometanos	8
3.2.3. Presencia e impacto de trihalometanos en aguas tratadas utilizadas para cultivo	8
3.2.4. Regulación de trihalometanos en aguas de consumo y aguas regeneradas para agricultura	9
3.3. EXTRACCIÓN AUTOMÁTICA POR ESPACIO DE CABEZA ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (HS-GC-QqQ-MS)	11
3.3.1 Técnicas de extracción reportadas para la determinación de THM en aguas	11
3.3.2. Espacio de cabeza	12
3.3.3. Cromatografía de gases	15
3.3.4. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con ionización electrónica (EI)	15
4. OBJETIVOS	22
5. EXPERIMENTAL	22
5.1. MATERIALES Y REACTIVOS	22
5.2. ANÁLISIS MEDIANTE HS-GC-MS	23
5.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	28
5.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO A MUESTRAS DE AGUAS DE CONSUMO Y AGUAS RESIDUALES REALES	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
6.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO	28
6.1.1. Optimización de las condiciones cromatográficas	28
6.1.2. Optimización del método de extracción por espacio de cabeza	32
6.1.3. Caracterización del fluorobenceno (IS)	40
6.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS	44
6.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO A MUESTRAS DE AGUAS DE CONSUMO Y AGUAS RESIDUALES REALES	45

7. CONCLUSIONES	48
8. BIBLIOGRAFÍA Y NOTAS	48
9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	52

1. RESUMEN

Se ha desarrollado y validado un método para la determinación de cuatro trihalometanos (cloroformo, bromodichlorometano, dibromoclorometano y bromoformo) en matrices acuosas, principalmente aguas de consumo y agua regeneradas basado en la extracción automática por espacio de cabeza (HS, *Headspace*) combinado con posterior determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Durante la optimización se han evaluado parámetros extracción como la temperatura, el tiempo y el volumen de muestra, velocidad de agitación, penetración y temperatura de la jeringa de HS, así como parámetros cromatográficos como el gradiente del horno, la temperatura del inyector y el volumen de muestra. El método optimizado ha sido sometido a validación. El rango lineal se ha establecido ente 250-2500 $\mu\text{g/L}$ con R^2 superiores a 0,9900 en todos los casos. Se han realizado ensayos de recuperación ($n=5$) a 250 y 2500 $\mu\text{g/L}$, obteniéndose recuperaciones en el rango de 80-120% para los cuatro compuestos y con desviaciones estándar relativas (RSD) inferiores al 15% (precisión intra-día). Además, se han llevado a cabo ensayos de precisión inter-día ($n=3$), obteniéndose valores de RSD inferiores al 15%.

Palabras clave: *Trihalometanos, agua reciclada, productos formados por desinfección, cromatografía de gases, espectrometría de masas.*

2. ABSTRACT

A method has been developed and validated for the determination of four trihalomethanes (chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane and bromoform) in aqueous matrices, mainly drinking water and reclaimed water. This method was based on automated headspace extraction (HS, *Headspace*) combined with subsequent determination by gas chromatography coupled to mass spectrometry. During the optimisation, extraction parameters such as temperature, time and sample volume, stirring speed, HS syringe penetration and temperature, as well as chromatographic parameters such as oven gradient, injector temperature and sample volume have been evaluated. The optimised method has been subjected to validation. The linear range has been established as 250-2500 $\mu\text{g/L}$ with R^2 greater than 0.9900 in all cases. Recovery tests ($n=5$) have been performed at 250 and 2500 $\mu\text{g/L}$, obtaining recoveries in the range of 80-120% for all four compounds and with relative standard deviations (RSD) below 15% (intra-day precision). In addition, inter-day precision tests ($n=3$) have been carried out and RSD values of less than 15% have been obtained.

Keywords: *Trihalomethanes, reclaimed water, disinfection by products, gas chromatography, mass spectrometry.*

3. INTRODUCCIÓN

3.1 DESINFECCIÓN DE AGUAS

Debido a la situación actual de superpoblación, la demanda global de agua ha aumentado de manera considerable en la última década, lo que ha conllevado que garantizar la calidad del agua, y por tanto su contaminación, sea una preocupación a nivel mundial. En cuanto a los contaminantes del agua, estos pueden ser físicos (por ejemplo, olor, color, sabor, sólidos en suspensión, etc.), químicos (como pueden ser: nitratos, fluoruros, cloruros, metales pesados, tintes, etc.) y biológicos (diferentes patógenos como: bacterias, hongos, virus, etc.), provocando todos ellos un deterioro en la calidad del agua potable. Estos tipos de contaminantes pueden llegar al agua mediante lixiviación de materiales de residuos sólidos municipales, por escorrentía de las tierras de cultivo, a través de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, etc.¹

Los contaminantes biológicos (patógenos), han causado históricamente muchos problemas relacionados con la salud. Actualmente, sobre todo en países en desarrollo, estos problemas son debidos, en muchos casos, al vertido de aguas residuales no tratadas que contienen materia fecal y a que las enfermedades pueden transmitirse fácilmente. La materia fecal es el principal contribuyente a esta contaminación biológica, pudiendo ocasionar enfermedades mortales como fiebre tifoidea, disentería, infecciones intestinales, hepatitis A, etc., por la presencia de diversos patógenos como *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Shigella*, *Acaris lumbricoides*, entre otros. Esto ha llevado a que, para que el agua sea apta para el consumo humano, su tratamiento sea esencial y se haya mejorado a lo largo de la última década.¹

Los microorganismos patógenos presentes en el agua se eliminan mediante un proceso conocido como desinfección. Por lo tanto, la desinfección del agua es necesaria antes de su ingesta para tratar de evitar graves enfermedades a la población. La desinfección del agua para su potabilización se lleva a cabo mediante el uso de productos químicos basados en cloro, cloraminas, bromo u ozono, mediante la aplicación de radiación ultravioleta o mediante la combinación de ambas técnicas. De todos los desinfectantes, el más comúnmente usado es el cloro, debido a su alta eficiencia y a su bajo coste.¹

A modo de ejemplo, desde la introducción de la desinfección en las plantas de tratamiento de agua en los Estados Unidos, las enfermedades transmitidas por el agua, como la fiebre tifoidea y el cólera han sido prácticamente eliminadas. Según Shina y col.² el uso de cloro como desinfectante reduce patógenos como la tifoidea en un 80%, el cólera en un 90% y la amebiasis en un 50% y según US-EPA³ (*United States Environmental Protection Agency*), en Niagara Falls (EE.UU.), entre los años 1911 y 1915 el número de casos de fallecimiento por tifoidea era de 185 cada 100.000 habitantes y mediante la introducción de la filtración y desinfección del agua se consiguió disminuir esta tasa hasta prácticamente cero.

3.2. SUBPRODUCTOS PROCEDENTES DE LA DESINFECCIÓN DE AGUAS

A pesar de las indudables ventajas que nos proporcionan los tratamientos de desinfección, la aplicación de desinfectantes puede provocar efectos indeseados, ya que en algunos casos pueden reaccionar con la materia orgánica e iones inorgánicos presentes

en el agua (como pueden ser el bromuro o el yoduro), dando lugar a la formación de nuevos contaminantes, los cuales reciben el nombre de subproductos de desinfección (DBP, *disinfection-by-products*)².

Como ya se ha comentado, por motivos de un bajo coste, asequibilidad comercial y rendimiento, el cloro es el desinfectante más usado. Sin embargo, su empleo genera múltiples tipos de DBP² como pueden ser:

- **Trihalometanos (THM):** se pueden representar químicamente como CHX_3 (X = halógeno) y están considerados como los DBP más abundantes cuando se usan proceso de cloración y cloraminación para la desinfección de aguas. Los principales trihalometanos reportados son el cloroformo (CFM), bromodichlorometano (BDCM), dibromoclorometano (DBCM) y el bromoformo (BFM)¹.
- **Ácidos haloacéticos:** al igual que los THM, estos DPB se forman mediante el uso de cloración como tratamiento para la desinfección de aguas. Químicamente se forman por la sustitución de uno o más hidrógenos no ácidos del ácido acético por un halógeno, siendo cinco compuestos los más comúnmente formados: ácido monocloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido monobromoacético y ácido dibromoacético¹.
- **Haloacetanitrilos:** este grupo de subproductos son menos frecuentes que los dos anteriores, aunque hay estudios que han reportado la presencia de bromocloroacetanitrilo, dibromocloroacetanitrilo y cloroacetanitrilo en agua de piscinas¹.
- **Otros tipos de DBP menos comunes:** hay estudios que han reportado la presencia, en aguas de piscina, de compuestos como la 1,1-dicloropropanona y la 1,1,1-tricloropropanona (haloacetanas); cloronitrometanos, bromonitrometanos y bromocloronitrometanos (halonitrometanos); dibromoacetamida, dicloroacetamida y tricloroacetamida (haloacetamidas)¹.

3.2.1. Formación de trihalometanos

La materia orgánica natural (NOM, *Natural Organic Material*) es el origen de más de la mitad del carbono orgánico disuelto en la naturaleza y es una mezcla compleja de compuestos con diferente tamaño molecular y propiedades. La NOM deriva de plantas, animales, microorganismos y sus desechos y productos metabólicos. Debido a esto, está presente en todas las fuentes de agua naturales y en los sedimentos del suelo, estando presente tanto disuelta, como en partículas o formas coloidales. Las características de la NOM dependen del clima, topografía y geología del lugar. En cuanto a la NOM presente en el agua, es una mezcla heterogénea de compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos. Los compuestos hidrofóbicos representan más de la mitad del carbón orgánico disuelto (DOC, *Dissolved Organic Carbon*) y predominan en las sustancias húmicas y fúlvicas (provenientes de ácidos húmicos y fúlvicos) y de otros compuestos fenólicos o con dobles enlaces conjugados, siendo el ácido fúlvico considerado la mayor parte de los compuestos hidrofóbicos de las aguas naturales^{2,4}.

La parte hidrofóbica de la NOM disuelta en el agua es rica en compuestos aromáticos procedentes principalmente de los ácidos húmicos, estando estos a su vez formados por

material vegetal en descomposición como la lignina que es bastante resistente a la biodegradación, pero fácilmente oxidable por el cloro^{2,4}. Por otro lado, la parte hidrofílica del agua consiste en carbonos alifáticos y compuestos que contienen nitrógeno como pueden ser los glúcidos, proteínas o aminoácidos^{2,4}. La parte hidrofóbica de la NOM, es la principal responsable de la formación de DBP al reaccionar con cloro, por lo que si el agua no es tratada de la manera adecuada puede significar un serio problema para su calidad^{2,4}.

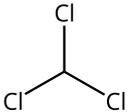
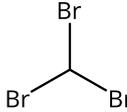
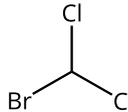
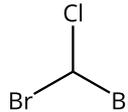
Cuando se lleva a cabo la desinfección por cloración, el cloro se administra de manera gaseosa o en forma de sales formadas por el ion hipoclorito. Ambas vías de suministro van a generar la formación de ácido hipocloroso (HClO) el cual a su vez se disociará y dará lugar a la formación del ion hipoclorito (ClO^-), si bien es el ácido hipocloroso el que presenta una mayor reactividad en cuanto a la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos. De esta manera, si en el agua tratada hay presencia de bromo o yodo, el par HClO/ ClO^- los oxidará y generará los pares HBrO/ BrO^- y HIO/ IO^- , los cuales explican la formación de los productos procedentes de la desinfección que se encuentran bromados y/o yodados².

Los pares ácidos/bases conjugados comentados anteriormente son los responsables de la oxidación de la materia orgánica del agua, que, mayoritariamente, produce THM como subproducto de esta oxidación (**Tabla 1**). Debido a la mayor abundancia de cloro que hay en el proceso, el trihalometano formado principalmente es el cloroformo o triclorometano (CFM). Si embargo, la presencia de bromo en el agua tratada produce otro tipo de THM bromados o cloro-bromados como pueden ser el bromoformo o tribromometano (BFM), bromodichlorometano (BDCM) o el dibromoclorometano (DBCM). Igualmente, si se encuentra presente el yodo en el agua bruta a tratar se pueden formar THM yodados como subproducto del tratamiento, siendo las principales especies reportadas: yodoformo, bromocloroiodometano, bromodiiodometano, clorodiiodometano, dibromoiodometano y dicloroiodometano².

Los THM yodados reciben una menor atención debido a su menor abundancia. Esto es debido a que el cloro (procedente del tratamiento de desinfección) oxida el ácido hipoyodoso (HIO) a ion yodato (IO_4^-) fácilmente, el cual ya no actúa como un reactivo oxidante para la materia orgánica presente en el agua. Este hecho reduce potencialmente la formación de THM yodados durante la desinfección de las aguas mediante procesos de cloración².

Como se observa en la **Tabla 2**, Cancho y col.⁵ han reportado los niveles producidos de THM tras el tratamiento de un agua de río en Barcelona y se ha llevado a cabo una comparativa de los niveles de THM antes y después del tratamiento por cloración. Se obtuvo como resultado un aumento sustancial de THM tras la cloración, pasando de concentraciones iniciales de 2,4 $\mu\text{g/L}$ como máximo a concentraciones de entre 58 y 91 $\mu\text{g/L}$ tras la cloración.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de los principales THM.

Estructura química				
Formula Química	CHCl ₃	CHBr ₃	CHBrCl ₂	CHBr ₂ Cl
Nomenclatura	Cloroformo Triclorometano	Bromoformo Tribromometano	Bromodichlorometano Diclorobromometano	Dibromoclorometano Clorodibromometano
N° CAS	67-66-3	75-25-2	75-27-4	124-48-1
Masa molecular (g/mol)	119,38	252,73	163,83	208,28
Punto de fusión (°C)	-63,2	8	-57	-20
Punto de ebullición (°C)	61,2	149,1	90	120
Log P a 25°C	1,94	2,44	2,04	2,21
Densidad a 20°C (g/mL)	1,48	2,89	1,98	2,38
Solubilidad en agua a 25°C (g/L)	1,6	0,76	1,4	1,1
Presión de vapor a 25°C (Torr)	200	5,17	65,3	21,0

De igual modo, Gol y col.⁶ han llevado a cabo el mismo estudio pero con la diferencia de que el agua provenía de pozos de agua subterránea, observándose del mismo modo como aumentaba las concentraciones de THM desde no detectados en el agua de pozo bruta a concentraciones de 5-106 µg/L tras el proceso de desinfección. Por último, Tokmak y col.⁷ reportaron resultados similares para un agua originaria de una reserva de agua superficial, en la que se detectaban inicialmente los THM y tras la cloración aparecieron en concentraciones de hasta 35 µg/L.

Tabla 2. Concentraciones de THM presentes en el agua bruta y tras su posterior desinfección por cloración.

Fuente del agua tratada	THM (µg/L)		Referencia
	Agua bruta	Agua clorada	
Agua río	ND-2,4	58-91	[5]
Agua de pozo	ND	5-106	[6]
Agua reserva superficial	ND	35	[7]

*No detectado (ND)

3.2.2. Impactos para la salud debidos a la presencia de trihalometanos

En 1976 se llevó a cabo un estudio en el que se reportó que el cloroformo era cancerígeno, al provocar tumores en ratones. Debido a esto surgió la necesidad de estudiar el impacto de este tipo de compuestos sobre la población humana². Años después, los subproductos clorados procedentes de los procesos de desinfección han sido asociados a diferentes tipos de cáncer, como el de recto, colon y vejiga, habiéndose reportado en 1992 hasta doce estudios epidemiológicos en los que se mostraba la relación de estos productos con el 15% de los casos de cáncer de recto y el 9% de los casos de cáncer de vejiga². En el estudio llevado a cabo por Evlampidou y col.⁸ estimaron las concentraciones de THM en aguas de consumo y su relación con el cáncer de vejiga mediante un estudio realizado en 28 países de la Unión Europea. En este trabajo se observó cómo la mayoría de los países tenían los niveles de THM por debajo de los niveles máximos permitidos por la Unión Europea, pero, aun así, es posible relacionar numerosos casos de cáncer de vejiga con la exposición a estos productos. Además de estos aspectos carcinogénicos, de Castro Medeiros y col.⁹ han llevado a cabo un estudio en el que se han evaluado una gran variedad de modelos experimentales para la comprensión de los efectos toxicológicos producidos por los THM. Este trabajo finalmente documenta de manera clara los posibles efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos que pueden afectar a la población humana.

La US-EPA clasifica al cloroformo, bromodichlorometano y bromoformo como probables promotores del cáncer, mientras que al dibromoclorometano como un posible promotor del cáncer³. Por otro lado, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) clasifica al cloroformo, bromodichlorometano y dibromoclorometano como posibles promotores de cáncer mientras que el bromoformo se indica como no clasificable por falta de evidencia sobre su carcinogenicidad¹⁰.

3.2.3. Presencia e impacto de trihalometanos en aguas tratadas utilizadas para cultivo

Diversos factores como el crecimiento demográfico, el uso abusivo, la urbanización y el cambio climático han provocado y/o empeorado la escasez de agua en muchas regiones del mundo, siendo el acceso al agua adecuada y segura un desafío que la humanidad está afrontando en la actualidad¹¹. En concreto, la agricultura representa un consumo del 70% del agua dulce extraída a nivel global, sufriendo de esta manera un mayor impacto por la escasez de este recurso¹¹. Por este motivo, surge el agua residual tratada como una fuente alternativa para el agua de riego, aplicándose cada vez más en regiones áridas y semiáridas¹¹.

Qingyang y col.¹¹ recogen en su revisión una serie de beneficios potenciales acerca de la reutilización de las aguas tratadas:

- Disminuye la presión sobre los suministros de agua dulce.
- Se reduce el coste y la energía de producción.
- Se reciclan nutrientes y ayudan a mantener la fertilidad del suelo.
- Se reducen los vertidos al medio natural de las plantas de tratamiento de aguas.

- Se reducen/evitan los impactos que supone el desarrollo de infraestructuras destinadas al suministro de agua.

No obstante, aunque el uso del agua regenerada presenta estos beneficios, tanto económicos como ambientales, también se introducen numerosos contaminantes orgánicos a nivel traza en el ecosistema cuando se usan en la agricultura ¹¹. Esto incluye a los subproductos formados por los procesos de desinfección. Como se ha comentado anteriormente, la cloración es ampliamente aplicada como tratamiento de regeneración, debido a su simplicidad y a su bajo coste, lo cual hace que los THM estén presentes en gran medida en las aguas recicladas para la agricultura. Aparte de sus propiedades toxicológicas negativas, ya comentadas anteriormente, pueden producir cambios fisiológicos en las plantas y acumularse en los tejidos comestibles de los vegetales, produciéndose de esta manera una bioacumulación en la cadena trófica de estos contaminantes ¹².

3.2.4. Regulación de trihalometanos en aguas de consumo y aguas regeneradas para agricultura

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recoge una visión global¹³ acerca de las regulaciones y normas aplicadas por 104 países para asegurar la calidad del agua de consumo. En esta revisión se incluyen como parámetro de calidad del agua a cuatro THM (cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y bromoformo) y se recoge un resumen en el que se comparan los valores paramétricos de cada país con los valores paramétricos dados por la OMS (**Tabla 3**).

Tabla 3. Resumen legislativo sobre niveles de THM regulados realizado por la OMS ¹³.

Compuesto	CFM	BDCM	DBCm	BFM
Valor de referencia de la OMS	0,3 mg/L	0,06 mg/L	0,1 mg/L	0,1 mg/L
Nº de Países que establecen un valor regulado	36	29	29	23
Nº de países que establecen valores mayores a la OMS	1	0	1	0
Nº de países que establecen las regulaciones de la OMS	6	22	23	21
Nº de países que establecen valores menores a la OMS	29	7	5	2
Valor paramétrico máximo	0,4 mg/L	0,06 mg/L	0,15 mg/L	0,1 mg/L
Valor paramétrico mínimo	0,03 mg/L	0,015 mg/L	0,01 mg/L	0,075 mg/L
Valor paramétrico medio (media robusta)	0,2 mg/L	0,06 mg/L	0,1 mg/L	0,01 mg/L

La US-EPA también tiene en cuenta a los THM como parámetros de calidad del agua y expresa el valor máximo permitido de THM como la suma de los cuatro, siendo este valor de 0,08 mg/L ¹⁴ (muy por debajo de los límites de referencia de la OMS).

La Unión Europea (UE) también pone atención en los THM cuando se trata de la calidad del agua de consumo. Al igual que la US-EPA, la UE tiene en cuenta el valor de la suma de los cuatro compuestos pero, con la diferencia de que establece como valor límite máximo permitido 0,1 mg/L ¹⁵. A su vez, como se puede observar en la **Tabla 4**, dentro de la UE hay países más restrictivos en cuanto a la concentración máxima de THM permitida en agua de consumo, como Italia y Alemania, que establecen este valor en 0,03 mg/L (valor expresado como suma de THM) ¹⁶⁻¹⁸.

Por otro lado, Shoushtarian y Negahban-Azar ¹⁹ recogen en su revisión las regulaciones y normas que se llevan a cabo para el agua tratada reusada para la agricultura. En él, incluyen como parámetro a los THM, siendo Italia el único país que los tiene en cuenta como parámetro para la calidad del agua regenerada para agricultura. Italia, al igual que para el agua de consumo, establece un valor límite de 0,03 mg/L como suma total de THM ^{16,17,20}.

Tabla 4. Resumen legislativo de control de THM en aguas.

País	Límite suma THM (µg/L)	Matriz	Referencia
España	100	Agua consumo	[21]
EPA	80	Agua consumo	[14]
Argentina	100	Agua consumo	[22]
Australia	250	Agua consumo	[23]
Canadá	100	Agua consumo	[24]
China	1000	Agua consumo	[25]
Italia	30	Agua reutilizada Agua de consumo	[16,17,20]
Alemania	30	Agua consumo	[18]
California	80	Agua consumo	[26]

3.3. EXTRACCIÓN AUTOMÁTICA POR ESPACIO DE CABEZA ACOPLADA A CROMATOGRFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (HS-GC-QqQ-MS)

3.3.1 Técnicas de extracción reportadas para la determinación de THM en aguas

En bibliografía están descritas diferentes técnicas para la extracción de THM en agua, siendo las predominantes (véase en **Tabla 5**) la extracción líquido-líquido, la extracción por purga y trampa, la extracción por espacio de cabeza y la microextracción en fase sólida (SPME, *Solid Phase Microextraction*) en modalidad espacio de cabeza.

Tabla 5. Técnicas de extracción reportadas para la determinación de THM.

Técnica de extracción	Matriz	R ²	Niveles validados (µg/L)	RSD ^a (%)	LOQ (µg/L)	REF.
HS-SPME	Agua desalada	>0,99	25 45	6-9 ^d 5,9-7,8 ^d	3,03-16,9	[27]
HS-SPME	Agua de consumo	>0,99	47	1,8-11 ^d	0,057- 0,319	[28]
LL	Agua residual	>0,98	0,6-25	NR	1	[29]
LL	Agua residual	NR	0,05-100	2,6-7,6 ^d	0,012- 0,035	[30]
PyT	Agua residual	NR	1 5	6-14 4-13	1	[31]
PyT	Agua de consumo	NR	20	2,62- 30,35	1	[32]
HS	Agua residual	>0,99	1	2,4-4,3	0,3-0,5	[33]
HS	Agua de consumo	>0,99	1	0,05-3,7	0,2-0,3	[34]

^a RSD: desviación estándar relativa; ^bNR: no reportado por el autor; ^cValores de precisión interdía; ^dValores de precisión intradía; ^e HS-SPME: microextracción en fase sólida en modalidad espacio cabeza; ^fLL: extracción líquido-líquido; ^gPyT: extracción por purga y trampa; ^hHS: extracción por espacio cabeza

Las cuatro técnicas han sido ampliamente utilizadas para el análisis de compuestos orgánicos volátiles en matrices acuosas (**Tabla 5**). En general, las cuatro técnicas consiguen unos resultados de validación adecuados para el análisis de THM en agua, pero el análisis mediante HS presenta ventajas frente a los demás. Por un lado, HS, SPME y purga y trampa presentan cierta ventaja frente a la extracción líquido-líquido, y es que además de ser extracciones libres de disolvente, son compatibles con la mayoría de la instrumentación analítica, minimizan el efecto matriz y son fáciles de automatizar (mayor reproducibilidad). Por otro lado, la técnica HS es menos compleja y más económica que la purga y trampa, y en comparación con la SPME, en modalidad espacio de cabeza, también es menos costosa económicamente debido a que la SPME emplean fibras de elevado coste que requieren de un manejo cuidadoso.

3.3.2. Espacio de cabeza

La técnica estática de espacio de cabeza (HS, *Headspace*) es una técnica de extracción no exhaustiva en la cual una muestra acuosa se somete a calentamiento de manera que se promueve la distribución de los analitos (de naturaleza volátil) hasta que se alcanza un equilibrio de partición entre la fase acuosa (la muestra) y el espacio de cabeza gaseoso situado encima de dicha fase acuosa³⁵. A continuación, se analiza una alícuota de vapor que esta termodinámicamente en equilibrio con una fase condensada, siendo el uso de una jeringa la forma más sencilla de tomar la muestra³⁵, véase en **Figura 1**.

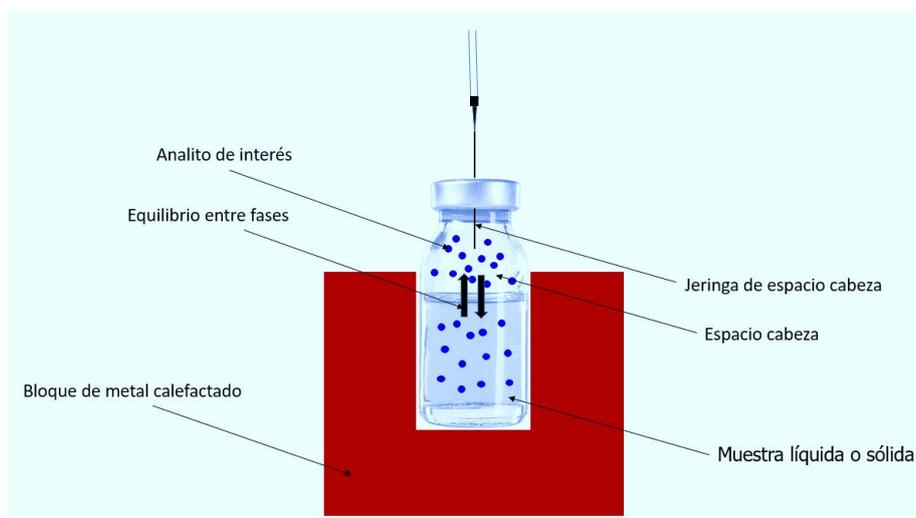


Figura 1. Representación simplificada de la técnica espacio de cabeza.

La técnica de HS ha sido ampliamente utilizada para el análisis THM en matrices acuosas (**Tabla 6**).

Como se puede observar en la **Tabla 6**, para el análisis de los THM se tienen en cuenta principalmente cuatro parámetros a la hora de su extracción mediante HS: volumen de muestra, temperatura de incubación, tiempo de extracción y temperatura de jeringa. El estudio y optimización de estos cuatro parámetros es fundamental a la hora de desarrollar un método basado en esta técnica de extracción, debido a la necesidad de lograr una máxima extracción de analito para conseguir que el método sea lo más sensible posible.

Atendiendo a la revisión recogida en la **Tabla 6**, los volúmenes de muestras utilizados han sido de 5 y 10 mL, en temperatura de incubación se han utilizado diferentes temperaturas en un rango de 30°C a 90°C, se han dejado tiempos de extracción de 15, 30 y 45 minutos y, dependiendo de la temperatura de incubación, se han usado diferentes temperaturas de la jeringa de HS, de manera que fuese siempre superior a esta.

El volumen de muestra es el menos mencionado por los autores, siendo de 5 y 10 mL empleados por dos de estos cuatro autores. Por otro lado, en cuanto a tiempo de incubación (**Tabla 6**) está en el rango de 30 a 90 min, aplicando temperaturas en un rango de 30°C a 90°C. Se observa que trabajos que emplean un menor tiempo de incubación hacen uso de una mayor temperatura de incubación. Y, por último, la temperatura de la

jeringa ha variado siempre en función de la temperatura de incubación elegida como óptima por el autor, siendo siempre superior esta.

En todos los estudios, como se puede observar en la **Tabla 6**, se establecen unos niveles de validación bajos, igual o inferiores a 1 µg/L, con rectas de calibrado con R² superiores a 0,99 y con límites de cuantificación del orden de ng/L.

Tabla 6. Resumen bibliográfico de métodos HS para la determinación de THM en aguas.

Matriz	Volumen de muestra (mL)	Temperatura de incubación (°C)	Tiempo de extracción (minutos)	Temperatura de jeringa (°C)	R ²	Niveles validados (µg/L)	RSD ^a (%)	LOQ (µg/L)	REF.
Agua reciclada	NR ^b	30	30	35	>0,99	1	2,4-4,3	0,3-0,5	[33]
Agua de piscina	10	60	15	NR	>0,99	NR	NR	NR	[36]
Agua de consumo	5	90	30	NR	0,997-0,999	1	0,7-4,3	0,002-0,008	[37]
Agua de consumo	10	60	45	NR	0,97-0,98	0,04	5,07-10,36	NR	[32]
Agua de consumo	NR	60	45	80	>0,99	1	0,05-3,7	0,2-0,3	[34]
Agua de consumo	10	70	10	NR	0,994-0,999	0,15	3,8-9,9	NR	[38]
Agua de consumo	10	85	15	NR	>0,99	0,1	2-4	0,1	[39]

^a RSD: desviación estándar relativa.; ^bNR: no reportado por el autor.; ^c Valores de precisión interdía.; ^d Valores de precisión intradía.

3.3.3. Cromatografía de gases

La cromatografía es un potente método de separación basada en la interacción de una muestra en una fase móvil que se mueve en una dirección y sentido (la cual puede ser un gas, un líquido o un líquido supercrítico) que se hace pasar a través de una fase estacionaria fija (inmiscible con la fase móvil) ⁴⁰.

En cromatografía de gases los componentes de una muestra vaporizada son repartidos entre una fase gaseosa (fase móvil) y una fase estacionaria contenida en una columna. Antes de realizar la separación cromatográfica, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de la columna, llevándose a cabo la elución mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte y mediante un programa de temperaturas que promueve una separación por las diferentes temperaturas de ebullición. Una característica de este tipo de cromatografía, en comparación otras, es que la fase móvil no interacciona con los analitos, siendo su única función el transporte de estos a través de la columna ⁴⁰.

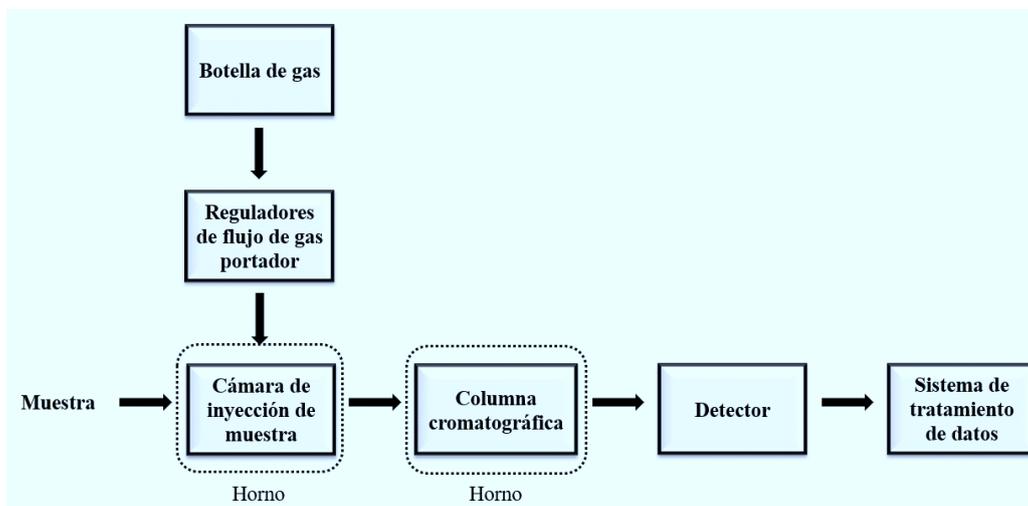


Figura 2. Diagrama de bloques de un cromatógrafo típico de gases (Figura adaptada de Skoog y col.⁴⁰).

A la hora de analizar muestras de agua y determinar THM, sus bajos pesos moleculares, sus bajos puntos de ebullición y su volatilidad hacen que la técnica de cromatografía de gases sea ideal para llevar a cabo su determinación ^{27,28,30-34,36,37,41,42} (Tabla 7).

3.3.4. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con ionización electrónica (EI)

Un espectrómetro de masas consta principalmente de tres componentes básicos: fuente de iones, analizador de masas y un detector (**Figura 3**).

En cromatografía de gases, la fuente de ionización más usada para el análisis de elementos trazas es la de ionización electrónica (EI, de las siglas en inglés *Electronic Ionization*). En ella, los iones para el análisis de masas se producen mediante ionización electrónica. En este proceso la muestra, en estado gaseoso, se somete a un haz de electrones de elevada energía.

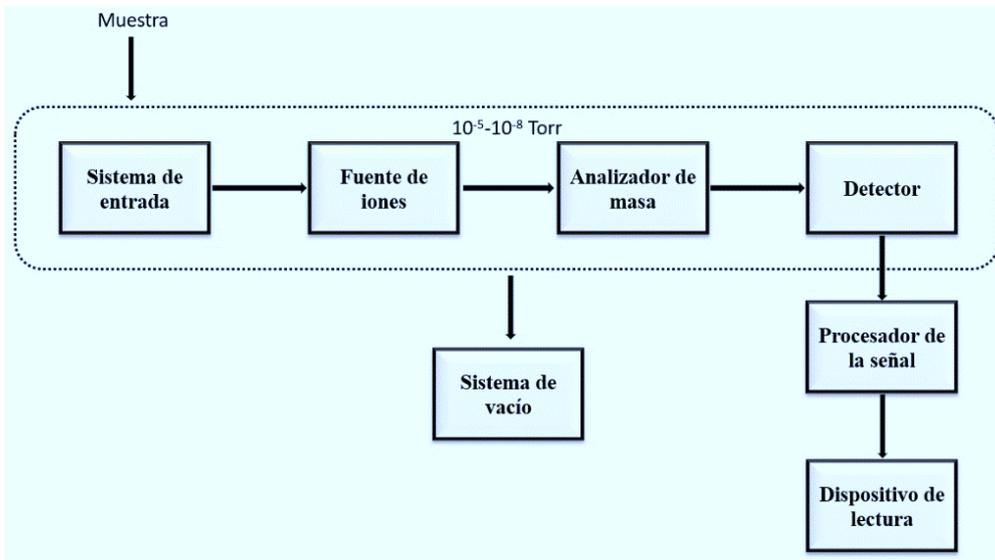


Figura 3. Representación simplificada de los componentes de un espectrómetro de masas (Figura adaptada de Skoog y col. ⁴⁰).

Como se muestra en la **Figura 4**, los electrones son producidos, generalmente, por un filamento de wolframio o renio y son acelerados mediante la aplicación de 70 eV entre el filamento y el ánodo. Además, como se puede observar en la **Figura 4**, las trayectorias entre las moléculas y los electrones son perpendiculares entre sí y se cruzan en el centro de la fuente (zona de ionización).

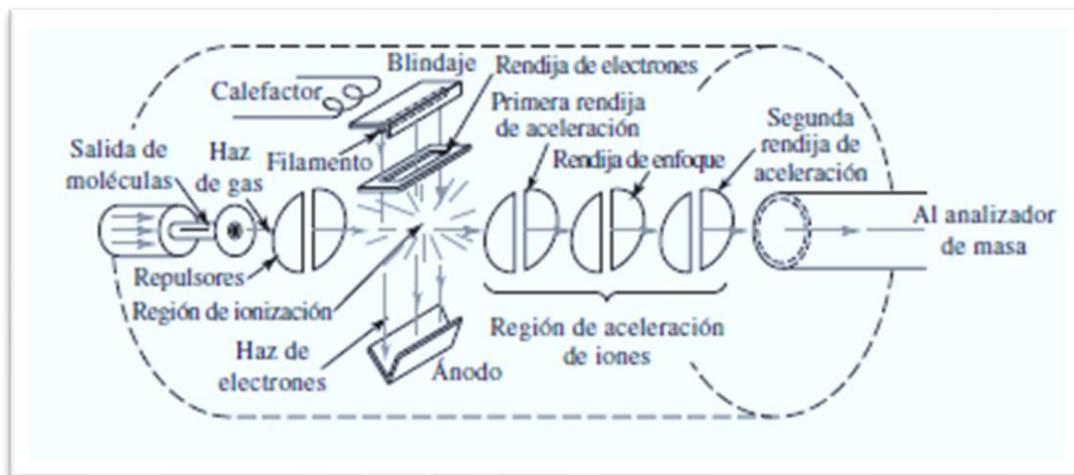


Figura 4. Fuente de iones por ionización electrónica ⁴⁰.

Principalmente, se produce como producto iones con una única carga positiva que son formados cuando el haz de electrones se acerca lo suficiente a una molécula y le hace perder un electrón por repulsión electrostática (como se representa en **Figura 5**).

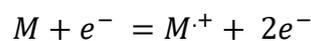


Figura 5. Mecanismo de ionización en una fuente de ionización electrónica.

Los iones producidos son atraídos a través de una rendija hacia lentes de aceleración y lentes focalizadoras mediante un diferencial de potencial para finalmente, llegar al analizador de masas que trabaja en condiciones de alto vacío (típicamente a una presión de 10^{-3} a 10^{-6} torr).

El analizador de triple cuadrupolo (QqQ) está compuesto por dos cuadrupolos (Q1 y Q3) analizadores de masas y entre ellos otro cuadrupolo que actúa como una celda de colisión (Q2). En la **Figura 6** se muestran los componentes de un analizador cuadrupolar, formado por cuatro barras paralelas de manera que a las barras situadas en posición opuesta se les aplican una corriente continua (DC) y un voltaje de radiofrecuencia (RF). En el interior del cuadrupolo, por efecto del campo eléctrico generado, los iones oscilan describiendo una trayectoria que depende de su relación m/z . De forma específica, en el cuadrupolo es posible ajustar la radiofrecuencia para estabilizar una determinada relación m/z , que es dirigida al detector, mientras que los iones con otras relaciones m/z son descartados. Así, el cuadrupolo actúa como un filtro de masas.

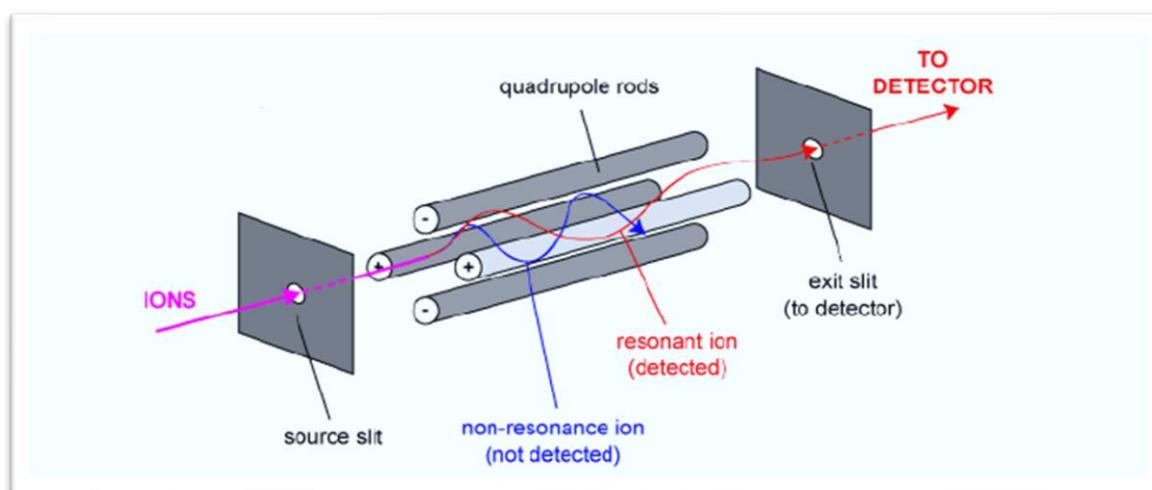


Figura 6. Esquema de un analizador cuadrupolo ⁴³.

En la **Figura 7** se muestra un esquema de un analizador de triple cuadrupolo. En el primer cuadrupolo (Q1) se selecciona el ion más intenso generado en la fuente de iones y que se denomina ion precursor, el cual es dirigido hasta la celda de colisión (Q2) donde se fragmenta y, por último, se aíslan dos o más iones producto de cada analito en el tercer cuadrupolo (Q3) para su detección.

La adquisición mediante un QqQ ofrece una gran versatilidad (**Figura 7**) pudiendo trabajar en diferentes modos de adquisición, dependiendo del modo de trabajo que se seleccione en cada uno de los dos cuadrupolos (Q1 y Q3):

1. Barrido de todos los iones (*Full scan*). Se realiza un registro completo de todos los iones procedentes de la fuente de ionización. Ambos cuadrupolos trabajan en modo registro completo.
2. Modo SIM (*Single Ion Monitoring*). Se analiza el ion precursor procedente de la fuente de ionización. Ambos cuadrupolos trabajan en modo SIM.
3. Modo SRM (*Selected Reaction Monitoring*). El ion precursor se aísla en Q1, a continuación, se fragmenta en Q2 y se registra los iones fragmento en Q3.

4. Barrido de iones producto (*Product Ion scan*). El ion precursor se aísla en Q1, a continuación, se fragmenta en Q2 y se registran los iones fragmento en Q3.
5. Barrido del ion precursor (*Precursor Ion scan*). En Q1 se separan los iones procedentes de la fuente de ionización, a continuación, se fragmentan en Q2 y se registra uno de los iones fragmento en Q3.
6. Barrido de pérdidas neutras (*Neutral Loss Scan*). Se utiliza específicamente para detectar analitos de la misma familia, Ambos cuadrupolos escanean de manera sincronizada, por lo que la diferencia de iones que pasan a través de Q1 y Q2 corresponde a un fragmento neutro.

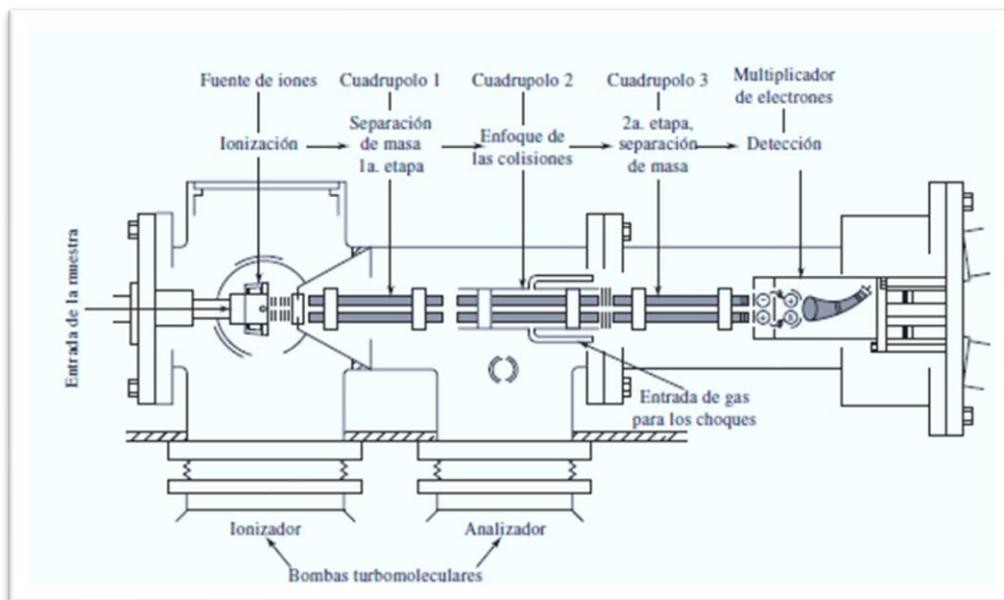


Figura 7. Esquema de un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo ⁴⁰.

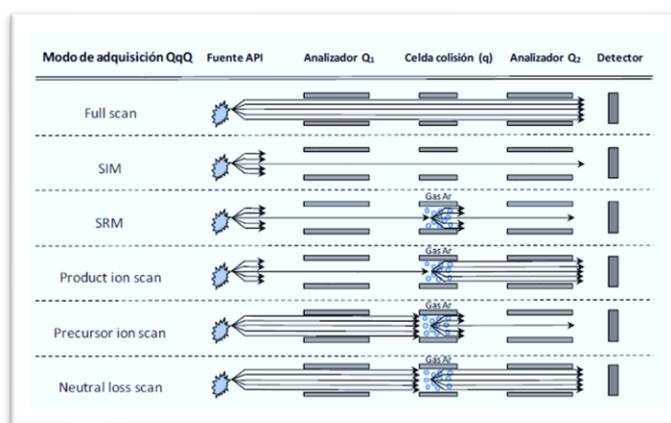


Figura 8. Esquema de los modos de adquisición permitidos en un analizador QqQ ⁴⁴.

Debido a su baja masa molecular y a la baja complejidad en cuanto a estructura molecular que presentan los THM a la hora de su determinación se utiliza la adquisición en modo SIM, ya que los fragmentos que se producen son solo los resultantes de la ruptura del enlace carbono-halógeno y además, este modo de trabajo reduce la presencia de interferentes y presenta elevadas sensibilidad y selectividad ^{28,31,32,34,36,37,41,42}. En este

modo de trabajo, se selecciona en el primer cuadrupolo (Q1) uno o varios iones precursores (generalmente los tres más intenso) pasan a través de la celda de colisión (Q2) sin sufrir ninguna fragmentación. Seguidamente, uno o varios iones, seleccionados previamente en Q1, siguen atravesando Q3 hasta llegar al detector. Generalmente se seleccionan para cada analito los tres iones más intensos, de tal manera que el ion precursor que presenta mayor relación S/R se utiliza para la cuantificación y el segundo y tercer más intenso para la identificación y confirmación.

Atendiendo a los datos de la **Tabla 7**, la temperatura de inyección no varía demasiado entre los autores, estando siempre comprendida entre valores de 200°C a 250°C. Por otro lado, el modo de inyección más usado ha sido la inyección con división de flujo (*split*), donde los autores han trabajado con *split* bajos de 1:5, 1:6 o 1:20, debido a la pérdida de sensibilidad que conlleva trabajar a *split* de mayores ratios.

En cuanto al método cromatográfico, podemos ver que la mayoría de los autores utilizan columnas especiales para analitos volátiles, con un espesor de película mayor a lo normal (1µm frente a 0,25 µm). Esto es debido a que, al tratarse de analitos volátiles, un mayor espesor de película será capaz de retenerlos mejor en la columna y de esta manera mejorar la resolución cromatográfica. Por otro lado, los programas de horno usados son similares, empezando por temperaturas bajas entre 30 y 40°C y terminando con temperaturas altas entre 200 y 250°C. La necesidad de comenzar con temperaturas bajas viene dada por el intento de condensar los analitos en la entrada a la columna cromatográfica y evitar así que difundan todos a la vez a través de la columna, consiguiendo de esta manera una correcta separación en función del punto de ebullición. Debido a la alta volatilidad de los analitos, para lograr esto, hay que poner temperaturas iniciales más bajas de lo normal, 30-40°C frente a 50-70°C de inicio de una rampa estándar.

Como analizador de masas y modo trabajo predomina el cuadrupolo sencillo en modo SIM de adquisición, eligiendo los iones correspondientes a un clúster isotópico, siendo siempre prácticamente los mismos tres iones los elegidos para la determinación de los THM. Por último, hay otros parámetros a los que los autores han dado menos importancia en sus trabajos y no han sido reportadas, como la temperatura de la línea de transferencia y la temperatura de la fuente de iones. En cuanto a la temperatura de la línea de transferencia, suele ser la misma temperatura con la que se acaba el gradiente del horno cromatográfico, mientras que la fuente de iones se tiene a una temperatura óptima indicada por el fabricante del equipo.

Por último, el *dwell time* (con un valor de 30 ms el elegido por Pérez y col.³⁷, de 100 ms tomado por Karine y col.³⁸ y entre 20 y 50 ms por Bonilla y col.³¹) solo ha sido reportado por dos de los siete autores. El *dwell time* es un parámetro importante a la hora de la adquisición del espectrómetro de masas que hace referencia al tiempo que permanece el equipo monitorizando un mismo ion. Este parámetro puede influir tanto en la forma de pico cromatográfico como en intensidad de la señal, de tal manera que un *dwell time* bajo favorece que aumenten los puntos por pico cromatográfico, mientras que un *dwell time* mayor favorece a tener una mayor sensibilidad, ya que al recolectar más cantidad de iones que llegan al detector, se gana señal.

Tabla 7. Resumen bibliográfico de métodos GC-MS para la determinación de THM en aguas.

Matriz	Temperatura del Inyector (°C)	Modo de inyección	Columna	Gradiente	Tiempo total de análisis (min)	Analizador	Modo de trabajo	Iones monitorizados (m/z)	Dwell time (ms)	Ref.
Agua regenerada	220	Split 1:5	Cyanopropylphenyl Polysiloxane (Volátiles) (30m x 0,53 mm ID x 3 µm)	35°C (hold time 3 minutos), 150C/minutos hasta 200°C (hold time 3 minutos)	39	Q	SIM	NR	NR	[34]
Agua residual	250	Split 1:30	VF-5 ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm)	50°C (hold time 2 min), 5°C/min hasta 70°C, 100°C/min hasta 250°C (hold time 5 min)	NR	QqQ	SIM	CFM (83, 85, 47) BDCM (83, 85, 47) DBCM (127, 129, 131) BFM (250, 252, 254)	20-50	[31]
Agua de piscina	250	Split 1:5	Restk-VMS (60 m x 0,25 ID x 1,4 µm)	40°C (hold time 1 min), 10°C/min hasta 200°C, 200°C (hold time 1 min)	33	Q	FULL SCAN	NR	NR	[36]
Agua de consuno	NR	NR	RTX-5ms (30 m length ø 0,25 mm, 0,25 µm)	31°C (hold time 1 min); 1°C/min hasta 40°C, 80°C/min hasta 200°C	57	Q	SIM	NR	NR	[32]

Agua	250	<i>Split</i> 1:20	DB-624 (20 m × 0,18 mm × 1 μm)	40°C (<i>hold time</i> 5 min), 8°C/min hasta 180°C, 30°C/min hasta 250°C (<i>hold time</i> 1 min)	35	Q	SIM	CFM (83) BDCM (83) DBCM (127) BFM (173)	100	[38]
Agua	250	<i>Split</i> 1:10	DB 5 MS UI (30 m × 0,25 mm × 1 μm)	40°C (<i>hold time</i> 1 min), 10°C/min hasta 250°C (<i>hold time</i> 1 min)	38	Q	SIM	CFM (83) BDCM (83) DBCM (127) BFM (173)	NR	[39]
Agua	PTV: 5°C y tras 1,7 12, 5°/s hasta 250°C	<i>Split</i> 1:50, tras 1,7 minutos modo <i>splitless</i>	DB-VRX (volátiles) (20 m x 0,18 mm x 1 μm)	45°C (<i>hold time</i> 4 min), 175°C hasta 70°C, 45°C/min hasta 240°C (<i>hold time</i> 1 minuto);	43	Q	SIM	CFM (83, 85, 47) BDCM (83, 85, 47) DBCM (127, 129, 131) BFM (171, 173, 175)	30	[37]
Agua	NR	NR	1,8 m de longitud por 2 mm de diámetro interior empaquetada con 1% de SP-1000 en Carbopack B de malla 60/80.	40°C (<i>hold time</i> 1 min), 10°C/min hasta 250°C (<i>hold time</i> 1 min)	NR	Q	SIM	CFM (83, 85) BDCM (83, 85) DBCM (127, 129) BFM (171, 173)	NR	[45]

^aNR: no reportado por el autor; ^bCFM: cloroformo; ^cBDCM: Bromodichlorometano; ^dDBCM: Dibromoclorometano; ^eBFM: Bromoformo

Lo ideal es llegar a una situación de compromiso en el que se mantenga un equilibrio entre forma de pico e intensidad del pico, ya que un *dwell time* demasiado bajo puede provocar picos mal definidos y con señal poco intensa, y un *dwell time* demasiado alto puede suponer picos cromatográficos mal dibujados por falta de puntos⁴⁶.

4. OBJETIVOS

Este trabajo pretende desarrollar un método efectivo para el análisis de THM en aguas de consumo y aguas residuales que han sido sometidas a un proceso previo de desinfección por cloración, mediante un método de HS-GC-MS. En base a esto, existen diferentes objetivos específicos que se han querido lograr con en este Trabajo Fin de Máster:

- Optimizar los parámetros de inyección y cromatográficos del método, para conseguir un método con buena resolución cromatográfica.
- Optimizar los parámetros que afectan a la extracción de los analitos mediante la técnica de HS.
- Validar el método para su aplicación en aguas de consumo y aguas residuales tratadas.
- Aplicar el método al análisis de aguas de consumo y aguas reales que han sido tratadas con procesos de desinfección que incluyen el proceso de cloración.

5. EXPERIMENTAL

5.1. MATERIALES Y REACTIVOS

Se utilizó una disolución multi-compuesto de THM (CFM, BDCM, DBCM y BMF) a 100 mg/L en metanol, así como una disolución comercial de fluorobenceno (2000 mg/L) en metanol empleado como estándar interno. Ambas disoluciones fueron adquiridas en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). A partir de estos patrones primarios en disolución se preparó una disolución intermedia (mediante dilución) de 4 mg/L de THM y una disolución intermedia de 200 mg/L de fluorobenceno, usando metanol como disolvente para ambos. Además, para la realización de los ensayos se preparó una disolución de trabajo de 0,5 mg/L de THM y una disolución de trabajo de 2 mg/L de fluorobenceno, utilizando de igual manera metanol como disolvente.

A la hora de preparar las disoluciones se han tenido en cuenta distintas precauciones como enjuagar el material con agua calidad LC/MS y secarlo en estufa a 60°C. Además, se ha asegurado que, a la hora de preparar las disoluciones, los viales y los matraces se encuentren fríos y que el metanol usado como disolvente también estuviese frío, de este modo, se intenta evitar tanto la contaminación del material como la pérdida de estos compuestos con alta volatilidad.

El agua calidad LC/MS, usada para la elaboración de los ensayos, y el metanol, empleado como disolvente orgánico, fueron adquiridos a Honeywell (Charlotte, Carolina del Norte, EE.UU.).

Además, se utilizó diferente material de laboratorio como matraces aforados, probetas, vasos de precipitado, viales magnetizados de 20 mL de HS, viales de 7, 4 y 2 mL, microjeringas de 10, 100, 1000 y 2500 mL, micropipetas y pipetas pasteur.

5.2. ANÁLISIS MEDIANTE HS-GC-MS

La preparación de las muestras fortificadas se ha llevado a cabo mediante el uso de una disolución de trabajo de 0,5 mg/L de THM y una disolución de trabajo de 1 mg/L en el caso del fluorobenceno. Para su preparación, se ha adicionado el volumen correspondiente para tener la concentración deseada, a 15 mL de agua de calidad LC/MS. En el caso de los ensayos de concentración 1 µg/L se han adicionado 30 µL de la disolución de trabajo, mediante el uso de una microjeringa, a los 15 mL de agua. Por otro lado, para la preparación de los niveles de la recta de calibrado de 0,25, 0,5, 1, y 2,5 µg/L se tomaron volúmenes de 7,5, 15, 30 y 75 µL de la disolución de trabajo. Por último, el estándar interno se añade a todas las muestras, muestras fortificadas o muestras control, adicionándose un volumen de 20 µL de la disolución de trabajo de 1 mg/L en todos los casos.

Con el uso de una probeta, se toman 15 mL de muestra de agua, muestras fortificadas o muestras control en los viales de HS, se colocan en el carro de viales del MPS y se da comienzo a la secuencia que engloba extracción y determinación. Los viales de muestra se introducen de manera automática en un agitador/calentador magnético en el cual estarán durante 15 minutos agitándose a 600 rpm (parándose 1 segundo cada 10 segundos la agitación para cambiar de sentido) y calentadas a 90°C. Transcurrido este tiempo, se toma una alícuota de 500 µL del gas presente en el espacio de cabeza de la muestra mediante una jeringa de HS (calefactada a 100°C) para posteriormente ser introducida en el cromatógrafo de gases (véase resumen de los parámetros de extracción en la **Tabla 8**).

Tabla 8. Parámetros de extracción HS.

PARÁMETROS HS	VALOR
Volumen de muestra (mL)	15
Tiempo de incubación (min)	15
Temperatura de Incubación (°C)	90
Agitación (rpm)	250
Tiempo de agitador ON (s)	10
Tiempo de agitador OFF(s)	1
Temperatura de jeringa (°C)	100
Distancia penetración jeringa (mm)	19
Tiempo flujo lavado jeringa (s)	10

Para la realización de la etapa de extracción por espacio de cabeza se utilizó un sistema automatizado MultiPurpose Sampler MPS (**Figura 9**), que incluye un brazo automuestreador, el bloque metálico donde se incuban las muestras y el inyector *split/splitless*, todo de la marca Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Alemania).



Figura 9. Partes sistema MPS Gerstel.

Una vez terminada la extracción, los analitos se introducen en el cromatógrafo, inyectándose una alícuota de 500 μL de la muestra gaseosa del vial HS. Se inyecta en modo *Split* con una ratio de 10:1.

A continuación, la separación de los analitos se llevó a cabo mediante el uso de un cromatógrafo de gases Agilent 8890 y una columna cromatográfica HP-5ms (15 m \times 0.25 mm DI \times 0.25 μm espesor de película) de Agilent (Palo Alto, CA, USA), véase en **Figura 11**. Se utilizó helio 5.6 (99.9996%, Linde Gas España, Valencia, España) como gas portador para el arrastre de los analitos a través de la columna, trabajando a un flujo constante de 1 mL/min. Para la adecuada separación de los analitos, se estableció un programa de temperatura para el horno del cromatógrafo que podemos ver en la **Figura 10**.

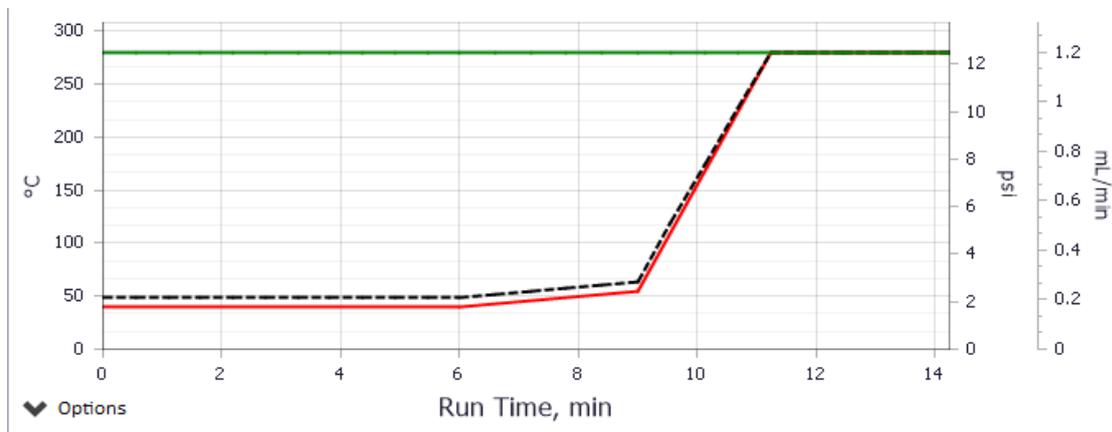


Figura 10. Rampa de temperatura del horno cromatográfico.

En la **Tabla 9** podemos ver un resumen de los parámetros de inyección y parámetros cromatográficos optimizados del método de análisis.

Tabla 9. Parámetros de inyección y cromatográficos.

Volumen de inyección (μL)	500		
Temperatura del inyector ($^{\circ}\text{C}$)	250		
Modo de inyección	Split		
Relación de <i>split</i>	10		
<i>Dwell time</i> (ms)	100		
	Velocidad ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo mantenida (min)
Horno	-	40	6
	5	55	0
	100	280	3
Flujo columna (mL/min)	1		

Como analizador se usó un detector 7010B Triple Quad GC/MS con fuente de iones EI de alta eficiencia, los dos de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Y para la adquisición de datos se usó la versión 10.1.733.0 del software de Agilent MassHunter QQQ Acquisition and Quantitative Analysis.

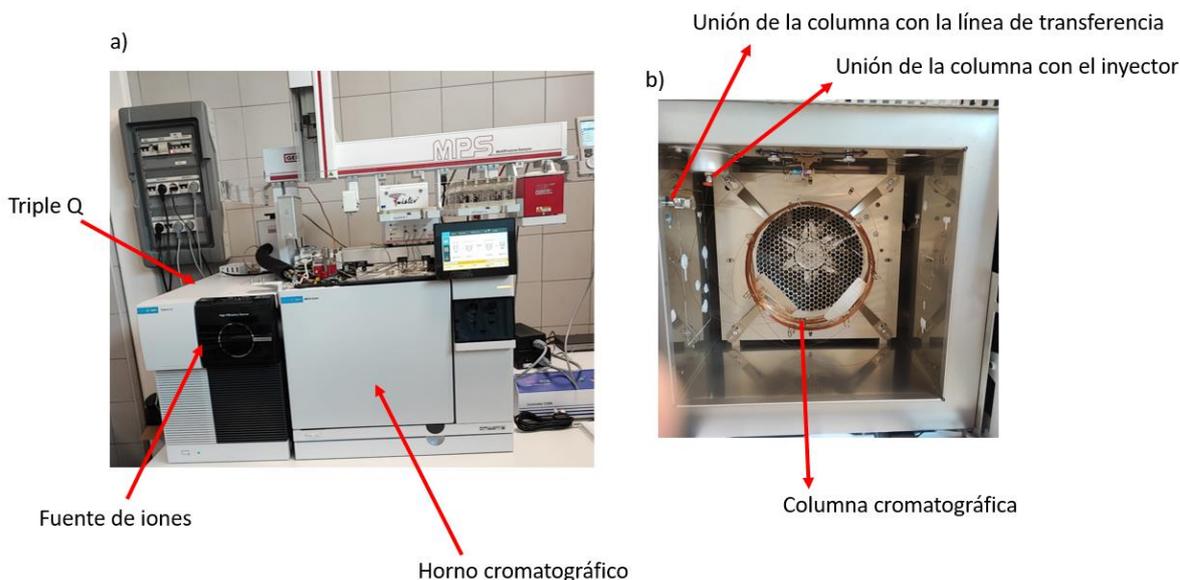


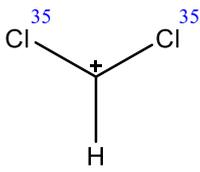
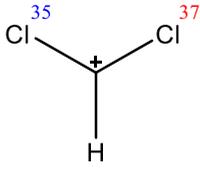
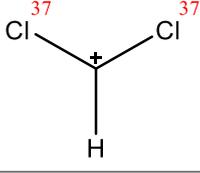
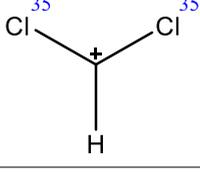
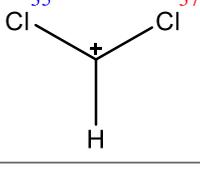
Figura 11. a) Equipo GC-MS. b) Horno del GC.

Para la ionización de los THM en la fuente EI, se estableció el voltaje estandarizado de 70 eV y la temperatura de la fuente de ionización y de la línea de transferencia de 280 $^{\circ}\text{C}$.

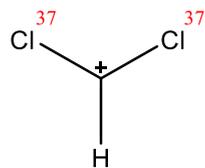
Debido a la baja complejidad molecular de los THM, que hace que los fragmentos formados sean solo los correspondientes a roturas carbono-halógeno, y a la abundante

literatura que describe estos iones formados por los THM, los iones monitorizados (Tabla 10) no han tenido que ser optimizados, por lo que se han elegido los iones vistos en bibliografía³¹, siendo los iones de m/z 83, 85 y 87 para el CFM, los iones de m/z 83, 85 y 87 para el BDCM, los iones de m/z 127, 129 y 131 para DBCM y por último, los iones de m/z 250, 252 y 254 para el BFM. Además, al trabajar en modo SIM, para cada compuesto se han registrado al menos tres iones, uno para la cuantificación y dos para la identificación y confirmación de la presencia del analito. Además, al trabajar en modo SIM, se ha llevado a cabo una monitorización de los iones por segmentos, de tal manera que en cada segmento se ha monitorizado 1 o 2 compuestos (en el caso del fluorobenceno y BDCM que eluyen a tiempos próximos), consiguiéndose de este modo más ciclos de monitorización por segundo. Esto lleva asociada consigo una mejora en la resolución del pico cromatográfico, además de la posibilidad de trabajar con un *dwell time* más alto, aumentando la sensibilidad del método.

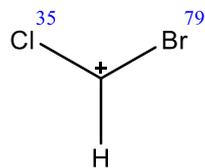
Tabla 10. Condiciones MS de los THM objeto de estudio.

Compuesto	Ion monitorizado (m/z)	Estructura	<i>Dwell time</i> (ms)	Segmento
Cloroformo	83		100	1
	85			
	87			
Bromodiclorometano	83		100	2
	85			

87



127



Dibromoclorometano

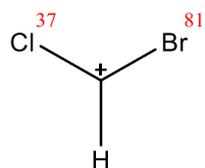
129



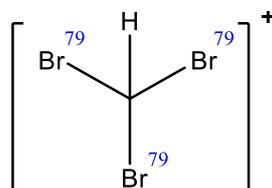
100

3

131

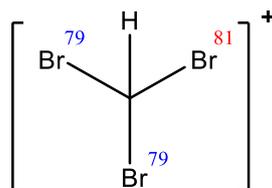


250



Bromoformo

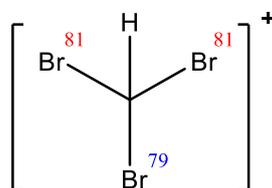
252



100

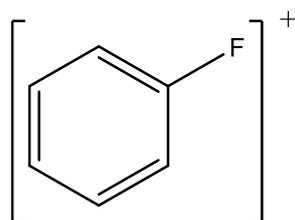
4

254



Fluorobenceno

96



100

2

5.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación de un método analítico supone el cálculo de una serie de parámetros que permiten definir el funcionamiento de este. Para la validación del presente método se estudiaron los siguientes parámetros analíticos: rango lineal, límites de detección (LOD, *Limit of detection*) y cuantificación (LOQ, *Limit of quantification*), rango de trabajo, exactitud (evaluada como veracidad) y precisión (intra-día e inter-día).

Los parámetros de validación instrumentales (rango lineal, LOQ) fueron estudiados mediante la preparación de muestras de agua calidad LC/MS fortificadas con diferentes concentraciones: 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2500 ng/L. Para el rango lineal, se consideró válido un valor de $R^2 \geq 0,9900$. Como LOQ se estableció el nivel de concentración más bajo que proporciona una recuperación y precisión aceptable

La precisión se evaluó en términos de precisión intra-día ($n=5$) e inter-día ($n=3$), de manera que se evaluaron muestras fortificadas a dos niveles diferentes de concentración: 250 y 2500 ng/L. Se consideraron como resultados aceptables aquellos valores de RSD (*Relative Standard Deviation*) inferiores al 20%.

Por otro lado, la veracidad se estudió como porcentajes de recuperación obtenidos para 5 ensayos fortificados con tres diferentes concentraciones: 250 y 2500 ng/L.

Por último, el rango de trabajo se determinó como el rango lineal de concentraciones para el que se obtuvo una exactitud y una precisión aceptable, considerando aceptables los valores de recuperación comprendidos entre el 80-120% en el caso de las recuperaciones.

5.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO A MUESTRAS DE AGUAS DE CONSUMO Y AGUAS RESIDUALES REALES

Para la validación, el método desarrollado fue aplicado para la determinación de THM en muestras de aguas residuales reales que fueron tratadas con procesos de cloración o con procesos de *foto-Fenton solar* combinados con cloración. Estas muestras fueron facilitadas por el departamento de ingeniería química del centro de investigación en energía solar (CIESOL) de la Universidad de Almería. Las muestras fueron tomadas en botes topacio de 25 mL y fueron almacenadas a 4°C hasta su análisis.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

6.1.1. Optimización de las condiciones cromatográficas

El método cromatográfico fue lo primero en ser optimizado, aplicando en todo momento unas condiciones generales de método de extracción de HS, y realizando cada ensayo con una muestra fortificada de 1 µg/L de agua LC-MS.

En primer lugar, se probaron unas condiciones iniciales basadas en el estudio llevado a cabo por Bonilla y col.³¹ que consisten en volumen de inyección de 1000 µL, temperatura de inyector de 250°C, modo de trabajo *Split* con una relación de 10:1, flujo

de columna de 1 mL/min y el siguiente programa de temperaturas de horno: 50°C (mantenido 2 min) → 70°C (5°C/min) → 250°C (100°C/min, mantenido 5 min).

Con estas condiciones se obtuvo como resultado el cromatograma que se puede observar a continuación en la **Figura 12**.

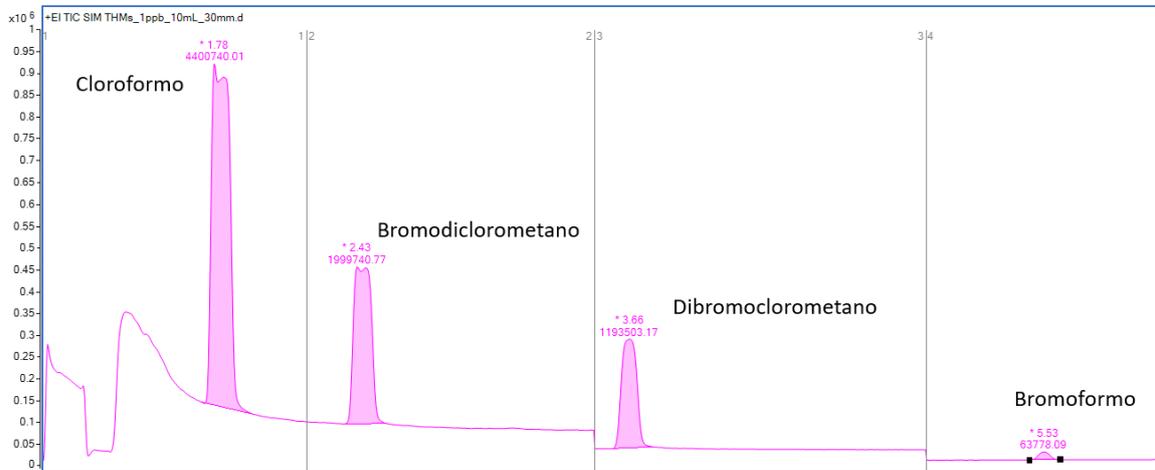


Figura 12. Cromatograma obtenido con las primeras condiciones probadas.

Con fin de intentar mejorar la resolución cromatográfica obtenida, debido a la meseta que presentan los picos cromatográficos del cloroformo y el bromodichlorometano, se modificó la relación de división de flujo de 10 a 30. La inyección de menor cantidad de muestra y, por tanto, de menos cantidad de analito reduce la saturación, mejorando el perfil de los picos. Para este ensayo, se obtuvo el cromatograma que podemos observar en la **Figura 13**.

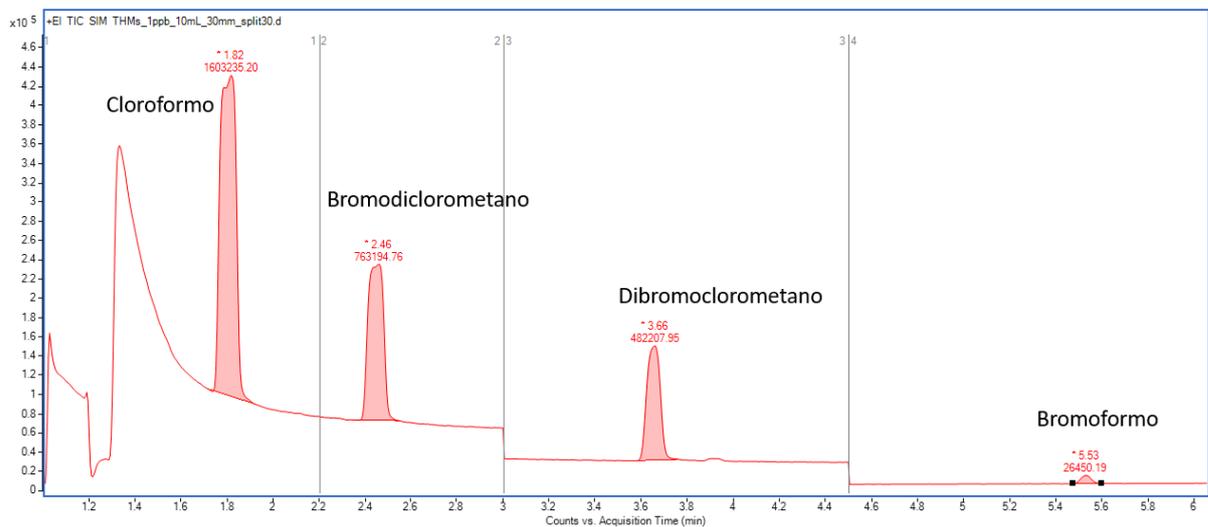


Figura 13. Cromatograma obtenido con modificación en Split a 30:1.

Al no verse una clara mejora en la resolución de los picos cromatográficos, se decidió descartar la modificación de este parámetro puesto que un mayor *split* supone una disminución de la sensibilidad del método.

A continuación, se probó un nuevo método basado en el trabajo de Cerreta y col.²⁹ que propone un cambio en el programa del horno y en la temperatura del inyector.

La temperatura probada del inyector fue de 175°C, más fría que la inicial, y el nuevo programa de horno propuesto fue: 40°C (mantenido 6 min) → 55°C (3°C/min) → 250°C (100°C/min), mantenido 5 min). El resultado se puede observar en la **Figura 14**.

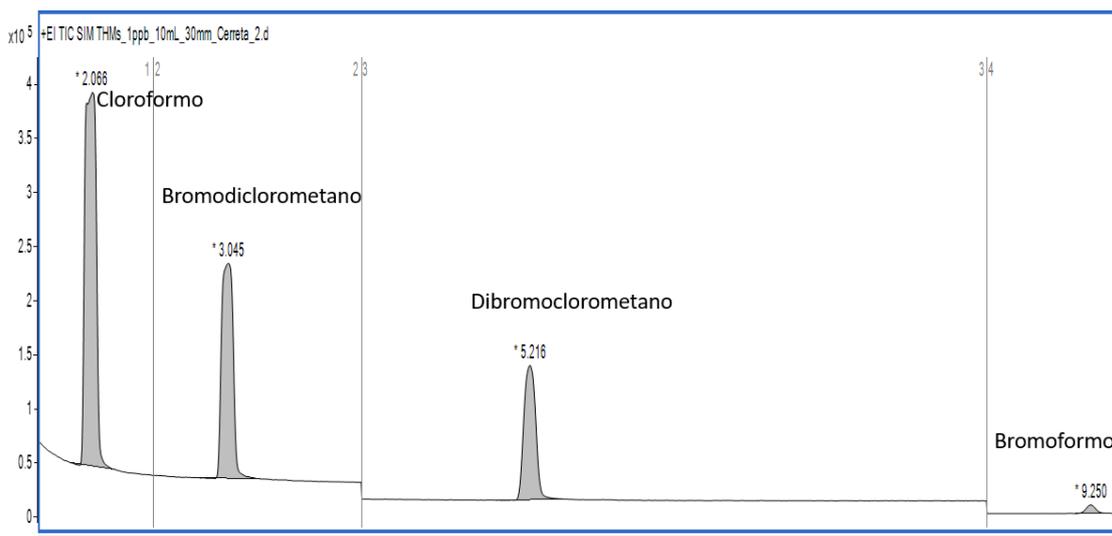


Figura 14. Cromatograma obtenido con el tercer método propuesto.

Atendiendo al cromatograma obtenido, se puede concluir que, con este método cromatográfico propuesto, la resolución de pico cromatográfico sigue sin ser la adecuada, quedando todavía mucho margen de mejora, sobre todo para el cloroformo. Por ello, se llevaron a cabo tres nuevos ensayos, y para cada uno se propuso un cambio diferente con el fin de mejorar dicha resolución:

En primer lugar, se varió el flujo de gas portador de 1 a 1,2 mL/min y el volumen de inyección de 1000 a 500 μ L para intentar obtener un estrechamiento en los picos cromatográficos, observándose (**Figura 15**) una clara mejora en la resolución de los picos.

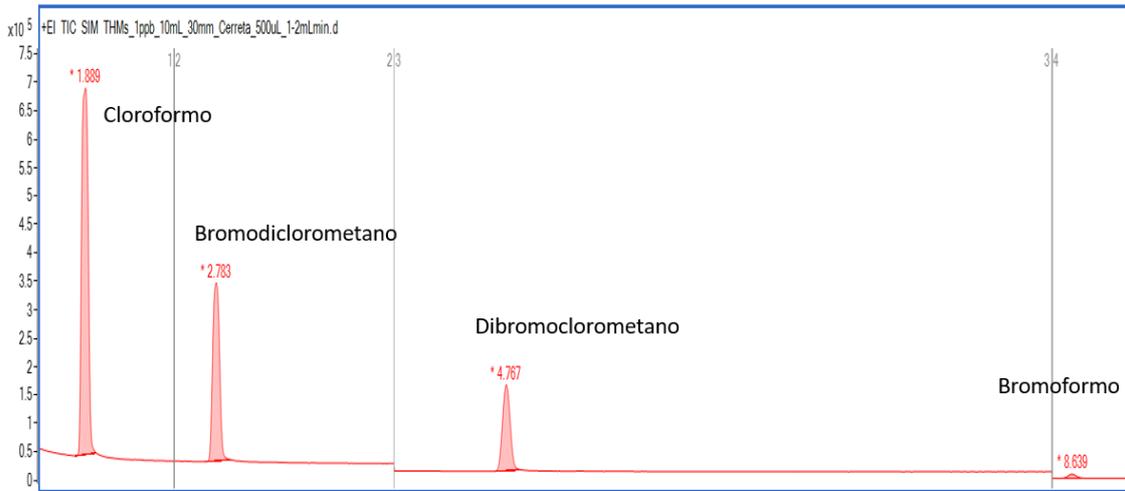


Figura 15. Cromatograma obtenido con modificación del flujo de He.

En segundo lugar, se bajó el *dwell time* desde 100 ms a 50 ms para comprobar si la resolución mejora al incrementar el número de puntos por pico cromatográfico y se modificó también el volumen de inyección a 500 μL (**Figura 16**), observándose, al igual que con el método anterior, una clara mejora en la forma de pico, aunque en este caso, la bajada del *dwell time* llevaba consigo una notable bajada de la sensibilidad, por ejemplo, el cloroformo tenía un área de $7 \cdot 10^5$ en la **Figura 15** y tras la bajada del *dwell time* pasa a un área de $2,3 \cdot 10^5$.

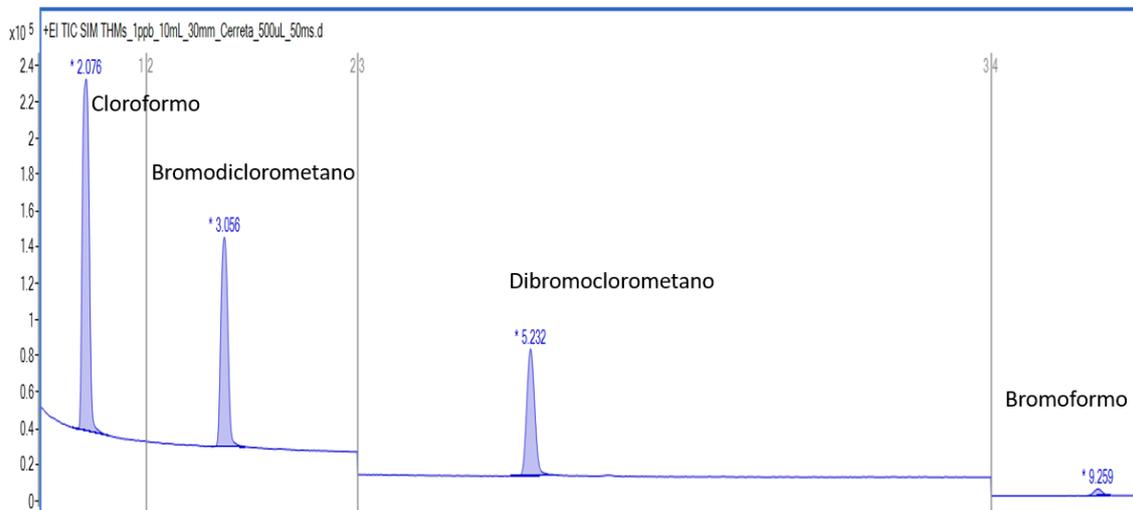


Figura 16. Cromatograma obtenido con modificación del *dwell time*.

Por último, se propuso una modificación de la temperatura del inyector (**Figura 7**), el volumen de muestra y la temperatura final del programa del horno para igualarla a la temperatura de la fuente de ionización (la cual se encuentra a 280°C).

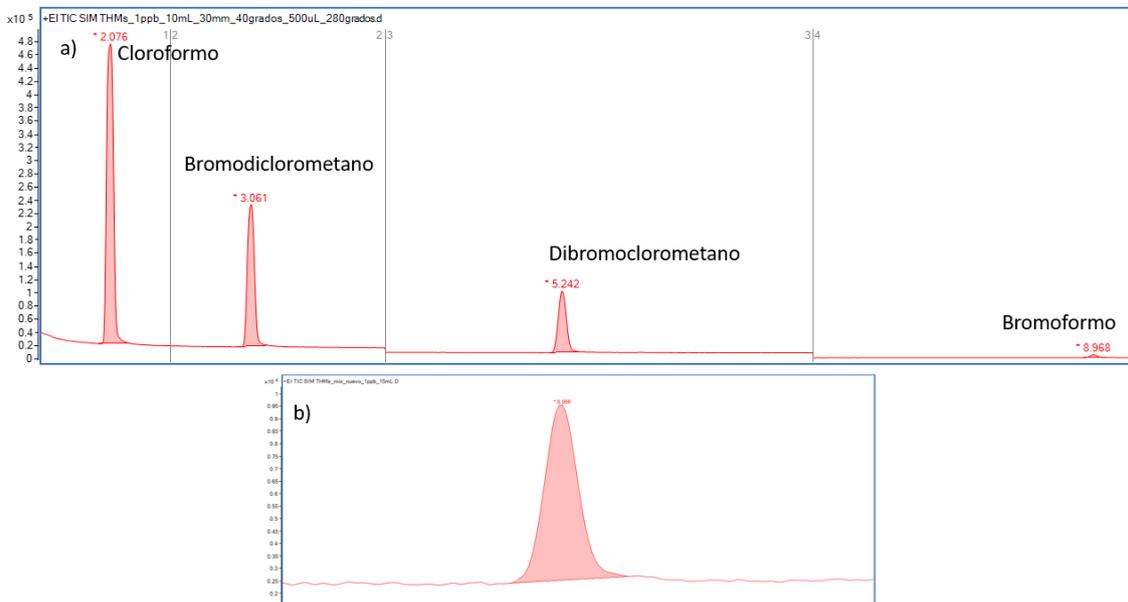


Figura 17. a) Cromatograma obtenido con el último método descrito. b) Ampliación del pico cromatográfico del bromoformo.

Este último método, propone una temperatura de inyector de 250°C, un volumen de muestra de 500 μL y dos cambios en el programa de temperaturas del horno: por un lado, se ha cambiado la rampa de temperatura que asciende de 40°C a 55°C tomando como nuevo valor 5°C/min y, por otro lado, se ha cambiado la temperatura final del programa, llegando hasta los 280°C. Si se observa la **Figura 17**, este último método mejora la resolución cromatográfica con un estrechamiento notable en los picos, sobre todo en el cloroformo.

Viendo los cromatogramas obtenidos (**Figura 15-17**) se concluyó que, pese a que las tres estrategias mejoraban la resolución de pico, se escogió como óptima la tercera estrategia correspondiente a la **Figura 17**. Esta decisión viene dada por el mayor volumen de helio que consume la primera estrategia (**Figura 15**), lo que implicaría un mayor gasto económico, y por otro lado, la pérdida de sensibilidad que conlleva bajar el *dwell time* tal y como se evaluó en la segunda estrategia (**Figura 16**).

6.1.2. Optimización del método de extracción por espacio de cabeza

Una de las etapas críticas del método de análisis es la extracción de los analitos disueltos en el agua, ya que se debe conseguir extraer la máxima cantidad de analito para su posterior análisis. En este caso, se ha elegido la técnica de extracción por HS debido a que la matriz es agua y al bajo peso molecular y bajo punto de ebullición (alta volatilidad) de los analitos diana. Además, la técnica de HS presenta la ventaja, frente a otras alternativas^{29,31}, de ser totalmente automática con mínima preparación y manejo de

muestra, incrementando los tiempos de respuesta. Con el objetivo de optimizar esta etapa crucial para el análisis, se han evaluado los siguientes parámetros:

- Volumen de muestra
- Tiempo de incubación
- Temperatura de incubación
- Velocidad de agitación
- Temperatura de incubación
- Temperatura de la jeringa
- Distancia de penetración de la jeringa.

En todos los casos, para la optimización de los diferentes parámetros se ha preparado un ensayo de THM a una concentración de 1 µg/L.

1. Volumen de muestra

Para la optimización del volumen de muestra sometida al proceso de extracción (teniendo en cuenta que los viales de HS son de 20 mL), se evaluaron los volúmenes de 10 mL y 15 mL, esto es porque con menores volúmenes podría disminuir demasiado la sensibilidad y con volúmenes mayores apenas quedaría espacio de cabeza en el vial.

En la **Figura 18** se muestra la respuesta del equipo dada para cada analito en función del volumen de muestra, siendo el valor de 15 mL el que proporcionó una mayor señal para los cuatro THM. Este resultado es esperable debido a que al tener mayor cantidad de muestra es lógico que haya más cantidad de analito a analizar y por lo tanto, que en el espacio de cabeza sea mayor la presencia de THM y se obtenga así una mayor sensibilidad.

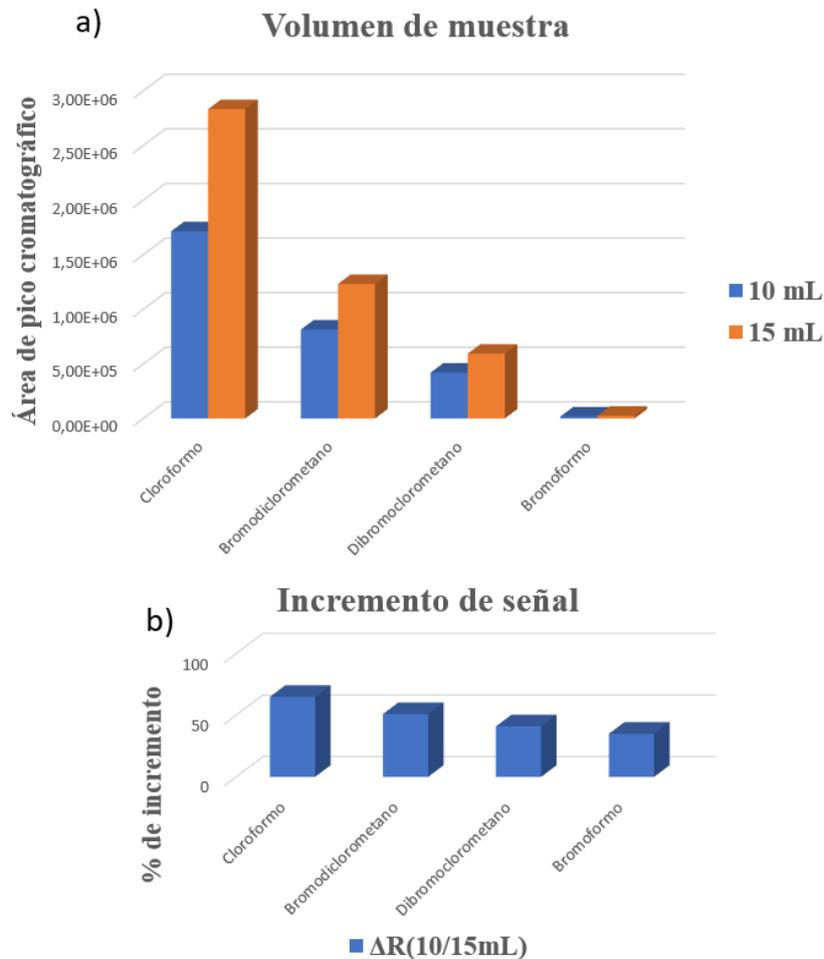


Figura 18. a) Área del pico cromatográfico obtenida para cada THM en función del volumen de muestra. b) incremento de señal entre 10 y 15 mL de muestra.

2. Tiempo de incubación de muestra

Otro parámetro importante en la extracción por HS es el tiempo de incubación de la muestra o tiempo de extracción, entendiéndose como incubación el periodo en el que la muestra se encuentra en calentamiento y agitación. Este parámetro es fundamental para conseguir que haya la mayor cantidad posible de analito en el espacio de cabeza, ya que un tiempo insuficiente puede llevar a que apenas haya analito en la fase gaseosa disminuyendo la sensibilidad considerablemente. Por el contrario, un tiempo demasiado largo puede llevar a la pérdida de analito por difusión, así como al incremento del tiempo total de análisis. Por este motivo, se estudiaron cinco tiempos diferentes: 5, 10, 15, 20 y 25 minutos. Se puede observar (**Figura 19**) como el tiempo óptimo de extracción ha sido de 15 minutos, observándose que entre 5 y 10 minutos apenas había variabilidad y que, a partir de los 15 minutos de extracción, la señal comenzaba a caer.

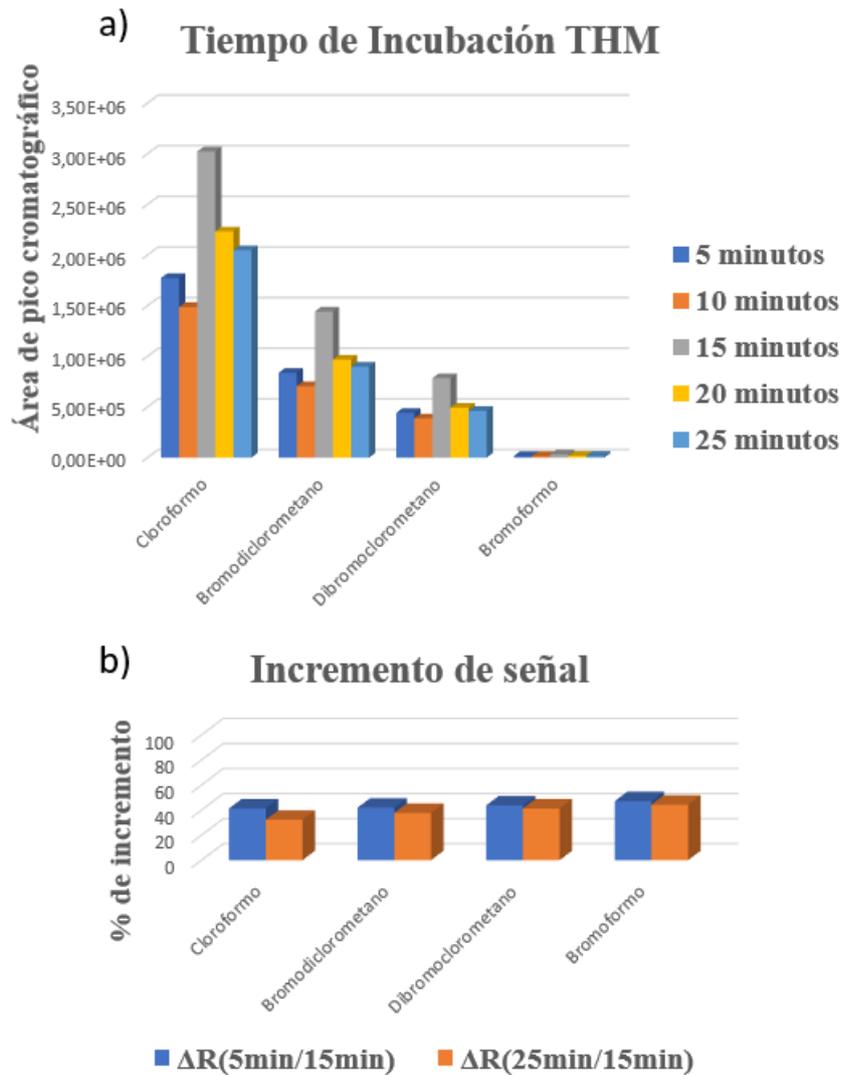


Figura 19. a) Área del pico cromatográfico obtenida para cada THM en función del tiempo de incubación de la muestra. b) incremento de señal entre 5-15 y 25-15 minutos de incubación.

3. Temperatura de incubación de la muestra

Uno de los parámetros críticos para la extracción de los analitos es la temperatura de incubación, ya que se debe conseguir el paso de la mayor cantidad de analitos al espacio gaseoso. Por ello, se investigaron tres temperaturas de extracción diferentes: 70, 80 y 90°C, obteniéndose que cuanto mayor era la temperatura, mayor era la señal debido al aumento de la proporción de analitos que conseguían pasar al espacio cabeza del vial (**Figura 20**). Este resultado era esperable como se ha comentado anteriormente. Por este motivo, el valor de temperatura de incubación elegido como óptimo fue de 90°C.

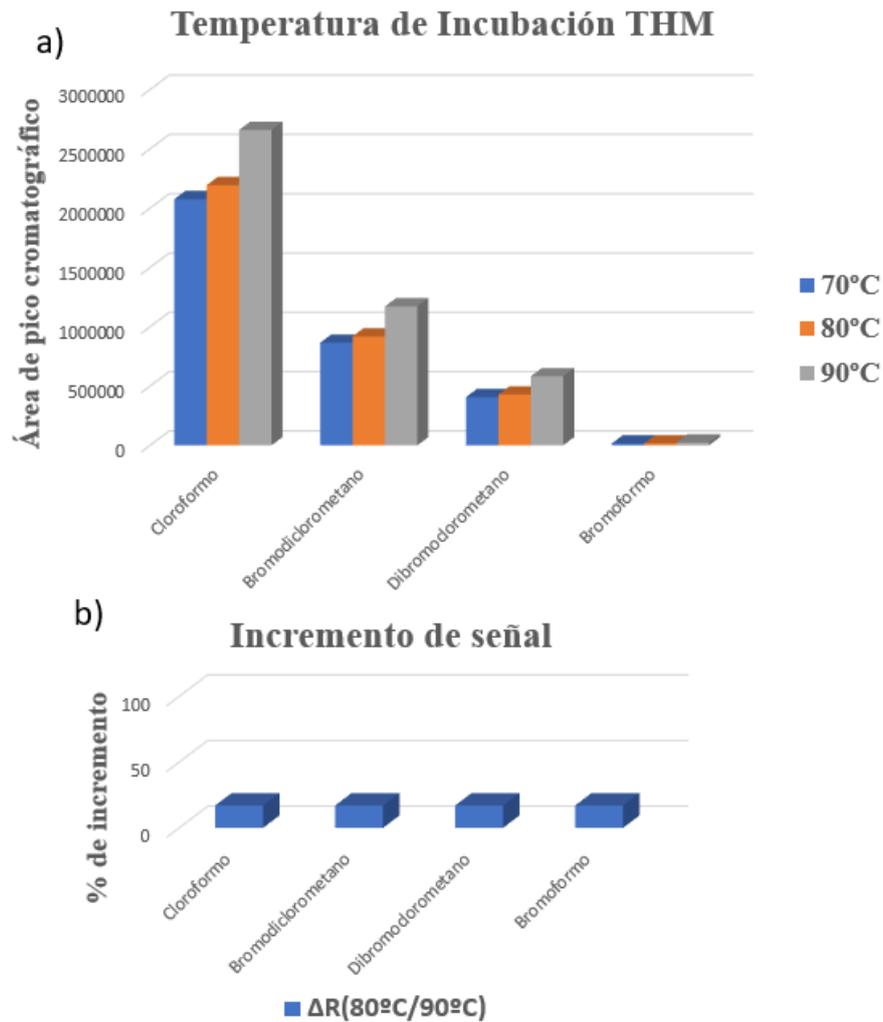


Figura 20. a) Área del pico cromatográfico obtenida para cada THM en función de la temperatura de incubación de la muestra. b) incremento de señal entre 80-90°C en incubación.

4. Velocidad de agitación de la muestra

Una vez optimizados la temperatura y el tiempo de optimización, se evaluó la velocidad de agitación a la que la muestra es sometida, ya que es un parámetro que ayuda a la transferencia de los analitos al espacio gaseoso, sin ser tan crítico como los anteriores. Se evaluaron tres velocidades diferentes: 500, 600 y 700 rpm.

Atendiendo a los resultados obtenidos (**Figura 21**), el valor óptimo de velocidad de agitación fue de 600 rpm, observándose un máximo de intensidad ya que a 700 rpm la señal, en vez de seguir aumentando, se reducía. Esta pérdida de señal al aumentar a 700 rpm, puede ser causa de pérdida de analito por difusión.

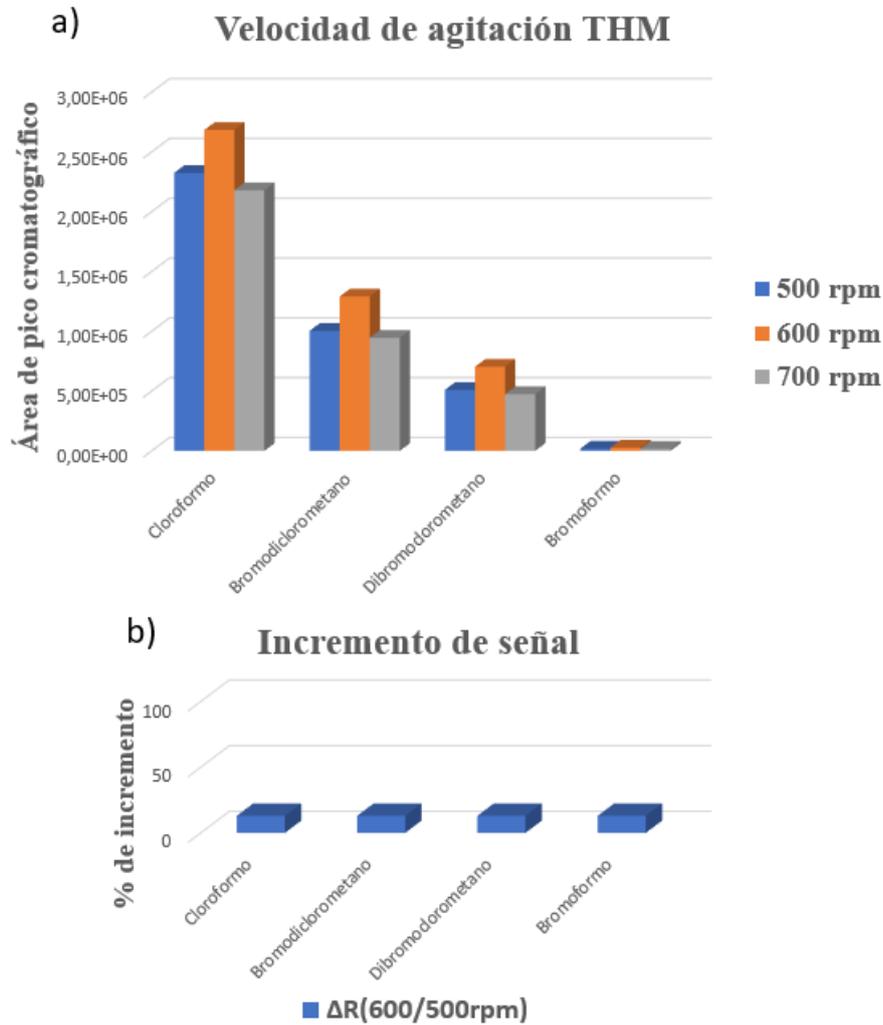


Figura 21. a) Área del pico cromatográfico obtenida para cada THM en función de la velocidad de agitación de la muestra. b) incremento de señal entre 600-500 rpm en incubación.

5. Temperatura de la jeringa de HS

Una vez ha terminada la etapa de incubación, la jeringa de HS procede a coger una alícuota de muestra del espacio gaseoso del vial, siendo la temperatura de la jeringa otro factor que influye a la hora del análisis de compuestos volátiles, como lo son los THM. Esto es debido a que si la jeringa no está a la temperatura adecuada se pueden perder analitos por condensación (si la temperatura de la jeringa es demasiado baja) o por difusión (en el caso de que la temperatura de la jeringa sea demasiado alta). Para la optimización de este parámetro se tuvo en cuenta la temperatura de incubación, previamente optimizada a 90°C, y se evaluaron 3 temperaturas diferentes: 90°C, 95°C y 100°C, siendo el valor óptimo para la temperatura de la jeringa el de 100°C (**Figura 22**).

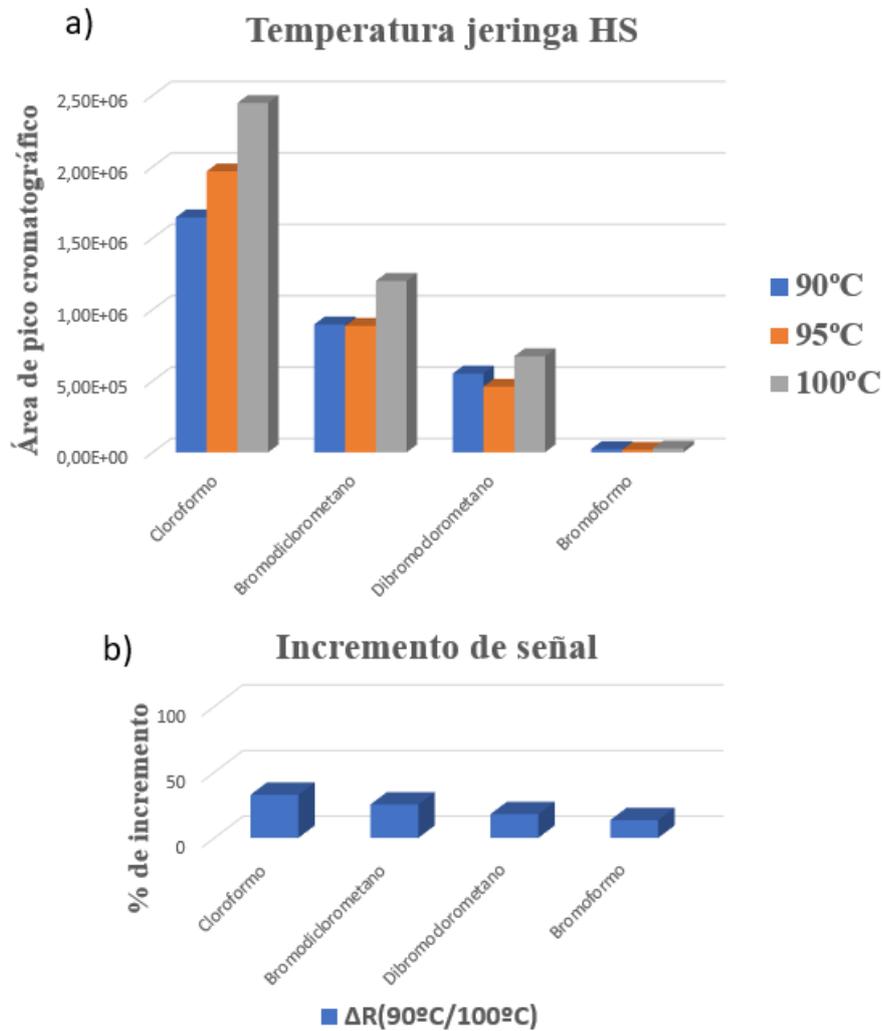


Figura 22. a) Área del pico cromatográfico obtenida para cada THM en función de la temperatura de la jeringa de HS. b) incremento de señal entre 90 y 100°C.

6. Distancia de penetración de la jeringa de HS

En último lugar, se estudió la distancia de penetración de la jeringa en el espacio gaseoso del vial. Hay que tener en cuenta que este factor puede ser importante ya que el reparto de los analitos en este espacio gaseoso no tiene por qué ser homogéneo en su totalidad y puede influir en la sensibilidad la zona en la que se tome la alícuota de muestra. Por este motivo, han sido estudiados dos distancias diferentes de penetración de jeringa: 19 y 15 mm. A 19 mm la aguja de la jeringa toma la alícuota de aproximadamente el centro del espacio gaseoso y a 15 mm la aguja toma la alícuota del cuello del vial, véase en **Figura 23**.



Figura 23. Vial HS con las medidas de penetración de la jeringa.

Se obtuvo (como se puede observar en la **Figura 24**) 19 mm como valor óptimo.

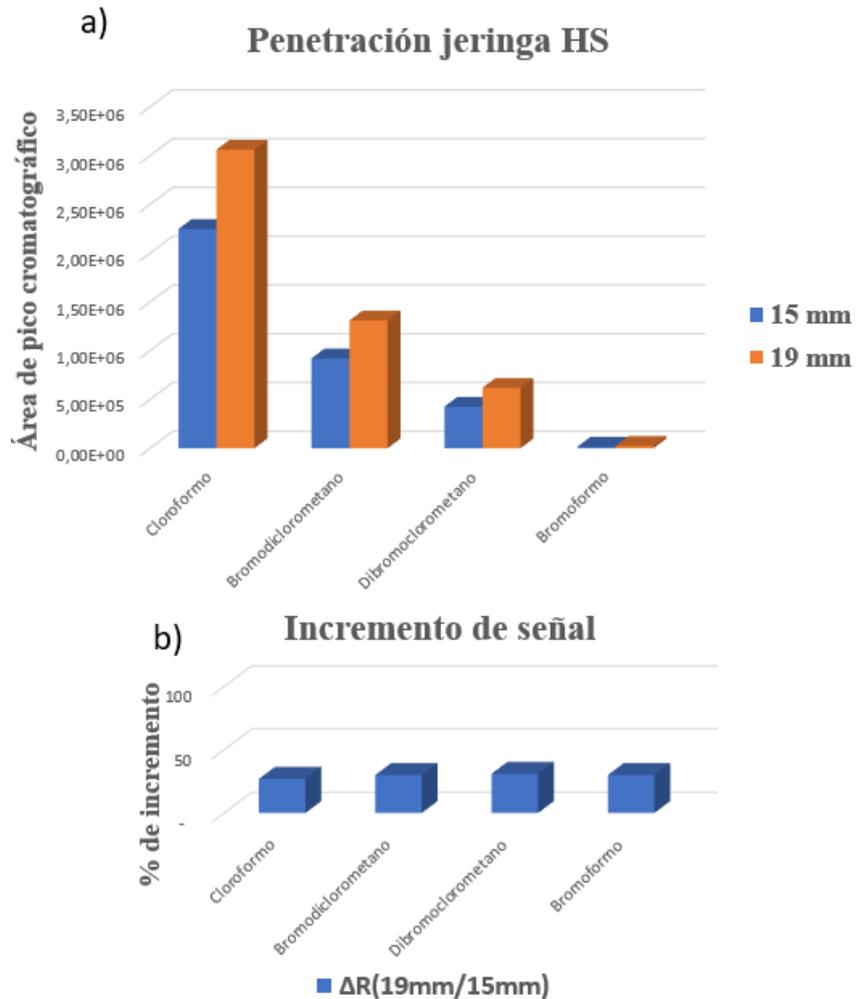


Figura 24. a) Área del pico cromatográfico obtenida para cada THM en función de la penetración de la jeringa de HS. b) incremento de señal entre 15 y 19 mm.

Tras la optimización de los seis parámetros se observó una clara mejora en la respuesta de los analitos, entre el 39 y el 50% (véase **Tabla 11**).

Tabla 11. Comparación respuesta de los THM en las condiciones iniciales y condiciones finales.

Compuesto	Condiciones iniciales	Condiciones finales	% Mejora
Cloroformo	$1.52 \cdot 10^6$	$3.06 \cdot 10^6$	50%
Bromodichlorometano	$7.29 \cdot 10^5$	$1.31 \cdot 10^6$	44%
Dibromoclorometano	$3.66 \cdot 10^5$	$6.20 \cdot 10^5$	41%
Bromoformo	$1.52 \cdot 10^4$	$2.48 \cdot 10^4$	39%

6.1.3. Caracterización del fluorobenceno (IS)

El fluorobenceno ha sido el estándar interno elegido y usado en los métodos EPA 501.2⁴⁷ y 501.3⁴⁸ por:

- No encontrarse en el agua de manera natural.
- Es estable en disoluciones acuosas.
- No se produce a escala industrial, pero si es posible obtenerlo como reactivo en el laboratorio.
- No coeluye con ningún THM, como se puede observar en la **Figura 28**.
- Puede controlarse con tan solo el ion m/z 96

Además de por estas razones, el fluorobenceno se eligió estándar interno debido a su similitud con los THM en cuanto a su baja complejidad molecular y su bajo punto de ebullición (volatilidad similar a THM), véase la **Tabla 12**. Todo esto ha llevado a la elección del fluorobenceno como estándar interno que nos permitirá utilizar la técnica de cuantificación con patrón interno en el presente método.

Una vez elegido el estándar interno que se usa en el método, se realizó su caracterización para incluirlo en el método de adquisición. Sabiendo que el ion más abundante del espectro de masas del fluorobenceno es el m/z 96^{47,48}, se preparó un patrón de IS en agua calidad LC/MS a 1 $\mu\text{g/L}$. Se analizó con el modo de adquisición *full scan* y se obtuvo el cromatograma de iones totales (TIC, *Total Ion Chromatogram*) que podemos ver en la **Figura 25**.

En dicha figura se observa un pequeño pico cromatográfico (señalado con una flecha en la **Figura 25a**) que podría asociarse con el flurobenceno. Cuando se realiza un cromatograma de ion extraído (EIC, *Extraction Ion Chromatogram*) con m/z 96 (**Figura 25b**), se observa cómo aparece un pico al mismo tiempo de retención que el anterior visto en el TIC y además, aparece en tiempo de retención similar al cloroformo y bromodichlorometano (más parecidos al fluorobenceno por su masa molecular y punto de ebullición).

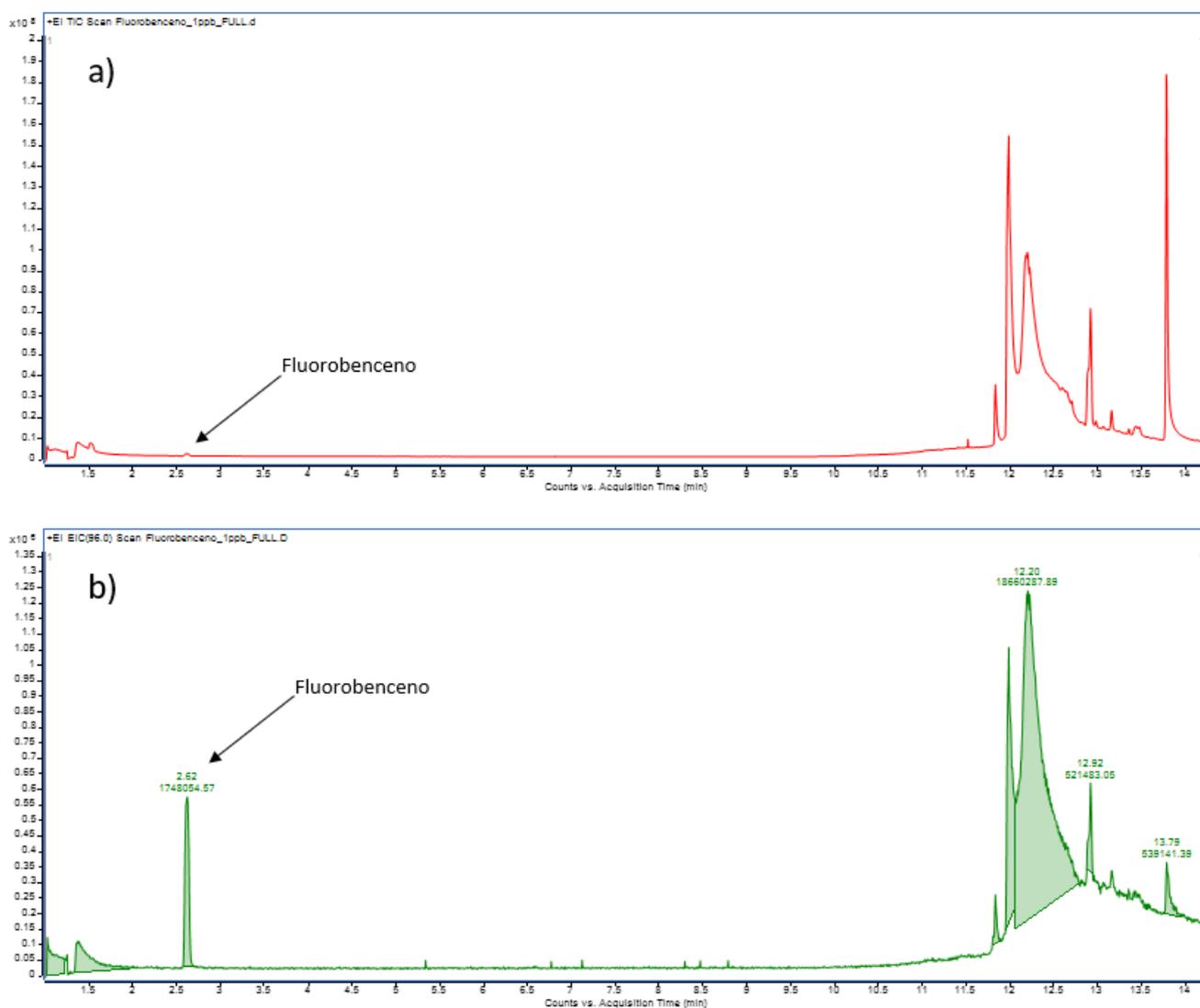
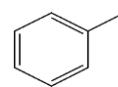


Figura 25. a) TIC de la adquisición en full-scan para la caracterización del fluorobenceno. b) EIC de m/z 96.

Tabla 12. Propiedades físicas y químicas del fluorobenceno.

Propiedades Físicas y Químicas	
Formula Química	<chem>C6H5F</chem>
Nomenclatura	Fluorobenceno Fluoruro de bencilo
N° CAS	462-06-6
Masa molecular	96,10 g/mol
Punto de fusión	-42,2 °C
Punto de ebullición	84,7 °C
Log P a 25°C	2,304
Densidad a 20°C	1,023 g/mL
Solubilidad en agua a 25°C	0,35 g/L
Presión de vapor a 25°C	79,9 Torr



Para la confirmación de la asignación del fluorobenceno al pico que aparece en el EIC con m/z 96 entorno a los 2,6 minutos, se extrajo el espectro de masas completo en ese punto del cromatograma y se realizó una búsqueda en la librería NIST (**Figura 26**).

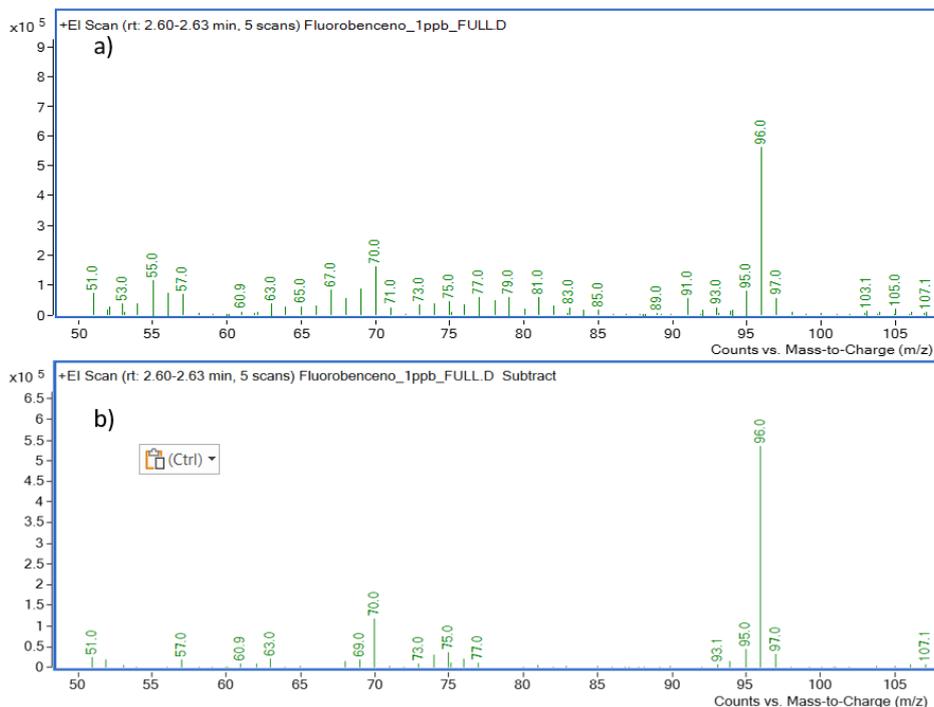


Figura 26. a) Espectro de masas experimental obtenido para el fluorobenceno. b) Espectro de masas experimental obtenido para el fluorobenceno con la sustracción del *background*.

El espectro de masas que se puede observar en la **Figura 26b** fue el usado para contrastar con la librería NIST, que apuntaba al fluorobenceno como el compuesto que mayor concordancia daba con el espectro de masas obtenido (MATCH = 837), véase en **Figura 27**.

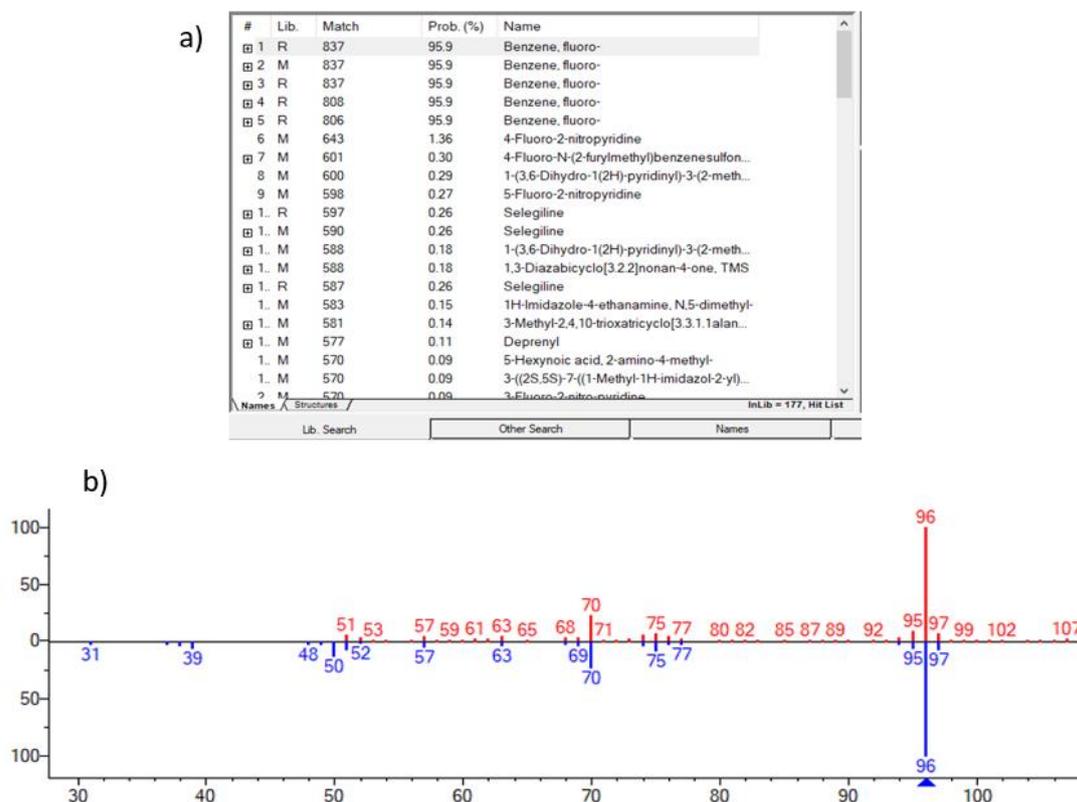


Figura 27. a) Lista de posibles compuestos que concuerdan con espectro de masas de Figura 26b según la librería NIST. b) Comparación dada por la NIST del espectro experimental y teórico del fluorobenceno.

Tras la búsqueda y el contraste con la librería espectral NIST, se puede confirmar de manera consistente que el fluorobenceno se trata del compuesto que eluye a 2,6 minutos en el cromatograma de la **Figura 25**.

Por último, en la **Figura 28** se puede observar un cromatograma realizado con las condiciones optimizadas, tanto cromatográficas como de extracción, que incluye al estándar interno fluorobenceno y a los cuatro THM.

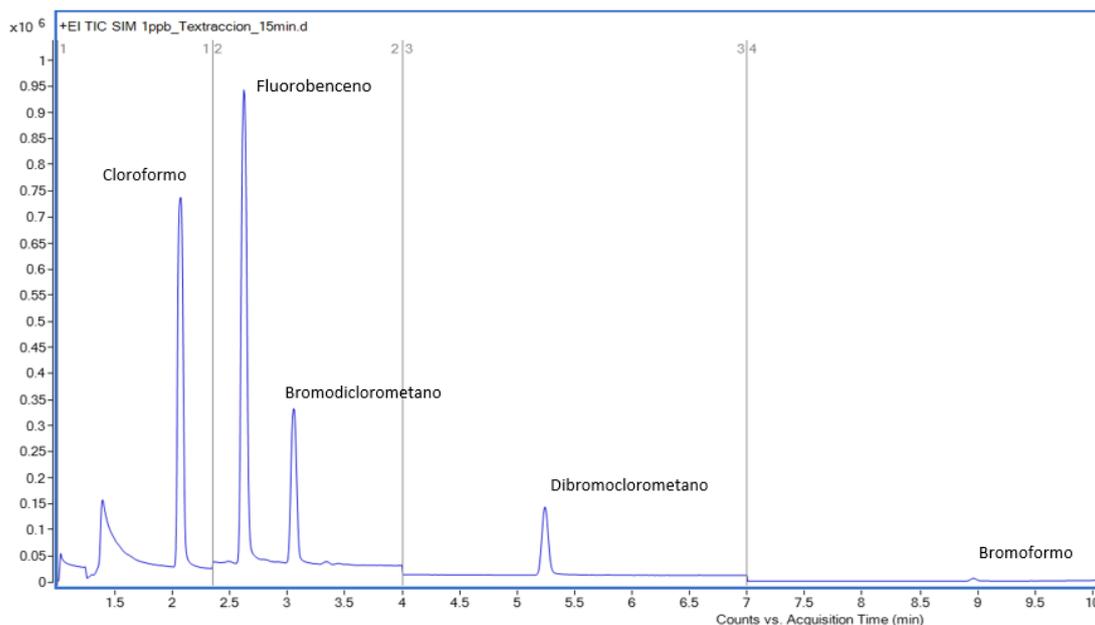


Figura 28. Cromatograma donde eluyen los 4 THM y el fluorobenceno.

6.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

Una vez optimizado el método de análisis, se procedió a realizar una validación del mismo para su posterior aplicación en muestras reales de agua de consumo y aguas residuales tratadas por cloración. En el apartado 5.4. se detallan los parámetros evaluados y los criterios de aceptabilidad. A continuación, se comentan los resultados obtenidos para cada parámetro:

- **Linealidad:** se evaluó en el rango de concentraciones entre 250 y 2500 ng/L para los cuatro THM en agua LC-MS, obteniéndose en todos los casos un coeficiente R^2 superior a 0,9900.
- **Veracidad:** ha sido estudiada mediante la realización de ensayos de recuperación a dos niveles de concentración: 250 y 2500 ng/L. En todos los casos se obtuvieron unas excelentes recuperaciones entre 93-119% a 250 ng/L y 108-119% a 2500 ng/L.
- **Precisión:** la precisión intra-día del método se evaluó a los mismos niveles ($n=5$) obteniéndose unos valores de $RSD \leq 6\%$ y $\leq 14\%$ a 250 y 2500 ng/L, respectivamente. Del mismo modo, para la evaluación de la precisión inter-día del método, se realizaron tres replicas a los dos niveles de concentración y se analizaron en diferentes días, obteniéndose de nuevo excelentes valores de $RSD: \leq 14\%$ a 250 ng/L y $\leq 13\%$ a 2500 ng/L.
- **LOQ:** se estableció como LOQ el nivel de concentración más bajo que proporciona una recuperación y precisión aceptable, es decir, 250 ng/L fue obtenido como el límite de cuantificación.

A continuación, en la **Tabla 13** se recoge un resumen de los resultados, ya comentados, de la validación.

Tabla 13. Resumen de los resultados obtenidos en la validación.

Compuesto	Rango lineal (ng/L)	R ²	Precisión intradía n = 5				Precisión interdía n = 3			
			250 ng/L		2500 ng/L		250 ng/L		2500 ng/L	
			Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
Cloroformo	250 -2500	0,999	119	3	119	7	120	7	107	12
Bromodichlorometano	250 -2500	0,998	103	5	117	10	119	13	103	13
Dibromoclorometano	250 -2500	0,998	94	6	110	12	113	14	101	11
Bromoformo	250 -2500	0,998	93	6	108	14	111	14	101	10

^a RSD: desviación estándar relativa.; ^bRec.: Recuperaciones.

6.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO A MUESTRAS DE AGUAS DE CONSUMO Y AGUAS REAIDUALES REALES

Para la determinación y evaluación de los niveles de THM en muestras reales de agua residual tratadas con procesos de cloración, se analizaron 10 muestras diferentes cedidas por el Grupo de Regeneración de Aguas del Centro de Investigación en Energía Solar (CIESOL) de la Universidad de Almería, que fueron:

- Una muestra de agua residual depurada procedente del efluente de la EDAR de El Toyo (Almería), que denominaremos “agua bruta”, ya que será sometida a procesos de regeneración posteriores.
- Dos muestras del agua bruta tratada con 10 mg/L de NaOCl, tomada a los tiempos de 60 minutos y 24 horas del tratamiento,
- Dos muestras del agua bruta tratada con 30 mg/L de NaOCl, tomada a los tiempos de 60 minutos y 24 horas de tratamiento
- Una tanda de seis muestras obtenidas durante el tratamiento en continuo del agua bruta con *foto-Fenton Solar* combinado con cloración con 10 mg/L de NaOCl (a tiempo 1, 2, 3, 4 y 24 horas del inicio del tratamiento).

Para poder cuantificar los compuestos presentes a concentración superior al rango de trabajo validado, se llevó a cabo una dilución de la muestra. En la **Tabla 14** podemos observar los resultados obtenidos.

Los resultados muestran la formación de los THM en aguas que han sido tratadas por procesos de desinfección a elevadas concentraciones, tanto mayores cuanto mayor es la dosis de NaOCl empleada en el tratamiento. Se puede destacar la mayor formación de los THM con un alto contenido en bromo: bromodiclorometano y bromoformo, cuyas concentraciones llegan hasta los 169.975 y 115.302 ng/L respectivamente.

Por otro lado, cabe destacar como la combinación del tratamiento de foto-Fenton solar con el proceso de cloración consigue reducir de manera muy significativa la formación de THM, dada la probada eficacia del foto-Fenton para la eliminación de microcontaminantes en agua. Por ejemplo, se puede observar como el BDCM y el BMF pasan de ser los más concentrados cuando solo se realiza cloración, a no detectarse cuando se combina con foto-Fenton solar.

Atendiendo a la revisión bibliográfica recogida en la **Tabla 2**, se ha reportado la generación de THM tras el tratamiento del agua bruta, obteniéndose resultados similares a los obtenidos en las muestras analizadas para este trabajo. En bibliografía, las aguas brutas pasan de no tener THM detectados o de tenerlos en bajas concentraciones (2.400 ng/L) a llegar a niveles de hasta 106.000 ng/L cuando son sometidas a procesos de cloración.

En general, se ha demostrado la capacidad del método validado para la determinación de THM en aguas residuales y su utilidad para la evaluación de la eficiencia de los tratamientos avanzados, como es el caso del foto-Fenton solar, para su eliminación.

Tabla 12. Resultados del análisis de muestras reales en ng/l.

Compuesto	Agua bruta	10 mg/l NaOCl 1 hora	10 mg/l NaOCl 24 horas	30 mg/l NaOCl 1 hora	30 mg/l NaOCl 24 horas	10 mg/l NaOCl + FFS 1 hora	10 mg/l NaOCl + FFS 2 horas	10 mg/l NaOCl + FFS 3 horas	10 mg/l NaOCl + FFS 4 horas	10 mg/l NaOCl + FFS 5 horas
CFM	523	11.187	4.243	33.741	23.347	1.518	2.105	2.268	2.139	649
BDCM	ND	27.124	11.820	80.310	84.949	1.765	782	603	526	ND
DBCM	ND	44.349	24.665	166.638	169.975	2.013	499	ND	ND	ND
BFM	ND	64.362	26.460	115.302	103.346	408	ND	ND	ND	ND

^aCFM: cloroformo; ^bBDCM: Bromodichlorometano; ^cDBCM: Dibromoclorometano; ^dBFM : Bromoformo; ^eND: no detectado; ^fFFS: Foto Fenton Solar

7. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado y validado un método para la extracción y la determinación de los 4 THM legislados en aguas, basado en una extracción por espacio de cabeza seguida por un análisis mediante GC-QqQ-MS.
- Se han optimizado los parámetros cromatográficos para lograr una resolución cromatográfica óptima para los THM, consiguiéndose una buena resolución para los cuatro analitos, así como un tiempo de análisis adecuado.
- Se han optimizado los diferentes parámetros que influyen en la extracción por espacio de cabeza, eligiéndose como óptimos 15 mL de muestra, 15 minutos de tiempo de extracción, 90°C de temperatura de extracción, 600 rpm de velocidad de agitación, 100°C como temperatura de la jeringa y 19mm de penetración de la jeringa.
- El método se ha validado con resultados aceptables para los distintos parámetros de validación, con recuperaciones entre 80-120% y RSD < 20% en todos los casos. Estableciendo el LOQ en 250 ng/L para los cuatro THM.
- La aplicación del método desarrollado en este trabajo en aguas tratadas reales se ha llevado a cabo de manera satisfactoria.
- Los resultados tras el análisis de las muestras reales manifiestan la generación de este tipo de productos de desinfección tras el uso de tratamientos de cloración. Por ello es importante la mejora de los tratamientos de cloración, siendo una buena alternativa, como se ha visto en los resultados, llevar a cabo el proceso simultáneo de *foto-Fenton solar* con el cuál se han reducido considerablemente los niveles de THM.

8. BIBLIOGRAFÍA Y NOTAS

- (1) Srivastav, A. L.; Patel, N.; Chaudhary, V. K. Disinfection By-Products in Drinking Water: Occurrence, Toxicity and Abatement. *Environ. Pollut.* **2020**, *267*, 115474. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115474>.
- (2) Sinha, R.; Gupta, A. K.; Ghosal, P. S. A Review on Trihalomethanes and Haloacetic Acids in Drinking Water: Global Status, Health Impact, Insights of Control and Removal Technologies. *J. Environ. Chem. Eng.* **2021**, *9* (6), 106511. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106511>.
- (3) USEPA. Alternative Desinfectants and Oxidants Guidance Manual. 1999.
- (4) Tak, S.; Vellanki, B. P. Natural Organic Matter as Precursor to Disinfection Byproducts and Its Removal Using Conventional and Advanced Processes: State of the Art Review. *J. Water Health* **2018**, *16* (5), 681–703. <https://doi.org/10.2166/wh.2018.032>.
- (5) Cancho, B.; Ventura, F.; Galceran, M. T. Behavior of Halogenated Disinfection By-Products in the Water Treatment Plant of Barcelona , Spain. **1999**, 610–617.

- (6) Gol, S. K. The Occurrence of Trihalomethanes in the Drinking Water in Greece. **2000**, 41.
- (7) Tokmak, B.; Capar, G.; Dilek, F. B.; Ā, U. Y. Trihalomethanes and Associated Potential Cancer Risks in the Water Supply in Ankara , Turkey \$. **2004**, 96, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2003.11.005>.
- (8) Evlampidou, I.; Font-Ribera, L.; Rojas-Rueda, D.; Gracia-Lavedan, E.; Costet, N.; Pearce, N.; Vineis, P.; Jaakkola, J. J. K.; Delloye, F.; Makris, K. C.; Stephanou, E. G.; Kargaki, S.; Kozisek, F.; Sigsgaard, T.; Hansen, B.; Schullehner, J.; Nahkur, R.; Galey, C.; Zwiener, C.; Vargha, M.; Righi, E.; Aggazzotti, G.; Kalnina, G.; Grazuleviciene, R.; Polanska, K.; Gubkova, D.; Bitenc, K.; Goslan, E. H.; Kogevinas, M.; Villanueva, C. M. Trihalomethanes in Drinking Water and Bladder Cancer Burden in the European Union. *Environ. Health Perspect.* **2020**, 128 (1). <https://doi.org/10.1289/EHP4495>.
- (9) de Castro Medeiros, L.; de Alencar, F. L. S.; Navoni, J. A.; de Araujo, A. L. C.; do Amaral, V. S. Toxicological Aspects of Trihalomethanes: A Systematic Review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, 26 (6), 5316–5332. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3949-z>.
- (10) IARC. Agents Clasified by the IARC Monographs. *I–I23*.
- (11) Shi, Q.; Xiong, Y.; Kaur, P.; Sy, N. D.; Gan, J. Contaminants of Emerging Concerns in Recycled Water: Fate and Risks in Agroecosystems. *Sci. Total Environ.* **2022**, 814, 152527. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152527>.
- (12) Akande, B. C.; Ndakidemi, P. A.; Fatoki, O.; Odendaal, J. The Possible Effect of the Bioaccumulation of Disinfectant By-Products on Crops Irrigated with Treated Wastewater. *African J. Biotechnol.* **2010**, 9 (9), 1280–1287. <https://doi.org/10.5897/ajb10.041>.
- (13) World Health Organization. *A Global Overview of National Regulations and Standards for Drinking-Water Quality*; 2018.
- (14) USEPA. National Primary Drinking Water Regulations <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>.
- (15) Unión Europea. *Directiva (UE) 2020/2184 Del Parlamento Europeo y Del Consejo de 16 de Diciembre de 2020 Relativa a La Calidad de Las Aguas Destinadas Al Consumo Humano (Versión Refundida)*.; 2020; p 1 a 62.
- (16) Ministero della Salute. *I Parametri Di Qualità Delle Acque*; 2022.
- (17) Ministero della Salute. Trialometani https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=4464&area=acque_potabili&menu=co.
- (18) Gobierno federal alemán. Ley Federal Consolidada: Legislación completa para la Ordenanza de Agua Potable, versión del 31.12.2017. Referencia original: Bundesrecht konsolidiert: Gesamte Rechtsvorschrift für Trinkwasserverordnung, Fassung vom 31.12.2017 <https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=20001483&FassungVom=2017-12-31>.

- (19) Shoushtarian, F.; Negahban-Azar, M. World Wide Regulations and Guidelines for Agriculturalwater Reuse: A Critical Review. *Water (Switzerland)* **2020**, *12* (4), 1–74. <https://doi.org/10.3390/W12040971>.
- (20) Istituto Superiore per la Protezione Ambientale. *Sul Riutilizzo Delle Acque Depurate*; 2006.
- (21) Gobierno de España. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2003-3596>.
- (22) Gobierno de Argentina. CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO Resolución Conjunta 68/2007 y 196/2007 Modificación. Bs. As., 22/5/2007.
- (23) NHMRC; NRMCC. *Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy. National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth*; 2011.
- (24) Gobierno de Canadá. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/environmental-workplace-health/reports-publications/water-quality/guidelines-canadian-drinking-water-quality-summary-table.html#t2> (accessed Jan 13, 2021).
- (25) CDWQ. National Standard of the People ' s Republic of China Standards for Drinking Water Quality. *Drink. Water Qual.* **2006**, No. GB 5749, 1–13.
- (26) California Water Boards. Maximum Contaminant Levels And Regulatory Dates for Drinking Water: U.S. EPA vs California. **2018**, No. November, 6–9.
- (27) González-Hernández, P.; Hernández-Padrón, M.; Pino, V.; Afonso, A. M.; Ayala, J. H. Monitoring Trihalomethanes and Nitrogenous Disinfection By-Products in Blending Desalinated Waters Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography. *Environ. Technol. (United Kingdom)* **2017**, *38* (7), 911–922. <https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1266393>.
- (28) Rosero, M. M.; Aguirre, M.; Pezo, D.; Taborda, G.; Dussán, C.; Nerin, C. Solventless Microextraction Techniques for Determination of Trihalomethanes by Gas Chromatography in Drinking Water. *Water. Air. Soil Pollut.* **2012**, *223* (2), 667–678. <https://doi.org/10.1007/s11270-011-0891-9>.
- (29) Cerreta, G.; Roccamante, M. A.; Plaza-Bolaños, P.; Oller, I.; Aguera, A.; Malato, S.; Rizzo, L. Advanced Treatment of Urban Wastewater by UV-C/Free Chlorine Process: Micro-Pollutants Removal and Effect of UV-C Radiation on Trihalomethanes Formation. *Water Res.* **2020**, *169*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115220>.
- (30) Liu, Y.; Duan, J.; Li, W.; Lai, Q.; Saint, C. P.; Mulcahy, D. Determination of Volatile Disinfection Byproducts in Water by Gas Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Anal. Lett.* **2015**, *48* (1), 188–203. <https://doi.org/10.1080/00032719.2014.930873>.
- (31) Barco-Bonilla, N.; Plaza-Bolaños, P.; Fernández-Moreno, J. L.; Romero-González, R.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M. Determination of 19 Volatile Organic Compounds in Wastewater Effluents from Different Treatments by Purge and Trap

- Followed by Gas-Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400* (10), 3537–3546. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5014-3>.
- (32) Culea, M.; Cozar, O.; Ristoiu, D. Methods Validation for the Determination of Trihalomethanes in Drinking Water. *J. mass Spectrom.* **2006**, No. October, 1594–1597. <https://doi.org/10.1002/jms>.
- (33) Alexandrou, L. D.; Meehan, B. J.; Morrison, P. D.; Jones, O. A. H. A New Method for the Fast Analysis of Trihalomethanes in Tap and Recycled Waters Using Headspace Gas Chromatography with Micro-Electron Capture Detection. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14* (5). <https://doi.org/10.3390/ijerph14050527>.
- (34) Ristoiu, D.; Haydee, M.; Ristoiu, T. Nanodetection of the Disinfection By-Products on GC-MS Techniques. *Adv. Top. Optoelectron. Microelectron. Nanotechnologies IV* **2009**, 7297 (4), 729729. <https://doi.org/10.1117/12.823693>.
- (35) Demeestere, K.; Dewulf, J.; De Witte, B.; Van Langenhove, H. Sample Preparation for the Analysis of Volatile Organic Compounds in Air and Water Matrices. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1153* (1–2), 130–144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.012>.
- (36) Yang, L.; Schmalz, C.; Zhou, J.; Zwiener, C.; Chang, V. W. C.; Ge, L.; Wan, M. P. An Insight of Disinfection By-Product (DBP) Formation by Alternative Disinfectants for Swimming Pool Disinfection under Tropical Conditions. *Water Res.* **2016**, *101*, 535–546. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.088>.
- (37) Pérez Pavón, J. L.; Martín, S. H.; García Pinto, C.; Moreno Cordero, B. Headspace-Programmed Temperature Vaporizer-Fast Gas Chromatography-Mass Spectrometry Coupling for the Determination of Trihalomethanes in Water. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1194* (1), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.037>.
- (38) Jacq, K.; David, F.; Sandra, P.; Klee, M. S. Analysis of Volatile Organic Compounds in Water Using Static Headspace-GC/MS. Application Note Environmental. *Agilent* **2008**, 1–16.
- (39) Szelewski, M. Environmental Volatiles Using a Headspace-GC / MSD Analyzer Application Note. 1–8.
- (40) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principios de Análisis Instrumental*, 6th ed.; 2008.
- (41) Safarova, V. I.; Sapelnikova, S. V.; Djazhenko, E. V.; Teplova, G. I.; Shajdulina, G. F.; Kudasheva, F. K. Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Headspace for the Analysis of Volatile Organic Compounds in Waste Water. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *800* (1–2), 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.10.070>.
- (42) Serrano, A.; Gallego, M. Rapid Determination of Total Trihalomethanes Index in Drinking Water. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1154* (1–2), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.101>.
- (43) AGARWAL, P.; GOYAL, A. A Review on Analyzers for Mass Spectrometry. *Int. J. Pharma Bio Sci.* **2017**, *8* (4). <https://doi.org/10.22376/ijpbs.2017.8.4.p139-151>.
- (44) Ponce Robles, L.; Rodríguez Fernández, A.; Gil García, M. D. Determinación de

- Pesticidas de Carácter Ácido En Frutas y Hortalizas, Almería, 2012.
- (45) US EPA. Measurement of Trihalomethanes in Drinking Water with Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Selected Monitoring.
- (46) Eveleigh, L. J.; Ducauze, C. J. Optimization of the Dwell-Time for the Quantitation Analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1997**, 765 (2), 241–245. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00939-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00939-9).
- (47) EPA. Analysis Of Trihalomethanes In Drinking Water By Liquid/Liquid Extraction. **1979**, *Method 501*.
- (48) EPA. Measurement Of Trihalomethanes In Drinking Water With Gas Chromatography/Mass Spectrometry And Selected Ion Monitoring. **1996**, *501.3*.

9. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

BDCM: Bromodiclorometano.

BFM: Bromoformo.

CFM: Cloroformo.

DBCM: Dibromoclorometano.

DBP: Subproductos de desinfección.

DC: Corriente continua.

DOC: Carbón Orgánico Disuelto.

EI: Ionización electrónica.

eV: Electronvoltio.

GC: Cromatografía de gases.

HS: Espacio-cabeza.

IARC: La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer

IS: Estándar interno.

LOD: Límite de detección.

Log P: Coeficiente partición octanol/agua.

LOQ: Límite de cuantificación.

MS: Espectrometría de masas.

NOM: Materia Orgánica Natural.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

QqQ: Analizador de tripe cuadrupolo.

RF: Corriente de radiofrecuencia.

S/R: Relación señal/ruido.

SIM: Monitorización de un solo ion.

SPME: Microextracción en fase sólida.

SRM: Monitorización de reacción seleccionada.

THM: Trihalometanos.

UE: Unión Europea.

US-EPA: Agencia de protección ambiental estadounidense.