

# A1.2.1 PROTOCOLO PARA EL SCREENING DE EPS

ACTIVIDAD A1: ÁREAS DE ESTUDIO Y EPS

Actividad	A1-ÁREAS ESTUDIO Y EP <sub>S</sub>
Acción	1.2.1
Fecha de actualización	31 / 03 / 2020
Versión	1
Autores	USC
Participantes	USC/INTECMAR

ESTE ENTREGABLE CONSTA DE ESTE ARCHIVO Y UN ARCHIVO EXCEL ANEXO: ENT\_A1.2.1\_ANEXO

# **DISCLAIMER**

El desarrollo de este documento ha sido cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional FEDER a través del Programa Interreg V-A España-Portugal (POCTEP) 2014-2020.

Las opiniones son de exclusiva responsabilidad del autor que las emite"





# **PROTOCOLO PARA EL SCREENING DE EPS**

# **ÍNDICE**

1. ESTRATEGIA DE MUESTREO	4
1.1. MUESTRAS PUNTUALES	
1.2. MUESTREO PASIVO	4
2. INSTRUMENTACIÓN	4
3. METODOLOGÍA ANALÍTICA	4
3.1. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS	4
3.1.1. MUESTRAS PUNTUALES	5
3.1.2. MUESTREO PASIVO	5
3.2. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA	
DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN (LC-HRMS)	5
3.3. TRATAMIENTO DE LOS DATOS	6
4. REFERENCIAS	7

El protocolo para el *screening* seguido en este proyecto se ha basado en el desarrollado y publicado por Castro y col. [1].

# 1. ESTRATEGIA DE MUESTREO

Con el fin de identificar el mayor número de compuestos posible en el estudio de *screening* se aborda el muestreo de dos tipos puntual y pasivo. Se realizó un muestreo en 24 puntos diferentes, según se especifica en el entregable A.1.1.1, en 20 de los cuales se tomó muestra puntual y se colocó muestreador pasivo. En los cuatro puntos restantes sólo fue posible la toma de muestra puntual. Además, se incluyeron 5 estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), en este caso se tomaron muestras compuestas de 24h del agua tratada en la EDAR. Se realizaron dos campañas de muestreo, una en enero/febrero y otra en junio/julio de 2020.

## 1.1. MUESTRAS PUNTUALES

Se tomaron muestras puntuales de 500 mL en cada uno de los puntos, que se recogieron con un toma-muestras telescópico de polietileno. En el caso de las estaciones depuradoras se tomó una muestra puntual en el agua de entrada a la planta (influente) y otra en el agua tratada de salida (efluente).

### 1.2. MUESTREO PASIVO

Se utilizaron muestreadores pasivos de tipo POCIS (polar organic chemical integrative sampler). Los POCIS se ensamblaron contiendo 100 mg de adsorbente de tipo OASIS HLB (previamente lavado con metanol) entre dos membranas de PES (previamente sonicadas en metanol). Las membranas y el adsorbente se intercalan entre dos anillos de soporte unidos con tres tornillos. Después de eso, los dispositivos POCIS se colocaron en una jaula (recipiente) de acero inoxidable que se coloca en el curso del agua (durante 1 semana en el caso de agua dulce y 2 semanas en el caso de auga salada) y los protege contra posibles daños en los puntos de muestreo.

# 2. INSTRUMENTACIÓN

Las medidas instrumentales se realizaron en un equipo tipo UPLC modelo 1290 Infinity II series de la casa comercial Agilent Technologies acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución modelo 6550 iFunnel Q-TOF de la misma casa comercial. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna ZORBAX Extend-2.1x50 mm, 1.8 µm (Agilent).

# 3. METODOLOGÍA ANALÍTICA

# 3.1. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS



Los protocolos para la extracción de las muestras se basaron en protocolos ya validados y publicados en estudios previos del grupo de investigación [1,2].

### 3.1.1. MUESTRAS PUNTUALES

Las muestras de agua se filtraron al vacío a través de filtros de microfibra de vidrio de 0,7  $\mu$ m GF / A. Se extrajeron alícuotas (200 mL en el caso de agua superficial y 100 mL en el caso de agua residual) con dos protocolos de extracción en fase sólida diferentes, por un lado, utilizando cartuchos Oasis WCX de 150 mg, previamente acondicionados con 5 mL de metanol (5%NH3) y 5 mL de agua ultrapura. Tras el paso de la muestra, el cartucho se lavó con 10 ml de agua ultrapura y se secó bajo una corriente de nitrógeno durante aproximadamente 30 min. La elución se llevó a cabo por gravedad usando 10 mL de metanol (2% de ácido fórmico). Por otra parte, otra alícuota de cada muestra se extrajo utilizando cartuchos OASIS WAX de 150 mg, acondicionados con 5 mL de metanol (2% de ácido fórmico) y 5 mL de agua ultrapura. Tras el paso de muestra, lavado y secado citado anteriormente, se eluyó con 10 mL de metanol (5% de NH3). Tras la elución, los extractos se concentraron aproximadamente a aprox. 0.5 mL usando un concentrador Turbovap II, luego a sequedad bajo una suave corriente de nitrógeno y finalmente se reconstituyeron a un volumen de 500  $\mu$ L de metanol. Los extractos se filtraron con un filtro de jeringa de 0,2  $\mu$ m de PTFE.

# 3.1.2. MUESTREO PASIVO

Al final de cada período de muestreo, los POCIS fueron recogidos y transportados al laboratorio. Después de la recepción, se enjuagaron con agua ultrapura, se envolvieron en papel de aluminio y se almacenaron a -20 ° C hasta la extracción.

Cada POCIS se desmontó y el material adsorbente OASIS HLB se transfirió a cartuchos de plástico para SPE de 10 mL vacíos (jeringa Discardit II, BD®) y se empaquetó entre dos fritas de polietileno. La elución de los analitos del adsorbente se realizó con 6 mL de metanol. La selección del eluyente se basó en el hecho de que el metanol es, con mucho, el eluyente más utilizado para POCIS. Posteriormente, el extracto se concentró aproximadamente a 0,5 mL usando un concentrador Turbovap II, luego a sequedad bajo una suave corriente de nitrógeno y finalmente se reconstituyó a un volumen de 500  $\mu$ L de metanol. Los extractos se filtraron con un filtro de jeringa de 0,2  $\mu$ m de PTFE.

# 3.2. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN (LC-HRMS)

Para los extractos obtenidos de los muestreadores tipo POCIS se realizaron dos inyecciones independientes en el sistema LC-HRMS trabajando en polaridad positiva y negativa, respectivamente. Los extractos obtenidos del paso por cartuchos OASIS WCX se inyectaron sólo en polaridad positiva y los de OASIS WAX en polaridad negativa. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes: la temperatura en la columna se fijó en 35 ° C, el volumen de inyección en 2  $\mu$ L y flujo de fase móvil de 0,4 mL min<sup>-1</sup>. Como fases móviles, agua (A) y metanol (B), conteniendo 0,1% de ácido



fórmico o 5mM de NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COOH, en función de la polaridad utilizada en la ionización. Cuando la adquisición se realizó en modo positivo, se utilizó como modificador el ácido fórmico, en caso de modo negativo, se utilizó acetato amónico. La elución en gradiente comenzó con 98% A, aumentando al 100% B en 22 min, mantenido durante 4 min. Posteriormente, se recuperaron las condiciones iniciales (98% A) y se mantuvieron durante 4 min para el acondicionamiento posterior de la columna. El tiempo total del programa cromatográfico fue de 30 min.

El control del instrumento y la adquisición de datos se realizaron con el software Agilent MassHunter Workstation B.10.00.

La interfaz de tipo ESI se programó en modo positivo o negativo (en diferentes inyecciones) y el voltaje de la aguja del ESI se fijó en 3500 V. Se usó nitrógeno como gas de nebulización (30 psi) y secado (200 ° C, 12 L min<sup>-1</sup>) en la fuente ESI, y también como gas de colisión en los experimentos MS/MS.

La adquisición de datos se realizó mediante un método de tipo All ions (DIA) utilizando un canal de baja energía (0 V de energía de colisión) y otro de alta energía (20 V de energía de colisión), sin selección de los iones precursores. Por lo tanto, en este modo, las asignaciones de fragmentos potenciales de MS/MS se basan en la coelución de dichos fragmentos potenciales en el canal de 20 V con el ion precursor en el canal de 0 V. El rango escaneado fue 60-1100 m/z en MS y 30-1000 m/z en modos MS/MS. Una solución de calibración de referencia, suministrada por Agilent, se introdujo continuamente en la fuente durante el ciclo cromatográfico para recalibrar continuamente el eje m/z [3].

## 3.3. TRATAMIENTO DE LOS DATOS

El análisis de datos se realizó con el software MassHunter Qualitative Analysis B.10.00. de Agilent Technologies y consistió en el uso del algoritmo de búsqueda Find by Formula, donde el software busca posibles iones que coincidan con la fórmula empírica considerando iones  $[M + H]^+$ ,  $[M + NH_4]^+$ ,  $[M + Na]^+$  en modo positivo y sólo [M - H] en modo negativo (Score > 80% y error de masa inferior a 5 ppm) en una base de datos de tipo PCDL que contiene más de 3400 compuestos químicos, incluidas todas las sustancias priorizadas, así como otros productos farmacéuticos, plaguicidas y otros contaminantes emergentes (la lista completa se presenta como archivo Excel Ent A1.2.1 anexo). Cuando se encuentra una coincidencia, se extraen hasta 7 iones producto del espectro de la biblioteca MS/MS como cromatogramas en el canal de 20 V, lo que genera score de coelución único, que indica la confianza en la correlación entre el precursor y los iones producto por abundancia. En el caso de aquellas sustancias priorizadas para las que no había espectro de MS/MS en la librería (alrededor de 200 sustancias), se identificaron en base a su Score de MS, se inyectaron en modo target MS/MS y se realizó una interpretación de su patrón de fragmentación, o bien se comparó con el espectro del patrón comercial, si estaba disponible. El umbral mínimo de intensidad de pico se estableció en 1000 unidades tanto en modo positivo como negativo.



Los analitos se consideraron identificados utilizando los niveles de confirmación propuesto por Schymanski y col. [4]. Se utilizó la puntuación inversa mínima (reverse Score) de la búsqueda en la biblioteca de 80% en el modo MS (puntuación que tiene en cuenta el error de masa frente a la masa teórica y coincidencia en el perfil isotópico y espaciado entre esos isótopos). Se permitió un error de masa máximo de 5 ppm a nivel de MS, mientras que para la comparación de se establecieron un mínimo de 2 fragmentos coincidentes con la librería de MS/MS, o en el caso de no tener espectros de MS/MS al menos 2 fragmentos que fuesen coherentes con la estructura del compuesto.

# 4. REFERENCIAS

- 1. Castro, V., Quintana, J.B., Carpinteiro, I. et al. (2021) "Combination of different chromatographic and sampling modes for high-resolution mass spectrometric screening of organic microcontaminants in water". Anal Bioanal Chem. https://doi.org/10.1007/s00216-021-03226-6
- 2. Montes, R., Rodil, R., Cela, R., & Quintana, J. B. (2019). "Determination of Persistent and Mobile Organic Contaminants (PMOCs) in Water by Mixed-Mode Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry". Anal Chem, 91(8), 5176-5183. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05792
- Wilson, E. W., Castro, V., Chaves, R., et al. (2021). Using zebrafish embryo bioassays combined with high-resolution mass spectrometry screening to assess ecotoxicological water bodies quality status: A case study in Panama rivers. Chemosphere 272, 129823. doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129823
- 4. Schymanski, E., Jeon, J., Gulde, R., et al. (2014) "Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence" Environmental Science & Technology 48 (4), 2097-2098 https://doi.org/10.1021/es5002105

