



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Desarrollo de un método analítico por
cromatografía de líquidos de ultra alta
resolución acoplada a espectrometría
de masas para la cuantificación del
trazador pasivo no reactivo USIP-TR-01
en agua congénita.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A
HERNÁNDEZ CEDILLO ADRIÁN**

**DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. Margarita Romero Avila**

CIUDAD DE MÉXICO, 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: INES FUENTES NORIEGA
VOCAL: Profesor: MARIA DE LOURDES BEATRIZ MAYET CRUZ
SECRETARIO: Profesor: MARGARITA ROMERO AVILA
1er. SUPLENTE: Profesor: KENNETH RUBIO CARRASCO
2° SUPLENTE: Profesor: MARTHA VERONICA ESCARCEGA BOBADILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ASESOR DEL TEMA: M. EN C. MARGARITA ROMERO AVILA
(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. ROBERTO CARLOS CAÑAS ALONSO
(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): HERNÁNDEZ CEDILLO ADRIÁN
(nombre (s) y firma (s))

Agradesco al proyecto 185183 CONACyT-SENER "Proceso de recuperación Mejorada con la Tecnología de Inyección de Químicos (ASP) con Aplicación Mediante Prueba Piloto en el Campo Poza Rica" por el apoyo con los materiales y equipos necesarios para la realización de este proyecto.

a. Lista de Abreviatura.....	VIII
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 Trazadores.....	2
2.1.1 Pruebas de trazadores.....	3
2.1.2 Tipos de trazadores.....	3
2.1.2.1 Trazadores naturales.....	3
2.1.2.2 Trazadores artificiales.....	4
2.1.3 Clasificación de trazadores de acuerdo a su	
Interacción con fluidos del subsuelo.....	4
2.1.3.1 Trazadores pasivos.....	4
2.1.3.2 Trazadores de partición.....	5
2.2 Propiedades generales Yacimientos en México.....	5
2.3 Agua congénita.....	5
2.4 Estandar interno.....	7
2.5 Trazador USIP-TR-01.....	7
2.6 Desarrollo de métodos analíticos para la	
cuantificación de trazadores pasivos.....	8
2.6.1 Cromatografía líquida de ultra alta	
resolución acoplada a Espectrometría de masas.....	9
2.6.2 Extracción en fase sólida.....	13
2.7 Validación de método analítico.....	15
3. Objetivos.....	17
3.1 Generales.....	17
3.2 Particulares.....	17
4. Metodología.....	18
4.1 Reactivos.....	18
4.2 Materiales, equipos e instrumentos.....	18
4.3 Soluciones.....	19
4.3.1 Preparación de soluciones.....	19
4.3.1.1 Solución de HFBA 20mM acuoso.....	19

4.3.1.2	Acetonitrilo grado cromatográfico.....	19
4.3.1.3	Fase móvil.....	20
4.3.1.4	Solución de Ácido fórmico al 5 % en metanol.....	20
4.3.1.5	Solución concentrada de USIP-TR-01 (DS1).....	20
4.3.1.6	Solución de USIP-TR-01 1 µg/mL (DS2).....	20
4.3.1.7	Solución concentrada de estándar interno (DSE1).....	20
4.3.1.8	Disolución de estándar interno de 1000 µg/mL (DES2).....	21
4.3.1.9	Disolución de estándar interno para el procesamiento de muestras (DES3).....	21
4.3.1.10	Solución de adecuabilidad del sistema.....	21
4.4	Software.....	21
4.5	Desarrollo de la metodología analítica.....	21
4.5.1	Fundamento analítico.....	21
4.5.2	Determinación del espectro de masas.....	22
4.5.3	Fragmentación selecta de masa / carga.....	23
4.5.4	Selección estándar interno.....	23
4.5.5	Pruebas de retención.....	24
4.5.6	Curva de calibración.....	24
4.5.7	Metodología inicial de extracción del analito.....	25
4.5.7.1	Evaluación del efecto del centrifugado de las muestras.....	27
4.5.7.2	Evaluación de la limpieza de la muestra.....	28
4.5.7.3	Evaluación del lavado del cartucho.....	29
4.5.7.4	Evaluación de la saturación de los cartuchos de SPE.....	29
4.5.7.5	Evaluación del uso del desemulsificante Q641-I (TRETOLITE DM046X DEMULSIFIER).....	30
4.5.8	Parámetros cromatográficos y espectrométricos Utilizados.....	32

4.6 Validación del método.....	33
4.6.1 Adecuabilidad del sistema.....	33
4.6.2 Selectividad.....	33
4.6.3 Efecto matriz.....	34
4.6.4 Efecto de acarreamiento (carry-over).....	34
4.6.5 Límite de cuantificación.....	34
4.6.6 Linealidad.....	34
4.6.7 Precisión.....	35
4.6.7.1 Repetibilidad.....	35
4.6.7.2 Reproducibilidad.....	36
4.6.8 Exactitud.....	36
4.6.9 Recuperación absoluta.....	36
4.6.10 Estabilidad.....	37
5. Resultados y Discusión.....	38
5.1 Determinación del espectro de masas.....	38
5.2 Fragmentación de masas selectas.....	40
5.3 Selección estándar interno.....	42
5.4 Pruebas de retención.....	43
5.5 Curva de calibración.....	49
5.6 Procedimiento de extracción en fase sólida en sistema y matriz del estándar interno junto con el trazador.....	50
5.7 Condiciones de optimización en el cartucho de extracción en matriz.....	50
5.7.1 Evaluación del efecto del centrifugado de las muestras.....	50
5.7.2 Evaluación de la limpieza de la muestra.....	52
5.7.3 Evaluación del lavado del cartucho.....	53
5.7.4 Evaluación de la saturación de los cartuchos de SPE.....	55
5.7.5 Metodología de extracción en fase sólida optimizada para cartuchos WCX de 200 y 60 mg.....	57

5.7.6 Evaluación del uso del desemulsificante Q641-I (TRETOLITE DM046X DEMULSIFIER).....	58
5.8 Validación del método.....	60
5.8.1 Adecuabilidad del sistema.....	60
5.8.2 Selectividad.....	60
5.8.3 Efecto matriz.....	62
5.8.4 Efecto de acarreamiento (carry-over).....	62
5.8.5 Límite de detección.....	65
5.8.6 Linealidad.....	65
5.8.7 Precisión.....	67
5.8.7.1 Repetibilidad.....	67
5.8.7.2 Reproducibilidad.....	67
5.8.8 Exactitud.....	68
5.8.9 Recobro.....	69
5.8.10 Estabilidad.....	70
6. Conclusiones.....	72
7. Referencias.....	73

a. Lista de abreviaturas

Abreviaturas	Significado
<i>ACN</i>	Acetonitrilo
<i>CAB</i>	Cabezal
<i>CaCO₃</i>	Carbonato de calcio
<i>Cl</i>	Cloro
<i>CNH</i>	Comisión Nacional de Hidrocarburos
<i>%CV</i>	Porcentaje de coeficiente de variación
<i>% DEA</i>	Porcentaje de desviación estándar absoluta
<i>EI</i>	Estándar Interno
<i>ESI</i>	Electrospray Ionization
<i>FDA</i>	Food and Drug Administration
<i>H</i>	Horas
<i>H₂O</i>	Agua
<i>HFBA</i>	Ácido Heptafluorobutírico
<i>HPLC -MS</i>	High Performance Liquid Cromatography – Mass Spectropy
<i>KV</i>	Kilo volts
<i>L</i>	Litro
<i>LDD</i>	Límite de Detección
<i>LIC</i>	Límite Inferior de Cuantificación
<i>LSC</i>	Límite superior de cuantificación
<i>MCA</i>	Muestra Control Alto
<i>MCB</i>	Muestra Control Bajo
<i>MCM</i>	Muestra Control Medio
<i>MeOH</i>	Metanol
<i>mg</i>	Miligramo
<i>mg/L</i>	Miligramos por litro
<i>min</i>	Minuto
<i>mL/L</i>	Mililitro por Litro

<i>mL/min</i>	Mililitro por Minuto
<i>mL/h</i>	Mililitro por Hora
<i>mS/cm</i>	Unidad de Conductividad
<i>mm</i>	Milímetros
<i>m/z</i>	Cociente masa-carga
<i>MΩ</i>	Mega Ohm
<i>ng/mL</i>	Nanogramos por mililitro
°C	Grados Celcius
<i>ppb</i>	Partes por billón
<i>TOF</i>	Tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés <i>time of fly</i>)
<i>r²</i>	Coefficiente de determinación
<i>SEMARNAT</i>	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
<i>SO₄</i>	Sulfatos
<i>SS</i>	Sólidos Sedimentables
<i>SST</i>	Sólidos Suspendidos Totales
<i>SPE</i>	Extracción en fase sólida (por sus siglas en inglés Solid Phase Extraction)
<i>SPR</i>	Saturación de Petróleo Residual
<i>UNAM</i>	Universidad Nacional Autónoma de México
<i>USIP</i>	Unidad de Servicios para la Industria Petrolera
<i>WCX</i>	Intercambio de cationes débiles (por sus siglas en inglés Weak Cation Exchange)
<i>μg/mL</i>	Microgramos por mililitro
<i>μL</i>	Microlitro

1. Introducción

Las compañías petroleras necesitan identificar y entender las anomalías, heterogeneidades e interconectividades de los yacimientos debido a que tienen varios proyectos de recuperación secundaria y mejorada. Las pruebas de trazadores son una herramienta adecuada para lograrlo, ya que ayudan a la descripción de estas heterogeneidades y proporciona información relevante del sistema roca-fluidos dentro del pozo. En México la mayoría de los pozos petroleros son del tipo carbonatados, es por estas características que los trazadores comerciales no son adecuados para su uso en ellos. Con la finalidad de llevar a cabo una prueba de trazadores en pozos carbonatados mexicanos, el Departamento de Ingeniería Química en conjunción con el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la UNAM y dentro del macro proyecto "185183 Proceso de recuperación Mejorada con la Tecnología de Inyección de Químicos (ASP) con Aplicación Mediante Prueba Piloto en el Campo Poza Rica", desarrollaron un nuevo trazador químico no reactivo nombrado USIP-TR-01 (p-trifluorometil N,N,N-trimetil-anilinio), el cual es un compuesto catiónico aromático fluorado que ha demostrado conservar un comportamiento de baja adsorción sobre la roca, una alta estabilidad térmica (150 – 175 °C) y una estabilidad química y biológica adecuadas. La molécula ha sido patentada en el marco de esta aplicación tecnológica como "SYNTHESIS PROCESS FOR THE PRODUCTION OF QUARTERNARY CATIONIC SALTS THAT ARE USEFUL

AS CHEMICAL TRACERS IN CARBONATE RESERVOIRS, AND PRODUCTS PRODUCED WITH SAME" Número de Publicación Internacional WO 2017/150962 A1. Fecha de publicación internacional 8 de septiembre de 2017 (08.09.2017).

Con la finalidad de usar este trazador dentro de un yacimiento seleccionado por el proyecto y conocer ciertas características relacionadas con el pozo, en el presente trabajo de investigación se desarrolló un método analítico para la

cuantificación del compuesto USIP-TR-01 a través de la cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución (QTOF) y extracción en fase sólida, en un rango de concentraciones de 1 a 30 ng/mL. Este método fue validado bajo recomendaciones internacionales y mostró ser altamente selectivo y sensible en una matriz tan compleja como lo es el agua congénita, logrando la cuantificación del citado compuesto fluorado en partes por billón.

2. Antecedentes

2.1. Trazadores

Inicialmente, el propósito del empleo de los trazadores era identificar el movimiento de los fluidos inyectados en la vecindad del pozo, o bien, para determinar la conexión o comunicación entre pozos, tal es el caso de su aplicación en los procesos de recuperación secundaria y mejorada. Posteriormente, debido a que las técnicas de detección llegaron a incrementarse, se pudo llegar a derivar información adicional más precisa o adecuada con el uso de estos trazadores. Por ejemplo, durante las operaciones de terminación de pozos, el uso de trazadores radioactivos y de herramientas de registros geofísicos espectrales como la de rayos gamma ha dado lugar a la capacidad de identificar la colocación de agentes sustentables en el área cercana del pozo.

En la recuperación secundaria y mejorada el uso de trazadores químicos/radioactivos ha permitido, no solamente predecir la canalización del fluido, si no también la determinación de las tendencias direccionales y barreras de flujo.

2.1.1. Pruebas de trazadores

Debido a que la producción de hidrocarburos en una primera fase no es completa en los yacimientos petroleros, se implementan procesos de recuperación mejorada para obtener mejores cantidades de aceite y gas remanente; sin embargo para el uso de estos procesos de recuperación es necesario conocer, entre otras cosas, las propiedades del flujo dentro del yacimiento. El conocimiento del movimiento de dichos fluidos es un elemento crucial en ambos procesos, el de la terminación de pozos y el de recuperación de hidrocarburos en un campo, para lograrlo se hace uso de las pruebas de trazadores; sin el conocimiento de esa información sería extremadamente difícil, si no es que imposible, el desarrollar un método para desplazar aceite en un yacimiento más eficiente, efectivo y bajo en costos.

En términos generales, se puede decir que una prueba de trazadores entre pozos en un yacimiento, consiste en la inyección de una sustancia (radioactiva o química) disuelta en el fluido de inyección y el monitoreo de su arribo en los pozos productores vecinos.

2.1.2. Tipos de trazadores

Los trazadores naturales y artificiales se han utilizado durante muchos años. Los trazadores naturales se definen como elementos presentes de forma natural en el entorno estudiado, por otra parte, los trazadores artificiales se definen como compuestos que no existen de manera natural en el depósito y que se introducen en este.

2.1.2.1. Trazadores naturales

Un trazador natural se utiliza para obtener información acerca del tiempo de la distribución de la producción, el origen del agua con la identificación de la

fuente productora y la contribución del agua inyectada al pozo productor. Algunos ejemplos de trazadores naturales son: SO_4^{2-} , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} , ^{18}O , ^2H , y ^{13}C .

2.1.2.2. Trazadores artificiales

Un trazador artificial es utilizado tanto para información cualitativa (conexiones entre pozos, la dirección del flujo, la vía del agua, la heterogeneidad) y la información cuantitativa (velocidades de los fluidos, permeabilidad, saturación de petróleo residual (SPR)). Algunos ejemplo de trazadores artificiales son: El anión ortofosfato (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}), ácidos benzoicos y alcoholes ligeros (metanol, etanol, isopropanol), cetonas y aldehídos, marcados con ^3H y ^{14}C .

2.1.3. Clasificación de trazadoresde acuerdo a su interacción con los fluidos del subsuelo

Los trazadores de acuerdo a su interacción con fluidos del subsuelo se dividen en pasivos y de partición.

Las diferencias entre un trazador pasivo y de partición es resultado de sus naturalezas químicas y de sus comportamientos físico-químicos particulares en el depósito de aceite.

2.1.3.1. Trazadores pasivos

El trazador pasivo tiene las mismas propiedades físico-químicas que el fluido en el que se inyecta (agua). También llamado "de no partición " o "trazador acuoso", se mueve a una velocidad aproximada a la fase agua sin reacciones químicas o interacciones (adsorción, intercambio iónico) con las fases de depósito (agua de formación, aceite) o con la roca a medida que avanza a

través del depósito de aceite. Un ejemplo de este tipo de trazadores son los ácidos carboxílicos aromáticos fluorados.

2.1.3.2. Trazadores de partición

El trazador de partición es soluble en diferentes proporciones en la fase oleosa como en el agua. Este fenómeno de partición con la parte aceitosa (interacciones físicas y químicas con la roca o los fluidos) provoca una "retraso cromatográfico" en la respuesta del trazador de partición en comparación con el trazador pasivo. Cuatro mecanismos puede afectar este retraso: un efecto de partición con los otros fluidos (petróleo), adsorción a la roca, intercambio iónico y de exclusión por tamaño. El primero mecanismo es el más importante y esperado para obtener la saturación residual de aceite.

2.2. Propiedades generales de Yacimientos en México

Se sabe que en el país el 66% de los yacimientos son carbonatados [CNH, 2012.]; las rocas sedimentarias que componen a estos yacimientos resultan de la litificación de precipitados químicos inorgánicos y orgánicos, así como algunos sedimentos terrígenos.

Estas rocas carbonatadas son del tipo rocas sedimentarias que poseen componentes que le confieren una carga global positiva, por lo que la interacción del trazador seleccionado con la roca debería ser mínima.

2.3. Agua congénita.

Se define como agua congénita al "agua asociada al hidrocarburo en el yacimiento y que surge durante la extracción del mismo" [NOM-143-SEMARNAT-2003]. El fluido dentro del pozo es agua de formación que también se encuentra dentro de la roca, asociada a la presencia de hidrocarburos,

formaciones de roca heterogéneas y sales disueltas, carbonatos, cloruros, sulfatos, entre otros. En la tabla 1 se muestra la composición del agua congénita que sirvió como matriz para el desarrollo y validación del método.

Tabla 1. Tabla de la composición y propiedades del agua congénita determinadas en la USIP.

Agua de CAB – Poza Rica	
<i>Agua proveniente de la CAB. Sin tratamiento previo</i>	
<i>Resultados de análisis</i>	
<i>Parámetro</i>	Resultado
<i>pH</i>	7.67
<i>Temperatura [°C]</i>	23.00
<i>Grasas y Aceites [mg/L]</i>	43.25
<i>Materia Flotante</i>	NA
<i>Sólidos sedimentables (SS) [mL/L]</i>	0.00
<i>Sólidos Suspendidos Totales (SST) [mg/L]</i>	24.50
<i>Demanda Bioquímica de Oxígeno [mg/L]</i>	191.96
<i>Fosforo Total [mg/L]</i>	32.44
<i>Sólidos Disueltos Totales [mg/L]</i>	27956.50
<i>Hidrocarburos Totales del Petróleo [mg/L]</i>	73.95
<i>Cianuros [mg/L]</i>	0.10
<i>Arsénico [mg/L]</i>	0.11
<i>Cadmio [mg/L]</i>	0.08
<i>Cobre [mg/L]</i>	0.29
<i>Cromo [mg/L]</i>	1.80
<i>Mercurio [mg/L]</i>	0.02
<i>Níquel [mg/L]</i>	0.42
<i>Plomo [mg/L]</i>	0.09
<i>Zinc [mg/L]</i>	0.03
<i>Dureza Total (como mg CaCO₃/L)</i>	5.765
<i>Dureza de Calcio (como mg de CaCO₃/L)</i>	4.132
<i>Cloruros Totales (como mg de Cl/L)</i>	18.000
<i>Alcalinidad Total (como mg de CaCO₃/L)</i>	1.161
<i>Sulfatos (como mg SO₄/L)</i>	32.98
<i>Conductividad (mS/cm)</i>	44.48
<i>Salinidad</i>	28.45

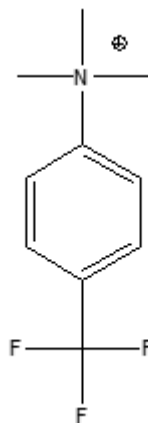
2.4. Estandar Interno

Es una cantidad conocida de un compuesto, diferente del analito, que se añade a la muestra problema. La señal del analito se compara con las del estándar interno, y de ese modo se determina el analito presente en el problema.

2.5. Trazador USIP-TR-01

El trazador USIP-TR-01 [yoduro de N,N,N, trimetil-(4-trifluorometil) anilinio] figura 1 es una molécula compuesta por una amina cuaternaria unida a un ciclo aromático, el cual tiene como sustituyente un triflorocarbono en la posición *para*. Este compuesto presenta una alta estabilidad química gracias a la unión carbono-flúor que es el más corto y por lo tanto el más fuerte y estable enlace carbón haluro. [C. Serres-Piole 2012].

Por otra parte, al presentar una carga positiva en la amina cuaternaria (sal de amonio) le permite tener una alta solubilidad en agua.



Exact Mass: 204,10

Figura 1. Molécula del trazador USIP-TR-01.

Las propiedades sobresalientes de este producto químico son: baja adsorción en la superficie mineral, alta solubilidad, fácilmente trazable, estabilidad térmica y estabilidad a alta fuerza iónica. El producto es un sólido de color blanquecino (entre blanco y amarillo pálido), en polvo, con olor característico. Es soluble en agua, metanol, etanol y dimetilformamida. Es ligeramente soluble en acetona e insoluble en acetato de etilo, diclorometano, cloroformo, dietil éter y hexano. En la tabla 2 se presentan las características fisicoquímicas del trazador USIP-TR-01.

Tabla 2. Características fisicoquímicas del trazador USIP-TR-01

PRUEBA	UNIDADES	Método	Especificaciones
<i>Contenido de activo</i>	>95%	1H_RMN	1H: 7.88(q), 4.74(s) 19F: -63(s)
<i>Apariencia</i>	Polvo	Inspección visual	Sólido blanquecino
<i>pH (al 0.2% en solución acuosa)</i>	4.5	Potenciometría	En agua desionizada.
<i>FTIR</i> (<i>Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier</i>)	cm ⁻¹	Reflectancia total atenuada (ATR)	1126, 1133, 1331, 3015 cm ⁻¹
<i>RMN de 1H y 19F</i>	ppm	Adquisición estándar	1H: 7.88(q), 4.74(s) 19F: -63(s)

2.6. Desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación de trazadores pasivos.

Para realizar el desarrollo de una metodología analítica de cuantificación, se debe tomar en cuenta las principales propiedades que caracterizan a la molécula y al sistema que la rodea. Con base en esas propiedades, se selecciona uno o

varios métodos adecuados para la extracción y detección del compuesto de interés y su posterior optimización de todos los procesos utilizados mediante la experimentación.

En el caso de trazadores pasivos no reactivos, esta descrita en la literatura algunos métodos basados en la cromatografía de líquidos y el uso de la espectrometría de masas. Por ejemplo se puede citar el trabajo realizado por Galdiga C. y colaboradores (1997) en el cual cuantifican ácidos carboxílicos aromáticos fluorados o Serres-Piole C. *et al.* (2011) que determinan ácidos carboxílicos fluorados en aguas del depósito de petróleo. La selección de estas técnicas permite la cuantificación del trazador a bajas concentraciones, sin embargo en varios de los casos, estas moléculas no son adecuadas para ser inyectadas en pozos carbonatados ó el volumen de muestra requerido para realizar el análisis puede llegar hasta 300 mL de muestra de agua.

Cabe mencionar que en la literatura, hasta la fecha de reporte de esta tesis, no existe mucha información sobre el desarrollo en particular de metodologías analíticas específicas para la cuantificación de trazadores en el pozo, por lo que se hace imprescindible el desarrollo de esta tecnología.

2.6.1. Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución acoplada a Espectrometría de masas

La cromatografía de líquidos ha resultado ser una herramienta muy poderosa y eficiente para la separación de mezclas complejas tanto de compuestos de bajo peso molecular como de proteínas y ácidos nucleicos.



Figura 2. Cromatografo de líquidos modelo 1290 infinity marca Agilent Technologies.

El sistema cromatográfico de fase reversa fue introducido por Howard y Marlin en 1950. Hasta ese momento, la cromatografía de líquidos se utilizaba básicamente para separar compuestos polares, siendo la fase estacionaria de un carácter altamente polar y la fase móvil poco polar (fase normal). Estos científicos revirtieron la polaridad de las fases con el objetivo de separar ácidos grasos. Así fue como surgió la cromatografía de fase reversa; aquella en la que la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar. Esta técnica proporciona retención y selectividad óptimas cuando las muestras tienen un carácter predominantemente alifático o aromático. (Esquivel y Leal UNAM, 2004).

Para la separación de moléculas pequeñas hay una preferencia en usar columnas C18 (sílicas con ligando n-octadecilo) logrando que dichas moléculas interactúen de manera eficaz con estas cadenas largas, generando así una

adsorción más fuerte de las moléculas y mejorando la retención en estas columnas.

Actualmente la resolución de moléculas de bajo peso molecular en las separaciones en fase reversa es óptima gracias a el uso de nuevas columnas cromatográficas con tamaño de partículas tan pequeñas como 1.8 micrones, que en conjunto con otros aspectos de la manufactura, permite tener un bajo valor de la altura de plato teórico, lo cual se traduce como mayor eficiencia de separación en un intervalo relativamente grande de flujo lineal. El cromatografo mostrado en la figura 2 fue acondicionado y optimizado bajo condiciones anteriormente mencionadas.

Uno de los ionizadores mas utilizados en el acoplamiento entre el HPLC y el espectrómetro de masas, es el ionizador tipo electrospray (ESI) Figura 3 y consiste en el proceso que se suscita cuando una disolución de la muestra se hace pasar a través de una aguja capilar de acero inoxidable a un flujo de algunos microlitros por minuto. La niebla de finas gotas cargadas resultantes pasa a través de un capilar de desolvatación en donde son conducidos a la parte de separación del analizador de masas. Debido a que las gotitas se vuelven más pequeñas por la evaporación del disolvente, su densidad aumenta produciéndose la desorción de los iones en la atmósfera gaseosa.

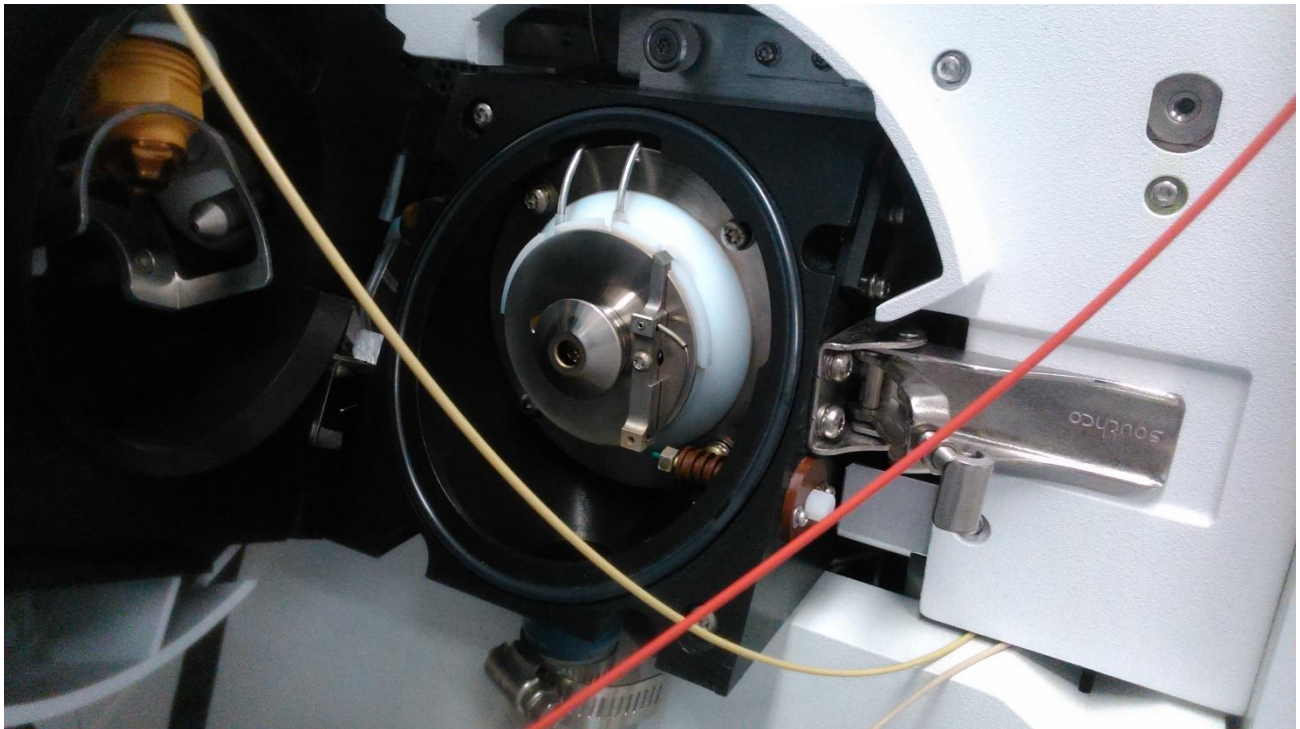


Figura 3. Ionizador tipo electrospray DUAL AJ ESI, Agilent technologies 6530

Existen varios modelos de analizadores de masas como son el tiempo de vuelo como el que se muestra en la figura 4, sector magnético, el triple cuadrupolo y la trampa de iones. En cada una de ellos el proceso de separación es diferente y deberá ser seleccionado según el tipo de análisis que se pretende realizar. En el caso de cuantificaciones de muestras complejas, es recomendable el uso de triple cuadrupolo o el tiempo de vuelo, siendo este último de alta resolución másica.

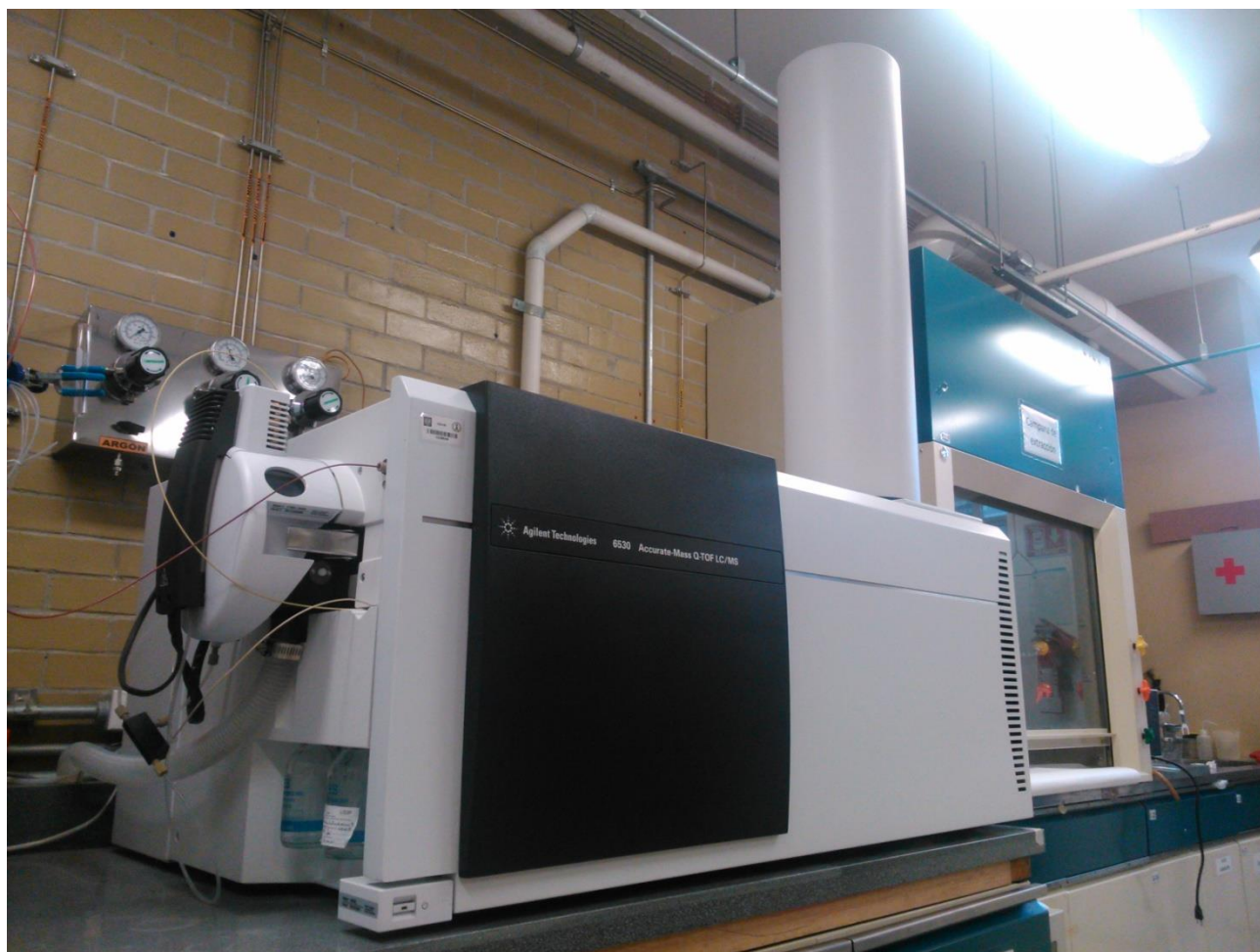


Figura 4. Espectrómetro de masas del tipo tiempo de vuelo (Q-TOF)

2.6.2. Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida SPE (figura 5) es una técnica preparativa que se utiliza para extraer de la muestra un analito en particular previamente a la cuantificación y/o para futura concentración del analito que está presente en la muestra. En la extracción en fase sólida el material base utilizado es un sólido, a través del cual pasa un líquido o un gas. Los analitos son adsorbidos en el soporte y luego eluidos de acuerdo a sus diferentes afinidades entre el material adsorbente y la fase móvil utilizada.

Al aplicar la muestra en la parte superior del lecho de adsorbente los contaminantes de matriz pueden pasar por la columna sin ser retenidos, y otros componentes de la matriz pueden retenerse más o menos fuertemente en

la superficie del adsorbente. El lavado permite la eliminación de una gran cantidad de compuestos que puedan interferir manteniendo los analitos en el lecho de adsorbente. Se pueden usar disolventes o mezcla de disolventes de diferente tipo para mejorar la eficacia del lavado.

Las trazas de disolvente se eliminan haciendo circular aire a través de la columna durante 2 a 10 minutos. Esta etapa mejora el la velocidad de concentración.



Figura 5. Equipo de extracción en fase sólida.

A continuación se adiciona un disolvente adecuado por la columna para eliminar la interacción en el cartucho y eluir el 100% de los compuestos de interés. El disolvente adecuado ha de tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con las demás impurezas, dejándolas en el lecho de adsorbente. El volumen de elución ha de ser el menor posible para mantener

alto el factor de concentración por ejemplo, los adsorbentes con partículas pequeñas de 30 a 50 μm requieren un menor volumen de elución que los adsorbentes con partículas mayores entre 90 y 140 μm). Finalmente los compuestos de interés se concentran evaporando el disolvente, utilizando por ejemplo un concentrador a vacío (ej. Vacufuge) o de corriente de nitrógeno (figura 6).

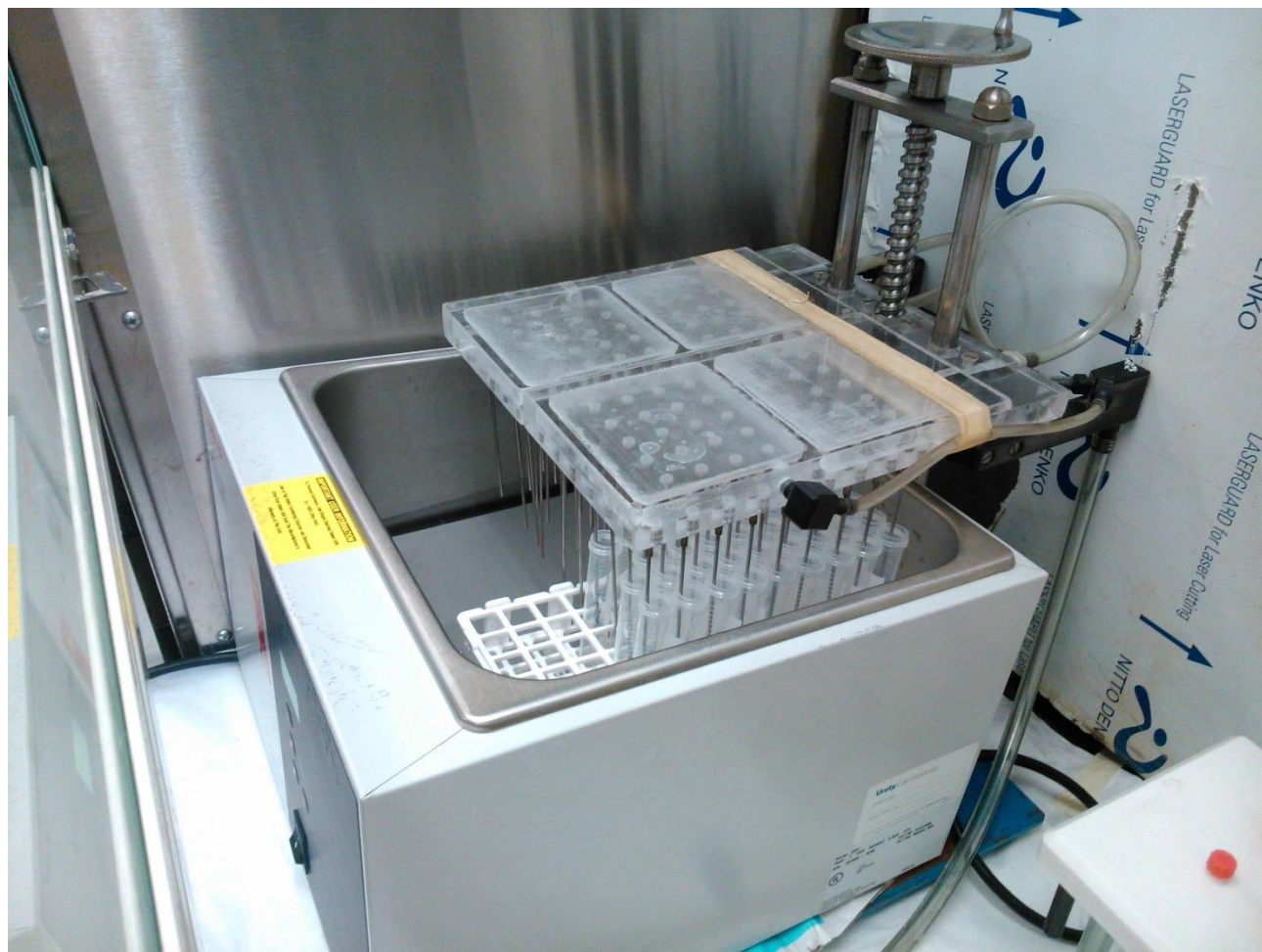


Figura 6. Equipo de concentración de muestras por corriente de gas nitrógeno.

2.7. Validación de método analítico.

Tomando en consideración las guías internacionales sobre el tema, se puede establecer en esta disertación que validación de un método analítico es el proceso documentado por el cual se demuestra que la metodología analítica

cumple con la función para la que fue creada, tomando como referencia y cumpliendo con parámetros y estándares de calidad específicos para el proceso de análisis.

A nivel internacional esta es un área en la que no se cuentan con guías específicas para la validación de métodos de cuantificación de trazadores pasivos en yacimientos sin embargo, varios documentos de orientación general sobre este tema han sido emitidos por varias organizaciones y conferencias internacionales. Todos estos documentos son potencialmente útiles para la validación de cualquier método.

Para los procedimientos cuantitativos, existe un acuerdo general de que al menos deben evaluarse los siguientes parámetros de validación: selectividad, modelo de calibración (linealidad), estabilidad, precisión (sesgo), precisión (repetibilidad, reproducibilidad) y el límite inferior de cuantificación (LLOQ). Parámetros adicionales que pueden ser relevantes incluyen límite de detección (LOD), recuperación, y robustez (robustez) [Frank T. Peters, 2006].

En el caso de métodos que involucren el uso de sistemas de separación y detección cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS) los experimentos para la evaluación de posibles efectos de la matriz (ME), es decir, supresión iónica o aumento de iones, siempre deben ser parte del proceso de validación, en particular si emplean la ionización por electrospray. [Frank T. Peters, 2006]

Debida a la complejidad de la matriz que conforma el agua congénita e implementando los puntos principales que debe abarcar esta validación, se tomaron en consideración guías que lidian con matrices complicadas como por ejemplo la guía de la FDA Draft Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation (Septiembre, 2013), así como también Validación de Métodos Analíticos (2016) y Guideline on bioanalytical method validation (2011), para cumplir con especificaciones normativas y parámetros confiables de validación.

3. Objetivos

3.1. General

- ❖ Desarrollar y validar un método analítico sensible para la cuantificación del trazador USIP-TR-01 en agua congénita perteneciente al pozo productor, utilizando la técnica instrumental Cromatografía Líquida de Ultra Alto Desempeño acoplada a un Espectrómetro de Masas de Alta Resolución (QTOF).

3.2. Particulares

- ❖ Establecer las condiciones instrumentales óptimas para la cuantificación del trazador USIP-TR-01.
 - ❖ Validar la metodología de acuerdo a las guías internacionales con la finalidad de cubrir los parámetros necesarios para la aplicación en un pozo productor.
-

4. Metodología

4.1. Reactivos

- Trazador USIP-TR-01, sintetizado por el grupo de investigación en síntesis orgánica de la Facultad de Química UNAM
- Ácido heptafluorobutírico (HFBA) Fluka-Sigma Aldrich 99%.
- Agua desionizada, obtenida *in situ* con el sistema Millipore con resistencia de 18 MΩ·cm
- Metanol grado cromatográfico
- Ácido fórmico
- Hidróxido de amonio

4.2. Materiales, equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de líquidos modelo 1290 infinity marca Agilent Technologies compuesto de un desgasificador y bomba binaria (G4220B); Termostato (G1330B); inyector (G4226A); y detector UV (G1314E)
- Detector espectrómetro de masas del tipo tiempo de vuelo (Q-TOF) equipado con un sistema de ionización tipo electrospray DUAL AJ ESI, Agilent technologies 6530
- Balanza analítica BEL Engineering, MARK205A
- Desionizador de agua Milli-Q, Millipore, Integral 5
- Infusionador Cole Parmer, 60061
- Vortex3, IKA, V35001
- Sonicador Cole Parmer, 8890
- Concentrador por corriente de nitrógeno gas
- Cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) Bont Elut WCX, Agilent Technologies.
- Viales ámbar 1.5 mL
- Insertos de plástico, 200 µL

- Columna cromatográfica Zorbax Eclipse plus C18; 2.1 x 50 mm; 1.8 Micron, Agilent Technologies
- Pre-columna 3PK Zorbax Eclipse Plus C18; 2.1 x 5 mm; 1.8 Micron, Agilent Technologies
- Micropipeta BRAND 100-1000 μ L, Transferpette
- Micropipeta Rainin 100-1000 μ L XIS
- Micropipeta Rainin 20-200 μ L XIS
- Micropipeta Rainin 2-20 μ L XIS

4.3. Soluciones

4.3.1. Preparación de soluciones

4.3.1.1 Solución de HFBA 20mM acuoso.

En un matraz volumétrico de 250 mL se agregan aproximadamente 50 mL de agua desionizada, a continuación se miden 650 μ L de HFBA concentrado y se agrega al matraz, una vez disuelto se lleva al aforo con agua desionizada. La solución se almacena en un frasco reservorio ámbar, este se somete a desgasificación por ultrasonido durante 20 minutos.

4.3.1.2 Acetonitrilo grado cromatográfico.

Se miden 250 mL de Acetonitrilo grado cromatográfico, se filtra en un equipo millipore y se vierte en un reservorio en el cual se somete a desgasificación durante 20 minutos.

4.3.1.3 Fase móvil.

Acetonitrilo grado cromatográfico, HFBA 20mM acuoso en una proporción de 17/83 respectivamente preparada mediante un mezclador por bombas cuaternarias integradas en el equipo.

4.3.1.4 Solución de Ácido fórmico al 5 % en metanol.

En un matraz volumétrico de 100 mL se agregan aproximadamente 20 ml de metanol, se miden 5 mL de ácido fórmico y se traspasa al matraz volumétrico, una vez disuelto se llevó al aforo con metanol. La solución se almacena en un frasco reservorio.

4.3.1.5 Solución concentrada de USIP-TR-01 (DS1).

En un tubo eppendorft con capacidad de 0.5 mL pesar en la balanza microanalítica 10 mg de trazador USIP-TR-01 (Pureza >95%) y disolverlo en 0.5 mL de agua desionizada; de la disolución se toma 0.5 mL para preparar 10 mL de la disolución (DS1) con una concentración de 1000 µg/mL (DS1).

4.3.1.6 Solución de USIP-TR-01 1µg/mL (DS2)

De la disolución DS1 se miden 50 µL se aforan a 50 mL con agua desionizada para obtener una solución final de 1 µg/mL.

4.3.1.7 Solución concentrada de estándar interno (DSE1)

Para la solución concentrada del estándar interno Q443-I (Pureza 95.5%), en un tubo eppendorf de 0.5 mL se pesa 10 mg de estándar interno y se disuelve en 0.5 mL agua desionizada.

4.3.1.8 Disolución de estándar interno de 1000 µg/mL (DES2)

Tomar 75 µL de la solución DSE1 para preparar 1.5 mL de estándar interno a una concentración de 1000 µg/mL (DES2).

4.3.1.9 Disolución de estándar interno para el procesamiento de muestras (DES3)

Tomar 65 µL de la solución DSE1 para preparar 13 mL de estándar interno en agua desionizada a una concentración de 100 µg/mL.

4.3.1.10 Solución de adecuabilidad del sistema.

Medir 5 µL de la solución DS2 y 25 µL de la solución DES2, se traspasan en un mismo tubo falcon de 15 mL, disolver en 5 mL de fase móvil ACN/HFBA 20 mM (17/83). La concentración final será de 1 µg/mL para USIP-TR-01 y 5 µg/mL. Para el estándar interno.

4.4 Software

Mass Hunter Work Station Software. Agilent technologies. Service Pack, conformado por: LC/MS Data acquisition Versión B.05.01, 2012; Quantitative analysis Versión B.05.01, 2012 y Qualitative Analysis Versión B.06.00, 2008.

4.5 Desarrollo de la metodología analítica

4.5.1 Fundamento analítico

La metodología analítica propuesta esta basada en las características químicas del compuesto USIP-TR-01 y lo encontrado en la literatura científica sobre trazadores.

El trazador trifluorado posee en su estructura una amina cuaternaria que confiere una carga positiva a la molécula, por lo que la determinación por espectrometría de masas es una óptima opción para determinar un fragmento con alta abundancia usando la polaridad positiva del instrumento. Por otra parte, con la finalidad de obtener retención en cromatografía de fase reversa, es necesario el uso de agentes modificantes de la fase móvil que permitan la mitigación de la carga. En este caso se seleccionó el ácido heptafluorobutírico como agente de par iónico. En el caso de la extracción y atendiendo a las características de la molécula, se propuso el uso de un sistema de extracción en fase sólida, utilizando cartuchos del tipo catiónico para realizar dicho proceso además este tipo de extracción, además de limpiar de la muestra y disminuir la probabilidad de que se presente el fenómeno de efecto de la matriz, permite la concentración de la muestra, obteniéndose así el aumento de la sensibilidad de la técnica analítica.

Se puede encontrar en la bibliografía científica algunos ejemplos de desarrollo de metodologías analíticas para trazadores. De acuerdo a los trabajos realizados por C. Serres y colaboradores (2011) para trazadores que pertenecen al grupo químico de ácidos fluorobenzoicos, el uso de columnas C18 permite una eficiente separación cromatográfica en un corto periodo de tiempo y una sensibilidad mejor en comparación de las columnas HILIC. En el caso que nos compete, se estable utilizar columnas del tipo C18 de alta eficiencia, con longitudes menores a 10 cm y un tamaño de partícula menores a 2 micras, que permite en su conjunto obtener una alta resolución y un tiempo de análisis menores a 10 minutos.

4.5.2 Determinación del espectro de masas

Para determinar el patrón de fragmentación, se utilizó el modo FULL-SCAN del instrumento. La muestra del trazador USIP-TR-01 (10 µg/mL) en agua desionizada o en fase móvil [H₂O/MeOH (50/50) y en H₂O/ACN (50/50)] se

infusionó a una velocidad de 5 mL por hora con la finalidad de obtener una alta abundancia de los fragmentos del compuesto.

4.5.3 Fragmentación selecta de masa / carga

Para realizar este estudio, el equipo se usó en la configuración de fragmentación. Se realizaron infusiones con una solución de 10 µg/mL del compuesto de interés, y se seleccionaron los fragmentos objetivos para conocer el patrón característico utilizando una energía de colisión entre 10 V y de 20 V.

4.5.4 Selección estándar interno

El uso del estándar interno dentro de un análisis proporciona la más alta precisión porque se evitan ciertas incertidumbres asociadas con la inyección y extracción de la muestra. En esta técnica, se introduce una cantidad conocida de estándar en cada una de las muestras y al término del análisis se utiliza la relación que existe entre áreas del analito de interés y al estándar interno para obtener la concentración del compuesto.

Debido a la presencia del estándar interno, es crítico asegurar que el pico del analito está separado del pico del estándar interno por lo que se sugiere tener una resolución mayor $> 1,5$ entre estos dos picos para dar una cuantificación fiable. Es importante resaltar que en espectrometría de masas, si el valor de la relación de masa / carga (m/q) de los iones del analito y el estándar interno difieren lo suficiente, al realizar la extracción del ión de ambas entidades químicas esta acción permite la completa determinación del área, por lo que el hecho de que coeluyan ambas entidades no afecta el análisis. Además, para cuantificar las respuestas del estándar interno de forma precisa, este no debe

estar presente como componente de la matriz y debe ser similar en naturaleza al analito en cuestión. [Chan, 2004]

4.5.5 Pruebas de retención

Las proporciones de fase móvil (HFBA 20mM en agua : ACN) que se ensayaron para obtener una retención adecuada para la metodología analítica fueron las siguientes: (20:80), (50:50), (80:20), (83:17), (85:15) y (87:13). Estas pruebas de retención se realizaron con muestras que contenían el trazador USIP-TR-01 y el EI a una concentración de 50 ng/mL cada uno.

4.5.6 Curva de calibración

Como primer estudio sobre la dependencia que guarda la respuesta y la concentración en este sistema, se realizaron curvas de calibración en agua desionizada utilizando las concentraciones de 3, 9, 18, 30, 120, 210, 270 y 300 ng/mL. Cabe mencionar que las respuestas cromatográficas obtenidas a estas concentraciones están relacionadas con el valor de la curva de calibración establecida constituida de 1 a 30 ppb del compuesto de interés.

Se preparó una disolución stock de 10 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto USIP-TR-01 en agua, para lo cual se pesó 10 mg del compuesto USIP-TR-01 y se aforó a un volumen de 10 mL. Posteriormente, se tomó una alícuota de 100 μL de la solución anterior para preparar 10 ml de una disolución de 10 $\mu\text{g/mL}$. Las diluciones para obtener la curva de calibración en agua se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Volúmenes necesarios para la preparación de la curva de calibración en agua desionizada.

Concentración (ng/mL)	Solucion stock a usar (µg/mL)	Volumen de solución µL	Volumen de aforo final
300	10	300	10
270	10	270	10
210	10	210	10
120	10	120	10
30	0.3	1000	10
18	0.3	600	10
9	0.3	300	10
3	0.3	100	10

Una vez listas las concentraciones de la curva se colocaron en sus respectivos viales para ser inyectadas en el equipo. Cabe indicar que se realizaron pruebas de adecuabilidad del sistema para verificar que el instrumento estuviera trabajando en condiciones reproducibles. Con los datos de las áreas obtenidas se calculó el %CV, el cual debe ser menor o igual al 2%.

4.5.7 Metodología inicial de extracción del analito

De acuerdo a las características químicas de la molécula y las propiedades de la matriz en la cual se encuentra el compuesto de interés, se propuso el siguiente procedimiento inicial de extracción en fase sólida (figura 7):

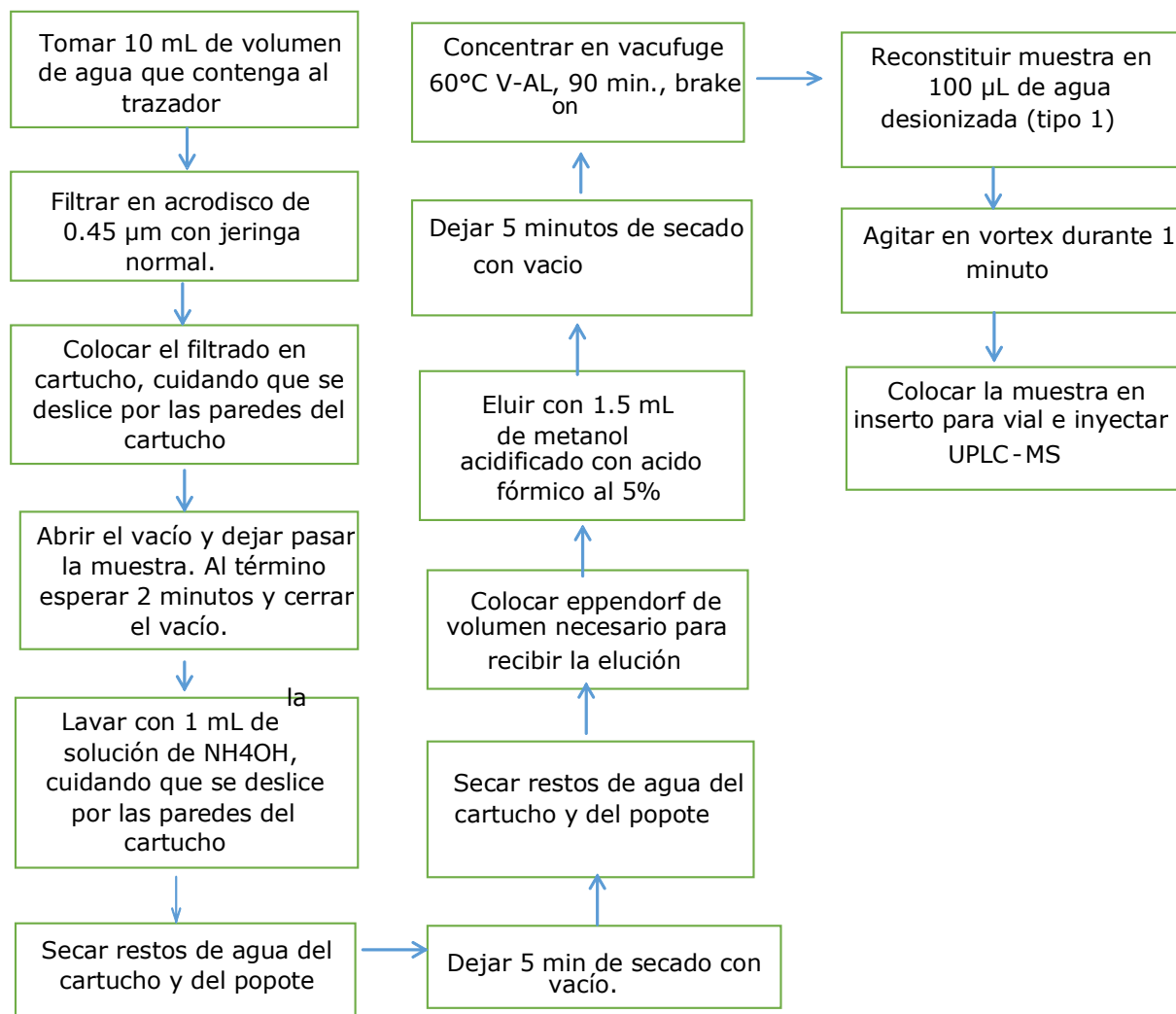


Figura 7. Procedimiento inicial de extracción en fase sólida

Para la extracción del compuesto de los cartuchos se utilizó una solución de ácido fórmico al 5 % en metanol, con la cual se garantiza la formación del ácido de los grupos carboxílicos en el cartucho y la liberación del trazador.

Se evaluó el proceso completo que se propuso preparando 2 muestras por duplicado, dos en agua desionizada y dos en agua congénita.

Las muestras se prepararon de la siguiente manera:

De una solución stock de 1 µg/mL, se tomaron 500 µL y se aforo a 10 mL utilizando agua desionizada o agua congénita según corresponda. Posteriormente estas muestras se sometieron al proceso de extracción en fase sólida y su posterior inyección en el equipo de cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a espectrómetro de masas (QTOF).

4.5.7.1 Evaluación del efecto del centrifugado de las muestras

Con la finalidad de realizar la optimización de la extracción, se desarrollaron diversos experimentos.

En el caso del efecto del tiempo de centrifugación, las muestras se someten al proceso de extracción sin usar los acrodiscos y centrifugando después de agregar los 400 µL de NH₄OH al 5% en agua durante el proceso de extracción en fase sólida.

La curva de calibración se preparó como se muestra en la tabla 4 en tubos falcon de 12 mililitros:

TABLA 4. Preparación de la curva de calibración para la prueba de centrifugación.

Muestra	Estándar Interno (0.56 µg/mL)	USIP-TR-01 (0.5µg/mL)	Agua congénita completar a
<i>Blanco</i>	-	-	10mL
<i>Cero</i>	560 µL	-	10 mL
<i>0.1 ng/mL</i>	560 µL	2 µL	10 mL
<i>0.3 ng/mL</i>	560 µL	6 µL	10mL
<i>1 ng/mL</i>	560 µL	20 µL	10mL
<i>10 ng/mL</i>	560 µL	200 µL	10mL
<i>20 ng/mL</i>	560 µL	400 µL	10mL
<i>30 ng/mL</i>	560 µL	600 µL	10mL
<i>40 ng/mL</i>	560 µL	800 µL	10mL
<i>50 ng/mL</i>	560 µL	1000 µL	10mL

4.5.7.2 Evaluación de la limpieza de la muestra

Para esto se usaron varios pre-tratamientos, como el basificar la muestra con 200 μL de NH_4OH al 5 % en agua y otro agregar agua desionizada. Estos cambios de pH se realizan con la finalidad de precipitar cationes o aniones presentes en el agua congénita y así obtener teóricamente una mejor limpieza.

Pretratamiento P.A.

Se toman 30 mL de muestra de agua congénita con trazador, se adicionaron 200 μL de la solución de estándar interno y se agitó en vórtex por espacio de 60 segundos. A las muestras se les adicionó 1.5 mL de NH_4OH al 5%. Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 4000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se colocó en el cartucho de extracción, el cual después fue lavado con 2 mL de NH_4OH al 5% en agua. Se eluyó con 4mL de metanol acidificado (ácido fórmico) al 5%. La muestra fue concentrada 2 h, a 60 °C con vacío en el sistema Vacufuge. El sólido fue reconstituido en fase móvil (100 μL) e inyectado al UHPLC-MS para su análisis.

Pretratamiento P.B.

Se toman 30 mL de muestra de agua congénita con trazador, se adicionaron 200 μL de la solución de estándar interno y se agitó en vórtex por espacio de 60 segundos. En este punto, a las muestras se les adicionó 1.5 mL de agua. Posteriormente dicha muestra fue centrifugada 15 minutos a 4000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se colocó en el cartucho de extracción, el cual después fue lavado con 2 mL de NH_4OH al 5% en agua. Se eluyó con 4mL de metanol acidificado (ácido fórmico) al 5%. La muestra fue concentrada 2 h, a 60 °C con vacío en el sistema Vacufuge. El sólido fue reconstituido en fase móvil (100 μL) e inyectado al UHPLC-MS para su análisis.

4.5.7.3 Evaluación del lavado del cartucho

Para esto se usaron dos métodos de lavado:

Tratamiento L.A.

Se tomaron 5 mL de muestra de agua congénita y se colocó esta cantidad en un tubo Falcon con capacidad de 15 mL. Se centrifugó en el sistema Eppendorf por 10 minutos. La muestra fue colocada de forma directa en el cartucho de extracción de fase sólida. El proceso continuó con un lavado con agua de 2 mL. Inmediatamente después de haber secado los cartuchos con el vacío, se eluyó con 1.5 mL de MeOH c/ ácido fórmico al 5%. La muestra fue concentrada utilizando el sistema de corriente de nitrógeno gas (45 °C, 1 hora), el sólido reconstituido en 100 µL de FM y se inyectó 20 µL al sistema acoplado UHPLC-MS.

Tratamiento L.B.

Se tomaron 5 mL de muestra de agua congénita y se colocó esta cantidad en un tubo Falcon con capacidad de 15 mL. Se centrifugó en el sistema Eppendorf (usando el rotor para Falcon) por 10 minutos. La muestra fue colocada de forma directa en el cartucho de extracción de fase sólida. El proceso continuó con un lavado con agua de 2 mL. Luego, se realizó un lavado con 1 mL de MeOH grado HPLC. Después de haber secado los cartuchos con el vacío, se eluyó con 1.5 mL de MeOH c/ ácido fórmico al 5%. La muestra fue concentrada utilizando el sistema de corriente de nitrógeno (45 °C, 1 hora), el sólido reconstituido en 100 µL de FM y se inyectó 20 µL al sistema acoplado UHPLC-MS.

4.5.7.4 Evaluación de la saturación de los cartuchos de SPE

Es necesario conocer cuanta muestra se puede utilizar antes de saturar el cartucho de extracción con componentes de la matriz ya que al aumentar la cantidad de muestra no garantiza un aumento de la respuesta.

Procedimiento de extracción S.A.

Se toman con exactitud 10 mL de muestra, la cual se centrifugó a 1400 rpm X 15 minutos. El sobrenadante se colocó de manera directa en el cartucho de extracción en fase sólida, el cual fue lavado con 2 mL de H₂O, seguido de 1 mL de MeOH. Los compuestos retenidos en el cartucho SPE WCX de Agilent fueron eluidos con 1.5 mL de MeOH acidificado (HCOOH) al 5%. Posteriormente el residuo fue concentrado en el sistema de corriente de nitrógeno (45 °C y 60 minutos), el residuo reconstituido en 100 µL se fase móvil y se inyectaron 20 µL al sistema UHPLC-MS (QTOF).

Procedimiento de extracción S.B.

Se toman con exactitud 15 mL de muestra, la cual se centrifugó a 4000 rpm X 15 minutos. El sobrenadante se colocó de manera directa en el cartucho de extracción en fase sólida, el cual fue lavado con 2 mL de H₂O, seguido de 2 mL de MeOH. Los compuestos retenidos en el cartucho SPE WCX de Agilent fueron eluidos con 1.5 mL de MeOH acidificado (HCOOH) al 5%. Posteriormente el residuo fue concentrado en el sistema de corriente de nitrógeno (45 °C y 60 minutos), el residuo reconstituido en 100 µL de fase móvil, se agitó vigorosamente por 2 minutos en el vórtex, se pasaron a un inserto de plástico (el cual se coloca adentro de un vial de 2 mL) y se inyectaron 20 µL al sistema UHPLC-MS (QTOF).

4.5.7.5 Evaluación del uso del desemulsificante Q641-I (TRETOLITE DM046X DEMULSIFIER)

Debido a que las muestras de agua congénita se encuentran en emulsión fue necesario implementar un pre tratamiento para romper este equilibrio y así obtener las muestras de agua para su análisis. Este pre tratamiento consta de la adición del compuesto nombrado de manera interna Q641-I el cual es un producto químico comercial que es denotado como TRETOLITE DM046X DEMULSIFIER, por lo que es necesario evaluar si este compuesto no interfiere en la cuantificación del trazador USIP-TR-01.

Para realizar la prueba se añadió el desémulsificante directamente a las muestras que contiene al trazador, el desémulsificante se colocó al 0.025% volumen final de la muestra (30 mL). Para realizar esta prueba se preparó en agua congénita un blanco y una muestra de 50 ng/mL de trazador ambas sin desémulsificante y otro blanco junto con otra muestra de 50 ng/mL ambas con desémulsificante.

Se realizó las siguientes diluciones para llegar al 0.025% de desémulsificante: Se tomó 1 mL de desémulsificante y se aforó a 10 mL con agua desionizada, de esta solución se tomaron 0.075 mL y se aforó a 30 mL con la matriz correspondiente.

Después de preparar las muestras con y sin desémulsificante, se sometieron al siguiente proceso de extracción: Se tomaron de manera exacta 30 mL de muestra y se centrifugó por espacio de 15 minutos a 400 rpm. Posteriormente se tomó 5 mL del sobrenadante con una jeringa de plástico, se filtró la muestra utilizando un acrodisco (40 μ m de poro) y el filtrado se colocó en un cartucho SPE Nexus WCX de 200 mg. El sistema fue lavado con 5 mL de agua y después con 3 mL de MeOH. Después se realizó una elución con 6 mL de MeOH c/ HCOOH 5%, se concentró a sequedad utilizando un sistema de corriente de nitrógeno (45 °C, 60 minutos). Por último la muestra fue reconstituida en 100 μ L de fase móvil, se tomaron 50 μ L de esta solución, se colocaron en un microvial de plástico con capacidad de 200 μ L y se inyectaron 20 μ L al sistema UHPLC-MS.

4.5.8 Parámetros cromatográficos y espectrométricos utilizados.

TABLA 5. Parametros utilizados en los equipos

Columna	Eclipse Plus C18, 1.8 micrones (Agilent) Zorbax 2.1 x 5mm
Guarda columna	UHPLC GUARD Zorbax eclipse Plus C18 2.1 x 5 mm, 1.8 micrometros
Volumen de inyección de la muestra	20 microlitros
Flujo	0.3
Fase móvil	Agua c/HFBA 20 mM/ ACN
Temperatura de horno (derecho e izquierdo)	30°C
Detección MS o MS/MS	MS
Fuente de iones	DUAL AJS ESI
Polaridad de iones	Positivo
Temperatura de gas	250°C
Gas de secado	10 L/min
Nebulizador	40 psig
Temperatura del gas de cubierta	350 °C
Flujo del gas de cubierta	10 L/min
Fragnetador MS (TOF)	175 V
Skimmer	65 V
OCT RF Vpp	750 V
Energia de colisión	10 V
Voltaje de capilar	2500

4.6 Validación del método

4.6.1 Adecuabilidad del sistema

La exactitud y precisión de los datos obtenidos a partir de cualquier sistema de medición dependerán en gran medida de que el sistema se comporte adecuadamente. La adecuabilidad del sistema de medición provee información necesaria para asegurar que el sistema se comporta de manera consistente y exacta de acuerdo a las especificaciones durante las etapas de la validación y la aplicación del método analítico.

Según la FDA La adecuabilidad del sistema se evalúa rutinariamente antes de una ejecución analítica. Las muestras de adecuabilidad del sistema deben ser diferentes de las muestras del estudio, las normas y los puntos control para ser analizados en la prueba.

Para evaluar la calidad de la respuesta, antes de cada corrida analítica se inyectaron por sextuplicado una muestra del trazador USIP-TR-01 a una concentración de preparada en fase móvil, se evaluó el %C.V. De las respuestas obtenidas. Este no debe sobrepasar el 2% [FDA, 2013].

4.6.2 Selectividad.

La selectividad se define como la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros componentes en la muestra. Se debe proporcionar evidencia de que la sustancia cuantificada es el analito deseado.

Para lograr esto se deben obtener análisis de muestras en blanco de la matriz biológica apropiada de al menos seis fuentes. Cada muestra en blanco debe someterse a pruebas de interferencia, y la selectividad debe garantizarse en el límite inferior de cuantificación (LIC).

4.6.3 Efecto matriz

Se define como la alteración o interferencia directa o indirecta en las respuestas espectrométrica debido a la presencia de analitos no deseadas (para el análisis) u otras sustancias pertenecientes a la matriz.

El factor matriz (FM) es la relación (respuesta matriz/respuesta solución) de la respuesta de pico en presencia de iones de matriz entre la respuesta de pico en ausencia de iones de matriz (solución pura del analito) de al menos 6 muestras que incluyen los puntos control bajo y alto. El FM normalizado con estándar interno se obtiene sustituyendo la respuesta de pico con la relación de pico de respuesta y estándar interno (analito / IS). El % CV debe ser ≤ 15 %. [EMA, 2011].

4.6.4 Efecto de acarreamiento (carry-over)

Al efecto generado por la aparición o aumento de la señal del analito o estándar interno causado por la contaminación de muestras anteriores se le conoce como efecto de acarreamiento [NOM-177-SSA1-2013]. Este efecto debe ser evaluado y monitoreado durante el análisis. Si se presenta este fenómeno, debe ser mitigado o reducido.

4.6.5 Límite de detección

La concentración más baja de un analito que el procedimiento bioanalítico puede diferenciar con fiabilidad del ruido de fondo. (FDA).

4.6.6 Linealidad

Una curva de calibración (estándar) es la relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas del analito. La relación entre respuesta y concentración debe ser continua y reproducible. Una curva de calibración debe consistir en una muestra en blanco (muestra matricial

procesada sin analito o patrón interno), una muestra cero (muestra matricial procesada sin analito pero con patrón interno) y al menos seis muestras distintas de cero (muestras matriciales procesadas con analito y estándar interno) que cubre el rango esperado, incluyendo LLOQ.

Los estándares no deben desviarse en más del 15% de las concentraciones nominales, excepto en LLOQ donde la concentración no debe desviarse en más del 20%.

El criterio de aceptación de la curva estándar es que al menos el 75% de los estándares distintos de cero deben cumplir con los criterios anteriores, incluyendo el LLOQ. La exclusión de una estándar individual no debe cambiar el modelo utilizado.

4.6.7 Precisión

La precisión de un método analítico describe la cercanía de las medidas individuales de un analito cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de un único volumen homogéneo de matriz biológica.

La precisión debe medirse utilizando un mínimo de cinco determinaciones por concentración. Se recomienda un mínimo de tres concentraciones en el rango de concentraciones esperadas de la muestra del estudio. La precisión determinada a cada nivel de concentración no debe exceder el 15% del coeficiente de variación (CV), excepto para el LLOQ, donde no debe exceder el 20% del CV.

La precisión se subdivide en repetibilidad y reproducibilidad (FDA).

4.6.7.1 Repetibilidad

La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación dentro de un intervalo de tiempo reducido (1 día). La repetibilidad se denomina también precisión intra-ensayo. (Sanchez, 2016).

4.6.7.2 Reproducibilidad

La precisión entre series es una evaluación de la precisión en el tiempo y puede involucrar a diferentes analistas, equipos, reactivos y laboratorios.

La reproducibilidad del método se evalúa mediante mediciones repetidas usando el ensayo, incluyendo los controles de calidad en distintos días. (FDA).

4.6.8 Exactitud

La exactitud de un método analítico describe la cercanía de los valores medios obtenidos por el método durante el ensayo con el valor real (concentración) del analito. La exactitud se determina mediante el análisis repetido de muestras que contienen cantidades conocidas del analito. La exactitud debe medirse utilizando un mínimo de cinco determinaciones por concentración. Se recomienda un mínimo de tres concentraciones en el rango de concentraciones esperadas del estudio. El valor medio debe estar dentro del 15% del valor nominal excepto en LLOQ, donde no debe desviarse en más del 20%. La desviación de la media del valor nominal sirve como medida de exactitud.

4.6.9 Recuperación absoluta

La recuperación de un analito en un ensayo es la respuesta del detector obtenida a partir de una cantidad del analito añadido y extraído de la matriz, en comparación con la respuesta del detector obtenida para la concentración verdadera del analito en disolvente. La recuperación se refiere a la eficiencia de extracción de un método analítico dentro de los límites de la variabilidad. La recuperación del analito no debe ser del 100%, pero el grado de recuperación de un analito y del patrón interno debe ser consistente, preciso y reproducible. Los experimentos de recuperación deben realizarse comparando los resultados analíticos de las muestras extraídas a tres concentraciones (baja, media y alta) con patrones no extraídos que representan una recuperación del 100%.

4.6.10 Estabilidad

La estabilidad química de un analito en una matriz dada bajo condiciones específicas para intervalos de tiempo dados se evalúa de varias maneras. Las evaluaciones de estabilidad antes del estudio deben cubrir las condiciones esperadas de manipulación y almacenamiento de la muestra durante la realización del estudio.

Las condiciones utilizadas en los experimentos de estabilidad deben reflejar las situaciones que probablemente se presenten durante el manejo y análisis reales de la muestra. Si, durante el análisis de la muestra para un estudio, las condiciones de almacenamiento cambiaran y / o excedieran las condiciones de almacenamiento de la muestra evaluadas durante la validación del método, debería establecerse estabilidad bajo estas nuevas condiciones.

Todas las determinaciones de estabilidad deben utilizar un conjunto de muestras preparadas a partir de una solución madre recién hecha del analito en la matriz biológica libre de analitos, libre de interferencias. Las soluciones madre del analito para la evaluación de la estabilidad deben prepararse en un disolvente apropiado a concentraciones conocidas. Las muestras de estabilidad deben compararse con los calibradores recién hechos y / o los QC recién hechos. Deben evaluarse al menos tres repeticiones en cada una de las concentraciones bajas y altas. Los resultados de la muestra de estabilidad deben estar dentro del 15% de las concentraciones nominales.

5 Resultados y Discusión

5.1 Determinación del espectro de masas.

En las figuras 8 y 9 se muestra el espectro de masas para el compuesto USIP-TR-01.

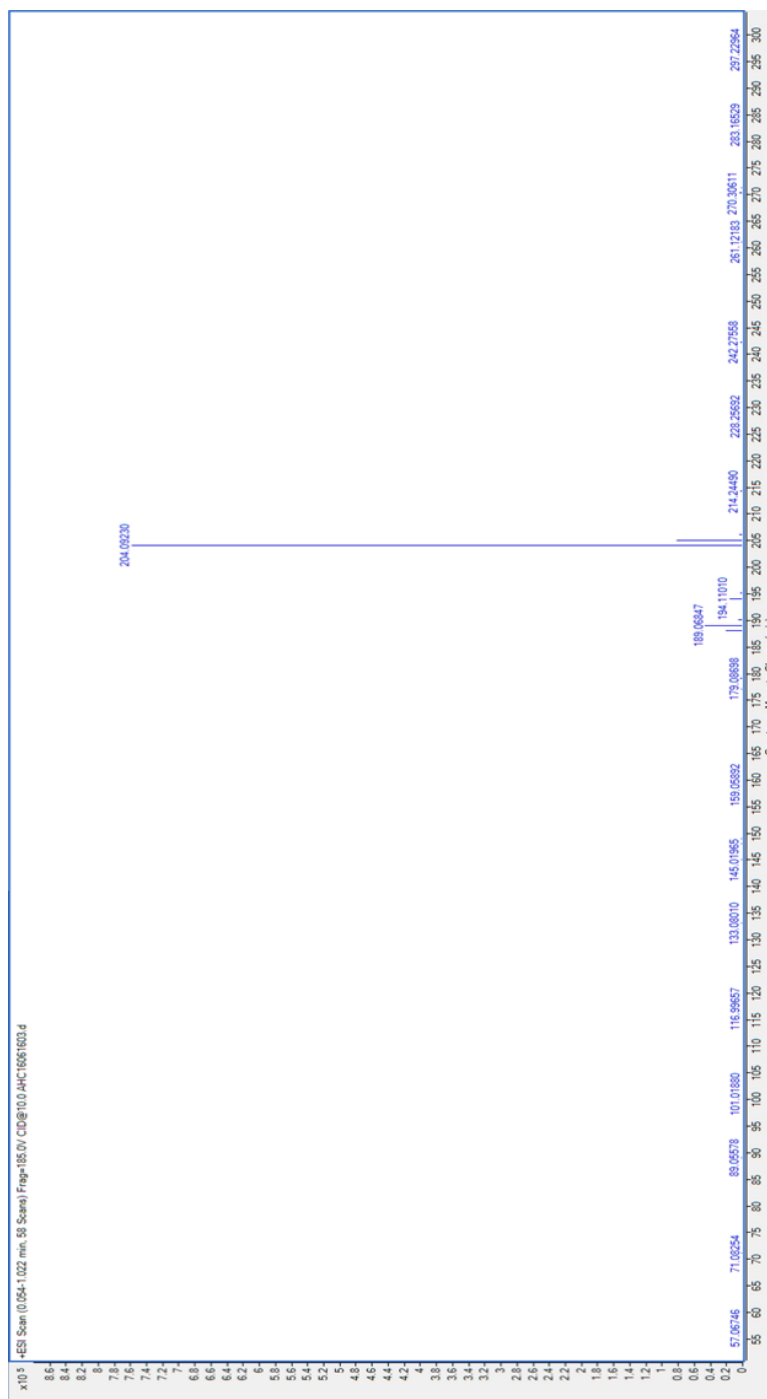


Figura 8. Identificación del Ion en MeOH/H₂O (50/50).

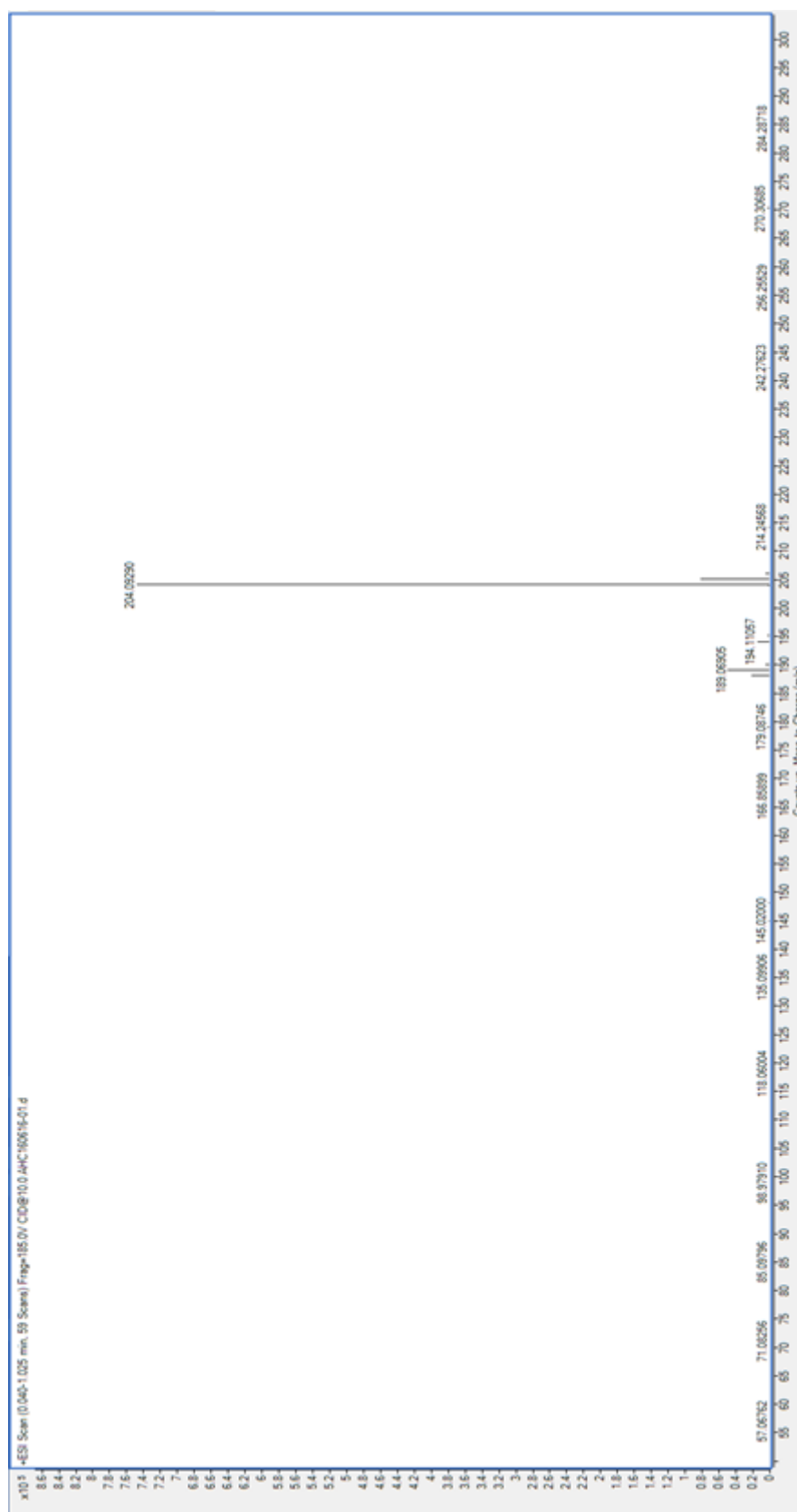


Figura 9. Identificación del Ion en ACN/H₂O (50/50).

El ion que se identifica correspondiente al compuesto es el 204.09 m/z en ambas fases móviles. El análisis en ambas disoluciones no presenta ninguna

interacción con el disolvente que afecte la abundancia del ión perteneciente al ión de interés.

5.2 Fragmentación de masas selectas

La fragmentación de varios enlaces químicos pertenecientes al analito de interés permite la producción de patrones de fragmentación que son característicos para esta molécula en condiciones experimentales específicas. En las figuras 10 y 11 se muestra los resultados obtenidos.



Figura 10. Fragmentación del Ion 204.09 m/z con una energía de colisión de 10

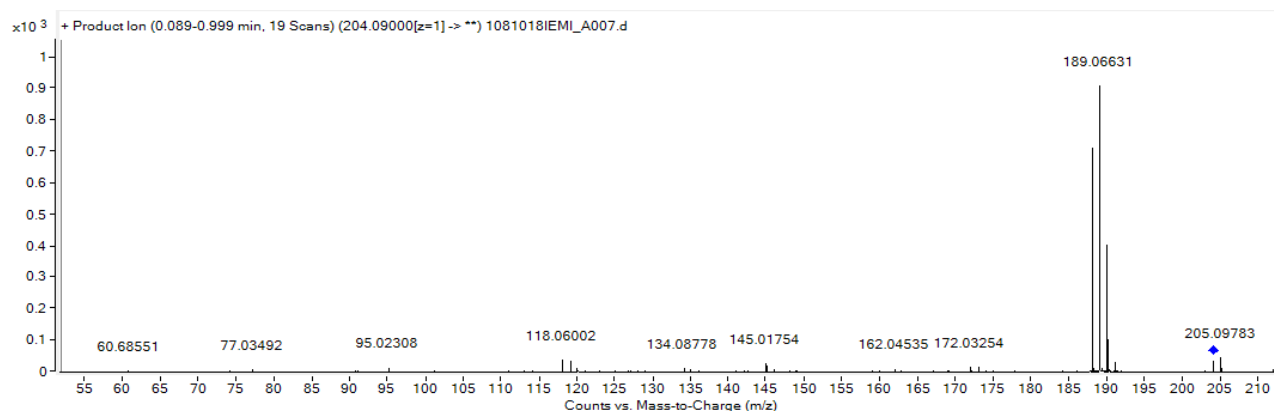


Figura 11. Fragmentación del ion 204.09 m/z con una energía de colisión de 20.

Se observan distintos iones siendo los principales los siguientes: 189 m/z que corresponde a la pérdida de un metilo; el fragmento 172 m/z que indica pérdida de 2 metilos; el ion con una m/z de 145 que corresponde a la pérdida

de un nitrógeno y 3 metilos y finalmente el ion con una m/z de 118 que corresponde a la pérdida de un 3 flúor y 2 metilos. Estos patrones de fragmentación se muestran en la figura 12.

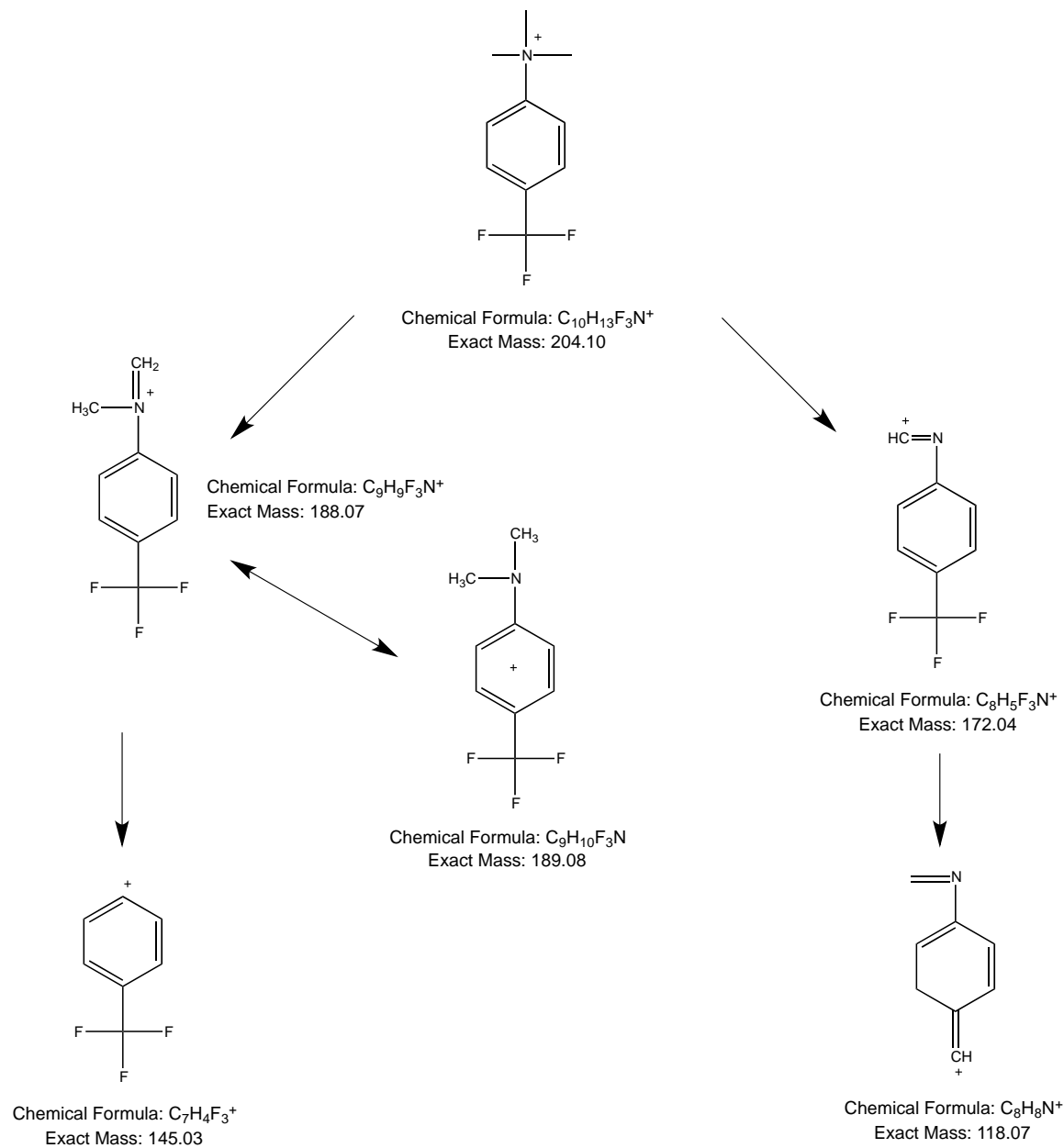


Figura 12. Patrón de fragmentación del ion 204.09 m/z .

5.3 Selección estándar interno

El estándar interno seleccionado fue el compuesto Q443-I [yoduro de 4-fluoro-N, N, N, trimetil-anililio] (figura 13), ya que este pertenece a la misma familia de moléculas orgánicas fluoradas que el compuesto USIP-TR-01 y por lo tanto se espera que presente resultados similares.

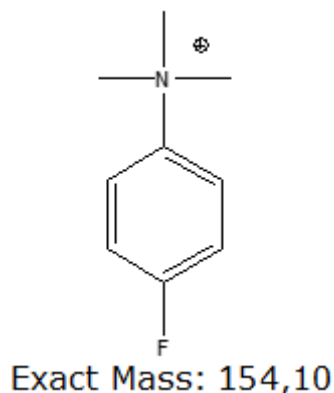


Figura 13. Molécula del estándar interno Q443-I.

Estos resultados se muestran en las pruebas de retención realizadas para ambos compuestos en una misma solución. A continuación se presenta en la figura 14 el espectro de masas del estándar interno, en el cual se observa que el ion característico es el 154.10 m/z.

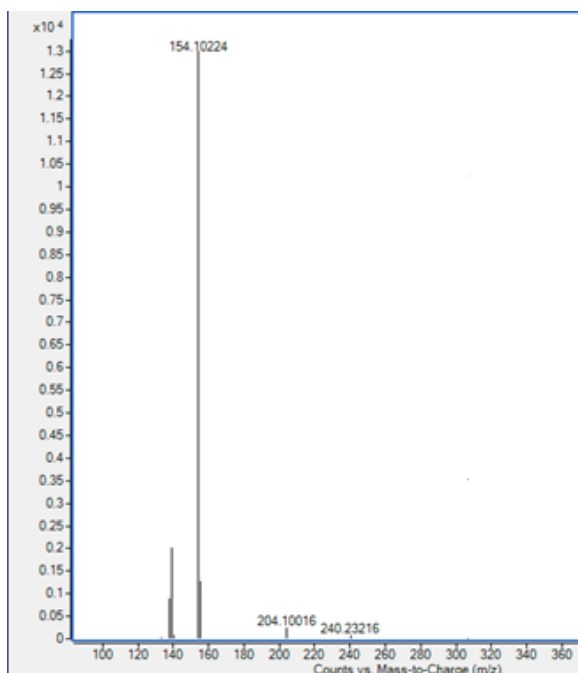


Figura 14. Espectro del estándar interno Q443-I con un valor de 154.10 m/z.

5.4 Pruebas de retención

A continuación se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de retención realizadas. Se monitoreó el ion 204.13 m/z perteneciente al compuesto USIP-TR-01 y el 154.12 m/z que corresponde al estándar interno (molécula monofluorada).

Tabla 6. Resultados en fase móvil 50/50 ACN/HFBA 20mM, 50ng/mL para ambos compuestos.

<i>ACN/HFBA 20 mM (50/50)</i>				
<i>Inyección</i>	<i>Área USIP-TR-01</i>	<i>Tiempo de retención</i>	<i>Área EI</i>	<i>Tiempo de retención</i>
1	875423.39	0.751	116110.02	0.7
2	773230.05	0.741	112940.68	0.707
3	877960.77	0.752	124139.48	0.702



Figura 15. Cromatograma del compuesto USIP-TR-01 ($Tr = 0.75$) y Estándar interno ($Tr = 0.7$) en fase móvil con una proporción 50/50 ACN/HFBA 20mM, 50ng/mL para ambos compuestos.

Tabla 7. Resultados en fase móvil 25/75 ACN/HFBA 20mM, 50ng/mL para ambos compuestos.

ACN/HFBA 20 mM (25/75)				
<i>Inyección</i>	Área USIP-TR-01	Tiempo de retención	Área EI	Tiempo de retención
1	1058865.03	2.022	147457.25	1.055
2	998335.56	1.928	141393.19	1.044
3	1030374.36	1.929	135102.42	1.045

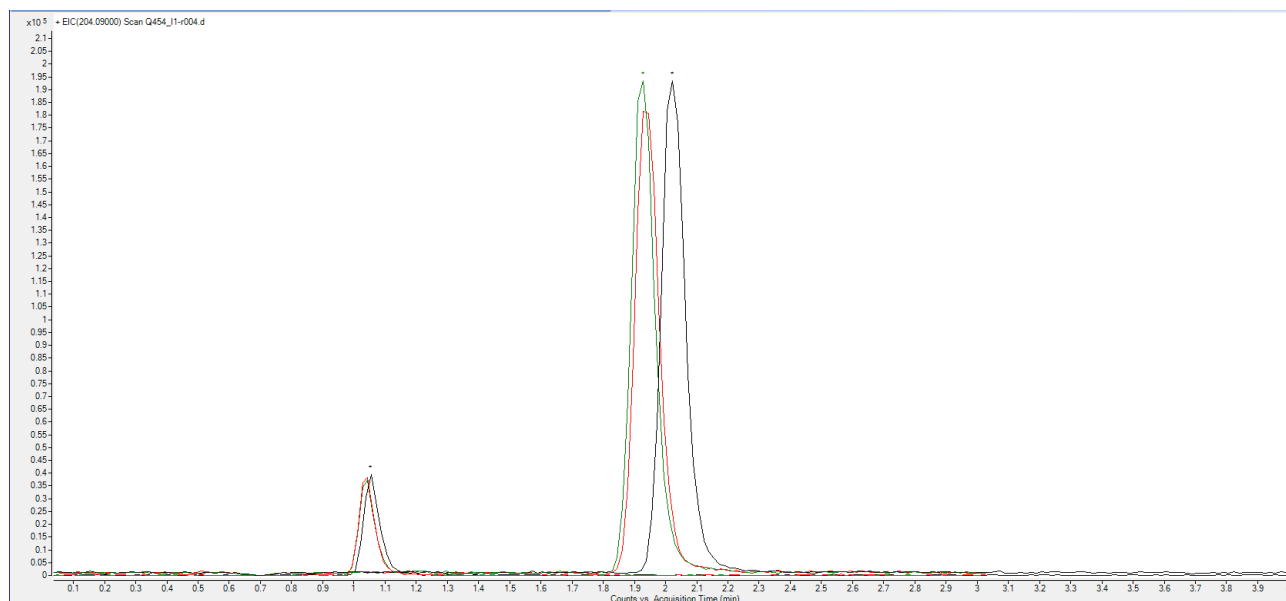


Figura 16. Cromatograma del compuesto Q454-I ($Tr = 2$) y Estándar interno ($Tr = 1.05$) en fase móvil con una proporción 25/75 ACN/HFBA 20mM, 50ng/mL para ambos compuestos.

Tabla 8. Resultados en fase móvil 20/80 ACN/HFBA 20mM, 50ng/mL para ambos compuestos.

<i>ACN/HFBA 20 mM (20/80)</i>				
<i>Inyección</i>	Área USIP-TR-01	Tiempo de retención	Área EI	Tiempo de retención
1	1053579.49	3.57	137452.12	1.369
2	1146834	3.574	151114.26	1.373
3	1076724.9	3.593	138842.67	1.392

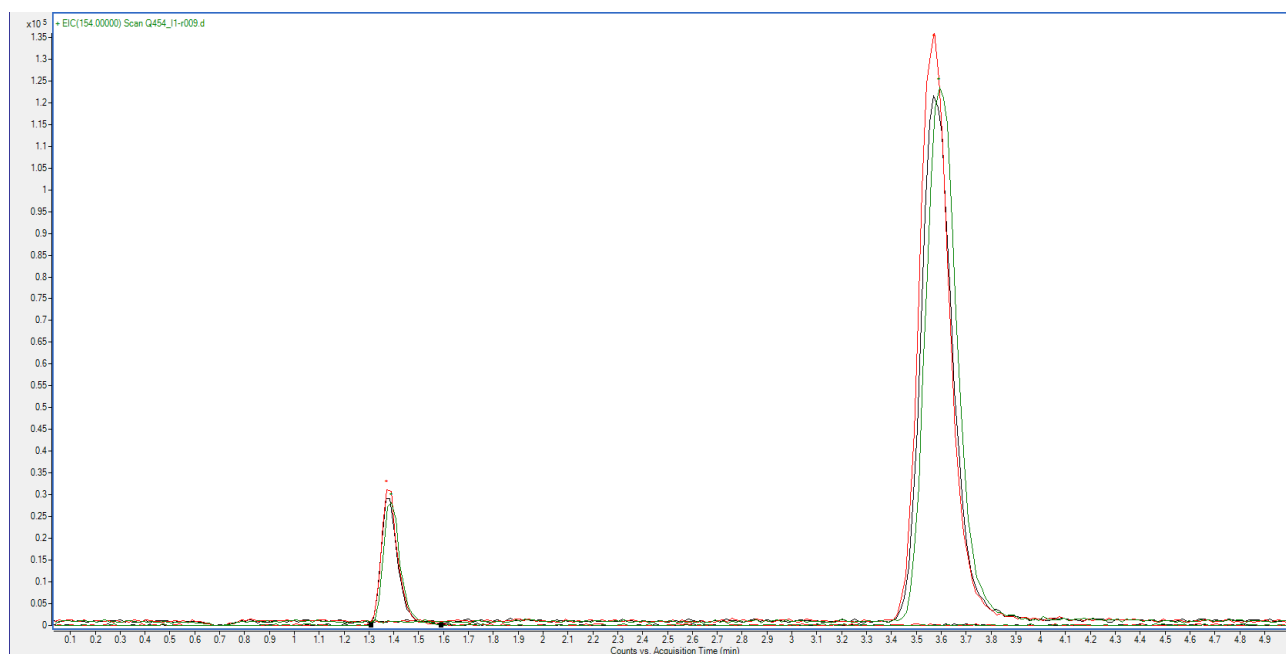


Figura 17. Cromatograma del compuesto USIP-TR-01 ($T_r = 3.6$) y Estándar interno ($T_r = 1.4$) en fase móvil con una proporción 20/80 ACN/HFBA 20mM, 50 ng/mL para ambos compuestos.

Tabla 9. Resultados en fase móvil 15/85 ACN/HFBA 20mM, 50ng/mL para ambos compuestos.

<i>ACN/HFBA 20 mM (15/85)</i>				
<i>Inyección</i>	<i>Área USIP-TR-01</i>	<i>Tiempo de retención</i>	<i>Área EI</i>	<i>Tiempo de retención</i>
1	1275240.83	8.173	159650	2.214
2	1242141.99	8.121	173404.21	2.178
3	1205010.64	8.199	172170.2	2.206

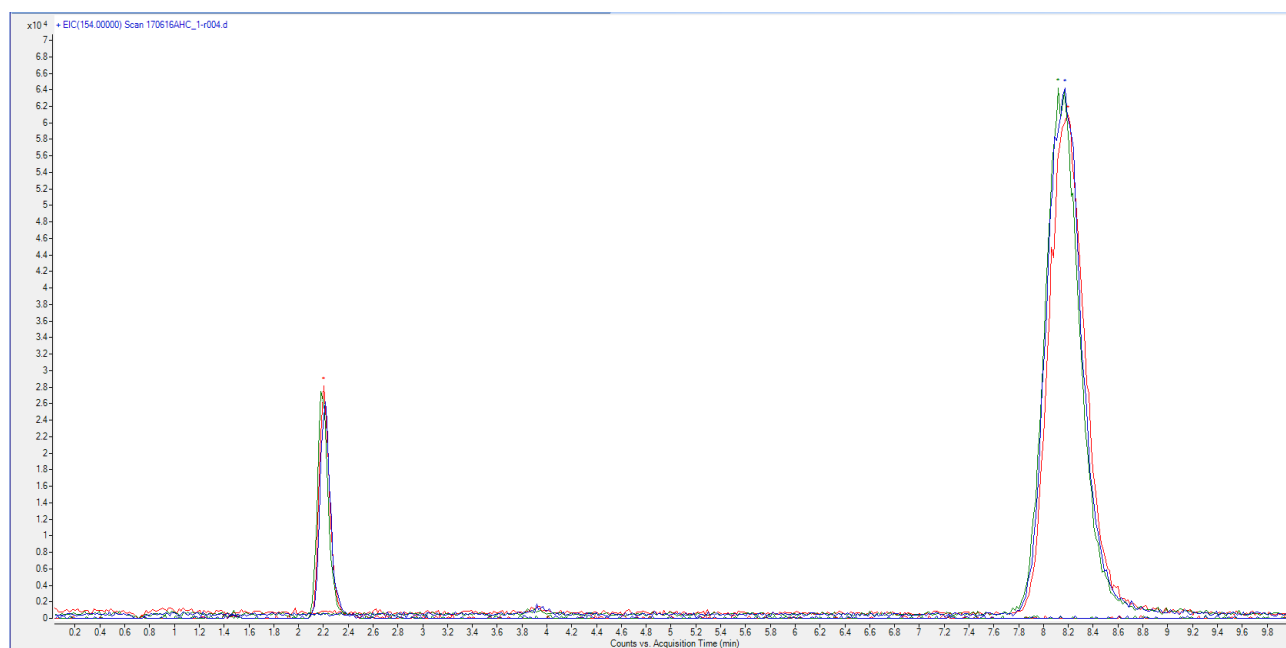


Figura 18. Cromatograma del compuesto USIP-TR-01 ($T_r = 8.2$) y Estándar interno ($T_r = 2.2$) en fase móvil con una proporción 15/85 ACN/HFBA 20mM, 50ng/mL para ambos compuestos.

Tabla 10. Resultados en fase móvil 13/87 ACN/HFBA 20mM, 50ng/mL para ambos compuestos.

<i>ACN/HFBA 20 mM (13/87)</i>				
<i>Inyección</i>	<i>Área USIP-TR-01</i>	<i>Tiempo de retención</i>	<i>Área EI</i>	<i>Tiempo de retención</i>
1	1061384	12.066	153439.39	2.852
2	1067571.33	11.94	151252.86	2.826
3	1010683.82	11.858	141147.04	2.794



Figura 19. Cromatograma del compuesto USIP-TR-01 ($Tr = 12$) y Estándar interno ($Tr = 2.9$) en fase móvil con una proporción 13/87 ACN/HFBA 20mM, 50ng/mL para ambos compuestos.

Tabla 11. Resultados en fase móvil 17/83 ACN/HFBA 20mM, 50ng/mL para ambos compuestos

ACN/HFBA 20 mM (17/83)				
<i>Inyección</i>	Área USIP-TR-01	Tiempo de retención	Área EI	Tiempo de retención
1	1066480.94	5.705	146307.22	1.765
2	1050343.91	5.759	148062.45	1.786
3	1095158.27	5.683	153401.41	1.777

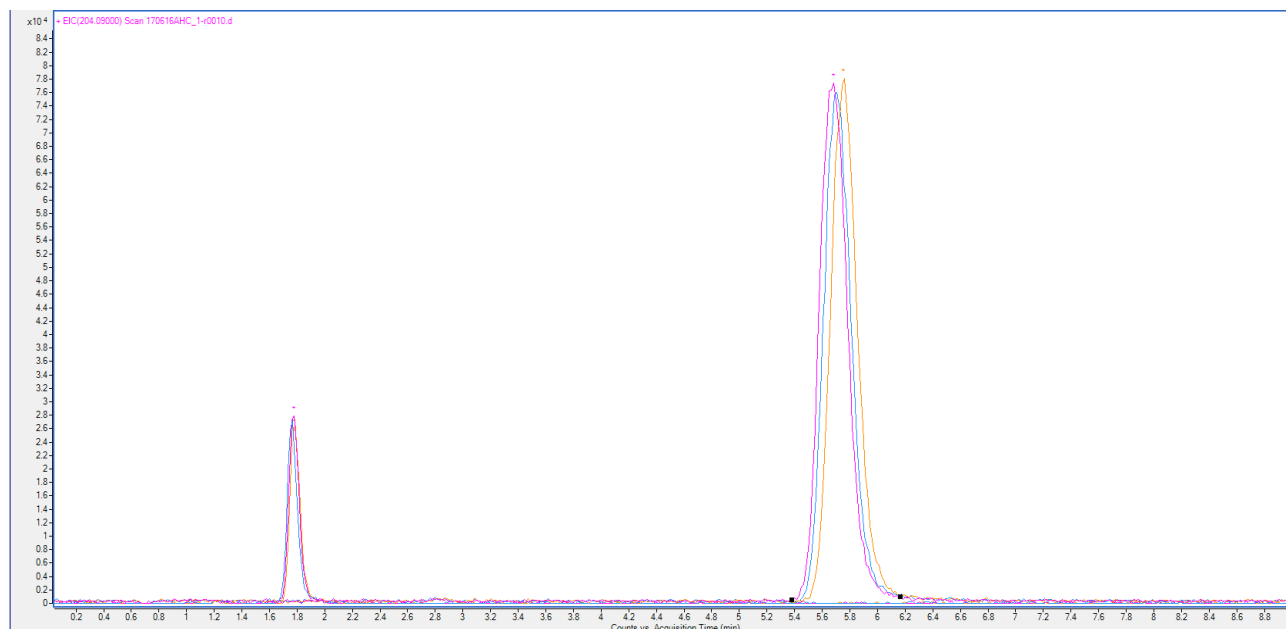


Figura 20. Cromatograma del compuesto USIP-TR-01 ($T_r = 5.7$) y Estándar interno ($T_r = 1.8$) en fase móvil con una proporción 17/83 ACN/HFBA 20mM, 50ng/mL para ambos compuestos.

De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionó la proporción de fase móvil correspondiente a ACN/HFBA 20mM 17/83, ya que esta nos ofrece una mejor area, una buena forma del pico y un tiempo de retención aceptable para el trazador pasivo USIP-TR-01, al igual que el estándar interno (tabla 11 y figura 20).

5.5 Curva de calibración

De acuerdo a estos resultados preliminares el método tiene un comportamiento cuadrático (figura 21) pero este puede ser debido a que el intervalo de concentración es muy extenso.

Al obtener estos resultados provenientes del análisis del trazador en agua desionizada sin ningún pretratamiento (tabla 12), se comenzaron a realizar las pruebas en extracción en fase sólida para muestras en agua desionizada y en agua congénita.

Tabla 12. Resultados de la curva de calibración en agua desionizada.

Concentración Experimental	Tiempo de retención	Respuesta	Concentración Final	Exactitud
3	4.3	320914	3.1	104.1
9	4.3	756709	8.7	96.6
18	4.3	1456383	17.8	98.7
30	4.2	2514874	31.8	106.0
120	4.2	8253843	115.8	96.5
210	4.2	13614885	212.9	101.4
270	4.2	16384155	276.5	102.4
300	4.3	17020340	293.4	97.8

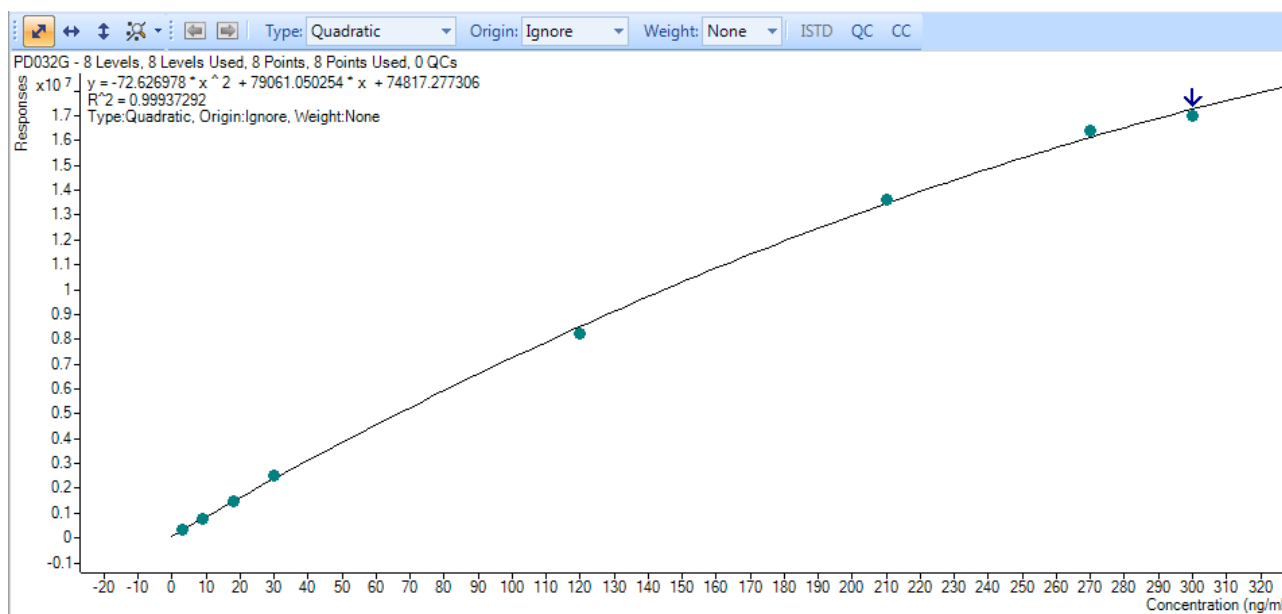


Figura 21. Curva de calibración en agua desionizada del trazador USIP-TR-01.

5.6 Procedimiento de extracción en fase sólida en sistema y matriz del estándar interno junto con el trazador

Tabla 13. Resultados de la extracción en fase solida del trazador USIP-TR-01 en agua desionizada y en agua congénita.

<i>Aumento del volumen de la muestra a 10 mL</i>		
<i>Muestra</i>	<i>Tiempo de retención</i>	<i>Área</i>
<i>Blanco H2O</i>	-	-
<i>Blanco H2O</i>	-	-
<i>1 en H2O</i>	4.2	798982.17
<i>2 en H2O</i>	3.9	748220.07
<i>Blanco agua congénita</i>	-	-
<i>Blanco agua congénita</i>	-	-
<i>1 en Agua congénita</i>	4.1	331304.07
<i>2 en Agua congénita</i>	3.8	323369.19

De acuerdo a estos resultados la respuesta del trazador USIP-TR-01 (tabla 13) disminuyo a la mitad al realizar el procedimiento en agua congénita por lo que es necesario optimizar el proceso de limpieza de la muestra para que los componentes de esta matriz interfieran de manera mínima y mejorar la respuesta del trazador.

5.7 Condiciones de optimización en el cartucho de extracción en matriz

5.7.1 Evaluación del efecto del centrifugado de las muestras

Al evaluar el procedimiento en las muestras anteriores se observó lo poco práctico que era el uso de acródiscos para la filtración de la muestra, debido a la gran cantidad de materia suspendida en el agua por lo que se opta por centrifugar las muestras.

El efecto de la centrifugación de las muestras durante 15 minutos a 3000 revoluciones por minuto, después de agregar los 200 µL de NH₄OH al 5% en agua, facilita en gran medida el procesamiento de las muestras. Estos resultados se muestran en la tabla 14 y figura 22.

Tabla 14. Prueba de la cuantificación del trazador sin uso de acrodiscos de 0.45 µm.

Nivel	Concentración teórica (ng/mL)	Tiempo de retención	Respuesta
Blanco	0	6.2	0
Cero	0	6.2	0
C1	0.1	6.2	11253.63
C2	0.3	6.1	1212.84
C3	1	5.8	1818.58
C4	10	6.2	233811.29
C5	20	6.2	231837.1
C6	30	6.2	508594.33
C7	40	6.1	517610.87
C8	50	6.1	875652.55

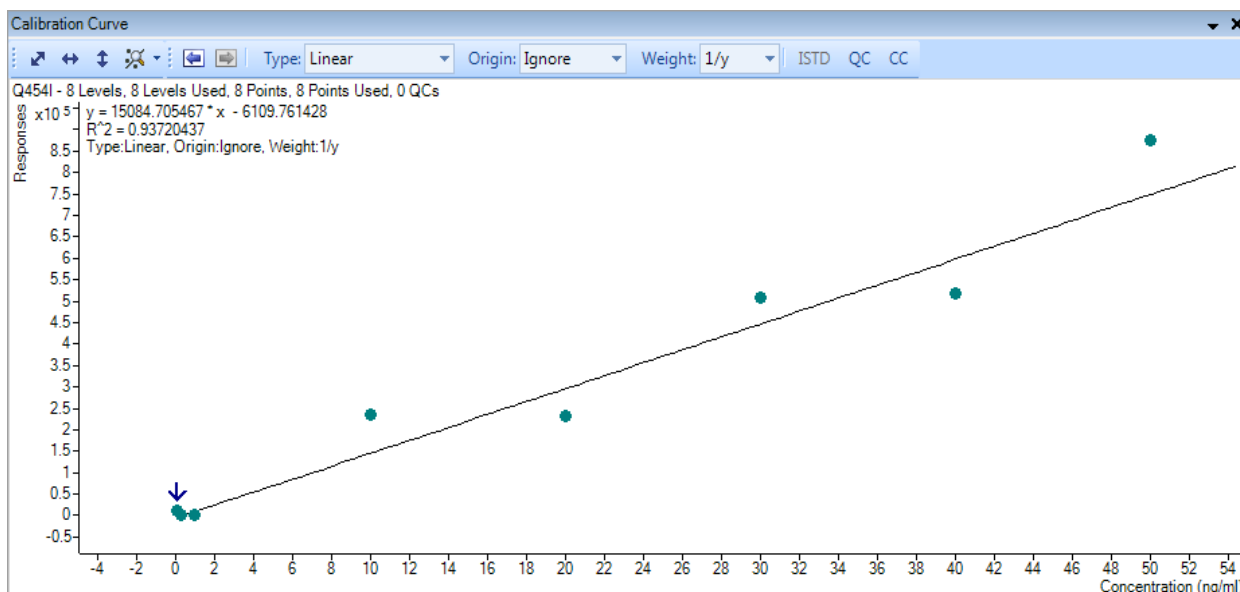


Figura 22. Curva de la respuesta del trazador USIP-TR-01 sin uso de acrodiscos.

5.7.2 Evaluación de la limpieza de la muestra

Tabla 15. Resultados de las respuestas obtenidos tras la aplicación de diferentes pretratamientos.

<i>Pre tratamiento</i>	Concentración teórica (ng/mL)	Tiempo de retención	Respuesta
<i>P.A.</i>	50	6.7	49100.007
<i>P.A.</i>	50	6.7	54915.639
<i>P.B.</i>	50	7.2	433494.86
<i>P.B.</i>	50	6.8	333295.78

Utilizando el pre tratamiento P.A, en donde se utiliza NH_4OH al 5% inmediatamente antes de la centrifugación, los resultados no son adecuados (tabla 15); los cromatogramas indican que el compuesto al parecer se asocia con algún componente del agua congénita en condiciones básicas y por lo tanto, el pico se observa deformado y con un tiempo de retención diferente al obtenido en la adecuabilidad del sistema (figura 23). El hidróxido de amonio es utilizado, en teoría, para cumplir dos funciones: establecer un pH básico del medio que permita tener en estado ionizado los carboxilatos que se encuentran en la fase estacionaria del SPE y por otra parte, precipitar sales de la matriz y así facilitar el proceso de interacción con el cartucho de extracción en fase sólida (limpieza) sin embargo, esto no sucede. Al parecer el hidróxido de amonio precipita parte de la muestra (área), al igual que hace que se asocie con algún o algunos componentes del agua congénita, lo cual explicaría el cambio de tiempo de retención.

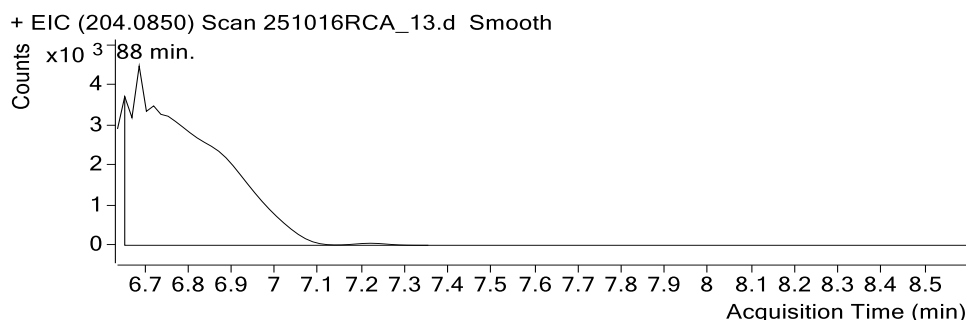


Figura 23. Cromatograma del pre tratamiento P.A.

Por otra parte, en el caso del pre tratamiento P.B, en donde solo se adicionó agua a la muestra antes de la centrifugación, los resultados son mejores (tabla 15 y figura 24), aunque perfectibles. En ambas metodologías se usa el hidróxido de amonio como agente de lavado después de la carga de la muestra, y cuando en el método B se adiciona, se observa inmediatamente una precipitación *in situ*. Esto afecta la calidad de la señal y no es recomendable su uso.

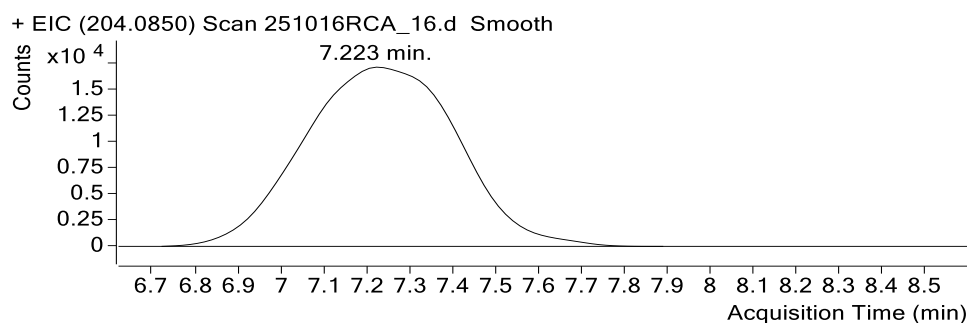


Figura 24. Cromatograma del pre tratamiento P.B.

5.7.3 Evaluación del lavado del cartucho

Al comparar los dos métodos, se pudo observar si el uso de MeOH en el proceso de lavado del cartucho permite una mejor limpieza. Los resultados gráficos de esta experimentación se indican a continuación.

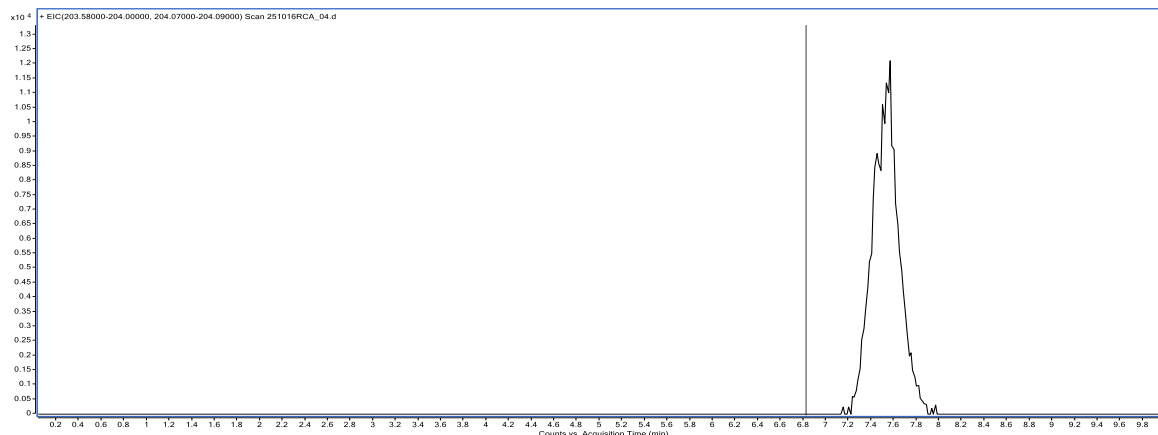


Figura 25. Cromatograma de USIP-TR-01 (Tr = 7.6) 50 ppb en agua congénita. Tratamiento L.A.

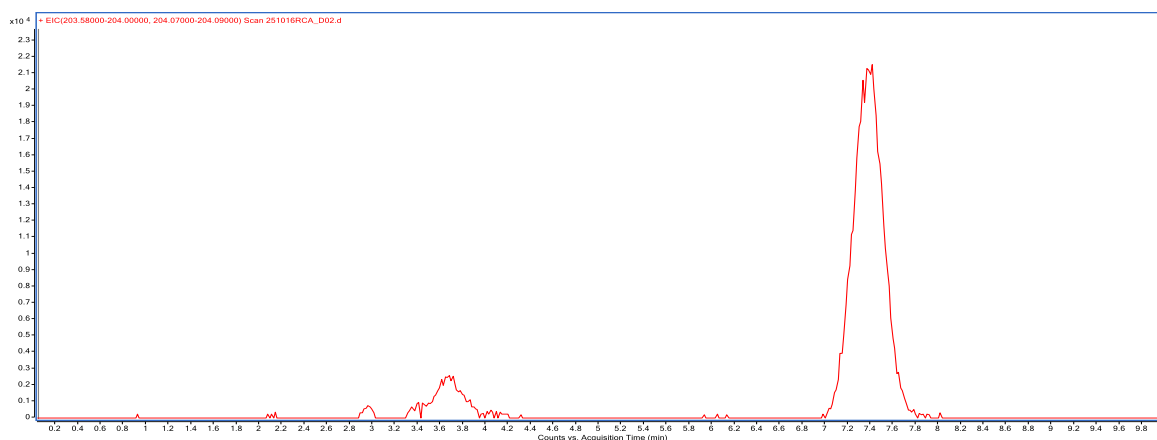


Figura 26. Cromatograma de USIP-TR-01 (Tr = 7.4) 50 ppb en agua congénita. Tratamiento L.B.

De manera cualitativa, se puede observar un mejoramiento en el pico cromatográfico al eliminar el uso de hidróxido de amonio (figura 25); existe mejor simetría de pico y el tiempo de retenciones muy similar a la de la adecuabilidad del sistema, con lo que se observa que el mantener el pH neutro de la muestra es más adecuado para que los carboxilatos se encuentren ionizados debido a que su pka es de 4 logrando así una buena interacción con el trazador. Por otra parte, al verificar la intensidad de la altura del pico, en el método L.B. (figura 26), es mayor, por lo que se puede establecer que la limpieza del cartucho con MeOH después de la carga de la muestra favorece un incremento del área.

El uso del equipo de concentración por corriente de nitrógeno disminuye en gran medida los tiempos de concentración.

5.7.4 Evaluación de la saturación de los cartuchos de SPE

Tabla 16. Respuesta obtenida en la evaluación de la saturación de los cartuchos de 10 mL (S.A.) y 15 mL (S.B.).

<i>Procedimiento</i>	Concentración teórica (ng/mL)	Tiempo de retención	Respuesta
S.A.	50	7.4	141457.32
S.A.	50	7.4	103322.42
S.B.	50	7.5	85900.836
S.B.	50	7.5	36213.732

En cuanto al uso de 15 mL de muestra para analizar, los datos del área obtenidos demuestran una saturación del cartucho de extracción (tabla 16), por lo que no es recomendable el uso de cantidades mayores de 10 mL.

En este experimento, con la finalidad de aumentar el área cromatográfica y así tener un mejor límite de cuantificación de ser necesario, se hizo uso de los cartuchos de extracción WCX de 200 mg y de acuerdo a los resultados del método S.A., se propuso el método S.C. (tabla 17), en el cual la cantidad de muestra (33 mL) y los volúmenes de lavado de los cartuchos son 5 mL de agua y 3 mL de MeOH y la elución con 6 mL de MeOH acidificado con HCOOH 5%.

Tabla 17. Respuesta obtenida de las muestras en el método S.C.

<i>Muestra</i>	Concentración teórica (ng/mL)	Tiempo de retención	Respuesta
1G	0.5	7.4	7620.0771
2G	0.5	7.4	15281.461
3G	50	7.3	1059031.5
4G	50	7.4	1101984.8

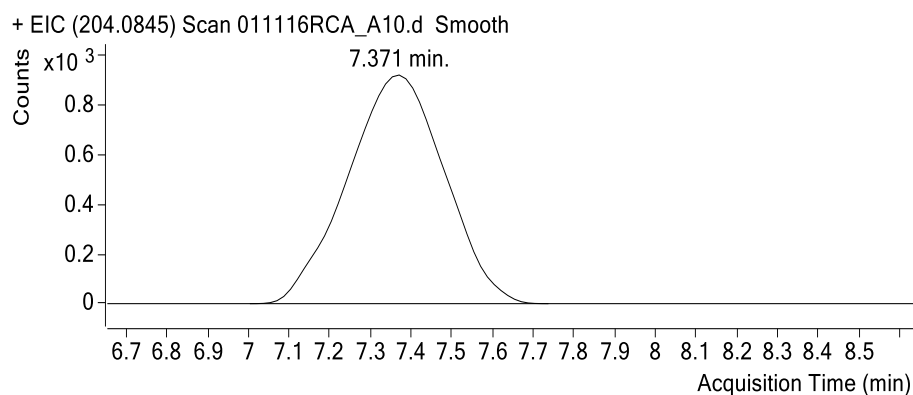


Figura 27. Cromatograma de USIP-TR-01 0.5 ppb en agua congénita como resultado de la aplicación del método S.C.

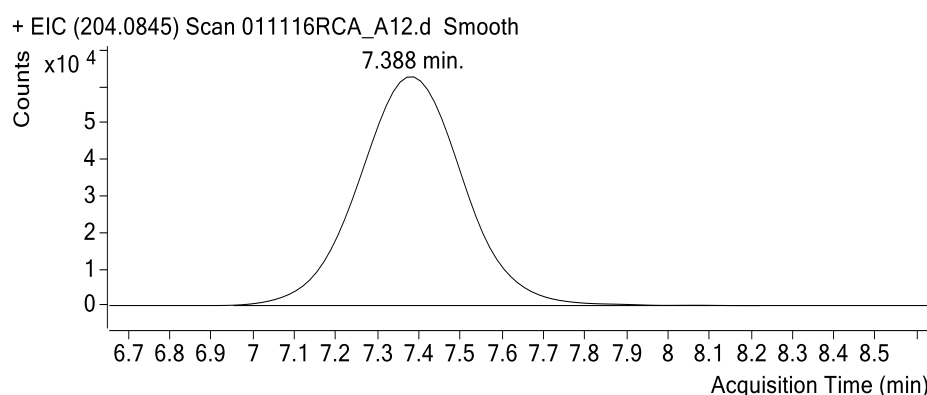


Figura 28. Cromatograma de USIP-TR-01 50 ppb en agua congénita como resultado de la aplicación del método S.C.

Utilizando 33 mL de agua congénita, los cartuchos de extracción de 200 mg WCX y el tipo de disolventes empleados, se obtiene un pico aceptable y una buena intensidad (figuras 27 y 28). Con estos resultados se propusieron las siguientes metodologías para la extracción en fase sólida para cartuchos de 200mg y 60 mg.

Tomando en consideración el siguiente paso de este desarrollo y validación del método se decidió usar el método S.A. ya que siendo menores las cantidades de muestra (10 mL con cartuchos WCX de 60 mg) y reactivos utilizados facilita en gran medida la manipulación, disminuye el tiempo de experimentación con un gran número de muestras como las requeridas para una validación y los costos por reactivos utilizados.

5.7.5 Metodología de extracción en fase sólida optimizada para cartuchos WCX de 200 y 60 mg.

❖ Cartuchos de 200 mg

- Tomar 30 mL de muestra.
- Centrifugar 400 rpm x 15 min.
- Cargar al SPE Nexus WCX 200 mg, cuidando que se deslice por las paredes del cartucho.
- Abrir el vacío y dejar pasar la muestra, cuidando de que no se derrame del contenedor donde es recibida.
- Lavar con 5 mL de H₂O y después con 3 mL de MeOH.
- Dejar 10 minutos de secado con vacío y secar restos de agua y MeOH del popote.
- Elución con 6 mL de MeOH c/ HCOOH 5%.
- Concentración por corriente de nitrógeno a 45 °C por 60 minutos.
- Reconstitución en 100µL FM.
- Inyectar 20 µL al sistema UHPLC-MS.

❖ Cartuchos de 60 mg

- Tomar 10 mL de muestra.
- Centrifugar 400 rpm x 15 min.
- Cargar al SPE Nexus WCX 60 mg, cuidando que se deslice por las paredes del cartucho.
- Abrir el vacío y dejar pasar la muestra, cuidando de que no se derrame del contenedor donde es recibida.
- Lavar con 2 mL de H₂O y después con 1 mL de MeOH.
- Dejar 10 minutos de secado con vacío y secar restos de agua y MeOH del popote.
- Elución con 2 mL de MeOH c/ HCOOH 5%.
- Concentración por corriente de nitrógeno a 45° C por 60 min.

- Reconstitución en 100µL FM.
- Inyectar 20 µL al sistema UHPLC-MS.

5.7.6 Evaluación del uso del desemulsificante Q641-I (TRETOLITE DM046X DEMULSIFIER)

Debido a que varias de las muestras provenientes de los pozos productores se encuentran emulsificadas, para dichas muestras es necesario la adición de un desemulsificante que permita la obtención del agua en donde se encuentra el trazador USIP-TR-01. Para verificar si existía interferencia del desemulsificante seleccionado en la metodología desarrollada, se realizó la inyección del compuesto Q641-I bajo las mismas condiciones de análisis que para el trazador USIP-TR-01 por triplicado y posteriormente se buscaron los iones correspondientes al trazador USIP-TR-01 y el estándar interno, estas inyecciones se realizaron con la disolución 0.025% de Q641-I en agua. En la figura 29 se muestra el "extracted ion" del compuesto USIP-TR-01.

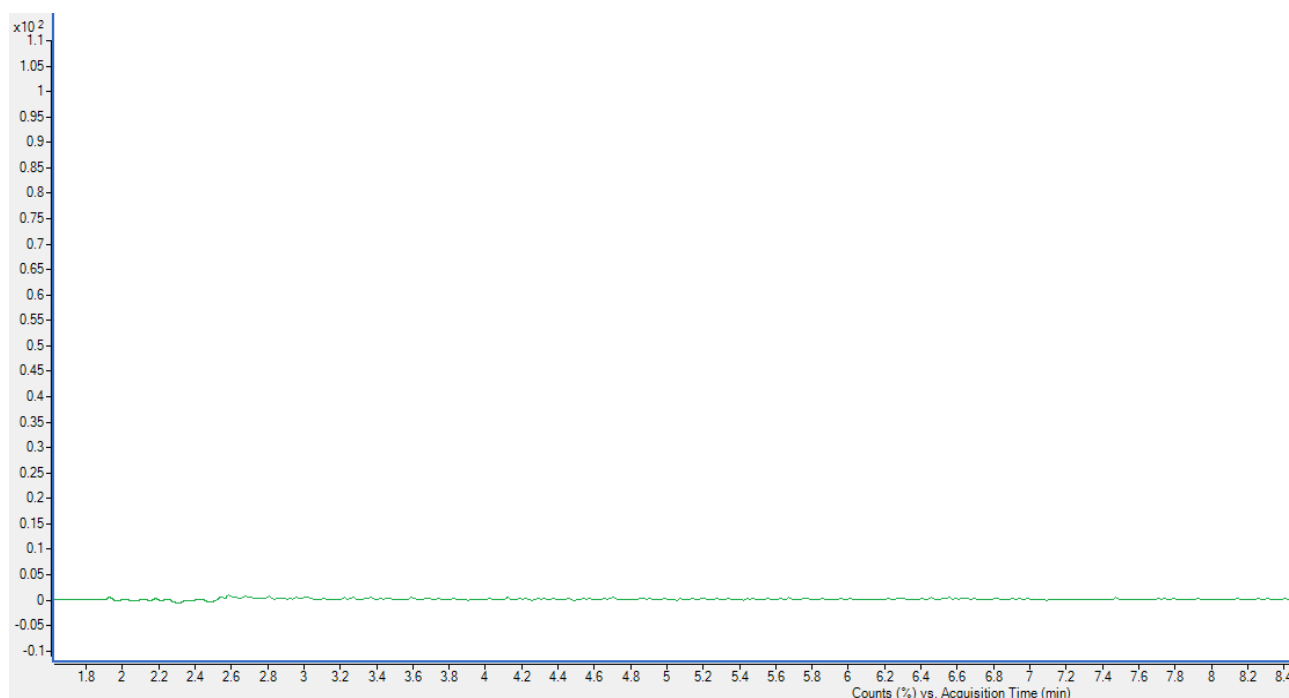


Figura 29. Cromatograma del compuesto Q641-I bajo condiciones de análisis para el trazador (ion buscado 204.09).

Entre las muestras con y sin desemulsificante no se observa alguna interferencia en la señal, El compuesto Q641-I no presenta ninguna interferencia (tabla 18 y figura 30) en la cuantificación del compuesto USIP-TR-01 al ser añadido de manera directa a las muestras en un porcentaje de 0.025%.

Tabla 18. Respuesta del trazador USIP-TR-01 con y sin desemulsificante.

<i>Sin desemulsificante</i>		
<i>Muestras</i>	<i>Respuesta</i>	<i>Tiempo de retención</i>
<i>Blanco</i>	0	-
<i>50 ng/mL</i>	108980	7.2
<i>Con desemulsificante</i>		
<i>Muestras</i>	<i>Respuesta</i>	<i>Tiempo de retención</i>
<i>Blanco</i>	0	-
<i>50 ng/mL</i>	109729	7.5

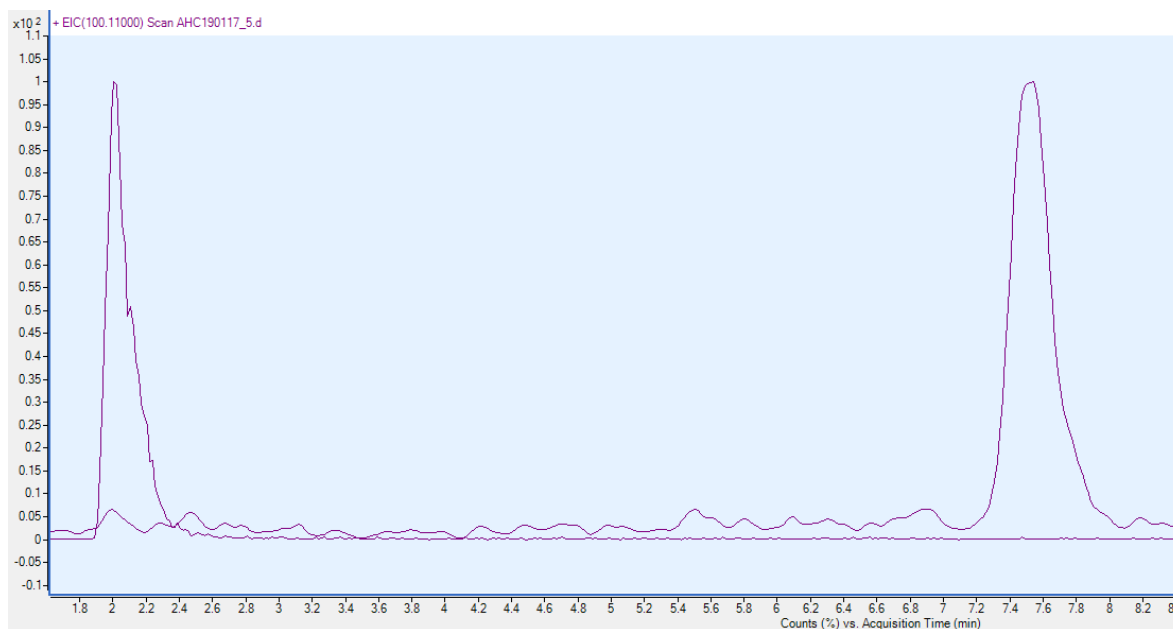


Figura 30. Cromatogramas sobrepuestos de los compuestos Q641-I (Tr = 2) y del compuesto USIP-TR-01 (tr = 7.6 min) en una misma muestra.

5.8 Validación del método

5.8.1 Adecuabilidad del sistema

Para cada día durante la validación del método se evaluó que el sistema se comportara de manera confiable realizando las inyecciones repetidas de una muestra que contenía 1 µg/mL de USIP-TR-01 y 5 µg/mL del estándar interno. La respuesta varía un 0.98 % (tabla 19), por lo que se encuentra dentro del rango de aceptación <2% de acuerdo a "Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. (2013). Food Administration Drugs (FDA)".

Tabla 19. Resultados típicos en la prueba de adecuabilidad del sistema.

<i>Inyección</i>	ISTD Resp. Ratio	Tiempo de retención
1.00	2.06	6.66
2.00	2.08	6.67
3.00	2.11	6.68
4.00	2.09	6.66
5.00	2.09	6.68
6.00	2.12	6.70
7.00	2.12	6.69
<i>Promedio</i>	2.10	6.68
<i>DE</i>	0.02	0.01
<i>%CV</i>	0.98	0.20

5.8.2 Selectividad

De acuerdo a la definición de selectividad de la "Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. (2013). Food Administration Drugs (FDA)", el método desarrollado es capaz de diferenciar y cuantificar el trazador USIP-TR-01 en presencia de los componentes de la matriz utilizada. Como se muestra en las figura 31 y figura

32 no existe interferencia en la cuantificación en ninguna de las 6 muestras de agua congénita analizadas para el límite inferior de cuantificación de 1 ng/mL.

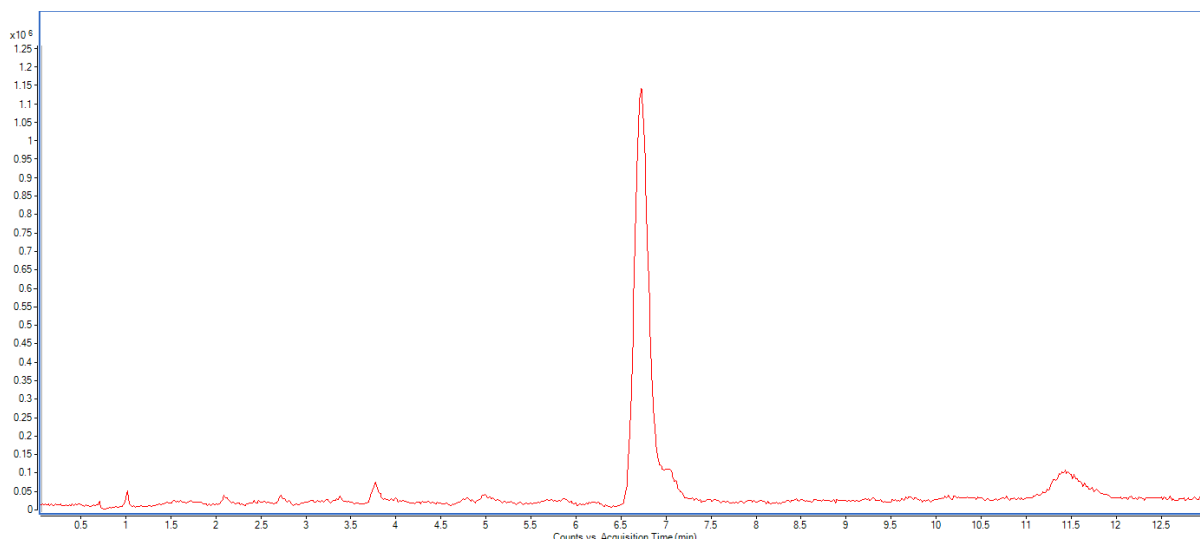


Figura 31. Cromatograma del límite cuantificación del trazador USIP-TR-01 ($T_r = 6.7$) (1 ng/mL).

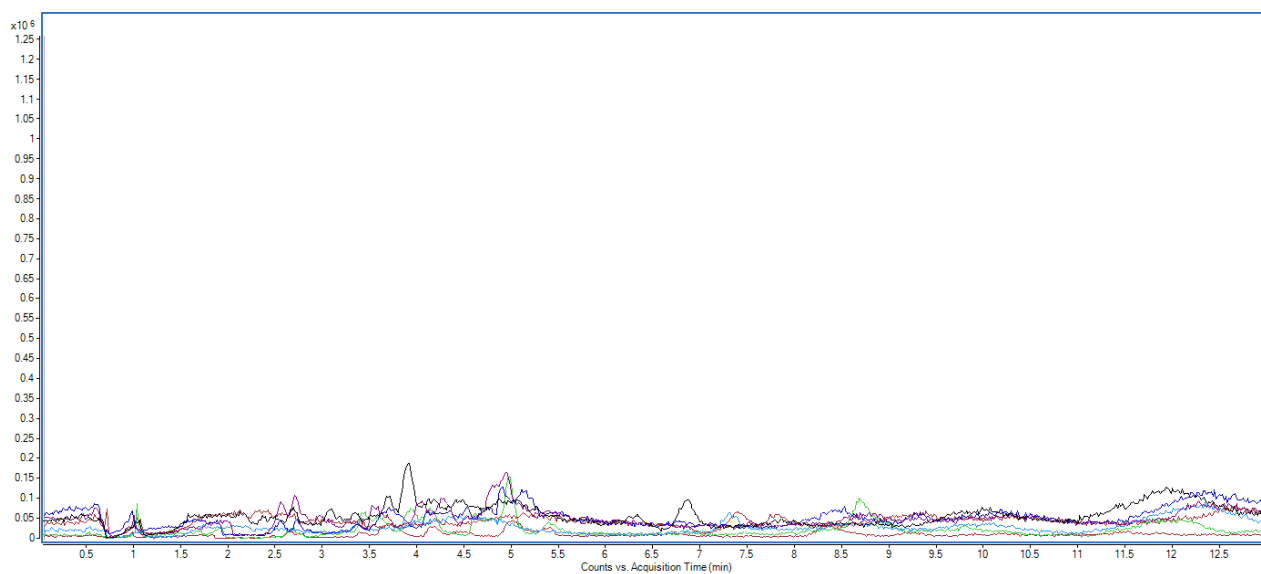


Figura 32. Cromatograma correspondiente a las 6 muestras de agua congénita.

5.8.3 Efecto matriz

En la tabla 20 se muestra que el %CV no es mayor al 15 % para el factor matriz encontrándose dentro de especificación de acuerdo a "Guideline on bioanalytical method validation de la EMA" por lo que no existe una alteración o interferencia en la respuesta del USIP-TR-01.

Tabla 20. Porcentaje del coeficiente de variación para el efecto matriz

Concentración nominal (ng/mL)	ISTD Respuesta Proporción en matriz	ISTD Respuesta Proporción en solución	FM
3	0.21	0.31	0.67
	0.30		0.96
	0.30		0.98
15	0.90	0.89	1.01
	0.91		1.02
	0.92		1.03
25	1.06	1.10	0.97
	1.11		1.01
	1.13		1.03
	Promedio		0.96
	ds		0.11
	%CV		11.90

5.8.4 Efecto de acarreamiento (carry-over)

Durante el análisis se inyectaron 4 muestras para evaluar el efecto de acarreo:

Blanco de agua congénita

Muestra de USIP-TR-01 de 1 ng/mL

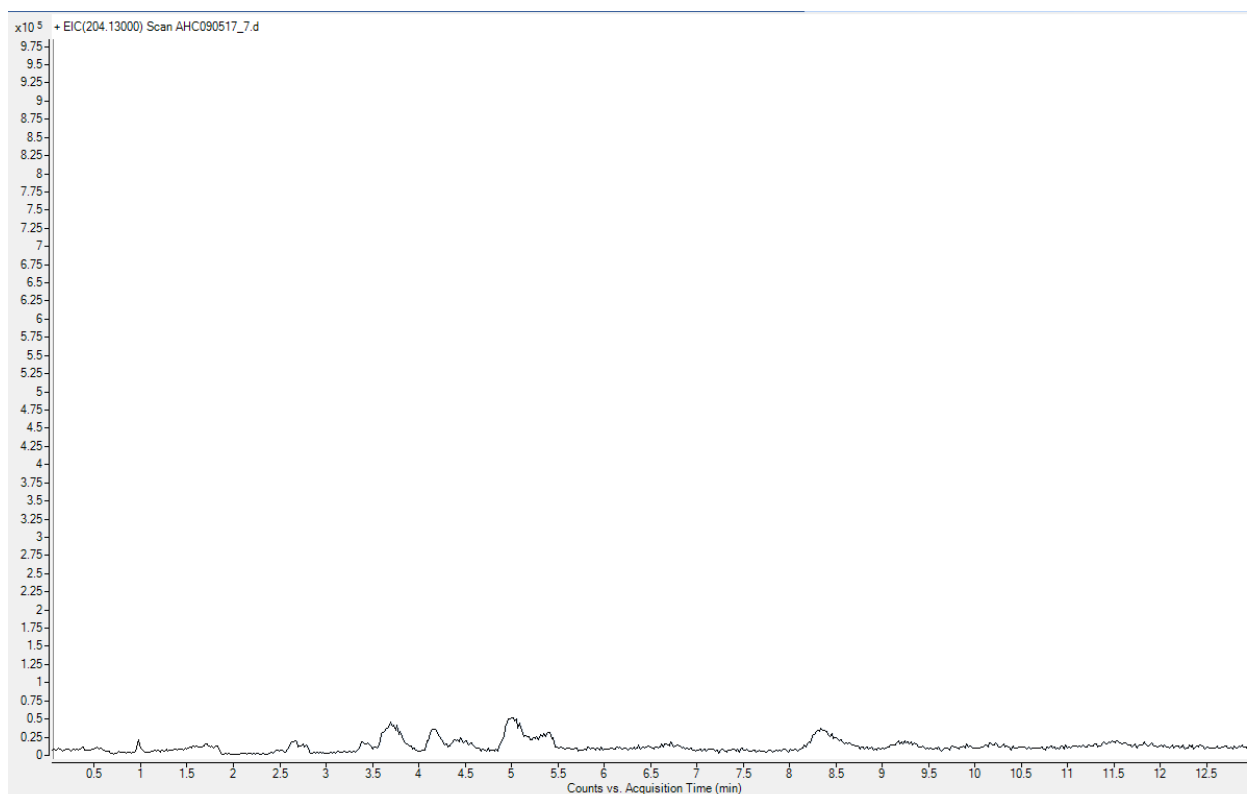
Blanco de agua congénita

Blanco de agua congénita

Al ser un método de cuantificación altamente sensible para el trazador USIP-TR-01 durante el proceso de desarrollo se implementó un proceso de limpieza para el sistema de inyección del cromatografía intercorrida, entre cada

inyección realizada y así eliminar cualquier posible contaminación que pudiera afectar la confiabilidad de los resultados.

Figura 33. Cromatograma correspondiente a blanco de agua



congénita.

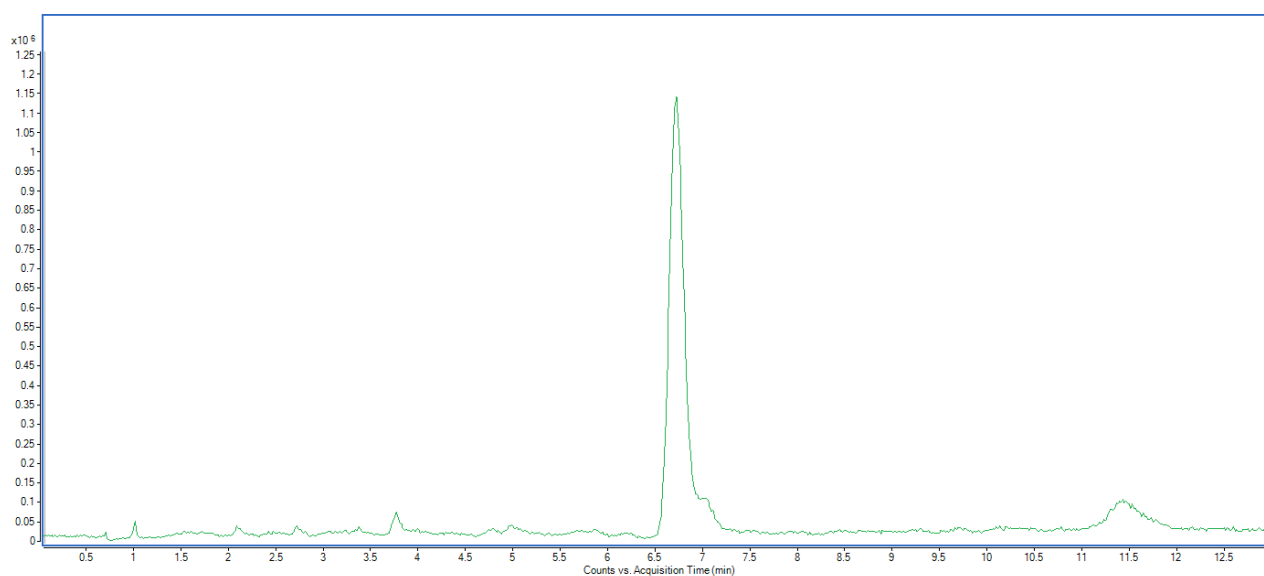


Figura 34. Cromatograma correspondiente a la muestras de 1 ng/mL de trazador en agua congénita.

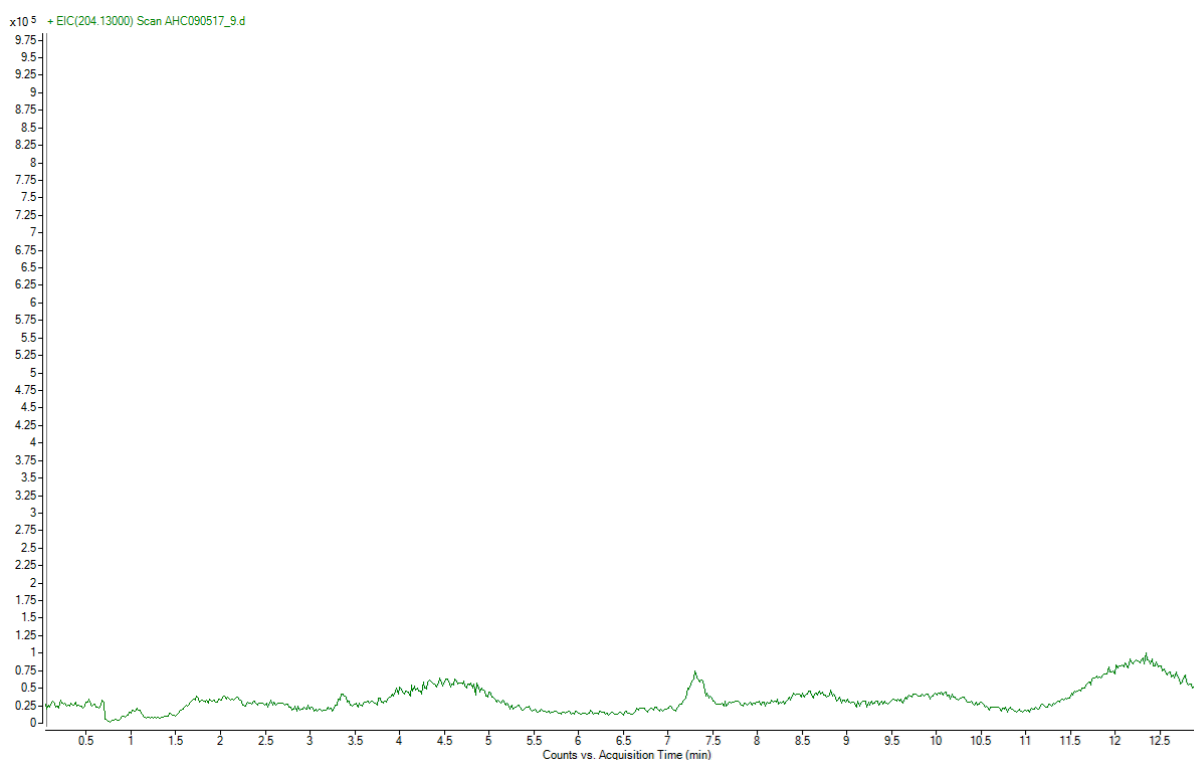


Figura 35. Cromatograma correspondiente a blanco de agua congénita después de la inyección de la muestra de 1ng/mL del trazador.

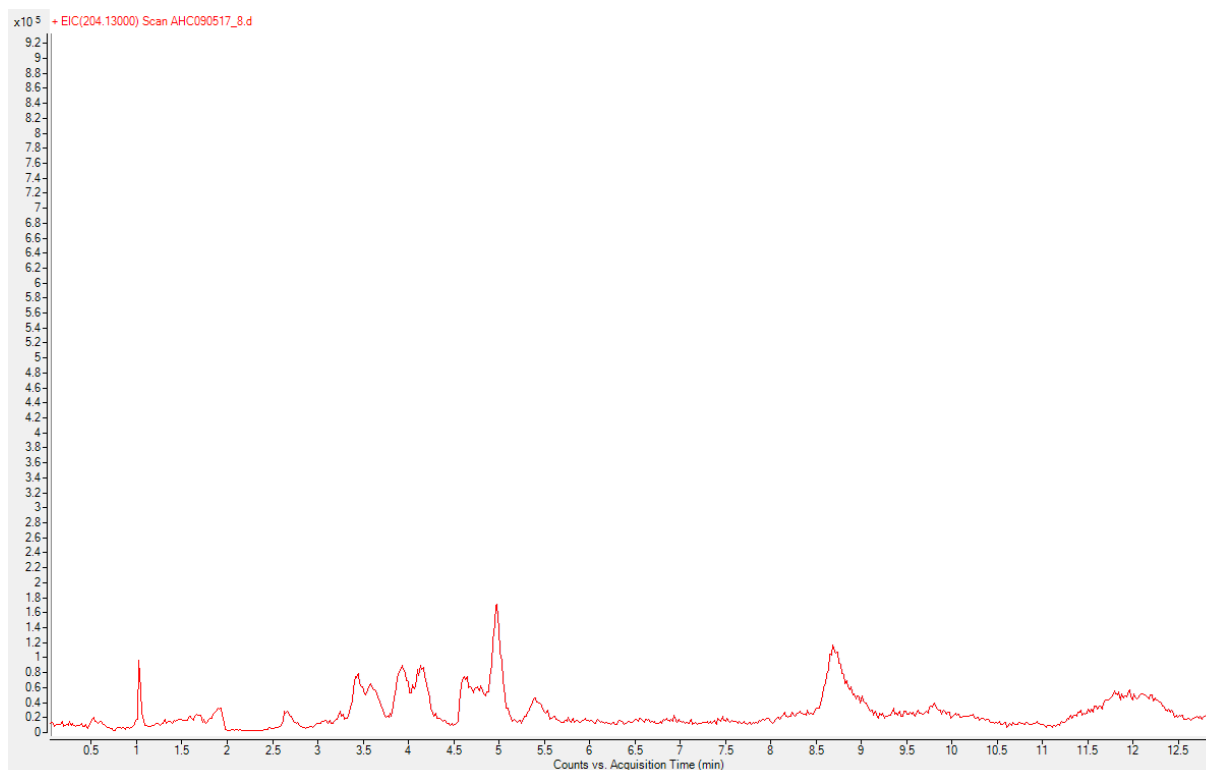


Figura 36. Cromatograma correspondiente a blanco de agua congénita después de la inyección de la muestra de 1ng/mL del trazador.

En cada una de las figuras 33, 34, 35 y 36 se puede observar que no existe ninguna señal del trazador después de la inyección de la muestra, demostrando la eficiencia del método de lavado.

5.8.5 Límite de detección

El límite de detección fue calculado a través de la desviación estándar de la respuesta de los blancos y la pendiente de la curva de calibración; con la fórmula de la figura 37 se obtiene 0.28 ng/mL como el valor del límite de detección.

$$DL = \frac{3.3 \sigma}{S} = \frac{3.3 (367887.7365)}{4349502.357}$$

Figura 37. Ecuación para el cálculo del límite de detección. Donde σ es la desviación estándar de la respuesta y S la pendiente de la curva de calibración.

5.8.6 Linealidad

El estudio de la relación respuesta concentración durante esta validación mostro un comportamiento lineal con una ponderación de $1/y^2$ ya que se obtuvo una $R^2 = 0.9901$. La curva de calibración se muestra en la figura 38.

Para fines de validación se uso un intervalo de concentraciones de 1 ng/mL a 30 ng/mL ya que son las concentraciones esperadas hasta el momento en el proyecto 185183 CONACyT-SENER "Proceso de recuperación Mejorada con la Tecnología de Inyección de Químicos (ASP) con Aplicación Mediante Prueba Piloto en el Campo Poza Rica".

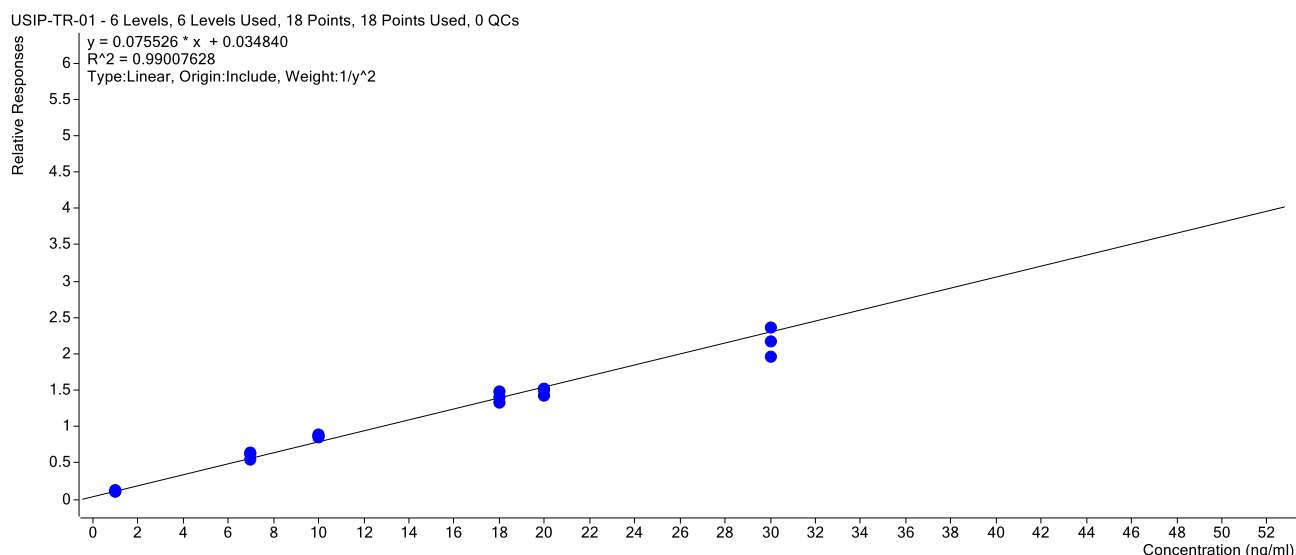


Figura 38. Curva de calibración, evaluación de respuesta lineal con una ponderación de $1/y^2$ establecida con base a la proporción de la respuesta por estándar interno.

Con este modelo se observa en las tablas 21 y 22 que más del 75% de las respuestas se encuentran dentro del rango, cumpliendo con las especificaciones de la FDA en el que no se deben desviar más del 15 % de la concentración nominal y en el caso del límite de cuantificación inferior no sobrepasa el 20 %. De esta forma se establece que la curva de calibración posee una exactitud y precisión adecuada.

Tabla 21. Porcentaje de Coeficiente de variación para las curvas de calibración

Concentración Nominal	Concentración calculada			Promedio	DE	%CV
1.00	1.13	0.92	0.93	0.99	0.12	12.37
7.00	7.78	6.65	8.02	7.48	0.73	9.76
10.00	10.93	11.01	11.38	11.11	0.24	2.17
18.00	19.12	18.20	17.17	18.16	0.98	5.38
20.00	19.70	19.43	18.48	19.21	0.64	3.33
30.00	28.27	25.49	30.92	28.23	2.71	9.61

Tabla 22. Porcentaje de variación absoluta para las curvas de calibración.

Concentración Nominal	Concentración calculada			Desviación Absoluta		
1.00	1.13	0.92	0.93	13.35	8.41	7.35
7.00	7.78	6.65	8.02	11.07	4.96	14.61
10.00	10.93	11.01	11.38	9.34	10.07	13.82
18.00	19.12	18.20	17.17	6.23	1.11	4.62
20.00	19.70	19.43	18.48	1.49	2.84	7.58
30.00	28.27	25.49	30.92	5.76	15.02	3.06

5.8.7 Precisión

5.8.7.1 Repetibilidad

Como se muestra en la tabla 23 cada una de las concentraciones no excede el 15 % del coeficiente de variación y para el caso del límite inferior de cuantificación no se excede el 20% de acuerdo a la FDA.

Tabla 23. Evaluación de la repetibilidad en el límite inferior y las muestras control

No. de Muestra	ISTD Resp. Ratio LIC(1ng/mL)	ISTD Resp. Ratio PBC (3ng/mL)	ISTD Resp. Ratio PMC (15ng/mL)	ISTD Resp. Ratio PAC (25ng/mL)
1	0.14	0.31	1.20	1.93
2	0.14	0.29	1.26	2.19
3	0.13	0.32	1.26	2.00
4	0.13	0.33	1.29	1.99
5	0.13	0.30	1.28	1.92
Promedio	0.13	0.31	1.26	2.01
Desviación estandar	0.01	0.02	0.03	0.11
%CV	5.06	5.47	2.61	5.48

5.8.7.2 Reproducibilidad

Para la reproducibilidad se muestran los resultados durante los tres días (tabla 24), los cuales cumplen con la normatividad (FDA) encontrándose por debajo

del 15% del coeficiente de variación y para el límite inferior de cuantificación encontrándose por debajo del 20 % del coeficiente de variación.

Tabla 24. Reproducibilidad de las muestras durante 3 días de análisis.

<i>Muestra</i>	ISTD Resp. Ratio Día 1	ISTD Resp. Ratio Dia 2	ISTD Resp. Ratio día 3	Promedio	Desviación Estándar	% CV
<i>LIC</i>	0.12	0.10	0.14	0.12	0.02	13.60
	0.10	0.11	0.14			
	0.10	0.15	0.13			
	0.12	0.13	0.13			
	0.10	0.13	0.13			
<i>PBC</i>	0.22	0.30	0.31	0.30	0.03	8.66
	0.16	0.30	0.29			
	0.28	0.29	0.32			
	0.31	0.30	0.33			
	0.30	0.31	0.30			
<i>PMC</i>	1.14	1.13	1.20	1.22	0.06	4.69
	1.28	1.20	1.26			
	1.27	1.19	1.26			
	1.26	1.18	1.29			
	1.22	1.12	1.28			
<i>PAC</i>	1.94	1.52	1.93	1.84	0.19	10.57
	1.91	1.77	2.19			
	2.01	1.68	2.00			
	1.79	1.60	1.99			
	1.78	1.52	1.92			

5.8.8 Exactitud

El valor del promedio de la desviación cumple con la especificación (FDA) encontrándose en un valor menor al 15 % del valor nominal y para el caso del límite inferior de cuantificación también se encuentra dentro de especificación siendo menor a un 20 %. Como se muestra en la tabla 25.

Tabla 25. Datos de desviación absoluta para la evaluación de la exactitud del método.

<i>Concentración nominal</i>	Concentración calculada	Desviación Absoluta	Promedio DEA
1.00	1.07	6.76	% 7.63
1.00	1.08	7.55	
1.00	0.90	10.33	
1.00	0.95	4.70	
1.00	0.91	8.78	
3.00	3.18	5.85	% 6.67
3.00	2.91	2.97	
3.00	3.26	8.59	
3.00	3.46	15.24	
3.00	3.02	0.73	
15.00	14.42	3.88	% 2.14
15.00	15.11	0.75	
15.00	15.06	0.43	
15.00	15.48	3.19	
15.00	15.36	2.42	
25.00	23.51	5.98	% 4.96
25.00	26.83	7.31	
25.00	24.45	2.21	
25.00	24.24	3.04	
25.00	23.43	6.27	

5.8.9 Recobro

En la tabla 26 se pueden observar los resultados del recobro obtenido a 3 concentraciones, obteniendo un promedio de 87.45% con %CV de 9.2% encontrándose dentro de especificaciones (FDA).

Tabla 26. Resultados de evaluación de porcentaje de recobro

<i>H₂O Desionizada</i>		Matriz		% Recobro
<i>Proporción Resp. EI</i>	Promedio	<i>Proporción Resp. EI</i>	Promedio	
0.39	0.38	0.30	0.30	78.95
0.39		0.30		
0.37		0.30		
0.97	0.95	0.81	0.84	88.42
0.98		0.85		
0.89		0.86		
1.81	1.79	1.69	1.70	94.97
1.79		1.71		
1.77		1.69		

5.8.10 Estabilidad

Estabilidad de la muestra procesada durante la estancia en el automuestreador hasta 48 horas y estabilidad en conservación a medio ambiente durante 1 mes se muestra en la tabla 27 la cual se encuentra entre el 15 % del valor nominal (FDA).

En el caso de los resultados para la segunda muestra de 1 ng para 1 mes de estabilidad se obtuvo un resultado aberrante y no se tomo cuenta para el cálculo del promedio y de la desviación estándar.

Tabla 27. Resultados de la estabilidad del trazador USIP-TR-01 en agua congénita.

No. de observacion	12 horas		24 horas		48 horas		1 mes	
	1 ng	30 ng	1 ng	30 ng	1 ng	30 ng	1 ng	30 ng
1	111.65	104.70	104.48	100.62	104.66	108.41	111.55	107.68
2	102.39	98.77	103.38	105.64	110.40	105.93	850.82	103.05
3	102.69	100.69	108.90	100.19	110.87	106.81	114.65	111.01
Promedio	105.58	101.39	105.59	102.15	108.64	107.05	113.10	107.25
Desviacion estandar	5.26	3.03	2.92	3.03	3.46	1.26	2.19	4.00

TABLA 28. Resultados de validación del método de cuantificación

Parámetro	Resultado	Especificación
<i>Selectividad</i>	No existe interferencia, el método es capaz de diferenciar el trazador de la matriz	6 blancos puestos a prueba para detectar interferencias contra el límite inferior de cuantificación para asegurar la selectividad.
<i>Efecto matriz</i>	% CV = 6.07	El % CV debe ser ≤ 15 %.
<i>Límite de detección</i>	0.28 ng/mL	NA
<i>Linealidad</i>	% DEA < 15 % en todos los puntos % CV < 15 % en todos los puntos Ponderación $1/y^2$ $r^2 = 0.9901$	%DEA < 15 % en todos los puntos. %CV < 15 % en todos los puntos. % DEA y % CV LIC < 20 %
<i>Repetibilidad</i>	LIC %CV = 5.06 MCB % CV = 5.47 MCM % CV = 2.61 MCA % CV = 5.48	%CV < al 15 % para puntos control. %CV < 20 % para LIC.
<i>Reproducibilidad</i>	LIC %CV = 13.60 MCB % CV = 8.66 MCM % CV = 4.69 MCA % CV = 10.57	%CV < al 15 % para puntos control. %CV < 20 % para LIC.
<i>Exactitud</i>	LIC % DEA = 7.63 MCB % DEA = 6.67 MCM % DEA = 2.14 MCA % DEA = 4.96	DEA < al 15 % para puntos control. DEA < 20 % para LIC.
<i>Recobro</i>	MCB = 78.95 % MCM = 88.42 % MCA = 94.97	El recobro puede no ser 100 %, pero debe ser consistente, preciso y reproducible
<i>Estabilidad</i>	Conservación Muestreador : 12, 24 y 48 horas entre el 15 % del valor nominal. Conservación medio ambiente: 1 mes entre el 15 % del valor nominal	La muestra es estable si los resultados se encuentran del del 15 % de las concentraciones nominales.

6 Conclusiones

- ✓ Se desarrolló y optimizó un método analítico sensible para la cuantificación del trazador USIP-TR-01 en agua del pozo productor utilizando la técnica instrumental Cromatografía de Líquidos de Ultra Alto Desempeño acoplada a un Espectrómetro de Masas de Alta Resolución (QTOF) y extracción en fase sólida. En un intervalo de trabajo de 1 a 30 ng/mL.
- ✓ Se establecieron las condiciones instrumentales, físicas y químicas óptimas para la limpieza y separación del trazador USIP-TR-01 para muestras con un volumen de 10 y 30 mL.
- ✓ La metodología se validó tomando en consideración las recomendaciones de las guías internacionales que lidian con matrices complejas, obteniendo resultados aceptables (tabla 28), al trabajar una matriz como es el agua congénita, demostrando que el método es selectivo, preciso y exacto en un intervalo de 1 a 30 ng/mL.

7 Referencias

- Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH), (2012) El futuro de la producción de aceite en México EOR e IOR. [Versión electrónica] https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/149844/IOR_EOR_published.pdf. Revisado el día 17 de Agosto del 2017 a las 15:47 h.
- Norma Oficial Mexicana NOM-143-SEMARNAT-2003, que establece las especificaciones ambientales para el manejo del agua congénita asociada a hidrocarburos.
- C. Harris Daniel (2007) Análisi Químico Cuantitativo. Editorial Reverte. Tercera Edición (Sexta Edición Origina). Mexico Pagina 91.
- Serres-Piole, C. Preud'homme, H. Moradi-Tehrani, N. Allanic, C. Jullia, H. Lobinski, R. (2012), Water tracers in oilfield applications : Guidelines. Journal of Petroleum Science and Engineering 98-99 (2012) 22–39.
- Serres-Piole, C. Moradi-Tehrani, N. Lobinski, R. Preud'homme, H. (2011), Direct sensitive simultaneous determination of fluorinated benzoic acids in oil reservoir waters by ultra high-performance liquid chromatography–tándem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 5872– 5877.
- Galdiga, C.U., Greibrokk, T. (1997) Ultra-trace determination of fluorinated aromatic carboxylic acids in aqueous reservoir fluids using solid-phase extraction in combination with gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 793 (1998) 297–306.
- Esquivel, E.E. Leal, L.I. (2004) Métodos fisicoquímicos en Biotecnología. [Versión electrónica] http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_fase_reversa.pdf. Revisado el día 15 de agosto del 2017 a las 20:15 h
-

-Peters, F.T. a,*,. Drummer, O.F. Musshoff, H .Frank (2006) Validation of new methods. FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL 165 (2007) 216–224.

-Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. (2013). Food Administration Drugs (FDA).

-Guideline on bioanalytical method validation. (2011). European Medicines Agency (EMA).

-Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology (1996). Food Administration Drugs (FDA).

-Norma oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, que establece las prueba y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable y un medicamento biotecnológico es biocomparable. Requiritos a que deben sujetarse los terceros autorizados, Centros de investigación o Instituciones hospitalarias que realicen las pruebas. (2013) Secretaria de Salud, México.

-Sánchez, J.F. Mora, J.L. y Hernández, V.J. Validación de Métodos Analíticos. (2016) Universidad Nacional Autónoma de México, México.

-Chan, C.C. Lam, H. Lee, Y.C. y Zhang, X. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verificación (2004). Publicado por Jhon Wiley and sons, Inc.

-Kiser, M y Dolan, J. Selecting the Best Curve Fit (2004) LCGC NORTH AMERICA VOLUME 22 NUMBER 2 112 - 117

-Chiap, P. Crommen, J. Boulanger, B. Chapuzet, E. Mercier, N. Bervoas-Martin S. et al. (1998) The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. Analytica Chimica Acta 391 (1999) 135-148

-Juhler, R. y Mortensen, A. (2002) Analysing fluorobenzoate tracers in groundwater samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry

A tool for leaching studies and hydrology *Journal of Chromatography A*, 957 (2002) 11–16

-Taylor, P. (2005) Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 38 (2005) 328– 334

-Sabag, J. (2008) PRUEBAS DE TRAZADORES EN LA RECUPERACIÓN DE HIDROCARBUROS. Academia de ingeniería en México.

-Müller, K. y Seubert A. (2012) Separation and determination of fluorobenzoic acids using ion chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1270 (2012) 96– 103

-Gavrilenko, Mikhail A. and Gavrilenko, Nataliya A. (2015) Solid-phase extraction of fluorinated benzoic acids for the chromatographic analysis of oil tracer agents. *Mendeleev Commun.*, 2015, 25, 159–160

-Müller, K. and Seubert, A. (2012) Ultra trace determination of fluorobenzoic acids in tap and reservoir water using solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1260 (2012) 9 – 15.

-Abián, J. Carrascal, M. y Gay, M. (2008). Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. *Proteómica*, Número 2.

-Chernushevich, Igor V. Loboda, Alexander V. and Thomson, Bruce A. (2001) An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY*. 2001; 36: 849–865.

-Tor Austad. (2012) Water Based EOR in Carbonates and Sandstones: New Chemical Understanding of the EOR-Potential Using “Smart Water”. Editor: James Sheng, Elsevier, 2012.

-SOLER, E.T. (2006) Validation of Qualitative Analytical Methods Thesis to obtain the degree of Doctor. Universitat Rovira i Virgili Tarragona.
