

Detección sensible y específica de explosivos y sus productos de degradación en matrices ambientales mediante UPLC-MS

Fernando D. Reina¹, Julio S. Fuchs^{2,3}, Gerardo D. Castro^{2,3}

¹Departamento de Química Aplicada. ²Departamento de Investigaciones en Bioseguridad y Toxicología. Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa (CITEDEF). Juan Bautista de La Salle 4397, B1603ALO Villa Martelli, Argentina. ³Unidad de Investigación y Desarrollo Estratégicos para la Defensa (UNIDEF, MINDEF-CONICET).
E-mail: freina@citedef.gob.ar

Resumen. La espectrometría de masa acoplada con cromatografía líquida de alta resolución (UPLC-MS) es una herramienta analítica de preferencia para la detección y cuantificación de tóxicos en matrices ambientales gracias a sus cualidades de sensibilidad y especificidad. Estamos desarrollando una capacidad para evaluar el impacto tóxico derivado de la contaminación ambiental con explosivos. Para ello es necesario desarrollar metodologías analíticas sensibles y específicas para la identificación y cuantificación de los explosivos y sus productos de transformación, que permitan evaluar el impacto tóxico in situ o en el laboratorio con muestras provenientes de los sitios contaminados. Estos ensayos requieren poner a punto metodologías para la recuperación eficiente de estos analitos desde muestras de suelos, agua y tejidos de organismos diana para evaluar toxicidad subletal y la absorción de los explosivos envejecidos desde muestras reales, teniendo en cuenta que cada suelo o agua modula cuali y cuantitativamente la composición de la mezcla tóxica.

Palabras clave: UPLC-MS, TNT, RDX, HMX, Biomonitorio

Introducción

La caracterización de la naturaleza y dimensión de los procesos tóxicos requiere de mediciones específicas y sensibles que permitan identificar y cuantificar sustancias en matrices variadas, biológicas o abióticas. Estas sustancias pueden ser los tóxicos originalmente liberados en un ambiente, sus productos de degradación o bien, metabolitos producidos en los organismos expuestos. La toxicología analítica, por definición, comprende el conocimiento sobre qué medir, dónde y en qué tiempo. Estas variables deben tenerse en cuenta siempre si quiere llegarse a la comprensión de un impacto tóxico. La presencia de los tóxicos en el ambiente supone, adicionalmente, una complejidad que otros escenarios más acotados no tienen. Esto hace necesarias metodologías analíticas que permitan la recuperación de los analitos desde distintas matrices, su conservación adecuada y el análisis cuali-cuantitativo específico y sensible. La contaminación del ambiente con sustancias químicas explosivas puede originarse durante la fabricación, el uso y la eliminación de municiones en distintos ámbitos y en todo el mundo. Las consecuencias para el ecosistema y la salud humana derivan de la contaminación de aguas subterráneas y superficiales, suelos y sedimentos, y del aire, a veces en concentraciones muy altas. Las estrategias para establecer riesgos tóxicos y objetivos de remediación están condicionadas por el conocimiento inadecuado del destino ambiental y de los efectos de estas sustancias en los ecosistemas acuáticos y terrestres. En nuestro país, si bien en una escala mucho menor que en otros, existen instalaciones y terrenos que presentan situaciones de contaminación ambiental por estas razones. Un caso de interés lo constituye la Fábrica Militar de Pólvoras y Explosivos “Azul”, cuyo cierre en 2017 motivó la necesidad de evaluar pasivos ambientales luego de su desmantelamiento. El muestreo y los análisis químicos preliminares estuvieron a cargo de profesionales de CITEDEF, quienes procedieron a la toma de muestras de aguas (superficiales y de napa) y de suelos en el predio. A partir de este caso testigo surgió la inquietud de realizar estudios más detallados para evaluar el impacto ambiental

de ésta y otras instalaciones similares o de campos de tiro en distintos sitios del país. En tal contexto es relevante realizar medidas de biomonitorio que puedan revelar algún impacto en el ecosistema del lugar y por supuesto, eventuales consecuencias para la población cercana (a través por ejemplo de la migración de contaminantes por las napas de donde se surten las fuentes de agua potable).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una metodología analítica por cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masa para la determinación simultánea de los explosivos trinitrotolueno (TNT), ciclotrimetilentrinitramina (RDX) y la ciclotetrametilentrinitramina (HMX), que permita mejorar la identificación y cuantificación de estos analitos y sus metabolitos, a bajos niveles de concentración en matrices complejas y en menores tiempos de análisis.

Experimental

El análisis de detección y cuantificación de estos compuestos se realizó empleando un sistema de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (UPLC-MS) triple cuadrupolo, compuesto por un cromatógrafo ACQUITY UPLC, un espectrómetro de masa Xevo TQ-XS, con ionización por electrospray (ESI) y el gestor de software MassLynx (TargetLynx XS) (Waters Co., EEUU), permitiendo la adquisición y el procesamiento de datos espectrales de masas a partir de análisis cromatográficos.

Cromatografía UPLC - La separación cromatográfica se logró con una columna ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (1,7 µm × 2,1 mm, 50 mm; Waters Co., EEUU). Se empleó acetonitrilo:acetato de amonio 5mM como fase móvil a una temperatura de columna de 35 °C y un caudal de 0,300 mL/min para la elución en gradiente, siendo la composición (acetonitrilo:acetato de amonio 80:20) al inicio hasta 3,5 min; (2:98 respectivamente) hasta 4,0 min y (80:20 respectivamente) hasta 5 min. Tiempo total de corrida: 5 min. El volumen de muestra inyectado fue de 10 µL.

Espectrometría de masa (MS/MS) - Se realizó una búsqueda espectral para identificar los iones característicos de mayor intensidad para cada analito, en el rango de masas de 50 a 500 Da. A partir de estos iones se obtuvieron los iones hijos como productos característicos de fragmentación, por monitoreo de reacciones múltiples (MRM), los que fueron utilizados para la identificación inequívoca de cada analito y su posterior cuantificación. El flujo y la temperatura del gas de secado (nitrógeno) en la fuente de ionización se ajustaron a 15 mL/min y 500 °C, respectivamente. Se optimizó para cada analito el valor adecuado de voltaje capilar, la energía del fragmentador y la energía de colisión. Límites de detección: se midieron muestras estándares de calibración preparadas en el rango de concentraciones de 0,1 a 100 µg/mL, disueltas en fase móvil y se analizaron las curvas de calibración mediante regresión lineal. Los límites instrumentales de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se determinaron por métodos estadísticos empleando 3 y 10 desvíos estándares relativos respectivamente para su cálculo.

Resultados

Se desarrolló y optimizó un método UPLC-MS para la determinación cualitativa y cuantitativa de los explosivos TNT, RDX y HMX. Se utilizó el modo electrospray negativo para la ionización de los compuestos investigados. Se emplearon iones desprotonados [M-H]⁻ como iones precursores y los iones obtenidos por fragmentación de éstos, en modo MRM, para la cuantificación e identificación de los analitos, a saber:

Para TNT: a partir del ión [TNT-H]⁻ m/z: 226, la fragmentación de la forma deprotonada del TNT produjo un pico a m/z: 195.8 que se asignó al ión [TNT-H-NO]⁻, empleado para la traza de cuantificación y un ión a m/z: 76 que se asignó a 5-metilidenciclopenta-1,3-dieno, empleado como traza de identificación. Para RDX: a partir del pico a m/z: 267 correspondiente al ión aducto [RDX+HCOO]⁻, la fragmentación proporcionó un pico a m/z: 91,1 correspondiente al ión [N₂O₄]⁻, empleado para la traza de cuantificación y un pico a m/z: 46 correspondiente al ión

[NO₂]⁻ que se utilizó en la traza de identificación. Para HMX: a partir del ión aducto [HMX+HCOO]⁻ m/z: 341 la fragmentación proporcionó un pico a m/z: 173,8 correspondiente al ión [HMX-H-CH₂N₂O₂-HNO₂]⁻, empleado para la traza de cuantificación y un pico a m/z: 146,9 correspondiente al ión [HMX-H-CH₂N₂O₂]⁻ utilizado en la traza de identificación.

Los resultados demostraron linealidad en el rango de concentraciones estudiado ($r^2 > 0.99$) para todos los analitos (Figura 1). El empleo del modo monitoreo de reacciones múltiples permitió la identificación de los compuestos estudiados, especialmente en el caso de compuestos coeluyentes. Se obtuvieron los siguientes límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ): para TNT 1,85 y 6,09 µg/L; para RDX 0,78 y 2,59 µg/L y para HMX 3,31 y 11,05 µg/L respectivamente.

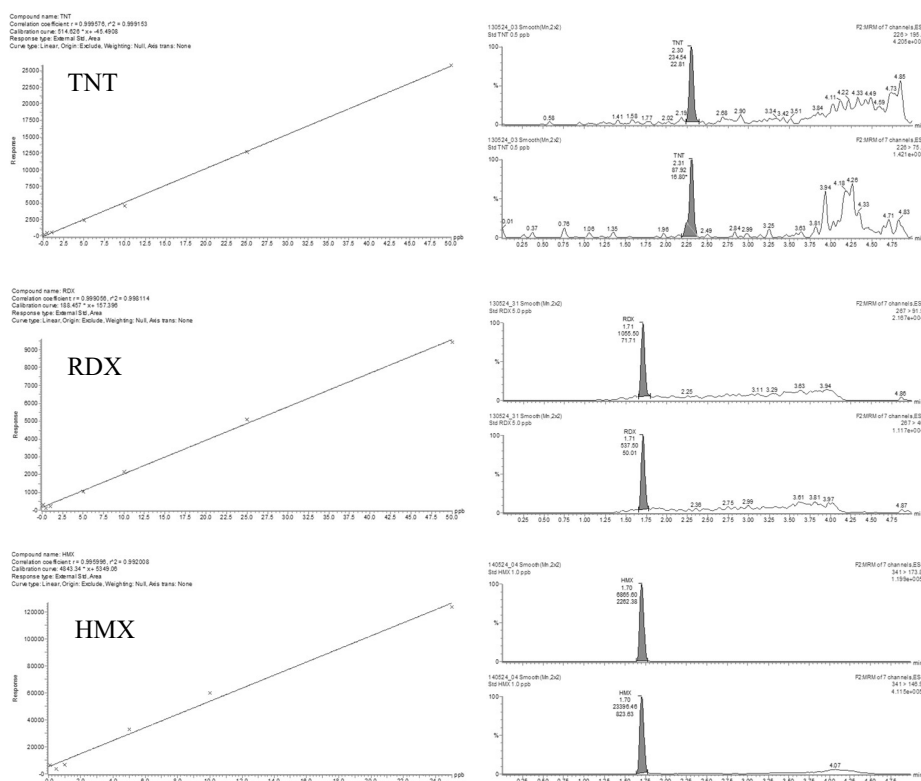


Figura 1. Curvas de calibración y cromatogramas para los explosivos TNT, RDX y HMX, demostrando el rango lineal para cuantificaciones entre 0 – 100 ppb.

Conclusiones

El método analítico basado en cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masa por ionización por electrospray fue aplicado exitosamente en el análisis de los explosivos TNT, RDX y HMX. La separación y cuantificación de éstos fue posible mediante el estudio de los espectros de masa de los iones formados en el modo de monitoreo de reacción múltiple obtenidos a partir de la estructura del ión precursor. Esta identificación y cuantificación de explosivos es factible incluso en muestras con matrices complejas, con gran cantidad de compuestos coeluyentes y extensible a productos de biodegradación. Estas ventajas se utilizarán en estudios ambientales posteriores, para la determinación e identificación de productos de transformación de explosivos en sitios contaminados.